



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Camille ROUILLON**

Rôle du facteur d'échange nucléotidique Arhgef1 dans l'hémostase

Soutenue le 18 septembre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Christilla BACHELOT-LOZA	Chargée de Recherche, UMR_S 1140, Paris
	Mr Bernard PAYRASTRE	PU-PH, UMR_S 1048, Toulouse
Examineurs :	Mme Cécile DENIS	Directrice de Recherche, UMR_S 1176, Paris
	Mr Patrick MENU	Professeur d'université, UMR 7365, Nancy
	Mme Véronique REGNAULT	Directrice de Recherche, UMR_S 1116, Nancy, directrice de thèse
	Mme Nathalie MERCIER	MCU, UMR_S 1116, Nancy, co-directrice de thèse
Invités :	Mme Gervaise LOIRAND	Directrice de Recherche, UMR_S 1087, Nantes
	Mr Patrick LACOLLEY	Directeur de Recherche, UMR_S 1116, Nancy

UMR_S 1116, « Défaillance cardiovasculaire aigüe et chronique »,

Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr Patrick Lacolley**, Directeur de l'unité UMR_S 1116, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je lui témoigne mon plus profond respect pour son dynamisme, pour tous ses conseils scientifiques et professionnels toujours éclairés afin d'avancer au mieux dans mon travail et également de présenter au mieux mes résultats.

Je remercie le **Dr Véronique Regnault**, ma directrice de thèse, pour m'avoir fait confiance depuis mon M1 et m'avoir encadré durant tout ce travail de thèse. Je la remercie pour son implication, ses conseils, sa réflexion scientifique, ses critiques constructives qui m'ont permis de m'améliorer.

Je remercie également le **Dr Nathalie Auchet-Mercier**, ma co-directrice de thèse, pour son soutien scientifique et moral qui ont été tout autant importants pendant ces trois années. Son aide, son écoute, sa grande disponibilité et sa dose de bonne humeur m'ont été d'un très grand soutien durant ces années passées dans l'unité. Merci d'avoir été là pour répondre à mes questions. Je la remercie également pour son aide durant la rédaction. J'ai été très fière d'être son étudiante.

J'adresse tous mes remerciements au **Dr Gervaise Loirand**, responsable de l'équipe III - Signalisation en physiopathologie vasculaire et pulmonaire - à l'Institut du Thorax de Nantes. Cette thèse est le fruit d'une collaboration de plus de trois années avec elle.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse :

Le Dr **Christilla Bachelot-Loza** pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans mon jury de thèse et d'évaluer mon travail et pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma plus profonde gratitude.

Le Pr **Bernard Payrastre** pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Le Dr **Cécile Denis** pour l'honneur d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Le Pr **Patrick Menu** de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examinateur. Merci pour votre bienveillance et vos conseils.

Merci à **Vincent Sauzeau** et à **Cédric Boura**, les membres de mon comité de suivi de thèse, pour leur disponibilité et leurs précieux conseils prodigués tout au long de ce travail.

Merci au **Dr Hugnette Louis** pour son travail, ses réflexions scientifiques, ses gueulantes qui donnent un sacré coup de boost mais également sa bonne humeur, ses pauses « clopes » qui m'ont permis de respirer et ses cookies sans arachides qui m'ont redonné le sourire.

Merci à **Cécile Lakomy** pour ses conseils techniques, sa bonne humeur et son humour qui sont très importants pour avancer dans de bonnes conditions.

Je tiens à remercier **Céline Fremy** pour sa bonne humeur, pour son sourire qui met énormément de baume au cœur et pour nos moments chocolat chaud en périodes de crises.

Je remercie **Véronique Laplace** pour s'être occupée de mes souris avec sérieux et dévouement ainsi que son calme quelles que soient les circonstances. Je remercie également **Remy Umoret** pour sa disponibilité et ses idées d'adaptation de l'environnement afin que les expériences puissent se passer dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie **Audrey Isch** pour ses conseils administratifs, sa bonne humeur, sa clairvoyance, sa générosité et nos covoiturages.

Merci au **Dr Zhor Ramdane-Cherif** pour ses conseils scientifiques, sa bonne humeur et son rire explosif et communicatif.

Je remercie le **Pr. Simon Thornton** pour toutes ses corrections d'abstracts et de présentations en anglais. Merci aussi pour tous ces échanges non scientifiques qu'ils soient cinématographiques, sportifs, ... A la vôtre : bien évidemment toujours à l'eau.

Je tiens à remercier tous les doctorants que j'ai pu côtoyer pendant ma thèse : le **Dr Narimane Al Kattany** pour son sourire contagieux, le **Dr Chaojie Wei** pour son partage des traditions chinoises (sucreries et souvenirs rapportés de son pays), le **Dr Ekaterina Belozertseva** pour avoir partagé mon bureau et ses conversations. Je remercie le **Dr Lambert Delphine** pour sa bonne humeur, ses talents et conseils culinaires et ses petites attentions (un ours de Bern qui vient compléter ma collection). Je remercie le **Dr Amel Mohamadi** pour tout : sa gentillesse, son écoute, son rire, son humour, ses gaffes, ses conseils scientifiques et personnels. Un grand merci pour m'avoir supporté comme padawan. Merci au **Dr Mélusine Didelot** pour avoir partagé mon bureau, mes doutes, mes crises d'angoisse mais également des moments de fou rire, excellentes bières, les karaokés Disney et bien sûr pour tous ses conseils scientifiques précieux.

Je remercie les doctorants qui sont en cours de route. Merci à **Alexandre Raoul** pour avoir été un sympathique et dynamique collègue de bureau particulièrement discret, pour avoir pris soin des plantes et avoir rendu Malo fumeur et à **Manon Durand** pour sa bonne humeur constante et son partage de nos valeurs vosgiennes. Je leurs souhaite bon courage pour la suite. Je souhaite un bon courage à **Ilona Saraieva** et **Matthieu Bardin** pour terminer leur thèse.

Je remercie les postdoctorants présents ou partis. Merci au **Dr Takouhie Mgrditchian** pour ses critiques scientifiques et vestimentaires, son dynamisme permanent et sa spontanéité, au **Dr John Pirault** pour toutes ses remarques scientifiques, ses conseils techniques mais aussi pour sa grande culture générale, sa maturité et sa franchise. Je remercie le **Dr Simon Toupance** pour ses conversations scientifiques et aussi sportives. Je remercie le **Dr Morel Worou** pour ses conseils professionnels et personnels et pour sa grande sagesse. Je remercie le **Dr Goerge Lindesay** pour sa joie de vivre contagieuse et son accent si chaleureux. Merci au **Dr Oualid Ayad** pour tous ses bons gâteaux.

Je remercie toutes les personnes qui ont fait une halte par le laboratoire avant de poursuivre leur chemin : **Marc-Damien Lorenzo** pour sa bonne humeur et son rire communicatif mais aussi pour toutes ces journées d'échotracking. Merci aussi à **Mélanie Folliot**, **Margaux Schmitt** et **Allyson Hollander** pour leurs énergies débordantes et toutes les ondes positives qu'elles ont pu apporter. Merci au Dr **Pierre Thoré** pour sa franchise, sa curiosité scientifique et sa culture générale dont il nous a fait profiter.

Je tiens également à remercier le **Dr Emilie Velot** pour la chance qu'elle m'a donné d'enseigner, le **Dr Reine El-Omar** pour sa gentillesse, son sourire et nos bons moments de stress partagés avant, pendant et après les cours.

Je remercie également les personnes qui m'ont appris certaines techniques expérimentales dans leur laboratoire : **Dr Anne-Clémence Vion**, **Dr Christilla Bachelot-Loza**, **Patrick Liminana**

Enfin je remercie mon futur époux pour son soutien quotidien indéfectible et sa tolérance pendant ces années difficiles et les périodes de remise en question. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, le premier servant de socle solide à l'épanouissement du second.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans une pensée pour mes plus grands fans : ma grand-mère et mes parents. Ils sont les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Ils ont toujours cru en moi, m'ont toujours poussé et su être à l'écoute à n'importe quelle heure du jour et de la nuit et sont restés patients durant cette période de thèse.

A ma famille,

Je leurs dédie cette thèse qu'elle soit le symbole de toute mon affection.

La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre.

Albert Einstein

J'ai compris que le bonheur, ce n'est pas de vivre une petite vie sans embrouilles, sans faire d'erreurs ni bouger. Le bonheur c'est d'accepter la lutte, l'effort, le doute et d'avancer, d'avancer en franchissant chaque obstacle.

Katherine Panco

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	5
Liste des tableaux	9
Abréviations	10
Synthèse bibliographique.....	12
I. Génération de thrombine plasmatique et tissulaire	13
A. La thrombine	13
B. Génération de thrombine dans le compartiment plasmatique	15
C. Génération de thrombine dans le compartiment pariétal	20
D. La fibrinolyse	22
II. Les cellules : support de la génération de thrombine	24
A. Les plaquettes.....	24
a. Structure plaquettaire	26
• La zone périphérique.....	26
• Le cytoplasme.....	27
• Les organelles	27
b. Adhérence à la paroi vasculaire lésée.....	28
c. Activation par les agonistes solubles et leurs récepteurs	28
• Activation par la thrombine	29
• Activation des plaquettes par l'ADP	30
• La voie du thromboxane A ₂	30
• Activation par le collagène	31
d. Activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	31
e. Agrégation plaquettaire	32
f. Les vésicules extracellulaires	33
g. Les granules plaquettaires	34
• Les granules α	34
• Les granules δ	34
• Les lysosomes	34
h. La microvésiculation	35
B. Les cellules musculaires lisses de la média	36
a. Localisation et caractérisation des CMLVs.....	36
b. Phénotype contractile versus sécrétoire	37
c. Génération de thrombine à la surface des CMLVs	38
III. Signalisation via les protéines G dans les plaquettes et les CMLVs.....	39
A. Signalisation plaquettaire.....	39
a. Les protéines G et leurs agonistes	39
b. Les RhoGTPases dans les fonctions plaquettaires	44
• RhoA	47
• Cdc42	48

• Rac	49
• D'autres RhoGTPases	50
c. Régulation intracellulaire des RhoGTPases plaquettaires par GEFs, GAPs et GDIs	50
B. Signalisation dans les cellules musculaires lisses	56
IV. Rho et maladies vasculaires.....	61
A. Pathogenèse de l'athérosclérose	61
B. Inhibition des Rhos et athérosclérose	62
C. Les fonctions endothéliales et la voie de signalisation RhoA	63
a. La barrière endothéliale.....	63
b. Migration endothéliale	64
c. Migration des leucocytes à travers l'endothélium	65
D. Fonctions des macrophages	66
E. Thromboses.....	66
F. Cellules musculaires et la voie de signalisation RhoA.....	67
a. Hypertension.....	67
b. Prolifération et migration des CMLVs.....	67
c. Survie des CMLVs	68
d. Phénotype des CMLVs	68
G. Rho et synthèse de la MEC.....	69
V. Le facteur d'échange Arhgef1.....	70
A. Structure d'Arhgef1.....	70
B. Arhgef1 et les pathologies cardio-vasculaires.....	71
<i>Hypothèse et objectifs.....</i>	73
<i>Matériel et méthode.....</i>	75
I. Les animaux : souris Arhgef1.....	75
• La règle des 3 R.....	76
• Les points limites.....	76
II. Préparation des spécimens plasmatiques et prélèvements d'organes.....	76
A. Préparation des spécimens plasmatiques murins	76
B. Prélèvements de tissus et d'organes	77
III. Thrombinographie	77
A. Génération de thrombine dans le sang.....	78
B. Génération de thrombine à la surface des CMLVs	79
IV. Agrégation plaquettaire	79
V. Activation plaquettaire.....	81
A. Quantification des glycoprotéines de surface des plaquettes murines	81
B. Evaluation de l'exposition de la phosphatidylsérine, de la P-sélectine et de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des plaquettes.....	82
C. Mesure du Ca^{2+} cytosolique suite à une mobilisation du système tubulaire dense.	83

VI.	Dosage par test ELISA des marqueurs pro- et anti-coagulants plasmatiques	84
VII.	Adhérence plaquettaire sur fibrinogène	85
VIII.	Etalement plaquettaire sur fibrinogène	85
IX.	Etude de la voie de signalisation par Western Blot.....	86
X.	Dosage de l'activation de RhoA par pull-down.....	86
XI.	Dosage d'hémoglobine et temps de saignement.....	87
XII.	Modèle de caillot physiologique à la queue	88
XIII.	Modèle de thrombose carotidienne induite par du Chlorure de Fer	90
A.	Préparation des animaux.....	90
B.	Visualisation du flux avant l'application du FeCl ₃	90
C.	Visualisation du flux après application du FeCl ₃	90
XIV.	Culture primaire des CMLVs à partir des aortes thoraciques des souris	91
A.	Isolement des cellules et mise en culture	91
B.	Entretien des cellules.....	91
C.	Caractérisation des cellules par immunocytochimie	92
XV.	Comptage des cellules pour mesurer la prolifération	92
XVI.	Détermination de l'activité procoagulante des phospholipides anioniques (APP) 93	
XVII.	Statistiques	95
Résultats		96
I.	Hémostase et coagulation.....	96
A.	Agrégation plaquettaire.....	96
B.	Activation plaquettaire	98
a.	Quantification des glycoprotéines de surface des plaquettes murines	98
b.	Evaluation de l'exposition de la phosphatidylsérine, de la P-sélectine et de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des plaquettes	99
c.	Mesure du calcium intracellulaire libéré par les plaquettes suite à une stimulation	102
C.	Réorganisation du cytosquelette	103
a.	Adhérence plaquettaire	103
b.	Etalement plaquettaire	103
D.	Mesure de l'activation de RhoA et étude de la voie de signalisation RhoA/Arhgef1....	104
E.	Génération de thrombine	105
a.	En sang total.....	105
b.	En plasma riche en plaquette	106
c.	En plasma pauvre en plaquettes.....	107
d.	Génération de thrombine tissulaire.....	108
F.	Dosages des facteurs pro- et anticoagulants dans le plasma par ELISA.....	109
G.	Modèles in vivo.....	110

a. Temps de saignement.....	110
b. Composition du caillot physiologique à la queue	111
c. Modèle de thrombose carotidienne induite par le FeCl ₃	113
• Visualisation du flux avant l'application du FeCl ₃	113
• Visualisation du flux après l'application du FeCl ₃	113
II. Culture primaire de cellules musculaires lisses vasculaires à partir des aortes thoraciques des souris	115
A. Prolifération des CMLVs.....	116
B. Détermination de l'activité procoagulante des phospholipides anioniques	116
<i>Discussion</i>.....	118
<i>Bibliographie</i>	128

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Aperçu des actions de la thrombine dans des conditions normales et physiopathologiques.</i>	<i>14</i>
<i>Figure 2 : Représentation schématique de la formation d'un caillot.</i>	<i>15</i>
<i>Figure 3 : Représentation schématique de la voie intrinsèque et extrinsèque de la coagulation.....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 4 : Présentation schématique de la cascade de la coagulation sanguine.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 5 : Interaction paroi-sang.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 6 : Les activateurs du plasminogène (u-PA et t-PA) circulent dans le plasma sous forme de complexe réversible avec PAI-1.</i>	<i>23</i>
<i>Figure 7 : Composition du sang.</i>	<i>24</i>
<i>Figure 8 : La signalisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplée à la protéine G dans les plaquettes.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 9 : Activation des récepteurs PARs par la thrombine.</i>	<i>30</i>
<i>Figure 10 : Le mécanisme à plusieurs étapes par lequel les plaquettes en circulation forment des contacts d'adhésion stationnaires avec la surface luminale d'un thrombus en croissance dans des conditions d'écoulement physiologique.</i>	<i>33</i>
<i>Figure 11 : Représentation schématique du fonctionnement de la flippase, floppase et scramblase.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 12 : Plasticité des CMLVs.....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 13 : Rôle de différents médiateurs sur la plasticité des CMLVs : contraction, prolifération, synthèse de la matrice et inflammation.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 14 : Schéma de la génération de thrombine à la surface des CMLVs.</i>	<i>39</i>
<i>Figure 15 : Voies de signalisation déclenchées par les récepteurs couplés aux protéines G dans les plaquettes.</i>	<i>43</i>
<i>Figure 16 : La liaison des agonistes aux RCPGs induit un changement de conformation qui facilite l'échange du GDP contre du GTP sur la sous-unité α du complexe hétérotrimérique.</i>	<i>44</i>
<i>Figure 17 : Représentation schématique des rôles connus de Cdc42, Rac1 et RhoA dans le changement de forme et la sécrétion plaquettaire.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 18 : RhoA est essentiel pour deux étapes de la production des plaquettes.</i>	<i>47</i>
<i>Figure 19 : Stabilisation des filaments d'actine dans les plaquettes.....</i>	<i>48</i>

<i>Figure 20 : Activation et régulation des RhoGTPases.</i>	<i>51</i>
<i>Figure 21 : Résumé des principaux mécanismes de régulation des RhoGTPases plaquettaires.</i>	<i>52</i>
<i>Figure 22 : Mitose versus endomitose des mégacaryocytes.</i>	<i>53</i>
<i>Figure 23 : Principaux mécanismes régulant l'adhésion focale et la contraction des CMLVs.</i>	<i>56</i>
<i>Figure 24 : Rôle et interactions des différentes voies de signalisation moléculaire dans le vieillessement des CMLVs.</i>	<i>59</i>
<i>Figure 25 : Représentation schématique de l'athérogenèse et d'une plaque athérosclérotique instable.</i>	<i>61</i>
<i>Figure 26 : Représentation schématique de la voie du mévalonate.</i>	<i>62</i>
<i>Figure 27 : Un modèle de régulation de la fonction de barrière endothéliale par Rho et Rac.</i>	<i>64</i>
<i>Figure 28 : Régulation intracellulaire et migration d'un leucocyte à travers la barrière endothéliale.</i>	<i>66</i>
<i>Figure 29 : Localisation génomique d'Arhgef1 sur le chromosome 19.</i>	<i>70</i>
<i>Figure 30 : Structure secondaire d'Arhgef1.</i>	<i>70</i>
<i>Figure 31 : Structure d'Arhgef1.</i>	<i>71</i>
<i>Figure 32 : Génération de souris knock-out (Arhgef1 -/-) totales, constitutives pour Arhgef1.</i>	<i>75</i>
<i>Figure 33 : Schéma des paramètres mesurés et calculés lors de l'analyse de la génération de thrombine.</i>	<i>77</i>
<i>Figure 34 : Génération de thrombine à la surface des CMLVs.</i>	<i>79</i>
<i>Figure 35 : Principe de Born.</i>	<i>80</i>
<i>Figure 36 : Principe de mesure, avant et après agrégation.</i>	<i>80</i>
<i>Figure 37 : Marquage des plaquettes à l'annexine V et à la P-sélectine et quantification des vésicules extracellulaires.</i>	<i>83</i>
<i>Figure 38 : Schéma du modèle de saignement à la queue.</i>	<i>87</i>
<i>Figure 39 : Schéma récapitulatif de la procédure de formation et de l'imagerie d'un caillot physiologique à la queue.</i>	<i>89</i>
<i>Figure 40 : Schéma de thrombose carotidienne induite par le FeCl3 chez la souris.</i>	<i>90</i>
<i>Figure 41 : Représentation schématique du comptage en chambre de Neubauer.</i>	<i>93</i>
<i>Figure 42 : Représentation schématique de la mesure de l'activité procoagulante des phospholipides.</i>	<i>94</i>

Figure 43 : Courbes typiques d'agrégation plaquettaire.....	97
Figure 44 : Agrégation plaquettaire.	98
Figure 45 : Expression par cytométrie en flux des glycoprotéines et intégrines impliquées dans la granulation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, et du récepteur activé par les protéases PAR1 (protease activated receptor).	99
Figure 46 : Quantité d'ATP relargué et marquage de la P-sélectine.....	100
Figure 47 : (A) Quantification par cytométrie en flux de la fixation d'annexine V et (B) la libération de vésicules extracellulaires (VE).	101
Figure 48 : Quantification de l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ en réponse à une stimulation par de la thrombine ou du collagène.	101
Figure 49 : Mesure du calcium intracellulaire libéré par les plaquettes des souris <i>Arhgef1</i> en réponse à différents agonistes.	102
Figure 50 : Mesure de l'adhérence plaquettaire pour les souris contrôles et <i>Arhgef1</i> $-/-$	103
Figure 51 : Etude de l'étalement plaquettaire.	104
Figure 52 : La délétion d' <i>Arhgef1</i> inhibe l'activation de RhoA et la phosphorylation de MLC dans les plaquettes.....	105
Figure 53 : Génération de thrombine en sang total chez les souris <i>Arhgef1</i>	106
Figure 54 : Génération de thrombine en plasma riche en plaquettes chez les souris <i>Arhgef1</i>	107
Figure 55 : Génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes.	108
Figure 56 : Génération de thrombine tissulaire.....	109
Figure 57 : Quantification par ELISA de la concentration en thrombomoduline (A), en TFPI (B), en vWF (C) et en CD146 soluble (D) dans le plasma des souris contrôles et <i>Arhgef1</i> $-/-$	110
Figure 58 : Modèle de saignement à la queue.	111
Figure 59 : Etude de la composition du caillot formé à la queue.	112
Figure 60 : Image échographique en mode M des carotides de souris avec mesure des diamètres et des épaisseurs systoliques et diastoliques.	113
Figure 61 : Formation du thrombus suite à l'application de chlorure de fer pendant 2 min.	114
Figure 62 : (A) Profils typiques du flux sanguin au niveau de la carotide, avant et après application de $FeCl_3$. (B) Temps moyen d'occlusion totale.	114
Figure 63 : Caractérisation des cultures primaires issues des aortes thoraciques des souris.....	115

<i>Figure 64 : Prolifération des CMLVs issues d'aortes thoraciques de souris contrôles et de souris Arhgef1 -/- comptées 48h après ensemencement et stimulées ou non par de la thrombine (1 U/mL) pendant 24h.</i>	<i>116</i>
<i>Figure 65 : Mesure de l'APP.....</i>	<i>117</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Protéines de la coagulation.</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 2 : Numération plaquettaire comparée entre une méthode manuelle et l'utilisation d'un automate.</i>	<i>25</i>
<i>Tableau 3 : Glycoprotéines membranaires des plaquettes participant à l'adhésion et à l'initiation de l'agrégation par liaison des ligands spécifiques.....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 4 : Principales substances contenues dans les granules plaquettaires.</i>	<i>35</i>
<i>Tableau 5 : Principaux stimuli plaquettaires agissant via les RCPGs et phénotypes observés chez la souris déficiente pour ces récepteurs.</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 6 : Phénotypes plaquettaires chez les souris déficientes pour une sous-unité de protéine G.....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 7 : Effecteurs RhoGTPases plaquettaires.....</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 8 : Liste des GEFs, GAPs et GDIs de RhoGTPases les plus présents dans les plaquettes humaines avec leurs GTPases cibles connues.</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 9 : Voies de signalisation des CMLVs.....</i>	<i>59</i>
<i>Tableau 10 : Protocole de cytométrie pour caractérisation des plaquettes de souris.</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 11 : Représentation des concentrations de la gamme étalon utilisée pour mesurer l'activité procoagulante des phospholipides.</i>	<i>93</i>
<i>Tableau 12 : Composition du sang chez les souris contrôles et les souris Arhgef1 -/-.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 13 : Diamètre et épaisseur de la carotide des souris contrôles et Arhgef1 -/-.....</i>	<i>113</i>

ABBREVIATIONS

AA = acide arachidonique

ACD = acide citrate dextrose

ADP = adénosine 5' diphosphate

APP = activité procoagulante des phospholipides

AT = antithrombine

AT1 = récepteur à l'angiotensine II de type 1

ATP = adénosine triphosphate

BSA = bovine serum albumin (albumine bovine sérique)

CE = cellule endothéliale

CMLV = cellule musculaire lisse vasculaire

ETP = endogenous thrombin potential (potentiel thrombotique endogène)

FII = prothrombine

FIIa = thrombine

FT = facteur tissulaire

GAP = protéine à activité GTPase

GEF = facteur d'échange de nucléotides guanyliques

HRP = horseradish peroxidase (peroxydase de raifort)

ICAM-1 = molécule d'adhésion intracellulaire des cellules endothéliales

IP3 = inositol-1,4,5-triphosphate

IRS-1 = récepteur à l'insuline

MEC = matrice extracellulaire

MMP = métalloprotéase matricielle

OCT = optimal cutting temperature

PAI = plasminogen activator inhibitor (inhibiteur de l'activateur du plasminogène)

PAR = protease activated receptor (récepteur activé par les protéases)

PC = protéine C

PCa = protéine C activée

PE = phosphatidyl-éthanolamine

PECAM-1 = platelet endothelial cell adhesion molecule (molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales)

PLC = phospholipase C

PPC = phosphatidyl-choline

PPL = phospholipide
PPLa = phospholipide anionique
PPP = plasma pauvre en plaquettes
PRP = plasma riche en plaquettes
PS = phosphatidyl-sérine
RCPG = récepteur couplé aux protéines G
RGS = régulateur de la signalisation des protéines G
SHR = spontaneously hypertensive rat (rat spontanément hypertendu)
SM-MHC = chaîne lourde de la myosine du muscle lisse
TFPI = tissue factor pathway inhibitor (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire)
tPA = activateur tissulaire du plasminogène
TRAP = thrombine receptor agonist peptide (peptide agoniste du récepteur de la thrombine)
TXA2 = thromboxane A 2
VE = vésicule extracellulaire
VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1)
VEGF = facteur de croissance vasculaire endothélial
VP = vésicule phospholipidique
VWF = facteur von Willebrand

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre : Notre étonnant appareil circulatoire

Le réseau de transport le plus perfectionné du monde n'est autre que notre appareil circulatoire. Sa longueur dépasse celle de toutes nos voies ferrées, puisqu'elle varie de 95000 à 160000 km. Silencieux, automatique, fonctionnant jour et nuit, il fournit aux organes et aux tissus l'exacte quantité de sang dont ils ont besoin ; il apporte à ses milliards de clients, les cellules, tout leur ravitaillement et assure l'évacuation des déchets. Ce merveilleux système de transport se répare tout seul : qu'une piqûre d'épingle crève par centaines les minuscules capillaires, et voilà qu'il en bourgeonne aussitôt de nouveaux. Une petite coupure provoque immédiatement l'apparition d'un écheveau cotonneux de fibrine qui enserre les globules rouges dans ses mailles et constitue un caillot obturateur, faute duquel la moindre plaie serait suivie d'une hémorragie mortelle. [...]

Chapitre : Ce que révèle notre sang

« Bon sang ne peut mentir » dit un vieux proverbe qui, sous l'effet des progrès de la médecine, est en train d'acquérir une signification nouvelle et profonde. Témoin de vérité, le sang en dit même fort long, et chaque année nous en apprend davantage. [...]

Les merveilles de notre corps

Sélection du Reader's digest

1971

L'hémostase est l'ensemble des phénomènes physiologiques qui concoure à la prévention et à l'arrêt des saignements. Elle participe à la réparation de la brèche vasculaire et d'une façon générale, elle assure le maintien de l'intégrité des vaisseaux. L'hémostase comprend : l'hémostase primaire avec le temps vasculaire et le temps plaquettaire, la coagulation plasmatique mettant en jeu de nombreux facteurs et inhibiteurs et enfin la fibrinolyse.

I. Génération de thrombine plasmatique et tissulaire

La génération de thrombine *in vitro* a été utilisée il y a un demi-siècle pour étudier la coagulation défectueuse notamment dans l'hémophilie et les thrombocytoses. Elle a été ensuite totalement supplantée par les temps de coagulation (temps de Quick, temps de céphaline activée et temps de saignement) qui sont des tests dits en un temps. Elle a été ensuite réadaptée par Hemker et al (*Hemker et al. 1985*) pour mesurer la capacité du sang à générer et inhiber de la thrombine. Les groupes de Kenneth Mann et Harold Roberts (*Bouchard et al. 2018, Monroe et al. 2002*) ont aussi contribué à faire renaître cette approche par l'étude des surfaces cellulaires et des plaquettes. Les mesures sur échantillons (dîtes en subsampling) consistent en la détermination de l'activité thrombotique en utilisant le fibrinogène (substrat physiologique) qui a été par la suite remplacé par des substrats artificiels ou encore par la mesure par ELISA du complexe stœchiométrique thrombine-antithrombine. Une amélioration capitale a été apportée par le recours à la fluorescence qui sera mesurée *in situ* dans le plasma pendant toute une cinétique.

A. La thrombine

Le facteur IIa, également nommé thrombine, est formé de deux chaînes : une chaîne légère de 36 acides aminés et une chaîne lourde de 259 acides aminés. C'est une sérine protéase, engendrée par protéolyse de la prothrombine au cours de la cascade de coagulation, qui présente de multiples fonctions. Quand elle est produite en quantité importante, elle est connue pour son action enzymatique où elle transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble (*Monroe et al. 2002*). A l'inverse, produite en plus faible quantité dans les tissus, en plus de ses rôles bien connus dans le système hémostatique, la thrombine est une protéase qui possède des effets démontrés sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires, les monocytes et les plaquettes. Il est de plus en plus évident que la thrombine agit comme un puissant modulateur de nombreux processus tels que la régulation du tonus vasculaire, la perméabilité de la barrière endothéliale (CEs), la migration et la prolifération des cellules

musculaires lisses vasculaires (CMLVs), le recrutement des monocytes dans les lésions athéroscléreuses et l'induction de divers marqueurs proinflammatoires. Tous ces processus sont liés à la progression de maladies cardiovasculaires (Borissoff et al. 2009). Les actions humorales et cellulaires de la thrombine en conditions normales et pathologiques sont résumées dans la figure 1.

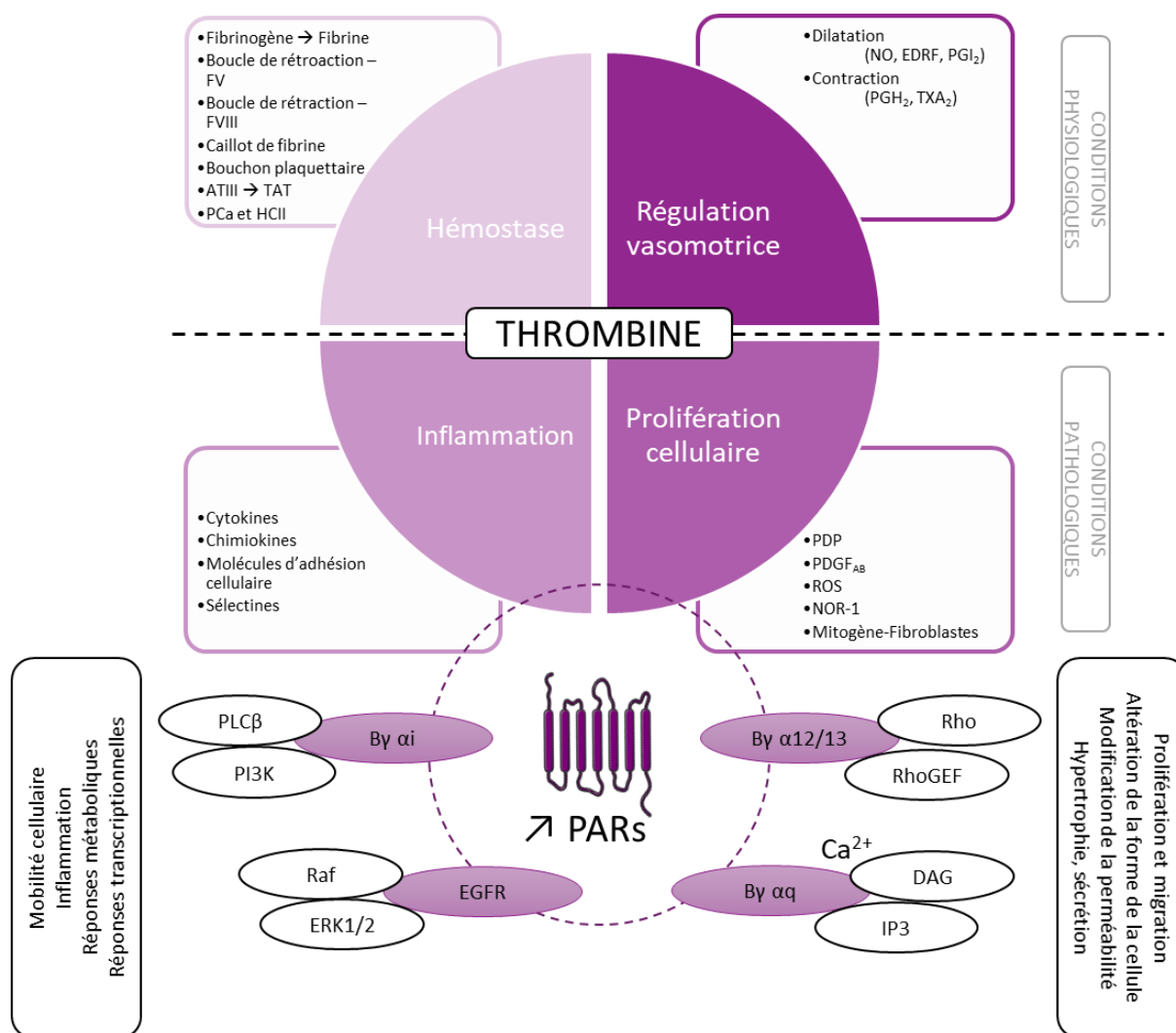


Figure 1 : Aperçu des actions de la thrombine dans des conditions normales et physiopathologiques.

ATIII : antithrombine, TAT : complexe thrombine-antithrombine, PCa : protéine C activée, HCII : cofacteur II de l'héparine, CAM : molécules d'adhésion cellulaire, NO : oxyde nitrique, EDRF : facteur de relaxation dérivé de l'endothélium, PGI₂ : prostacycline, PGH₂ : prostaglandine H₂, TXA₂ : thromboxane A₂, PDP : produits dérivés des plaquettes, PDGF_{AB} : facteur de croissance dérivé des plaquettes AB, ROS : espèces réactives de l'oxygène, NOR-1 : récepteur orphelin dérivé des neurones (d'après Borissoff et al., 2009).

B. Génération de thrombine dans le compartiment plasmatique

La coagulation dans le compartiment sanguin, dont l'étape clef est la génération de thrombine, fait intervenir des protéines plasmatiques mais nécessite également une surface phospholipidique, du calcium et des récepteurs pour concentrer les facteurs de la coagulation à la surface membranaire. Cette cascade dynamique de réactions enzymatiques permet la transformation du fibrinogène soluble en un réseau de fibrine insoluble qui obstrue la brèche vasculaire et consolide le caillot (Figure 2).

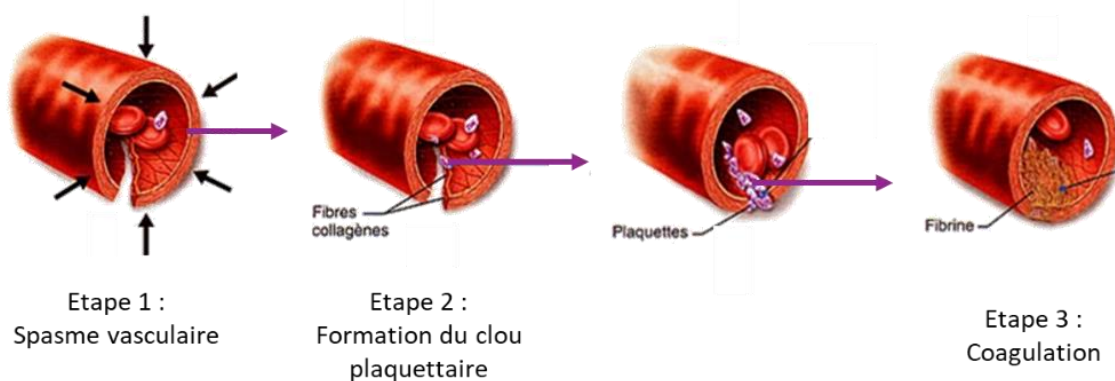


Figure 2 : Représentation schématique de la formation d'un caillot.

Etape 1 : spasme vasculaire (contraction du muscle lisse entraînant la vasoconstriction). Etape 2 : formation du clou plaquettaire (lésion de l'endothélium et mise à nu des fibres de collagènes ; adhésion des plaquettes qui libèrent des substances et rendent les plaquettes avoisinantes actives). Etape 3 : coagulation (filaments de fibrine emprisonnant des érythrocytes et des plaquettes pour former le caillot insoluble) (d'après CorpsHumain.ca)

Dans les années 1960, des chercheurs ont construit un modèle de coagulation qui ressemblait à une chute d'eau. Ce modèle a donc été appelé à juste titre : cascade de la coagulation. Ici, chaque facteur de coagulation consiste en une proenzyme qui est convertie en une enzyme active par le facteur de coagulation activé en amont et également grâce à l'intervention de cofacteurs. Il a également été suggéré qu'il existe deux cascades différentes qui convergent dans l'activation du facteur (F) X. Elles constituent la voie intrinsèque, ainsi appelée parce que tous les composants sont présents dans le sang, et la voie extrinsèque nécessitant un facteur externe (facteur tissulaire (FT)).

La voie intrinsèque est déclenchée lors du contact du sang avec des surfaces artificielles ou certains éléments du sous endothélium. Cette étape est appelée « la phase contact ». Elle fait intervenir de nombreux facteurs de coagulation. Le FXI, activé par le FXIa, qui active le FIX. Le FIXa se fixe sur les phospholipides membranaires, par l'intermédiaire du calcium. C'est à ce niveau que le FIXa active ensuite le FX, cette activation est accélérée en présence du cofacteur

FVIII. Le cofacteur VIIIa, le facteur FIXa, les phospholipides membranaires et le calcium forment un complexe appelé « ténase ». La voie intrinsèque peut être explorée par le temps de céphaline activée (*Palta et al. 2014*). Par ailleurs, la contribution de cette voie à l'hémostase physiologique est considérée comme minime. Cela est notamment démontré par l'étude de sujets présentant une déficience en FXII. Chez ces patients, il n'existe aucun syndrome hémorragique (*Mariano et al. 2011*). La voie extrinsèque est déclenchée par le contact entre le FT et le FVIIa pour permettre l'activation du FX en FXa. L'activation du FX est une voie commune avec la voie intrinsèque aboutissant à la génération de thrombine. La voie extrinsèque est prépondérante et peut être explorée globalement par le temps de Quick (*Palta et al. 2014*). De façon intéressante, chez l'homme, aucune mutation homozygote dans le gène codant pour le FX n'a été recensée (human Gene mutation database), suggérant que la déficience complète du FX est incompatible avec la vie. Des résultats similaires ont été remarqués chez des souris. Une mutation ciblée du gène FX est associée à une perte de 50% des souris homozygotes *in utero*, et une perte des souris restantes suite à des complications hémorragiques dans les jours suivant la naissance (*Dewerchin et al. 2000*). Tai et collaborateurs ont montré qu'une activité minimale de FX aussi faible que 1 à 3% est suffisante pour éviter le phénotype létal (*Tai et al. 2008*). La déficience en FVII est la plus courante parmi les troubles de saignement autosomiques récessifs héréditaires rares (*Napolitano et Siragusa 2017*). Cependant, comme le FX, des études sur des souris déficientes indiquent que l'absence de FVII est incompatible avec la vie. Ainsi, la déficience du FVII ne peut pas être associée à une absence totale de FVII fonctionnel (*McVey et al. 2001*). Les cascades de coagulation sont représentées figure 3.

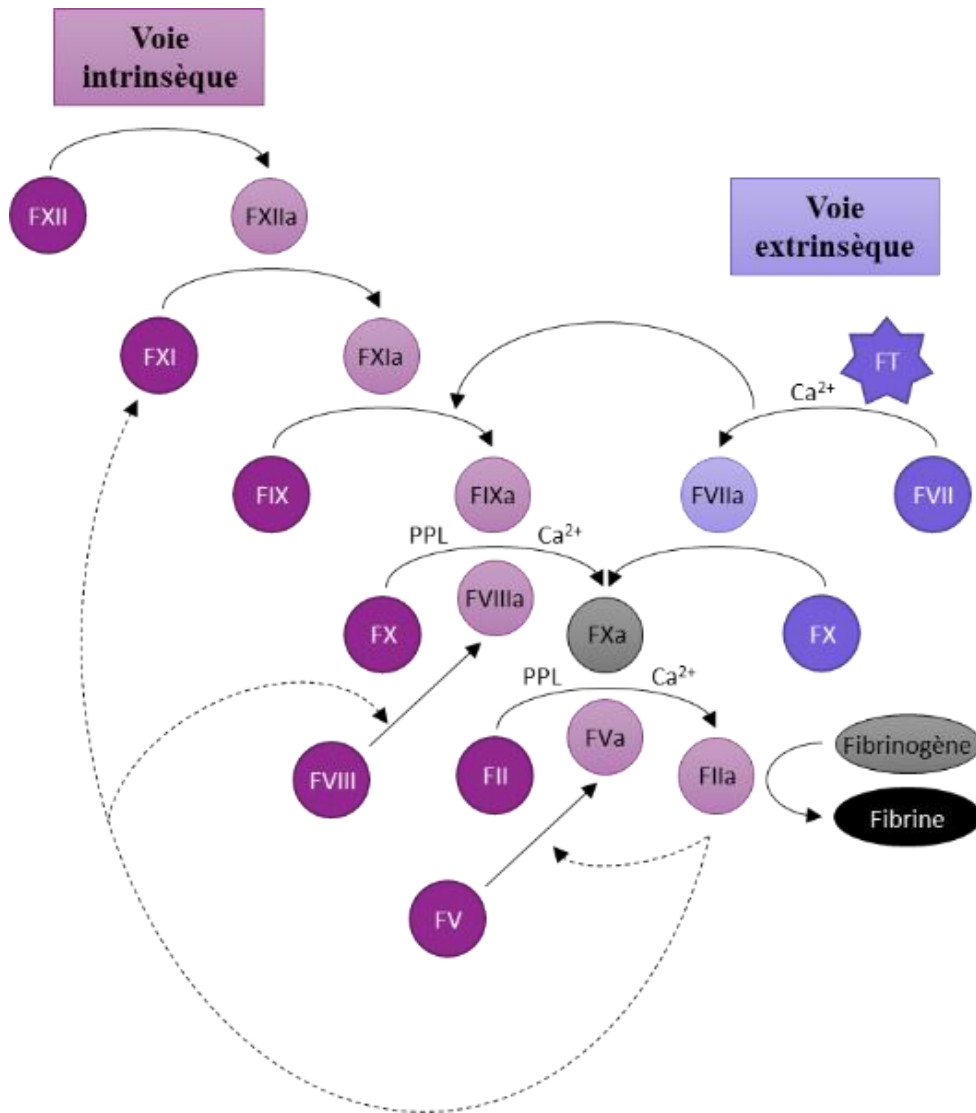


Figure 3 : Représentation schématique de la voie intrinsèque et extrinsèque de la coagulation.

(d'après de Gyrid Nygaard et al., 2017) (PPL : phospholipides ; FT : facteur tissulaire) (flèches pleines : facteurs impliqués directement dans la cascade de coagulation ; flèches pointillées : facteurs impliqués indirectement dans la cascade de coagulation).

La coagulation se décompose en trois phases qui sont (Figure 4) : (1) une phase d'initiation dans laquelle sont générées de faibles quantités de facteurs de coagulation activés, (2) une phase d'amplification dans laquelle le niveau de facteurs de coagulation activés est amplifié et (3) une phase de propagation dans laquelle les facteurs de coagulation se lient à des membranes hautement procoagulantes et des caillots de fibrine sont formés (Monroe et al., 2006).

(1) **Phase d'initiation** : lors d'une brèche vasculaire, les CMLVs et les fibroblastes sont exposés au flux sanguin. Ces cellules synthétisent de façon constitutive un initiateur majeur de la cascade de coagulation : le FT qui est, en temps normal, isolé du compartiment sanguin par l'endothélium. En cas de lésion de la paroi vasculaire, la coagulation est alors déclenchée

par l'interaction du FT avec le FVIIa qui est présent de manière basale dans la circulation sanguine. Le complexe FT/FVIIa possède alors une activité protéolytique qui va activer les FIX et FX. Ce complexe peut être inhibé par le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Le FXa active la prothrombine (FII) à la surface de membranes procoagulantes et provoque la formation de la thrombine (FIIa).

(2) **Phase d'amplification** et (3) **propagation** : elle débute dès les premières traces de thrombine formées. La thrombine formée active les plaquettes en se fixant aux récepteurs activés PAR1 et 4 (Protease Activated Receptor), augmentant ainsi les phospholipides (PPL) membranaires des plaquettes disponibles pour la coagulation. L'inhibition de la flippase et l'activation de la floppase et de la scramblase vont permettre l'externalisation des phospholipides anioniques. La thrombine va également activer le FVIII, le FV et le FXI qui sont des cofacteurs dépourvus d'activité enzymatique propre mais capables d'augmenter la vitesse d'activation des enzymes. Ces cofacteurs engendrent la formation des complexes ténase (FIXa-FVIIIa-Ca²⁺-phospholipides) et prothombinase (FXa-FVa-Ca²⁺-phospholipides) qui vont permettre une activation rapide et massive de la prothrombine. La thrombine va activer le fibrinogène à deux endroits différents, ce qui va donner des monomères qui vont polymériser pour former un réseau de fibrine. Cette fibrine est un cofacteur de la thrombine pour activer également le FXIII qui va stabiliser le caillot formé.

(4) **Phase d'inhibition** : deux systèmes principaux permettent de limiter la cascade de coagulation. Ce sont les inhibiteurs circulants dits « stœchiométriques » et le système de la protéine C (PC). Parmi les inhibiteurs stœchiométriques, l'antithrombine (AT) est le principal acteur de cette inhibition. L'AT va piéger la thrombine et le FXa en les fixant par une liaison covalente irréversible mais elle a aussi la capacité d'inhiber tous les facteurs de la coagulation activés. Les complexes vont être éliminés par le foie. Le TFPI est un autre inhibiteur compétitif qui forme des liaisons faibles. Il va lier le FXa avec le FT et le FVIIa formant le complexe FT/FVIIa/FXa/TFPI qui inhibe l'activation du FX et du FIX. Le complexe FT/FVIIa n'est inhibé que lorsque le FX est activé. Le système de la PC est un système d'inhibition qui est dynamique. La PC est une pro-enzyme (peptidase) qui circule sous forme inactive. Elle peut être clivée et activée par la thrombine en PC activée (PCa) à la surface des cellules. La PCa est un inhibiteur très puissant des FVa et VIIIa et son action est augmentée par la protéine S.

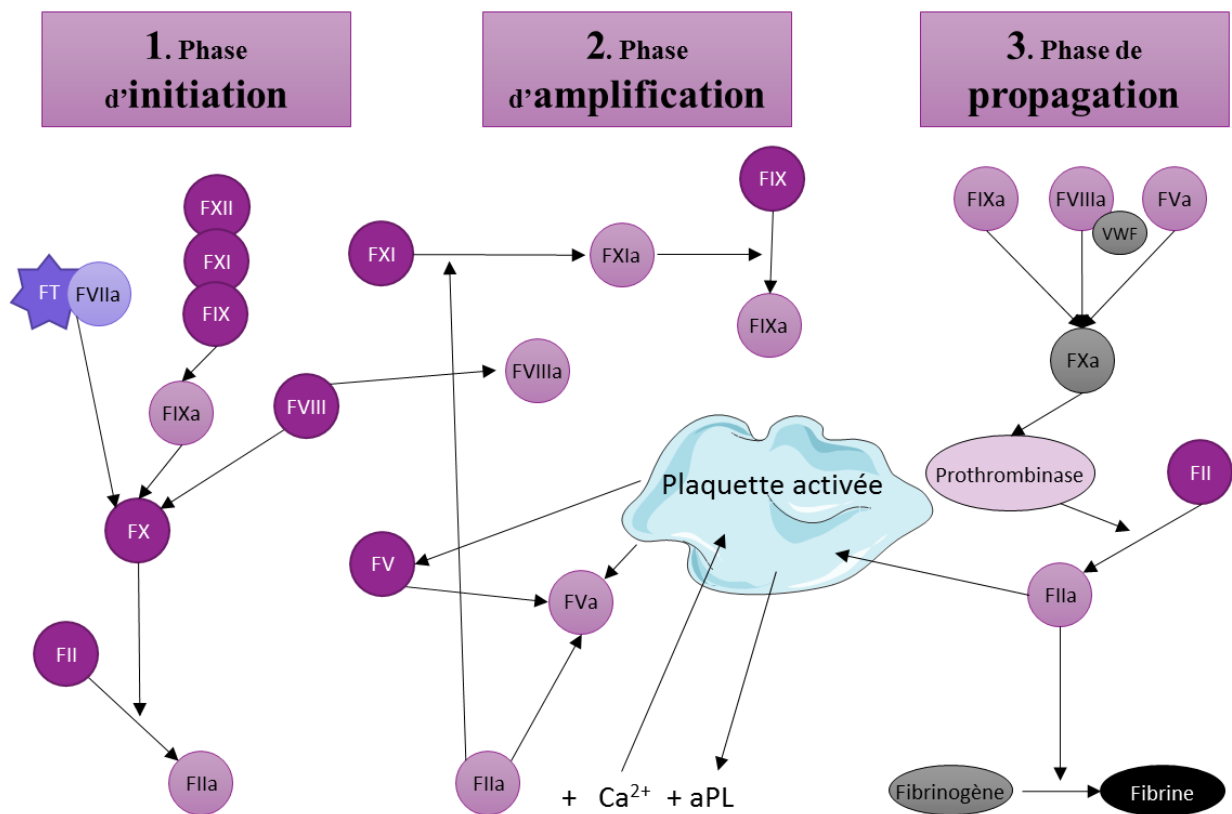


Figure 4 : Présentation schématique de la cascade de la coagulation sanguine.

Le modèle est divisé en 3 phases : l'initiation, l'amplification et la propagation (d'après Pérez-Gómez et al., 2007) (aPL : anticorps antiphospholipides)

Toutes les protéines impliquées dans la coagulation sont répertoriées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Protéines de la coagulation.

F : facteur ; CE : cellule endothéliale ; CML : cellule musculaire lisse ; PC : protéine C ; VWF : facteur von Willebrand (d'après Palta et al. 2014)

	Fonction	Poids moléculaires (Da)	Concentrations plasmatiques (µg/mL)	Lieu de synthèse
FI (fibrinogène)	Substrat	333 000	200-400	Foie
FII (prothrombine)	Zymogène	72 000	100	Foie
FV	Procofacteur	330 000	10	Foie
FVII	Zymogène	51 000	0,5	Foie
FVIII	Procofacteur	330 000	0,1	Foie
FIX	Zymogène	55 000	5	Foie
FX	Zymogène	59 000	10	Foie
FXI	Zymogène	160 000	5	Foie
FXII	Zymogène	80 000	30	Foie
FXIII	Zymogène	300 000	20	Foie
FT	Cofacteur	37 000	0	CE, CML, fibroblaste
PC	Zymogène	62 000	5	Foie
Protéine S	Cofacteur	80 000	25	Foie
Thrombomoduline	Cofacteur	60 300	0	CE, CML
Antithrombine	Inhibiteur	58 200	150	Foie
TFPI	Inhibiteur	42 000	5 à 20	CE, CML, hépatocyte
VWF	Cofacteur	270 000	10	CE, mégacaryocyte

F : facteur ; CE : cellule endothéliale ; CML : cellule musculaire lisse ; PC : protéine C ; VWF : facteur von Willebrand (d'après Palta et al. 2014)

C. Génération de thrombine dans le compartiment pariétal

Des résultats récents *in vitro* suggèrent que la paroi artérielle est également capable de générer de la thrombine. La présence de fibrine au sein des plaques d'athérosclérose est un argument en sa faveur. Dans ce manuscrit, cette réponse est appelée « thrombine tissulaire » par opposition à la « thrombine plasmatique ». Elle met en jeu des CMLVs capables de servir de support cellulaire pour générer de la thrombine en fonction des conditions hémodynamiques ou inflammatoires de la paroi. En cas de brèche, l'exposition du collagène et des CMLVs présents au niveau du sous-endothélium favorise l'activation et l'agrégation plaquettaire pour aboutir à des thrombi plaquettaires et fibrino-cruoriques plus stables (Badimon et al. 2012). De surcroît, les

CMLVs se trouvent alors au contact du sang et pourraient être directement impliquées dans la thrombose. La synthèse de molécules procoagulantes par les CMLVs suggère également que ces cellules pourraient de façon autonome générer de la thrombine au niveau pariétal. Cette thrombine est susceptible d'exercer des effets cellulaires ou des effets coagulants au sein de la paroi. La thrombine a des effets sur plusieurs fonctions biologiques des cellules constituant la paroi vasculaire, comme la prolifération (McNamara et al. 1993), la différenciation (Martin et al. 2009), la migration des CMLVs (Noda-Heiny, CD, 1995) ou des CEs, la réponse inflammatoire (Ma et al. 2012), la production de matrice extracellulaire (MEC), le développement vasculaire, l'athérogenèse (McNamara et. 1996) et l'angiogenèse (Tsopanoglou et al. 2009). Les CMLVs, qui sont le composant principal de la média et responsables du tonus contractile et de la production de la MEC, sont exposées constamment aux contraintes mécaniques de pression mais également aux contraintes de cisaillement (flux sanguin). Ces contraintes cycliques, rythmées par la fréquence cardiaque, régulent de nombreuses fonctions cellulaires via les intégrines. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est non seulement un mécanotransducteur mais aussi le récepteur de la prothrombine à la surface des CMLVs. L'activation de cette intégrine par les contraintes mécaniques cycliques, favorise la liaison de la prothrombine soluble à la surface des CMLVs et ainsi accélère la génération de thrombine à la surface de ces cellules (Mao et al. 2012). Dans le cas de l'hypertension, l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en réponse aux contraintes mécaniques *in vivo* participe au remodelage eutrophique de la paroi artérielle (Heerkens et al. 2006). Cette activation participe au risque thrombotique. La thrombine pourrait stimuler sa propre production à la surface des CMLVs en présence de FT (Vidwan et al. 2010) mais également intervenir directement sur les CMLVs en induisant leur prolifération, leur migration et la formation des plaques d'adhésions focales. La thrombine peut participer à la modulation phénotypique des CMLVs qui libèrent des facteurs procoagulants dans le compartiment sanguin et vasculaire (Nguyen et al. 2001). Au sein de la paroi vasculaire, l'endothélium, qui assure une fonction de barrière entre le compartiment sanguin et les CMLVs, joue un rôle physiologique anticoagulant. L'inflammation peut provoquer un dysfonctionnement endothélial qui modifie les propriétés des CEs d'un phénotype anticoagulant vers un phénotype procoagulant et favorise la convection des facteurs de coagulation plasmatique vers les CMLVs. L'inflammation et la dysfonction endothéliale sont impliquées dans la thrombogenèse et dans l'athérogenèse. (Kakar et al. 2007). Ces mécanismes de la thrombose interviennent dans le développement des certaines pathologies comme l'athérosclérose ou encore les anévrismes (Figure 5).

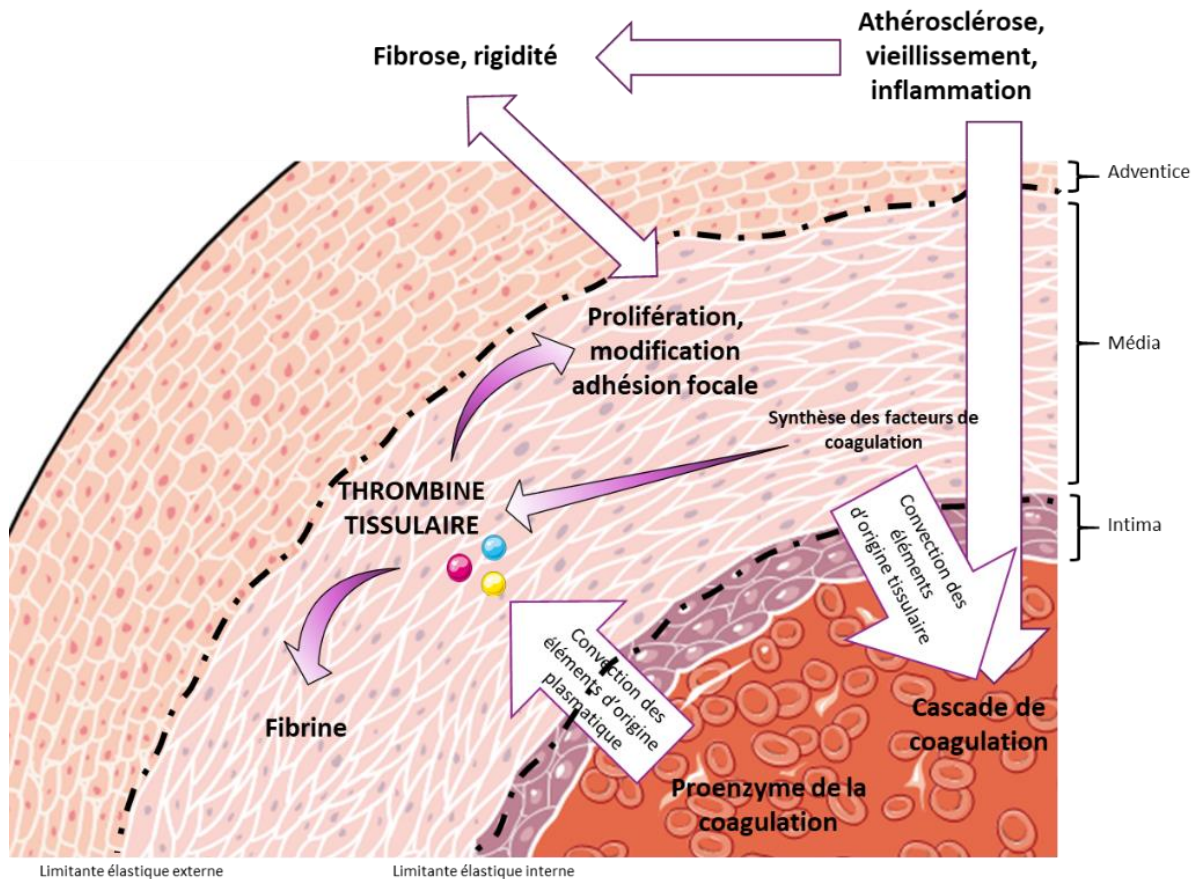


Figure 5 : Interaction paroi-sang.

Les proenzymes de la coagulation présentes dans le sang peuvent traverser l'endothélium et agir sur les CMLVs. Ces dernières peuvent alors générer de la thrombine tissulaire qui participera à des modifications phénotypiques des cellules (prolifération, changement du cytosquelette). Ces changements sont impliqués dans le développement d'une fibrose et d'une rigidité vasculaire (d'après Lacolley et al., 2012).

D. La fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus physiologique complexe de dissolution des caillots sanguins (constitués de fibrine) par la plasmine. Ce processus clôtur la coagulation sanguine afin de repermeabiliser les vaisseaux sanguins réparés et sert à empêcher la formation de thromboses. (Cesarman-Maus et al. 2005). Le plasminogène, substance circulante dans le sang et synthétisée par le foie, va se transformer en plasmine sous l'action de deux types de facteurs : l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) principalement synthétisé par les CE au niveau de la lésion et l'urokinase produite au niveau du caillot sanguin à partir de la pro-urokinase synthétisée par les cellules rénales et autres cellules parenchymateuses. La plasmine est une enzyme protéolytique très puissante qui a la capacité de dégrader le réseau de fibrine et de détruire le fibrinogène ainsi que d'autres facteurs de coagulation. Cette peptidase agit en catalysant l'hydrolyse des liaisons peptidiques localisées à la suite d'un résidu d'arginine ou de lysine. La

fibrinolyse est régulée par deux types d'inhibiteurs : l' α_2 -macroglobuline et l' α_2 -antiplasmin qui sont des inhibiteurs de la plasmine et par le PAI-1 et -2 (Plasminogen activator inhibitor) qui sont respectivement des inhibiteurs du tPA et de l'urokinase.

En l'absence de fibrine, le plasminogène et la pro-urokinase circulent sous la forme de proenzymes inactives et le tPA reste lié à son inhibiteur PAI-1. Par contre, dès que la fibrine est produite, les CEs vont libérer du tPA qui a une forte affinité pour la fibrine et va induire la transformation du plasminogène en plasmine. Également, en présence de fibrine, la pro-urokinase est activée en urokinase. Sous l'action de ces deux enzymes produites exactement au niveau du réseau de fibrine, ce dernier sera progressivement dégradé en différents fragments qui vont être directement évacués par les reins et le foie (Figure 6). La plasmine présente dans la circulation sanguine est par la suite rapidement neutralisée par l' α_2 -macroglobuline et l' α_2 -antiplasmin.

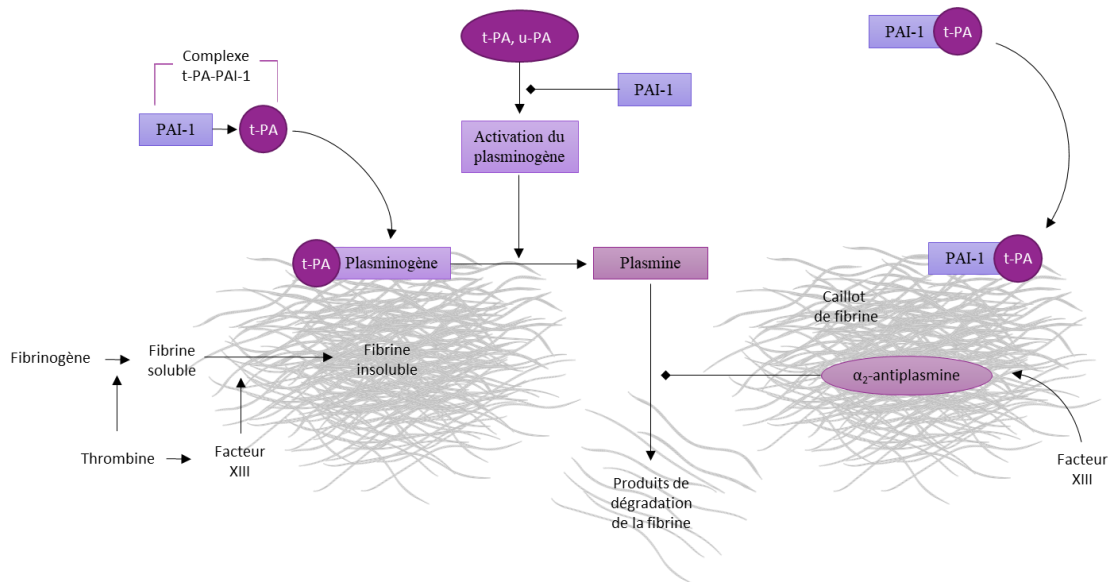


Figure 6 : Les activateurs du plasminogène (u-PA et t-PA) circulent dans le plasma sous forme de complexe réversible avec PAI-1.

Lorsque le caillot de fibrine est formé, le plasminogène et le t-PA ou l'u-PA se lient au caillot et forment la plasmine, ce qui entraîne la lyse de la fibrine réticulée en produits de dégradation de la fibrine. Le PAI-1 se lie également à la fibrine et, lorsqu'il est lié, peut inhiber de manière irréversible les activateurs du plasminogène (d'après Heiman et al., 2017).

Tout au long de l'hémostase, il y a un équilibre permanent entre la coagulation et la fibrinolyse.

II. Les cellules : support de la génération de thrombine

La paroi vasculaire remplit de nombreuses fonctions physiologiques allant de la régulation de la pression sanguine en passant par les échanges gazeux, sans oublier le contrôle de l'hémostase. Le sang qui circule dans ce réseau est composé de globules rouges ou hématies ou érythrocytes, de globules blancs ou leucocytes et de plaquettes qui baignent dans un liquide appelé plasma (Figure 7).

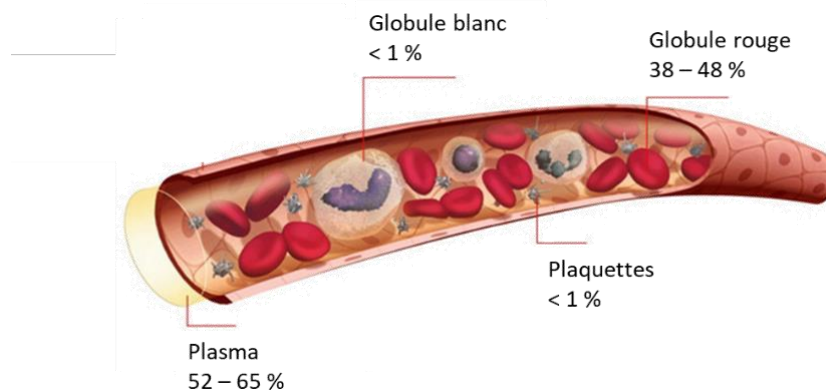


Figure 7 : Composition du sang.
(d'après ledictionnairevisuel.com)

Le sang joue un rôle essentiel dans le transport de l'oxygène, des nutriments, des anticorps et des hormones.

A. Les plaquettes

L'observation des plaquettes sanguines n'a été rendue possible qu'à partir des années 1830 avec la production d'objectifs achromatiques, permettant de distinguer des particules jusqu'à 2 μm de diamètre. Les premières traces écrites qui décrivent des éléments ressemblants aux plaquettes sont datées de 1842 avec les observations de Donné, d'Addison et de Gerber et Gulliver. Si d'autres ont pu décrire des éléments similaires après cette période, c'est Max Schultz qui désigne les plaquettes comme le « troisième élément » du sang en 1865, en indiquant qu'elles constituent des « masses granulaires » entremêlées d'un réseau fibreux. Ce « troisième élément » est étudié encore davantage par Giulio Bizzozero en 1882, qui le nommera « petite plaque » et notera qu'elle est capable de s'accrocher à la paroi d'un vaisseau lésé. Le terme plaquette n'est introduit qu'en 1895 par M.L Holbrook, qui suggère alors que ces éléments sont issus de la fragmentation des globules rouges, et le lien entre plaquette et mégacaryocyte est suggéré en 1906 par Wright.

Les plaquettes sont des cellules sanguines libérées par les mégacaryocytes de la moëlle osseuse au niveau des sinusoides. La durée de vie des plaquettes est de 8 à 10 jours chez l'homme et de 3 à 4 jours chez la souris. Elles sont éliminées par phagocytose au niveau de la rate, du foie et de la moëlle osseuse par les monocytes et les macrophages. Elles possèdent un cytoplasme granulaire sans noyau. Leur diamètre est en moyenne de 2,5 μm et la numération plaquettaire normale dans le sang périphérique est comprise entre 150 000 et 400 000 par μL chez l'homme (Fritsma et al. 2015). Chez la souris, cette numération est légèrement supérieure à 1 000 000 par μL . Ce nombre varie selon l'espèce et le choix de la technique pour la numération (manuelle ou réalisée par un automate) (Tableau 2) :

Tableau 2 : Numération plaquettaire comparée entre une méthode manuelle et l'utilisation d'un automate.

(d'après Teruko Fukuda et al. 2017)

Souris	Méthodes	Numération plaquettaire ($\times 10^4/\mu\text{L}$)
BALB 20 semaines	Manuelle	121 $\pm$ 13
	Automate	110 $\pm$ 22
C57BL/6	Manuelle	104 $\pm$ 18
	Automate	95 $\pm$ 15
DBA/1	Manuelle	107 $\pm$ 14
	Automate	94 $\pm$ 9

Plusieurs phases de l'activation plaquettaire peuvent être distinguées, à savoir l'adhérence initiale, l'activation au contact de la paroi lésée, la sécrétion et l'amplification de l'activation et enfin l'agrégation des plaquettes entre elles (Gresele et al. 2017). Ces différentes phases font intervenir un large éventail de récepteurs membranaires (Tableau 3).

Tableau 3 : Glycoprotéines membranaires des plaquettes participant à l'adhésion et à l'initiation de l'agrégation par liaison des ligands spécifiques.

(CAM : molécule d'adhésion cellulaire, GP : glycoprotéine, VWF : facteur de Willebrand)
(d'après Yu et al. 2012 et Zlamal et al. 2018)

Nom du récepteur plaquettaire	Intégrines	Ligands	Désignation du cluster	Commentaires
GPIa-IIa	$\alpha_2\beta_1$	Collagène	CD49b, CD29	L'avidité est régulée positivement via une activation qui dépend de la liaison du collagène à la GPVI
	$\alpha_v\beta_1$	Vitronectine		
	$\alpha_5\beta_1$	Laminine	CD49e, CD29	
	$\alpha_6\beta_1$	Fibronectine	CD49f, CD29	
GPVI		Collagène		Le récepteur clé du collagène, déclenche l'activation, la libération d'agonistes qui augmentent l'avidité des intégrines $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$
GPIb-IX-V		VWF et Thrombine	CD42a	25 000 copies à la surface des membranes plaquettaires
			CD42b	
			CD42c	
			CD42d	
GPIIb-IIIa	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogène, VWF	CD41, CD61	

a. Structure plaquettaire

Les plaquettes sont formées de trois structures principales : la zone périphérique, le cytoplasme et les organelles.

- La zone périphérique

La membrane plaquettaire présente une structure classique avec deux feuillets lipidiques (externe et interne) de composition différente. Les lipides membranaires sont constitués essentiellement de phospholipides (80 % du total lipidique). La phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont majoritairement situées dans le feuillet externe, tandis que la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol sont majoritaires dans le feuillet interne. Il existe une asymétrie de distribution des lipides membranaires, les charges négatives étant confinées essentiellement dans le feuillet interne : au cours de l'activation plaquettaire, les charges négatives migrent vers le feuillet externe, étape importante

qui va promouvoir la coagulation. La composition en acides gras des phospholipides est particulièrement riche en acide arachidonique : lors de l'activation plaquettaire il sera libéré par la phospholipase A2. Il faut noter également la présence des lipides neutres, surtout du cholestérol, qui permettent la stabilisation de la membrane.

Outre la membrane plasmique, il existe un système canaliculaire connecté à la surface : système canaliculaire ouvert. Il correspond à des invaginations profondes de la membrane plasmique au travers du cytoplasme, qui permet à la plaquette de disposer d'une surface membranaire importante en contact avec l'extérieur. Ce « réservoir » de membranes facilite l'étalement des plaquettes et fournit un plus grand nombre de molécules (glycoprotéines) accessibles en surface lors de leur activation.

Un système de membranes non connectées à la surface, le système tubulaire dense, correspond à du réticulum endoplasmique lisse résiduel du mégacaryocyte. Il contient les enzymes du métabolisme lipidique (essentiellement prostaglandines) comme la peroxydase plaquettaire, mais aussi des ATPases.

- Le cytoplasme

Il regroupe les divers composants structuraux de la plaquette : un faisceau de 8 à 24 microtubules (tubuline) en périphérie interne, permettant de maintenir la structure discoïde de la plaquette au repos (désassemblage lors de l'activation) ; également un réseau de microfilaments d'actine partant dans le cytoplasme, et un cytosquelette composé de petits filaments d'actine relié à la membrane externe (ils interviennent dans la contraction, la dégranulation, la rétraction du caillot et l'émission de pseudopodes) et des filaments intermédiaires de vimentine.

Les microfilaments d'actine se présentent sous forme dépolymérisée (actine G monomère) ou polymérisée (actine F). A l'état basal, des protéines comme la profiline, la thymosine β -4 et la gelsoline limitent la polymérisation ; l'activation de la plaquette entraîne la polymérisation de l'actine ce qui aboutit à une modification de forme, une redistribution des granules et des glycoprotéines membranaires.

- Les organelles

Les plaquettes renferment également dans leur cytoplasme de nombreux organelles telles que les mitochondries qui assurent le métabolisme énergétique, les grains de glycogène (réserves énergétiques) et les granules (décrits dans un paragraphe suivant).

b. Adhérence à la paroi vasculaire lésée

Lors d'une brèche vasculaire, de nombreuses protéines du sous-endothélium ainsi que des couches plus profondes du vaisseau sont exposées au sang circulant parmi lesquelles le VWF, différents types de collagènes, la fibronectine, des laminines, qui chacune interagissent avec des glycoprotéines réceptrices de la membrane des plaquettes. Ces interactions sont régulées en fonction de l'hémodynamique locale. Dans des conditions de flux rapide où les forces de cisaillement à la paroi sont élevées, comme cela peut exister dans les petites artères ou dans les vaisseaux sténosés, l'interaction initiale des plaquettes avec le substrat se fait par l'intermédiaire du VWF qui fait le pont entre le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX des plaquettes et le collagène du sous-endothélium (Marx et al. 2008, Ruggeri et al. 2007, Navarrete et al. 2012). La fonction principale de liaison du VWF est portée par la sous-unité GPIb α au niveau de son extrémité N-terminale extracellulaire. La liaison du VWF déclenche une signalisation intracellulaire qui entraîne des changements morphologiques des plaquettes avec émission de filopodes et l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ pour favoriser l'adhérence à la paroi lésée. Le complexe GPIb-V-IX participe également à l'activation des plaquettes par la thrombine via la sous-unité GPIb α qui possède un site de liaison à la thrombine. L'interaction entre le VWF et les plaquettes via GPIb α est réversible et permet aux plaquettes de rouler sur une surface de VWF. Le mécanisme de cette interaction rapide et réversible tient au fait que le VWF fixé aux protéines de la paroi lésée prend une conformation particulière qui expose des motifs de liaison spécifiques : le domaine A1 (Navarrete et al. 2012). Cette étape favorise les interactions avec d'autres protéines de la paroi et d'autres récepteurs des plaquettes qui mèneront à leur adhérence stable, leur activation, la mise en route de mécanismes de sécrétion et le recrutement de plaquettes circulantes afin de former le clou hémostatique. Les principales protéines de la matrice sous-endothéliale impliquées dans l'adhérence stable sont le collagène, puissant activateur des plaquettes via deux récepteurs, la glycoprotéine VI et l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, la fibronectine via l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, les laminines via l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ et le fibrinogène adsorbé à la paroi lésée, via l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Versteeg et al. 2013).

c. Activation par les agonistes solubles et leurs récepteurs

De nombreux agonistes solubles sont susceptibles d'activer les plaquettes sanguines parmi lesquels les plus importants sont l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), le thromboxane A₂ (TXA₂), la thrombine et la sérotonine. Ces médiateurs aux effets autocrines et paracrines agissent par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Sur chaque plaquette, 1000 à 2000 copies de ces récepteurs sont présentes (Offermanns et al. 2006) (Figure 8).

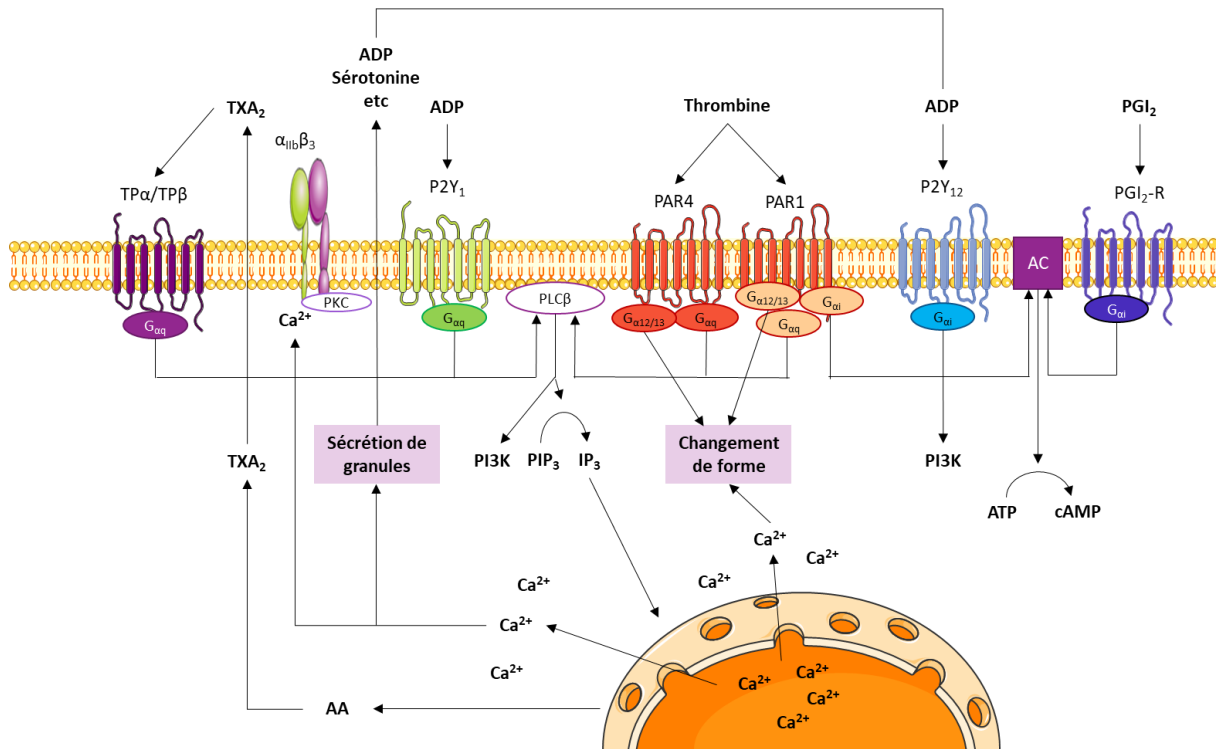


Figure 8 : La signalisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplée à la protéine G dans les plaquettes.

GTP : guanidine triphosphate ; PKC : protéine kinase C ; TXA₂ : thromboxane A₂ ; PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase ; PIP₂ : phosphatidylinositol biphosphate ; IP₃ : inosit-1,4,5-triphosphate ; PLA : phospholipase A ; AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; PGI₂-R : récepteur de la prostaglandine I₂ ; PAR : récepteur activé par protéase (d'après Jurk et al., 2005).

- Activation par la thrombine

La thrombine est l'activateur le plus puissant des plaquettes sanguines. Là aussi, deux récepteurs couplés aux protéines G sont impliqués dans l'activation des plaquettes par la thrombine, les récepteurs PAR1 et PAR4 (Coughlin et al. 2005) (Figure 9) chez l'homme et les récepteurs PAR3 et PAR4 chez les souris. Le mode d'activation de ces récepteurs est très original : dans son domaine N-terminal extracellulaire, le récepteur possède un site de clivage spécifique par la thrombine. Le clivage est à la fois nécessaire et suffisant pour l'activation du récepteur. Selon le modèle actuel d'activation du récepteur, la thrombine, en clivant son récepteur démasque une nouvelle extrémité NH₂ (hexapeptide) qui joue le rôle de ligand. Cet hexapeptide est responsable de l'effet cellulaire de la thrombine mais n'intervient pas dans son effet coagulant.

Ces récepteurs sont couplés aux protéines G_q et G_{12/13}. L'activation des plaquettes par la thrombine ou par les peptides activateurs des PARs (TRAP6 pour Thrombin Receptor

Activator Peptide 6 par exemple) induit la sécrétion du contenu granulaire et par voie de conséquence la stimulation de la voie G_i via l'activation du récepteur $P2Y_{12}$.

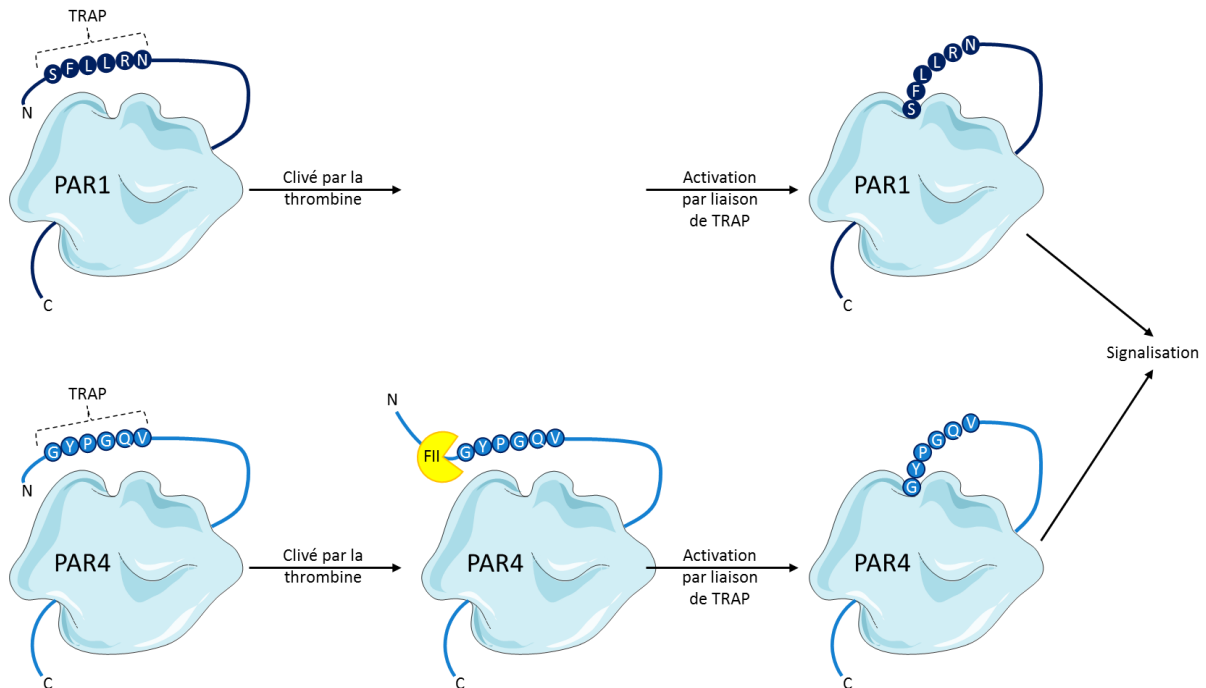


Figure 9 : Activation des récepteurs PARs par la thrombine.

La thrombine va cliver la partie N-ter et libérer la séquence TRAP qui pourra à son tour activer le récepteur. TRAP : Thrombin Receptor Activator Peptide (d'après Coughlin et al., 2000).

- Activation des plaquettes par l'ADP

L'ADP est contenue à très forte concentration dans les granules denses des plaquettes et sécrétée lors de l'activation. Son rôle est à la fois de renforcer l'activation et de stabiliser le clou plaquettaire. Les récepteurs aux nucléotides adényliques sont appelés récepteurs purinergiques P2. Les plaquettes sanguines possèdent deux récepteurs à l'ADP : $P2Y_1$ et $P2Y_{12}$. Le premier est couplé à la protéine G_q et est responsable de la mobilisation du calcium intracellulaire, du changement de forme et de l'initiation de l'agrégation. Le second couplé à la protéine G_i est impliqué dans la potentialisation de l'agrégation (Gachet et al. 2008). La sous unité α de la protéine G_i inhibe l'adénylate cyclase ce qui empêche l'accumulation de l'AMPc et l'activation de la PKA (Yang et al. 2002). Le dimère $\beta\gamma$ de cette protéine active la PI3 kinase qui va permettre la production du phosphatidyl inositol 3,4,5-triphosphate et à son tour va activer des effecteurs Akt et de la petite GTPase Rap1b (Hirsch et al. 2001).

- La voie du thromboxane A_2

Le TXA_2 est le métabolite instable de l'acide arachidonique qui est libéré par la phospholipase A_2 lors de l'activation des plaquettes. Le TXA_2 est à la fois un activateur des plaquettes et un

puissant vasoconstricteur. Il se lie avec des récepteurs membranaires spécifiques, les récepteurs TP, qui appartiennent à la classe des récepteurs des prostanoïdes (Feletou et al. 2010). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G de type G_q et $G_{12/G13}$, qui induisent respectivement de la mobilisation du calcium intracellulaire et de l'activation de la GTPase RhoA, responsable notamment des phénomènes contractiles des plaquettes.

- Activation par le collagène

Le collagène est le principal composant du sous endothélium avec lequel les plaquettes interagissent. Il existe 23 types de collagènes dont 9 sont présents dans la paroi vasculaire (I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII et XI). Les types I et III sont les constituants majeurs de la MEC. Outre la liaison au VWF circulant, le collagène peut interagir avec de nombreux récepteurs plaquettaires spécifiques dont les deux principaux sont l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et la GPVI. L'activation des plaquettes par le collagène entraîne le changement de forme des cellules, la formation de pseudopodes et filopodes, ainsi que la libération du contenu des granules de sécrétion.

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

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est l'intégrine majoritaire des plaquettes (entre 50 000 et 100 000 copies par plaquette) et joue un rôle central dans l'agrégation plaquettaire. Ce rôle est lié à sa capacité à modifier sa conformation d'une forme inactive de basse affinité à une forme de haute affinité pour ses ligands qui sont le fibrinogène et le VWF. Comme toutes les intégrines, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ a une structure en hétéro-dimère : une sous unité α et une sous unité β . La sous unité α_{IIb} est restreinte à la lignée mégacaryocytoplaquettaire tandis que la sous unité β_3 est ubiquitaire (par exemple, elle est également le partenaire de $\alpha_v\beta_3$ présente sur les plaquettes). Chaque sous-unité est composée d'un grand domaine extracellulaire, d'un seul domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. Les portions intracellulaires proches de la membrane plasmique et les domaines transmembranaires des deux sous-unités forment un complexe qui contraint l'intégrine dans sa conformation de repos. C'est la disjonction de ce complexe qui induit l'activation de l'intégrine et sa capacité à lier le fibrinogène. L'activation de $\alpha_{IIb}\beta_3$ est étroitement régulée par un processus appelé « signalisation inside-out », dans lequel des agonistes, tels que l'ADP et la thrombine, activent des récepteurs couplés aux protéines G, ou d'autres protéines adhésives, telles que le collagène ou le VWF, qui activent GPIb-IX-V ou GPVI. Ces activations initient des événements de signalisation intracellulaire (Rap) et des changements conformationnels initiés au niveau du cytoplasme (impliquant la liaison de la

taline) qui se propagent à travers la membrane jusqu'aux domaines extracellulaires de l'intégrine (Ma et al. 2007).

e. Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est un processus au cours duquel les plaquettes s'agrègent les unes aux autres sur les sites de lésion vasculaire et elle est essentielle à la formation d'un bouchon hémostatique (Figure 10). Pendant plus de trois décennies, les facteurs agissant sur l'agrégation plaquettaire sont apparus comme un concept simple : un stimulus plaquettaire (agoniste), une protéine adhésive soluble (fibrinogène) et un récepteur plaquettaire lié à la membrane (intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou GPIIb-IIIa). Bien que ces éléments centraux restent fondamentaux, les progrès techniques récents permettant une analyse en temps réel de l'agrégation plaquettaire *in vivo* ont mis en évidence un processus beaucoup plus complexe et dynamique. Les plaquettes sont exposées *in vivo* à un large éventail de conditions hémodynamiques, allant de débits relativement faibles dans les veinules et les grandes veines (taux de cisaillement de la paroi $< 500 \text{ s}^{-1}$) à de petites artérioles (taux de cisaillement de la paroi $< 5000 \text{ s}^{-1}$) et à des artères sténosées avec des taux de cisaillement de la paroi supérieurs à $40\,000 \text{ s}^{-1}$. Les plaquettes ont la capacité unique de former des contacts d'adhésion stables dans toutes les conditions de cisaillement. Des systèmes expérimentaux ont confirmé le rôle essentiel de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa) dans la médiation de l'agrégation plaquettaire dans toute la gamme de conditions de cisaillement opérant *in vivo*. Les études basées sur les flux ont joué un rôle crucial dans le développement du concept selon lequel l'adhésion des plaquettes (induite par le VWF et le collagène) est distincte de l'agrégation plaquettaire (induite par le fibrinogène) (Jackson et al. 2007).

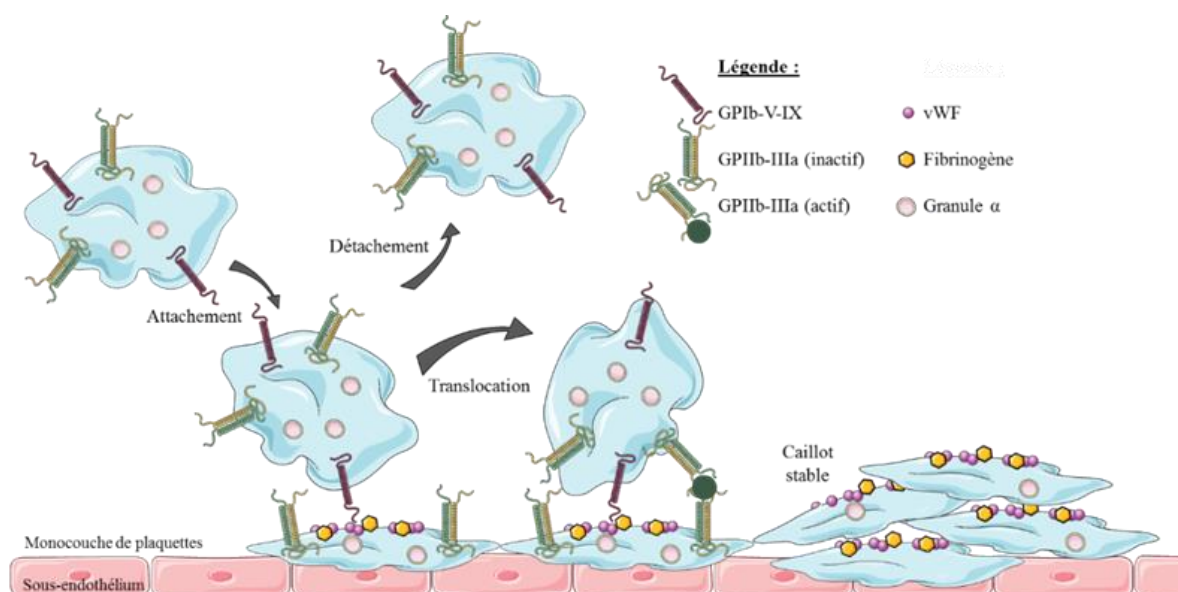


Figure 10 : Le mécanisme à plusieurs étapes par lequel les plaquettes en circulation forment des contacts d'adhésion stationnaires avec la surface luminale d'un thrombus en croissance dans des conditions d'écoulement physiologique.

Lors d'une lésion vasculaire, les plaquettes sont recrutées sur le sous-endothélium où elles s'activent et libèrent ainsi leur contenu granulaire. VWF exprimé à la surface de plaquettes immobilisées attache les plaquettes circulantes par liaison de GPIIb-IIIa. La majorité des plaquettes attachées renforcent leur accroche ou alors parfois se détachent. La formation de contacts d'adhésion stationnaires dépend de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par son changement de forme à la surface des plaquettes immobilisées et de la disponibilité en VWF ou en fibrinogène. Ce processus d'adhésion en plusieurs étapes fonctionne aux niveaux de cisaillements artériels et veineux et semble être le mécanisme prédominant par lequel les plaquettes s'agrègent in vivo. Toutefois, il convient de noter qu'au niveau du cisaillement veineux, les plaquettes peuvent également former des contacts d'adhésion stationnaires immédiats avec des plaquettes immobilisées indépendamment de l'interaction VWF-GPIIb. (D'après Kulkarni et al., 2000).

f. Les vésicules extracellulaires

Le sang contient des vésicules extracellulaires (VE) dérivées de différents types cellulaires. L'activation cellulaire et l'apoptose conduisent au bourgeonnement de la membrane plasmique et à la libération de VE dans l'espace extracellulaire. Les VE (appelées aussi microparticules, microvésicules ou ectosomes) sont de petites vésicules membranaires qui expriment toute une gamme de PPL et de protéines caractéristiques de la cellule d'origine. Elles sont dépourvues de noyau mais un cytosquelette membranaire persiste. Elles présentent à leur surface des antigènes de surface des cellules d'origine et des antigènes témoins de l'activation cellulaire. Leur diamètre est compris entre 0,1 et 1 μm . Elles diffèrent des exosomes par leur origine, leur contenu protéique et leur distribution de tailles. Principalement constituées de lipides et de protéines, elles peuvent contenir de l'ARNm, des virus, des prions et d'autres substances. Elles sont chargées négativement par la présence de phosphatidylsérine à leur surface. Durant leur

formation, le remodelage de la membrane plasmique est à l'origine de l'exposition de la phosphatidylsérine. Les VE du sang circulant sont principalement issues de plaquettes. Elles proviennent aussi d'hématies, granulocytes, monocytes, lymphocytes, cellules endothéliales et de cellules tumorales.

g. Les granules plaquettaires

- Les granules α

Les granules α sont les organelles plaquettaires majoritaires, avec environ 40 granules α par plaquette humaine et une dizaine par plaquette de souris et elles contiennent une grande diversité de protéines. Ils peuvent être de forme ovale ou allongée mais sont le plus souvent de forme sphérique et présentent un diamètre compris entre 200 et 500 nm. Ces granules contiennent des protéines de la MEC, des facteurs de croissance, des facteurs de coagulation, des inhibiteurs de protéases et encore des protéoglycanes. Lors de la sécrétion granulaire par exocytose, les membranes des granules α et la membrane plasmique fusionnent ce qui entraîne l'exposition de la P-sélectine à la surface plaquettaire c'est pourquoi le marquage de cette protéine par cytométrie en flux est un bon témoin de l'activation plaquettaire.

- Les granules δ

Ces granules, également nommés denses, sont estimés au nombre de 6 à 8 par plaquette humaine et 8 à 10 par plaquette de souris. Elles se présentent sous l'aspect de vésicules sphériques, ou parfois allongées, de 150 à 300 nm de diamètre. Ces organelles contiennent des composés non protéiques dont du calcium, de l'ADP, de l'ATP, des pyrophosphates, de la sérotonine et de l'histamine qui amplifient l'activation plaquettaire (Tableau 4).

- Les lysosomes

Les plaquettes contiennent des lysosomes primaires et secondaires qui renferment essentiellement des enzymes (hydrolases acides et métalloprotéases) et présentent une importante hétérogénéité. Ces organelles sont des vésicules sphériques de 175 à 250 nm qui présentent souvent un aspect similaire aux granules.

Tableau 4 : Principales substances contenues dans les granules plaquettaire ou à leur surface.

(d'après Fitch-Tewfik et al. 2013)

Granule α	Granule δ	Lysosome
Glycoprotéines adhésives (Fibrinogène, thrombospondine-1, fibronectine, vitronectine...) Facteurs de coagulation (FV, FXI, FXII, FT...) Inhibiteurs de la fibrinolyse (α_2 -antiplasmine, PAI-1...) Facteurs de croissance et chimiokines (PDGF, TGF β , EGF, VEGF, PF4...) P-sélectine Albumine	ADP ATP Sérotonine Pyrophosphate Ca²⁺	Hydrolases acides (cathepsines...) Métalloprotéases (collagénases...)

h. La microvésiculation

La dernière étape de l'activation plaquettaire correspond à l'externalisation des phospholipides anioniques procoagulants. Ce sont des surfaces indispensables pour permettre les différentes réactions enzymatiques de la cascade de coagulation.

La membrane plasmique est organisée en bicouche. Elle est essentiellement composée de lipides, protéines et protéoglycanes. Au repos, la membrane présente une asymétrie transversale de répartition de ses phospholipides. Des enzymes maintiennent l'équilibre asymétrique de la membrane en assurant le trafic des phospholipides. La flippase est une aminophospholipide translocase spécifique du trafic de la phosphatidylsérine et de la phosphatidyléthanolamine. Elle permet le mouvement de la face externe du feuillet vers la face interne par un mécanisme ATP-dépendant. Lors d'un influx de calcium cytosolique comme lors de l'activation cellulaire, la flippase est inhibée. Le trafic de la phosphatidylcholine et des aminophospholipides est conditionné par la floppase. Elle permet des mouvements du feuillet interne vers le feuillet externe. Par le biais du « flip-flop » (passage d'un lipide membranaire d'un feuillet à l'autre), des phospholipides anioniques et procoagulants se retrouvent à la face externe de la membrane. Une troisième enzyme, appelée scramblase, induit une perte de

l'asymétrie des phospholipides suite à une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Les PPLa se retrouvent alors à la surface externe du feuillet (Figure 11).

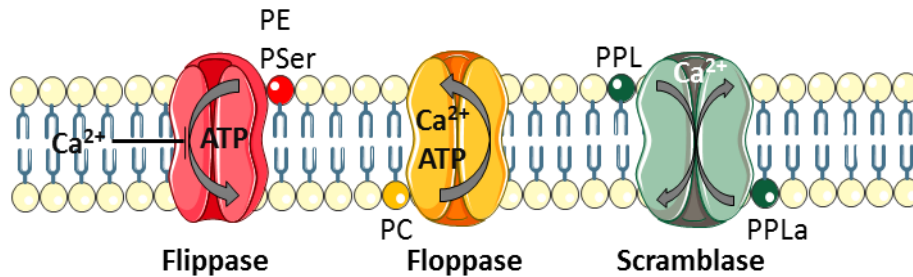


Figure 11 : Représentation schématique du fonctionnement de la flippase, floppase et scramblase.

(d'après Burnier et al., 2009. (PSer : phosphatidylsérine, PE : phosphatidylethanolamine, PC : phosphatidylcholine, PPL : phospholipide, PPLa : phospholipide anionique))

Le syndrome de Scott est une maladie hémorragique extrêmement rare, de transmission autosomique récessive. Les patients présentant ce syndrome ont un bilan d'hémostase normal à l'exception du test de consommation de prothrombine. L'anomalie génétique se traduit en effet par un défaut d'exposition de phosphatidylsérine à la surface des plaquettes stimulées, mécanisme essentiel pour l'assemblage des complexes d'activation de la coagulation. L'émission de VE plaquettaires procoagulants est en outre pratiquement inexistante chez ces patients, ce qui contribue probablement à la tendance hémorragique. La découverte de TMEM16F en tant que composant essentiel pour l'activité de la scramblase calcium-dépendant et l'identification d'une mutation de cette protéine chez les patients atteints du syndrome de Scott, en font une protéine d'intérêt pour les recherches futures dans ce domaine (Lhermusier et al. 2011).

B. Les cellules musculaires lisses de la média

a. Localisation et caractérisation des CMLVs

Les CMLVs représentent la population cellulaire majeure des artères. Elles sont essentiellement localisées dans la média, couche intermédiaire de la paroi vasculaire. Les CMLVs sont des cellules mononucléées, adhérentes et différenciées. Cette différenciation se caractérise par l'expression de protéines spécifiques telles que l' α -SMA, la caldesmone, la smootheline, la chaîne lourde de myosine du muscle lisse (SM-MHC) ou encore la métavinculine, qui leur permettent de maintenir le tonus contractile des artères de résistance, la régulation de la pression artérielle et la distribution du flux sanguin (Korff et al. 2013, Lacolley et al. 2017). Ces protéines sont des marqueurs de différenciation cellulaire et non pas des marqueurs de lignée cellulaire qui

permettraient de distinguer les CMLVs des autres types cellulaires. A titre d'exemple, l' α -SMA est largement exprimée par les CMLVs (jusqu'à 40 % des protéines des CMLVs) et elle joue un rôle dans la contraction de ces cellules. Néanmoins, cette protéine s'exprime également de façon transitoire dans les cardiomyocytes (Woodcock-Mitchell et al. 1988), les CEs (Arciniegas et al. 1992), les fibroblastes (Sartore et al. 2001) ou les cellules tumorales (Cintorino et al. 1989). C'est pourquoi l'identification de la lignée des CMLVs nécessite l'utilisation de plusieurs marqueurs.

b. Phénotype contractile versus sécrétoire

Les CMLVs constituant la média des artères saines sont principalement au repos et très différenciées. Cependant, contrairement aux cellules musculaires squelettiques et cardiaques, elles conservent un potentiel élevé de dédifférenciation et de plasticité (Figure 12).

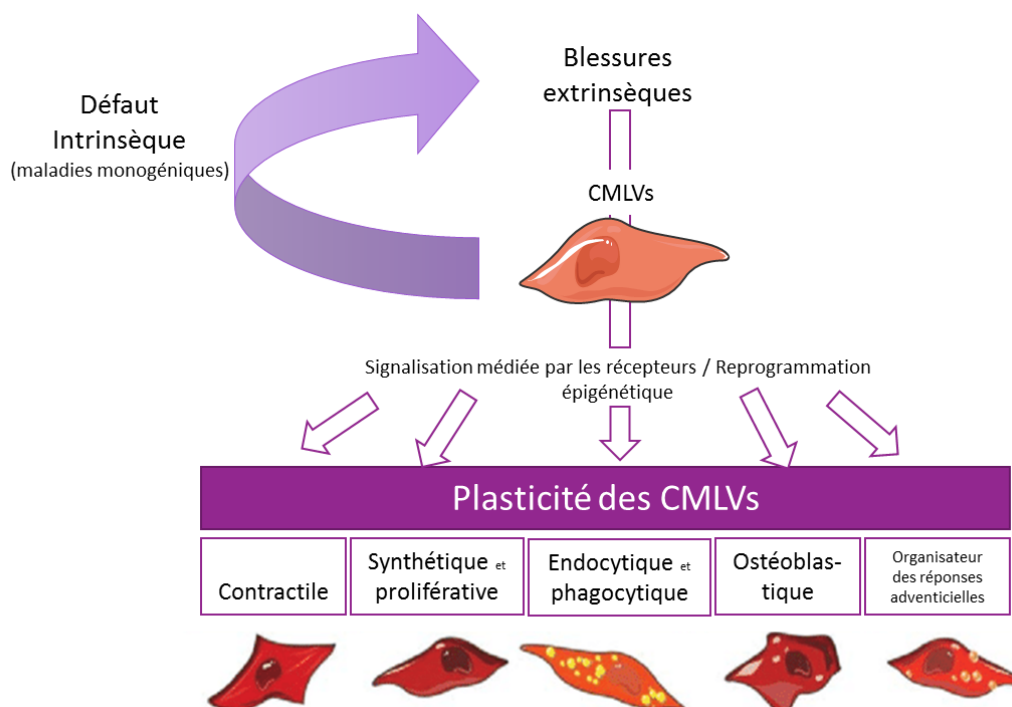


Figure 12 : Plasticité des CMLVs.

Les CMLVs reprogramment leurs voies de signalisation en réponse à des stimuli aigus et chroniques principalement par des interactions ligand – récepteur et des processus épigénétiques (d'après Michel et al., 2012).

Ce phénomène est connu sous le nom de modulation ou de changement phénotypique des CMLVs (Figure 13). Ce processus a lieu, par exemple, au cours du vieillissement (Lacolley et al. 2018), lors de la formation des plaques d'athérosclérose ou suite à la pose de stent ou à une angioplastie chez l'homme. Dans les artères de rat, de lapin et de porc après une lésion endothéliale induite de manière expérimentale ou un régime hypercholestérolémique, les CMLVs originaires de la média s'accumulent dans l'intima et présentent une dédifférenciation

phénotypique. Dans ces situations pathologiques et expérimentales, les CMLVs acquièrent un phénotype sécrétoire. Cette transition phénotypique est possible grâce à un passage graduel d'un état différencié à un état dédifférencié, défini par la diminution ou la perte de plusieurs protéines du cytosquelette spécifiques des CMLVs. L'expression de l' α -SMA, l'isoforme d'actine propre aux CMLVs vasculaires, est réduite ou perdue au cours de ce processus de dédifférenciation ainsi que la SM-MHC, la calponine, la caldesmone... (Allahberdian et al. 2018).

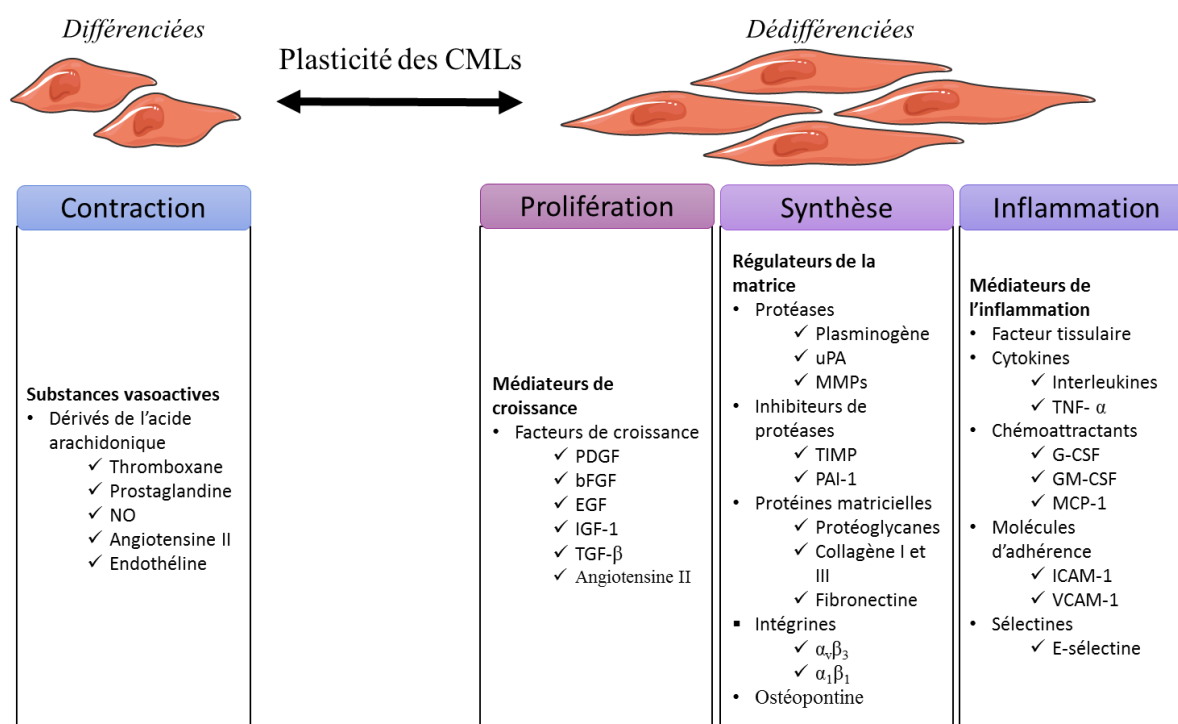


Figure 13 : Rôle de différents médiateurs sur la plasticité des CMLVs : contraction, prolifération, synthèse de la matrice et inflammation.

La plupart des médiateurs synthétisés sont multifonctions. Cette liste n'est pas exhaustive. Par exemple, l'angiotensine II est un vasoconstricteur mais stimule aussi la prolifération. TNF, facteur de nécrose tumorale ; G-CSF : facteur stimulant les colonies de granulocytes ; GM-CSF : facteur stimulant les colonies de granulocytes – monocytes ; MCP : protéine chimioattractante de monocytes ; ICAM : molécule d'adhésion intracellulaire ; VCAM : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; bFGF : facteur de croissance basique des fibroblastes ; EGF : facteur de croissance épidermique ; IGF : facteur de croissance analogue à l'insuline ; TGF : facteur de croissance transformant ; uPA : activateur du plasminogène de type urokinase ; MMP : métalloprotéinases matricielles ; TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases ; PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène (d'après Dzau et al., 2002).

c. Génération de thrombine à la surface des CMLVs

La régulation de l'hémostase dépend de la collaboration entre les cellules de la paroi et le système de la coagulation. La formation de thrombi artériels peut aboutir à différentes manifestations cliniques, telles que l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral.

La formation du thrombus implique la génération de thrombine, qui active les plaquettes et catalyse la formation de la fibrine. L'activation protéolytique de la prothrombine a lieu en présence de PPL membranaires. Ces PPL servent de plateforme nécessaire à l'action de la prothrombinase. Le modèle le plus courant pour étudier la génération de thrombine utilise les plaquettes comme composante cellulaire. Cependant, la génération de thrombine a été également observée dans des systèmes utilisant les CMLVs, les CEs et les macrophages (*Pathak et al. 2005*). Les conditions nécessaires pour la génération de thrombine par les CMLVs sont : (1) l'assemblage du complexe prothrombinase sur une surface de PPLa (*Flynn et al. 1997*) ; le FXa, le FVa (*Rodgers et al. 1988*), le calcium et les PPL sont généralement fournis par les plaquettes activées mais également par les CMLVs quel que soit leur phénotype, apoptotique ou non apoptotique (Figure 14) ; (2) la présence de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sous sa forme activée. L'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est nécessaire pour l'adhésion de la prothrombine aux surfaces des CMLVs (récepteur-dépendant) (*Byzova et al. 1998*). Ainsi, cette liaison facilite la génération de thrombine au niveau des CMLVs (*Mao et al. 2012*).

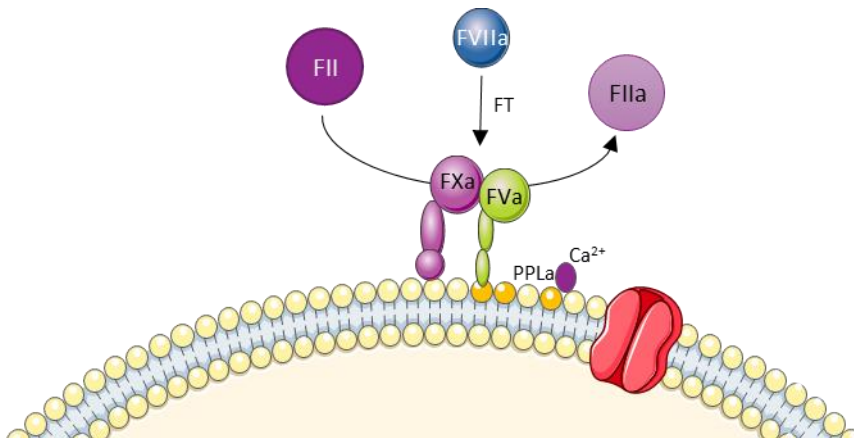


Figure 14 : Schéma de la génération de thrombine à la surface des CMLVs.

Pour générer de la thrombine (FIIa) à partir de la prothrombine (FII), les éléments nécessaires sont les facteurs VII, X et V, activés (a), le facteur tissulaire (FT), des surfaces phospholipides anioniques (PPLa), et du calcium.

III. Signalisation via les protéines G dans les plaquettes et les CMLVs

A. Signalisation plaquettaire

a. Les protéines G et leurs agonistes

Les protéines G sont essentiellement impliquées dans la deuxième étape de la formation du caillot. L'ADP est stockée dans les granules denses plaquettaires. Elle est libérée pendant l'activation des plaquettes. Elle active les plaquettes via les deux RCPGs, P2Y₁ et P2Y₁₂. Ce

premier récepteur est couplé à G_q alors que le second est couplé à G_i . Cette activation dépend des PARs qui sont couplés à G_q , $G_{12/13}$ et dans certains cas G_i . Cependant, cette dernière association est remise en question. En effet, divers travaux sont en faveur d'une participation indirecte consécutive à l'activation induite par l'ADP secrété (Kim et al. 2002). PAR1 est impliqué dans l'activation plaquettaire en réponse à une faible concentration en thrombine alors que PAR4 contribue à cette activation quand la thrombine est à une forte concentration. PAR3 fonctionne comme un co-récepteur de PAR4 chez la souris car il facilite le clivage et l'activation de PAR4 en présence d'une concentration faible ou intermédiaire en thrombine (Schrör et al, 2010). Comme l'ADP, le TXA_2 fonctionne comme un médiateur pendant l'activation plaquettaire. Son action est restreinte localement car il a un temps de demi-vie très court. Son récepteur TP est couplé à G_q et $G_{12/13}$. Chaque médiateur a la possibilité d'augmenter la fabrication de la thrombine et la sécrétion du TXA_2 et de l'ADP : leurs effets sont alors amplifiés et toutes les voies de signalisation dépendantes des protéines G sont activées (Tableau 5).

Tableau 5 : Principaux stimuli plaquettaires agissant via les RCPGs et phénotypes observés chez la souris déficiente pour ces récepteurs.
(d'après Offermanns et al. 2006)

Agoniste et récepteur	Protéine G	Phénotype plaquettaire <i>in vitro</i>	Phénotype plaquettaire <i>in vivo</i>
ADP	P2Y ₁ G_q	Absence de Ca^{2+} transitoire et de changement de forme en réponse à l'ADP ; agrégation réduite en réponse à l'ADP	Temps de saignement modérément prolongé ; un peu protégé contre les événements thromboemboliques
	P2Y ₁₂ G_i	Agrégation fortement réduite et inhibition de la formation d'AMPC, mais taux de Ca^{2+} transitoires et changement de forme en réponse à l'ADP normaux ; agrégation réduite en réponse à la thrombine et au collagène	Temps de saignement fortement prolongé ; protégé contre les événements thromboemboliques ; altération de la formation de thrombus

Thrombine			
PAR1	G_q , $G_{12/13}$, (G_i)		
PAR3		Agrégation et sécrétion réduites en réponse à la thrombine	Temps de saignement prolongé ; formation de thrombus instable ; protection contre les événements thromboemboliques
PAR4	G_q , $G_{12/13}$	Complètement insensible à la thrombine	Temps de saignement fortement prolongé ; formation de thrombus instable ; protégé contre les événements thromboemboliques
TXA2			
TP	G_q , $G_{12/13}$	Absence de réponse au TXA2	Temps de saignement prolongé ; réduction de la prolifération vasculaire induite par une lésion ; progression réduite de l'athérosclérose
Epinéphrine			
$\alpha 2A$	G_z	Absence de réponse à l'épinéphrine	Temps de saignement modérément prolongé ; altération de la formation de thrombus
Prostaglandine E2			
EP3	G_i	Absence de réponse à la prostaglandine E2	Temps de saignement modérément prolongé ; absence de formation d'un thrombus en réponse à l'acide arachidonique
Sérotonine			
5-hydroxytryptamine 2A	G_q	NA	NA

Parmi les protéines G, G_i , G_q , G_{13} et G_{12} ont un rôle dans l'activation plaquettaire qui a été démontré et leurs implications sont décrites dans le tableau 6 qui liste les phénotypes plaquettaires *in vitro* et *in vivo* chez des souris déficientes pour une de ces sous-unités.

Tableau 6 : Phénotypes plaquettaires chez les souris déficientes pour une sous-unité de protéine G.

(d'après Offermanns et al. 2006)

Sous-unité de la protéine G	Effecteur	Phénotype plaquettaire <i>in vitro</i>	Phénotype plaquettaire <i>in vivo</i>
G_{ai2}	⊃AC : ⌈PI3K	Agrégation réduite et inhibition de la formation de l'AMPc en réponse à l'ADP et à la thrombine ; changement de forme normal	NA
G_{ai3}	⊃AC : ⌈PI3K	Aucun défaut apparent	NA
G_{az}	⊃AC	Agrégation réduite et inhibition de la formation d'AMPc en réponse à l'épinéphrine ; changement de forme normal	Aucun défaut de saignement manifeste dans une étude ; volume de saignement accru dans l'autre ; protège contre les événements thromboemboliques induits par le collagène / épinéphrine
G_{aq}	⌈PLCβ	Absence de production d'IP3 et de Ca ²⁺ transitoire ; agrégation et sécrétion en réponse à TXA ₂ , ADP et thrombine : changement de forme normal et activation de RhoA en réponse à la thrombine et au TXA ₂ mais pas à l'ADP	Augmentation du temps de saignement ; protège contre les événements thromboemboliques induits par le collagène / épinéphrine
G_{α12}	⌈RhoGEF	Aucun défaut apparent	Aucun défaut apparent
G_{α13}	⌈RhoGEF	Agrégation et sécrétion réduites en réponse au TXA ₂ et à la thrombine ; altération du changement de forme et de l'activation de RhoA	Augmentation du temps de saignement ; protège contre la thrombose artérielle

La famille G_{q/11} couplée à l'isoforme β de la phospholipase C (PLC) est présente dans les plaquettes. L'activation de la PLC résulte en la formation d'IP3 et de diacyl glycérol, ce qui entraîne l'augmentation du calcium libre intracytoplasmique et l'activation de la protéine kinase C. La plupart des cellules d'un mammifère expriment à la fois G_q et G₁₁ : les plaquettes sont une exception car elles contiennent uniquement G_q, ou tout du moins aucun rôle physiologique

pour G_{11} n'a été démontré dans les plaquettes. G_{13} , membre de la famille $G_{12/13}$, régule plusieurs voies de signalisation dont la Rho/RhoKinase qui est la plus étudiée. G_{13} activée se lie et active un sous-groupe spécifique de facteurs d'échanges nucléotidiques. Les protéines G de type G_i peuvent réguler plusieurs canaux ou enzymes telles que l'adenylyl cyclase ou PI3K (Offermans et al. 2006) (Figure 15).

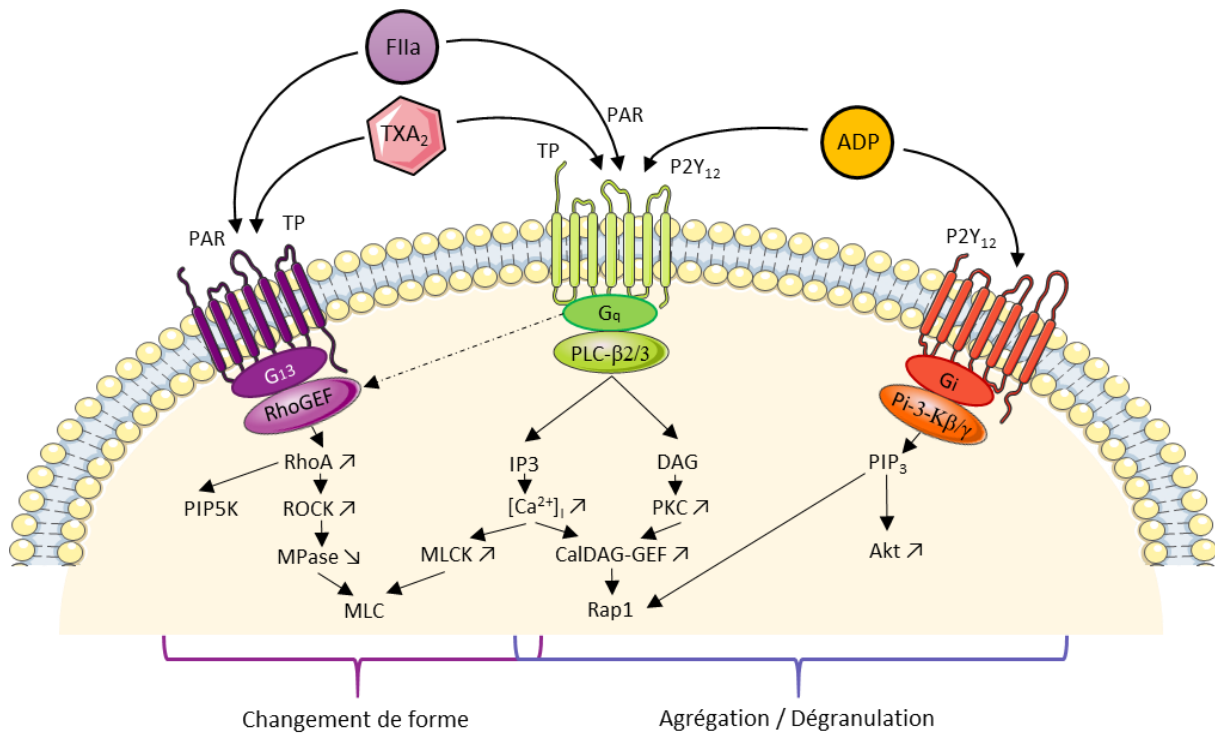


Figure 15 : Voies de signalisation déclenchées par les récepteurs couplés aux protéines G dans les plaquettes.

Principaux mécanismes de signalisation reliant l'activation des RCPGs par l'ADP, le TXA₂ et la thrombine (FIIa) via les protéines G G_{13} , G_q et G_i engendrant le changement de forme plaquettaire, l'agrégation ou la dégranulation (d'après Offermanns et al., 2006).

Les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS) régulent de manière négative les RCPGs en agissant comme les protéines à activité GTPase (GAP) et en facilitant le retour à la forme inactive des protéines G (Figure 16).

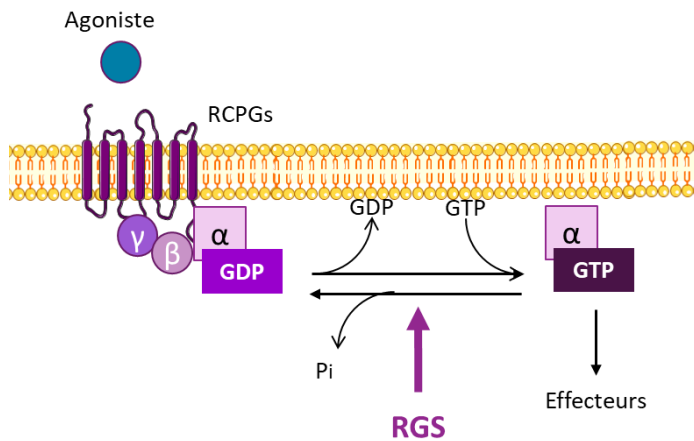


Figure 16 : La liaison des agonistes aux RCPGs induit un changement de conformation qui facilite l'échange du GDP contre du GTP sur la sous-unité α du complexe hétérotrimérique. Le $G\alpha$ lié au GTP sous forme active et le dimère $G\beta\gamma$ libéré peuvent ensuite stimuler un certain nombre d'effecteurs en aval. Les protéines RGS ont pour fonction de mettre fin à la signalisation par les RCPGs en accélérant l'activité GTPase intrinsèque de $G\alpha$ et en favorisant la réassociation du complexe hétérotrimérique avec le récepteur situé au niveau de la membrane cellulaire. (d'après Stewart et al., 2014)

Plus de 30 RGS ont été identifiés grâce à un domaine conservé et ils participent à la fixation des sous-unités G_i , G_q et/ou $G_{12/13}$ et également à l'activité des GAPs. Les plaquettes des rongeurs et des hommes expriment des RGS communs tels que RGS2, 10, 16 et 18. Chez des souris déficientes pour RGS10, l'agrégation, la sécrétion et l'activation des intégrines plaquettaires sont augmentées par rapport aux souris contrôles. Le temps de saignement à la queue est diminué ainsi que le temps d'apparition d'un thrombus occlusif en réponse à l'application de $FeCl_3$ (Hensch et al. 2016). Les mêmes résultats sont obtenus chez des souris déficientes pour RGS18 (Alshboo et al. 2015). Ces résultats suggèrent que les RGS modulent l'hémostase et la fonction plaquettaire.

b. Les RhoGTPases dans les fonctions plaquettaires

Les RhoGTPases forment une des cinq familles de la superfamille des Ras. Chez les mammifères, la famille des RhoGTPases comprend 20 molécules qui interviennent dans la signalisation intracellulaire (Loirand et al. 2010 ; Hall et al. 2012).

Les plaquettes contiennent des membres de la famille Rho classiques ainsi que des GTPases Rho atypiques telles que RhoBTB1. Les Rho GTPases Rac, RhoA et Cdc42, ont un rôle établi en tant que régulateurs de la fonction plaquettaire (Figure 17).

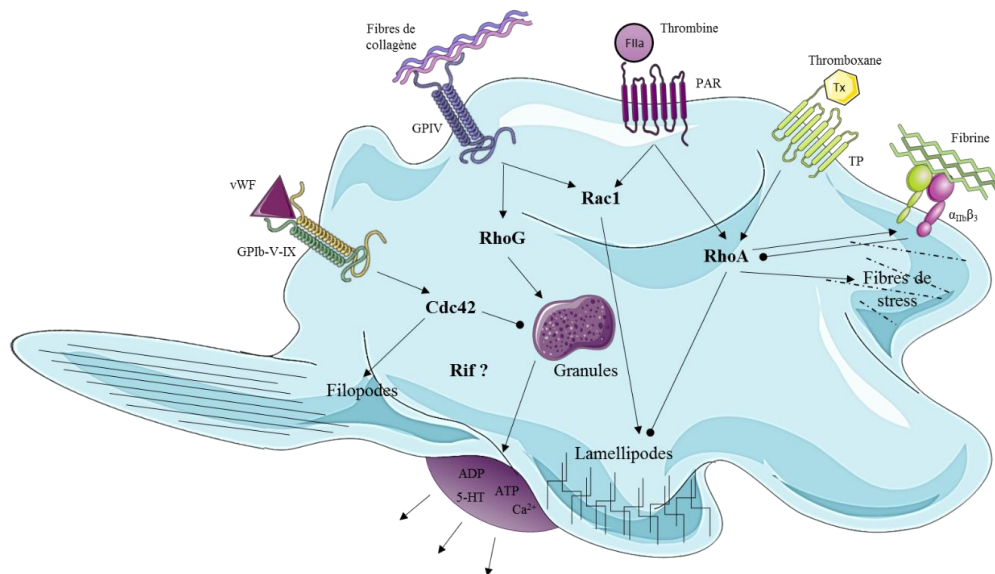


Figure 17 : Représentation schématique des rôles connus de Cdc42, Rac1 et RhoA dans le changement de forme et la sécrétion plaquettaire.

Cdc42 joue un rôle dans la régulation de la sécrétion des granules et est en partie responsable de la formation des filopodes plaquettaires. Rac1 est impliqué dans la formation des lamellipodes en aval des interactions collagène-GPVI et thrombine-PAR. RhoA est également impliqué dans la régulation de la formation des lamellipodes, de l'activation des intégrines et est responsable de la formation des fibres de stress (d'après Goggs et al., 2015).

Les études de transcriptomique et de protéomique suggèrent également que les plaquettes humaines expriment d'autres membres de la famille Rho classique, tels que RhoB, RhoC, RhoH et RhoQ mais les fonctions de la plupart de ces autres RhoGTPases sont inconnues dans les plaquettes. Une des fonctions principales des RhoGTPases est la régulation du cytosquelette d'actine mais elles sont également impliquées dans un certain nombre d'autres voies biochimiques. Elles contrôlent la PLC et la phosphoinositide-3-kinase et régulent la dynamique des microtubules, la sécrétion et les contacts cellule-cellule. Cette diversité fonctionnelle est permise par la liaison d'une large gamme de protéines effectrices à la GTPase active chargée de GTP (Tableau 7).

Tableau 7 : Effecteurs RhoGTPases plaquettaires.

Une liste de protéines effectrices connues pour RhoA, Rac1 et Cdc42 compilée à partir de Bishop and Hall

GTPase	Effecteur	Action biologique
RhoA	IP3R1	Entrée de calcium dans les cellules endothéliales
RhoA	PI4,5PK	Modulation du niveau de phosphatidylinositol biphosphate
RhoA	KCNA2	Entrée de potassium
RhoA	PPP1R12A	Inactivation des MLC, régulation du cytosquelette
RhoA	PNK1,2	Recyclage des vésicules, activation de PLD1
RhoA	ROCK1,2	Blocage de l'inhibition du contact cellulaire
Cdc42	CoqG2	Trafic de vésicules (route de la clathrine)
Cdc42	N-WASP	Régulation du cytosquelette via le complexe Arp2 / 3
Cdc42	Trip10	Liaison de WASP aux microtubules
Cdc42	P70S6K	Régulation de la traduction, cycle cellulaire
Rac1	FHOD1	Changement du cytosquelette et transcriptionnel
Rac1	FMNL1	Organisation du cytosquelette, polarité cellulaire, cytokinèse
Rac1	CybA	Production de superoxyde
Rac1	ARFIP2	Régulation du cytosquelette
Rac1	CYFIP1,2	Régulation du cytosquelette via les protéines WASF
Rac1	MTSS1	Organisation du cytosquelette via WASF / WAVE
Rac1	NCK1	Formation de complexes avec WASP, transduction du signal
Rac1	NCKAP1	Régulation du cytosquelette avec les protéines WASF
Rac1	WASP	Régulation du cytosquelette via le complexe Arp2 / 3
Rac1	α -tubuline	Composant intégral de microtubules
RhoA / Rac1	DIAPH1,2	Changement du cytosquelette via la profiline et IRSp53
Cdc42 / Rac1	NCF1,2	Production de superoxyde
Cdc42 / Rac1	PLC β 2	Production de seconds messagers
Cdc42 / Rac1	PIK3R1	Régulation de l'activité PIK3C, transduction du signal
Cdc42 / Rac1	IQGAP1,2	Régulation du cytosquelette, contact cellule à cellule
Cdc42 / Rac1	Cdc42SE1,2	Modulation des sorties de signalisation GTPase
Cdc42 / Rac1	Pard6A,G	Liens GTPases et PKC atypiques
Cdc42 / Rac1	WAVE/Scar1,2	Régulation du cytosquelette via le complexe Arp2 / 3
Cdc42 / Rac1	Cdc42bpgB	Régulation du cytosquelette
Cdc42 / Rac1	PAK2	Organisation du cytosquelette, activation de la kinase
Cdc42 / Rac1	Stat3	Transcription
RhoA / Cdc42 / Rac1	Filamine A	Régulation du cytosquelette réticulation des filaments d'actine
RhoA / Cdc42 / Rac1	Kinectine1	Liaison à la kinésine, trafic vésiculaire aux microtubules
RhoA / Cdc42 / Rac1	PKC α	Transduction du signal

- RhoA

RhoA joue un rôle multifonctionnel dans la biologie plaquettaire. Au cours du développement des plaquettes, RhoA a été proposée pour réguler l'endomitose des pro-mégacaryocytes, la formation des proplaquettes et la libération des plaquettes, en plus d'avoir un rôle dans l'activation plaquettaire. Ces processus ont déjà été étudiés à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques *in vitro* mais ils présentent des inconvénients potentiels, tels que des inhibitions ou perturbations incomplètes des protéines cibles visées. C'est pourquoi une souris knock-out conditionnelle pour RhoA dans les mégacaryocytes a été développée. Il est démontré que la suppression de RhoA dans les mégacaryocytes *in vivo*, entraîne d'importantes macrothrombocytopénies. Les mégacaryocytes privés en RhoA sont plus gros, ont une ploïdie moyenne plus élevée et présentent une rigidité membranaire plus élevée. Les mégacaryocytes libèrent rapidement des plaquettes mais le niveau plaquettaire chute en quelques heures. En effet, les changements dans la rhéologie de la membrane provoquent la libération de plaquettes anormales qui sont instables. Ces plaquettes sont rapidement éliminées de la circulation ce qui entraîne la macrothrombocytopénie. Ces observations démontrent que RhoA est essentiel au maintien du développement de mégacaryocytes normaux et à la production de plaquettes normales (Suzuki *et al.* 2013) (Figure 18).

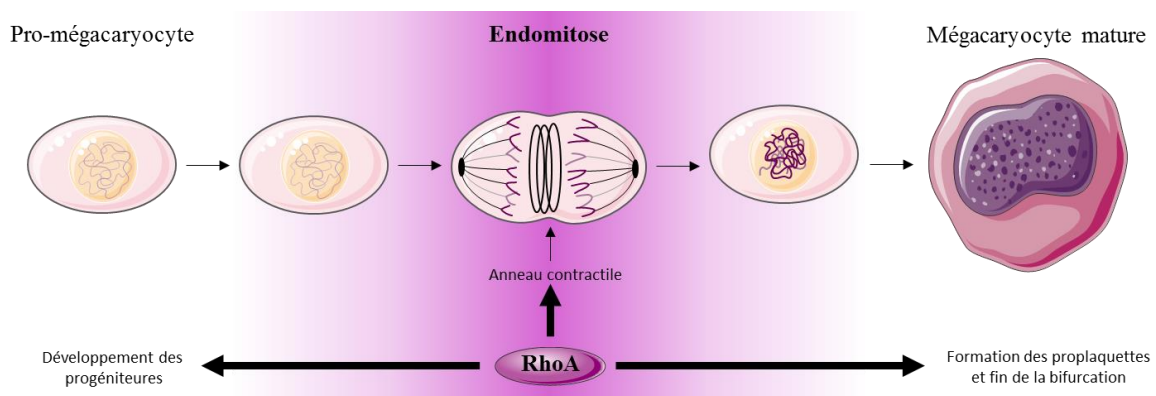


Figure 18 : RhoA est essentiel pour deux étapes de la production des plaquettes.

*RhoA coordonne la cytokinèse des promégacaryocytes et l'endomitose des mégacaryocytes en régulant les effecteurs qui contrôlent l'anneau contractile d'actine (d'après Suzuki *et al.*, 2013).*

Dans les plaquettes, l'activation de RhoA provoque le changement de forme après l'activation. Suite à la stimulation des plaquettes avec de la thrombine ou le mimétique U46619 du TXA₂, RhoA est activée par Arhgef1 (p115RhoGEF). Ce GEF de RhoA est stimulé par l'activité des sous unités Gα₁₃ des récepteurs à la thrombine et au TXA₂. RhoA peut agir par l'intermédiaire

de mDia1 pour polymériser de nouveaux filaments d'actine et par l'intermédiaire de ROCK et LIM-kinase pour stabiliser les filaments d'actine (Figure 19).

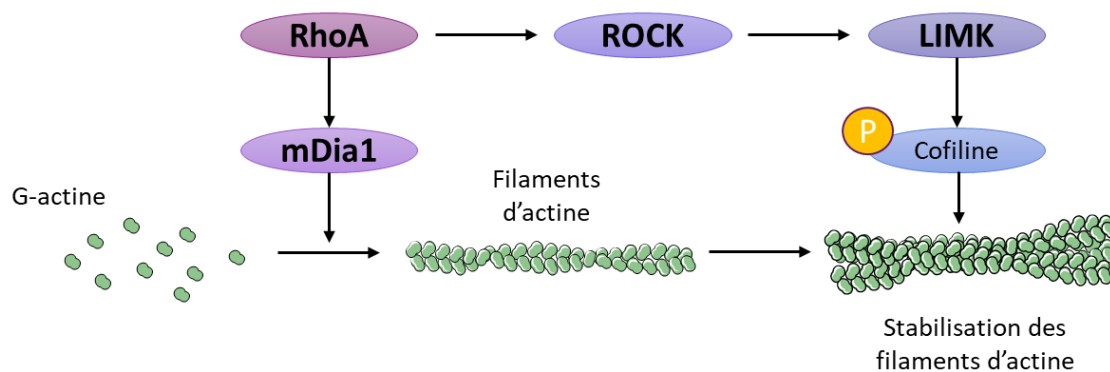


Figure 19 : Stabilisation des filaments d'actine dans les plaquettes.

mDia1 activée par *RhoA* rend possible la polymérisation des G-actines en filaments d'actine. Ces derniers sont stabilisés grâce à l'intervention de la Cofiline phosphorylée par la kinase LIM (d'après Faix et al., 2006).

RhoA est également capable de provoquer la contraction de la myosine par le biais de la phosphorylation de la protéine de ciblage de la myosine phosphatase et de l'inhibition de l'activité phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLC). La régulation de RhoA dans les plaquettes est complexe car, après l'activation initiale, la signalisation de $\alpha_{IIb}\beta_3$ inhibe la GTPase, permettant ainsi à l'étalement plaquettaire d'avoir lieu. Par la suite, cette inhibition est levée et RhoA peut alors aider à stabiliser les thrombi sous cisaillement (Schoenwaelder et al. 2002) et assurer la formation de fibres de stress et la rétraction du caillot (Flevaris et al. 2007). RhoA est nécessaire à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, à la sécrétion des granules denses et à la rétraction du caillot et son abolition se traduit *in vivo* par des défauts hémostatiques et thrombotiques (Pleines et al. 2012).

- Cdc42

Cdc42 est fortement exprimée dans les plaquettes (Burkhart et al. 2012) et est activée par la stimulation à la thrombine ou lorsque les plaquettes s'étalent sur le collagène. Cdc42 effectue une translocation vers le cytosquelette d'actine suite à la stimulation des récepteurs PAR ou P2Y : événement qui nécessite l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, la polymérisation de l'actine et une activité tyrosine kinase (Dash et al. 1995). Bien qu'elle soit connue pour être activée dans les plaquettes, les fonctions de Cdc42 dans les plaquettes ne sont actuellement pas claires. Des études utilisant la sécramine A, un inhibiteur de la GTPase, ont suggéré que Cdc42 était

nécessaire à la formation des filopodes plaquettaires (*Pula et al. 2008*). Ces filopodes permettent un ralentissement de la circulation des plaquettes et leur première accroche à l'endothélium. La sélectivité de cet inhibiteur a été toutefois mise en doute et d'autres études ont depuis utilisé une stratégie de délétion du gène chez la souris afin d'étudier la fonction du Cdc42 dans les plaquettes. L'utilisation d'un système piloté par PF4-Cre (Cre pour *causes recombination*) pour réaliser une délétion spécifique du gène Cdc42 dans les mégacaryocytes et par conséquent dans les plaquettes chez la souris, entraîne une macrothrombocytopénie légère ($\sim 500 \times 10^3/\mu\text{l}$) et une durée de vie des plaquettes plus courte (*Pleines et al. 2010*). De manière surprenante, les plaquettes Cdc42^{-/-} forment des filopodes avec une morphologie normale sur des surfaces recouvertes de fibrinogène, démontrant que des voies indépendantes de Cdc42 pour la formation des filopodes existent dans les plaquettes. Cdc42 n'est pas totalement redondante dans les plaquettes, car la formation des filopodes sur le VWF est défectueuse pour les plaquettes Cdc42^{-/-}, ce qui suggère que Cdc42 pourrait être couplée spécifiquement à GPIb. Le phénotype principal des plaquettes de ces souris est l'augmentation de la sécrétion en réponse aux agonistes de GPVI qui sont le collagène et le CRP (peptide lié au collagène) mais pas en réponse à la thrombine et l'U46619 (mimétique du thromboxane). Cdc42 fonctionne alors normalement comme un régulateur négatif de la sécrétion des plaquettes. Cette sécrétion accrue se traduit par une augmentation de la formation des thrombi *in vivo*, mais curieusement, ces souris ont des temps de saignement à la queue plus longs.

- Rac

Trois isoformes de Rac existent, mais seulement Rac1 et Rac2 sont exprimées par les plaquettes. L'activation de Rac1 se produit en aval des interactions collagène-GPVI ou thrombine-PAR. Des études utilisant des souris KO pour Rac1 et 2 suggèrent que les Rac favorisent la formation des lamellipodes mais pas des filopodes plaquettaires (*McCarty et al. 2005*). Les lamellipodes, expansions plates en forme de feuillet, permettent un étalement et un couvrement plus importants de la part des plaquettes afin d'obstruer la brèche vasculaire. La formation des lamellipodes dépendante de Rac1 se produit probablement via la voie d'activation WAVE/SCAR et ARP2/3. Rac1 est également essentielle pour l'étalement plaquettaire régulé par la GPVI, pour le maintien d'agrégats de plaquettes qui doivent résister aux forces de cisaillement sous un flux *in vitro* et *in vivo* et pour la sécrétion des granules plaquettaires (*Akbar et al. 2007*).

- D'autres RhoGTPases

La RhoGTPase RhoA ou RhoF est présente dans les plaquettes humaines et de souris. Les souris KO pour RhoF sont viables et présentent une numération plaquettaire, leucocytaire et érythrocytaire normale. Les plaquettes déficientes en RhoF sont capables de former des filopodes et de s'étaler normalement sur différentes surfaces que ce soit en condition statique ou sous tension. De plus, ces plaquettes possèdent une organisation et une dynamique du cytosquelette normales et peuvent s'agréger et sécréter des granules α et denses en réponse au collagène ou à la thrombine. C'est pourquoi, RhoF ne semble pas indispensable pour un bon fonctionnement des plaquettes chez la souris (Goggs et al. 2013).

Les RhoGTPases telles que Rac, RhoA et Cdc42 sont essentielles pour le bon fonctionnement de la fonction plaquettaire mais le rôle de RhoG dans les plaquettes a été étudié plus tardivement. RhoG est exprimée dans les plaquettes humaines et de souris et est activée à la fois par le collagène et la thrombine. Chez des souris KO pour RhoG, l'activation des intégrines et l'agrégation sont diminuées en réponse au collagène mais les réponses à la thrombine restent normales. Le défaut principal des plaquettes RhoG^{-/-} est une sécrétion réduite en granules α et denses en réponse au collagène. Tous ces résultats se traduisent par une réduction de la formation de thrombi *in vivo*. Cependant, les temps de saignement à la queue restent normaux chez les souris KO pour RhoG (Goggs et al. 2013).

c. Régulation intracellulaire des RhoGTPases plaquettaires par GEFs, GAPs et GDIs

Les petites protéines G sont désormais reconnues comme régulateurs d'un nombre important de fonctions qui sont au cœur de la dynamique du cytosquelette cellulaire. Elles alternent entre une forme liée au GDP et une forme liée au GTP, qui diffèrent par la conformation de leur site de liaison au GTP (Figure 16). La forme liée au GDP est souvent considérée comme inactive alors que la forme liée au GTP active les voies en aval en se liant aux effecteurs. Le GDP est généralement fortement lié aux petites protéines G et le GTP est très lentement hydrolysé. Elles ont donc besoin d'aide de facteurs d'échange nucléotidique (GEF) pour faciliter la dissociation du GDP et de protéines activant la GTPase (GAP) pour stimuler l'hydrolyse du GTP. Le commutateur moléculaire est donc composé d'une petite GTPase, d'un GEF et d'un GAP plutôt qu'une petite GTPase seule. C'est sur cette petite GTPase qui porte un farnesyl ou un géranylgeranyl en C-terminal que l'alternance GDP/GTP définit la localisation membranaire ou cytoplasmique de la petite protéine G. GDI est un inhibiteur de la dissociation de la membrane car il forme un complexe soluble avec les GTPases en protégeant leurs lipides (Cherfils et al. 2013) (Figure 20).

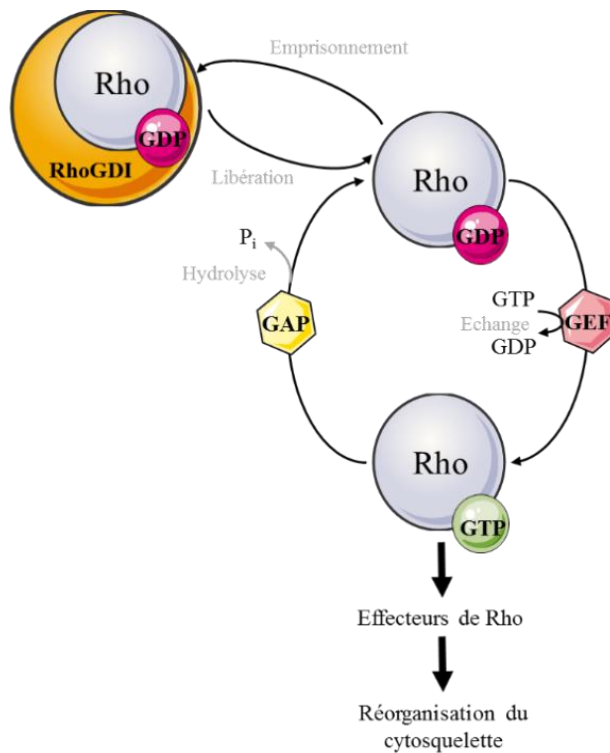


Figure 20 : Activation et régulation des RhoGTPases.

Liées au GTP, les RhoGTPases, y compris RhoA, Cdc42 et Rac1, sont associées à des effecteurs spécifiques en aval pour réguler les événements de remodelage du cytosquelette et les fonctions cellulaires. RhoA, Cdc42 et Rac1 sont régulées cycliquement par des protéines GEF et GAP spécifiques. Les protéines GEF favorisent les échanges du GDP en GTP pour activer les RhoGTPases. Les protéines GAP accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP et inhibent efficacement l'activation des RhoGTPases. Les protéines GDI sont des inhibiteurs de la dissociation de la membrane (d'après Hodge et al., 2016).

Les RhoGTPases plaquettaires sont également régulées par des phosphorylations réversibles (Figure 21). Dans les plaquettes, plus de 20 GEFs catalysent l'échange du GDP en GTP et plus de 20 GAPs favorisent l'hydrolyse du GTP en GDP. Ces cellules expriment également deux GDIs qui séquestrent spatialement et temporairement l'activation des RhoGTPases (Tableau 8).

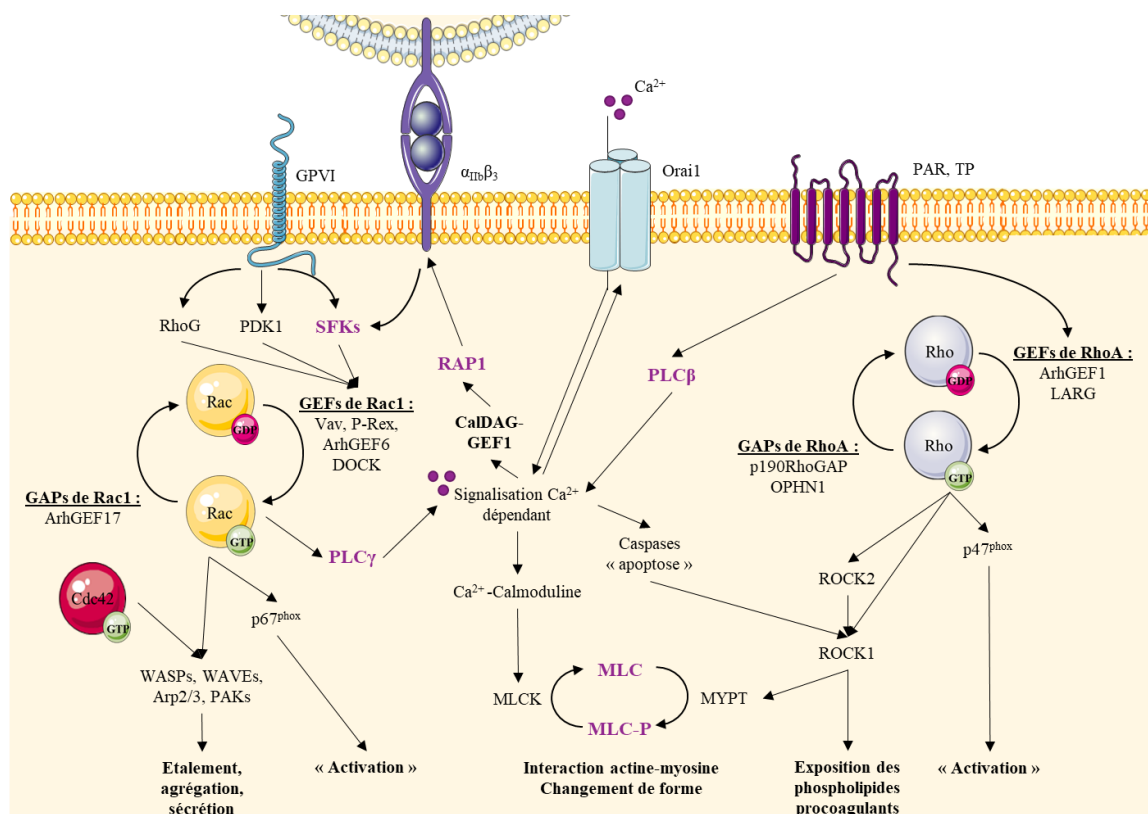


Figure 21 : Résumé des principaux mécanismes de régulation des RhoGTPases plaquettaires.

Suite à l'activation de GPVI, des événements de signalisation intracellulaire se mettent en place (RhoG, PDK1 et SFK) qui permettent l'activation de Rac1 via des GEFs (Vav1, P-Rex, Arhgef6, DOCK). Rac1 participe à l'activation de phospholipases (PLC) pour prendre en charge les événements de signalisation du calcium intracellulaire, y compris l'entrée de calcium par l'intermédiaire de Orai1. La signalisation calcique joue également un rôle dans l'activation de CalDAG-GEF1 puis Rap1 afin d'activer de manière intracellulaire l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. En se liant à la calmoduline, le calcium joue également un rôle dans l'activation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLC). Cette chaîne intervient dans les processus contractiles essentiels qui soutiennent le changement de forme et l'activation plaquettaire. Avec Cdc42, Rac1 prend également en charge l'activation de nombreux effecteurs en aval (WASP, WAVE, Arp2/3 et PAK) qui assurent la forme du cytosquelette. Suite à l'activation des GPCRs des plaquettes (PAR, TP), les RhoA GEFs tels que Arhgef1 et LARG favorisent l'activation des RhoA kinases ROCK1 et ROCK2. Ces kinases jouent un rôle dans la phosphorylation de MLC et donc dans les événements contractiles et l'activation plaquettaire. ROCK1 intervient également dans l'exposition des phospholipides procoagulants à la surface des plaquettes. Les GPCR plaquettaires peuvent également jouer un rôle dans le processus de mobilisation de calcium intracellulaire via la PLC β (d'après Aslan et al., 2018).

La polyploïdisation des mégacaryocytes est un processus de développement hautement contrôlé et est essentiel à une production normale de plaquettes. L'utilisation de cellules primaires a montré que les facteurs d'échange Arhgef2 (GEF-H1) et Arhgef31 (ECT2), souvent exprimés dans le cancer, sont essentiels pour l'activation de RhoA au cours de la cytokinèse et doivent être régulés négativement pour la polyploïdisation des mégacaryocytes. Le premier cycle d'endomitose (2N - 4N) nécessite une diminution d'Arhgef2, tandis que les cycles ultérieurs (>

4N) nécessitent une diminution d'Arhgef31 (Figure 22). Dans des leucémies mégacaryocytaires, l'expression d'Arhgef2 est anormalement élevée (Gao et al. 2013).

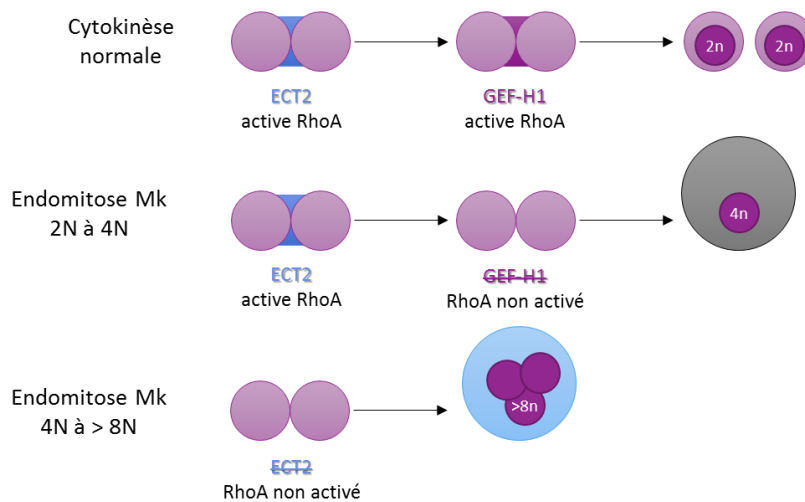


Figure 22 : Mitose versus endomitose des mégacaryocytes.

La polyploïdisation dans les mégacaryocytes (Mks) est un processus de développement hautement contrôlé. En utilisant des cellules primaires, il a été démontré que les facteurs d'échange de guanine, GEF-H1 et ECT2 doivent être régulés pour la polyploïdisation des Mks. Le premier cycle d'endomitose (2N – 4N) nécessite une régulation à la baisse de GEF-H1, tandis que les cycles suivants (> 4N) nécessitent une régulation à la baisse de l'ECT2. (d'après Gao et al., 2012)

Le facteur d'échange Arhgef3 est principalement exprimé dans les mégacaryocytes et est régulé à la hausse pendant la maturation de ces cellules humaines et murines. Chez des souris KO pour Arhgef3, les plaquettes sont plus grosses mais la fonction plaquettaire n'est pas modifiée (Zou et al. 2017).

Les CE inhibent l'adhérence des plaquettes sanguines à l'endothélium en libérant de l'oxyde nitrique (NO) et de la prostacycline (PGI₂). NO et PGI₂ activent la synthèse du GMPc et de l'AMPc, conduisant à l'activation des protéines kinases dépendantes du GMPc et de l'AMPc (PKG, PKA). Une cible connue de la PKA et de la PKG est la petite protéine G Rac1. La forme active de Rac1 contribue à la réorganisation du cytosquelette, à l'adhérence, à la libération des granules et à l'agrégation des plaquettes. Il a été démontré que l'activation de PKG et de PKA réduit le niveau de Rac1 actif. Ceci est permis par une réorganisation protéique impliquée dans le contrôle de Rac1 suite à des phosphorylations de Arhgef6 (Cool-2 ou αPIX) et ArhGAP17 (Nadrin ou RICH1) (Nagy et al. 2015).

Le rôle d'Arhgef10 dans la fonction plaquettaire a été examiné à l'aide de souris KO pour ce facteur d'échange. Les souris KO ont un nombre normal de plaquettes mais présentent une agrégation modifiée en réponse à la thrombine, au collagène et à l'ADP. L'adhérence est diminuée ainsi que la formation des lamellipodes pour les plaquettes des souris KO par rapport

aux souris contrôles sur une surface recouverte de fibrinogène. La déficience en Arhgef10 provoque un allongement du temps de saignement à la queue et inhibe la formation d'un thrombus stable en réponse au chlorure de fer dans l'artère carotidienne. Le facteur d'échange Arhgef10 est donc un régulateur important dans les modifications de forme, dans l'agrégation et dans l'adhérence plaquettaires mais également dans la formation de thromboses artérielles (Lu et al. 2017).

Le facteur d'échange Arhgef12 (LARG pour Leukemia-associated Rho guanine-nucleotide) est hautement exprimé dans les plaquettes. Arhgef12 est important pour la maturation des mégacaryocytes humains mais pas murins. Les souris KO pour Arhgef12 présentent une macrothrombocytopénie, des saignements internes des ovaires et des temps de saignement prolongés. Les plaquettes sans Arhgef12 ont une diminution de l'agrégation, de la sécrétion de granules α et de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en réponse à la thrombine et au TXA₂ mais pas à l'ADP. Les mêmes diminutions sont observées avec des plaquettes humaines traitées par l'inhibiteur de Arhgef12. Ces plaquettes ont également une activation réduite de RhoA ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine. Les souris KO pour Arhgef12 sont protégées de la formation de thrombi *in vivo*. Tous ces résultats montrent que Arhgef12 régule la maturation des mégacaryocytes humains et est essentiel à la fonction plaquettaire chez l'homme et la souris (Zou et al. 2016).

Le facteur d'échange Vav, cible de la phosphorylation par Src, régule l'activation des plaquettes en association avec la signalisation en aval de Rac1-GPVI ainsi que celle en aval des intégrines. La coopération entre certaines protéines GEF, telles que Vav et P-Rex, est également un médiateur des événements importants dans la signalisation plaquettaire comme le recrutement des leucocytes sur le site d'inflammation (Pan et al. 2015).

Arhgef1, un autre facteur, sera développé par la suite dans le dernier chapitre.

La GAP oligophrenine1 (OPHN1) régule l'activité plaquettaire de RhoA, Rac1 et Cdc42 *in vitro* et est impliquée dans la signalisation via GPVI et PAR pour la formation d'un thrombus *in vivo* (Elvers et al. 2012).

Contrairement aux rôles que jouent les GEFs et GAPs, les rôles des GDIs dans les plaquettes sont restés plus longtemps en grande partie ignorés. Les études de protéomique suggèrent que les plaquettes expriment deux des trois membres de la famille GDI : RhoGDI (ArhGDI1) et LyGDI (ArhGDI2). LyGDI est aussi fortement associé au réticulum endoplasmique plaquettaire ou au système de tubules denses qu'au cytosquelette plaquettaire et au système de signalisation associé à la PKC. Cette dernière facilite la phosphorylation de LyGDI et également d'autres substrats plaquettaires.

Tableau 8 : Liste des GEFs, GAPs et GDIs de RhoGTPases les plus présents dans les plaquettes humaines avec leurs GTPases cibles connues.
(d'après Goggs et al. 2015)

Nom du gène	Nom de la protéine (en anglais)	GTPase cible
<i>Arhgef1</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 1	RhoA
<i>Arhgef2</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	RhoA
<i>Arhgef3</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 3	RhoA, RhoB, Cdc42
<i>Arhgef6</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	Rac, Cdc42
<i>Arhgef12</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 12	RhoA, RhoB, Rac
<i>Arhgef18</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 18	RhoB, Rac
<i>FGD3</i>	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 3	Cdc42
<i>KALRN</i>	Kalirin	Rac
<i>PREX1</i>	P-Rex1 (PtdIns(3,4,5)-dependent Rac exchanger 1)	Rac
<i>VAV1</i>	Proto-oncogene Vav	Rac, Cdc42
<i>VAV3</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	Rac, Cdc42
<i>TRIO</i>	Triple functional domain protein (TRIO)	Rac, RhoA
<i>DOCK2</i>	Dedicator of cytokinesis protein 2	Rac
<i>DOCK5</i>	Dedicator of cytokinesis protein 5	RhoA, Rac
<i>DOCK8</i>	Dedicator of cytokinesis protein 8	Rac, Cdc42
<i>SOS1</i>	Son of sevenless homologue 1 (SOS-1)	Rac
<i>ITSN2</i>	Intersectin-2	Cdc42
<i>ArhGAP1</i>	Rho GTPase-activating protein 1	Cdc42
<i>ArhGAP4</i>	Rho GTPase-activating protein 4	Rac
<i>ArhGAP6</i>	Rho GTPase-activating protein 6	Rac
<i>ArhGAP9</i>	Rho GTPase-activating protein 9	Cdc42, Rac, RhoA
<i>ArhGAP10</i>	Rho GTPase-activating protein 10	RhoA, Cdc42
<i>ArhGAP18</i>	Rho GTPase-activating protein 18	Rac, RhoQ, RhoU
<i>ArhGAP21</i>	Rho GTPase-activating protein 21	RhoA, Cdc42
<i>ArhGAP25</i>	Rho GTPase-activating protein 25	?
<i>ArhGAP27</i>	Rho GTPase-activating protein 27	Cdc42, Rac
<i>ArhGAP30</i>	Rho GTPase-activating protein 30	Rac, RhoH
<i>BCR</i>	Breakpoint cluster region protein	Rac, Cdc42
<i>ARAP1</i>	Arf-GAP with Rho-GAP, ANK repeat, PH domains 1	?
<i>GMIP</i>	GEM-interacting protein	RhoA
<i>STARD8</i>	StAR-related lipid transfer protein 8	RhoA, Cdc42
<i>OPHN1</i>	Oligophrenin-1	RhoA, Rac
<i>ABR</i>	Active breakpoint cluster region-related protein	Rac, Cdc42
<i>TAGAP</i>	T-cell activation Rho GTPase-activating protein	?
<i>ArhGDIA</i>	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Rac, RhoA, RhoH
<i>ArhGDIB</i>	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Rac, RhoA, RhoB, RhoH

B. Signalisation dans les cellules musculaires lisses

Un certain nombre de voies de signalisation clés faisant intervenir la voie des petites protéines G, y compris les intégrines, les RCPGs, les filaments d'actine-myosine, les glycosphingolipides participent à la mécanotransduction et la plasticité des CMLVs.

Avec les propriétés d'adhérence des CMLVs, les interactions cellules-matrice représentent des mécanismes importants de la rigidité vasculaire et sont contrôlées par le mécanosensing et la mécanotransduction (Figure 23). Les intégrines sont impliquées dans le complexe adhésion focale-fibre de stress. Au niveau des adhésions focales, la liaison de la taline à la vinculine améliore la liaison actine-taline et stimule la propagation cellulaire et la migration multidirectionnelle. L'accumulation de ces protéines peut participer au recrutement des « clusters » d'intégrines ce qui va conduire à une augmentation des adhésions focales. La combinaison de l'activation des fibres de stress et les adhésions focales augmentées représente un mécanisme majeur par lequel les cellules répondent aux forces mécaniques.

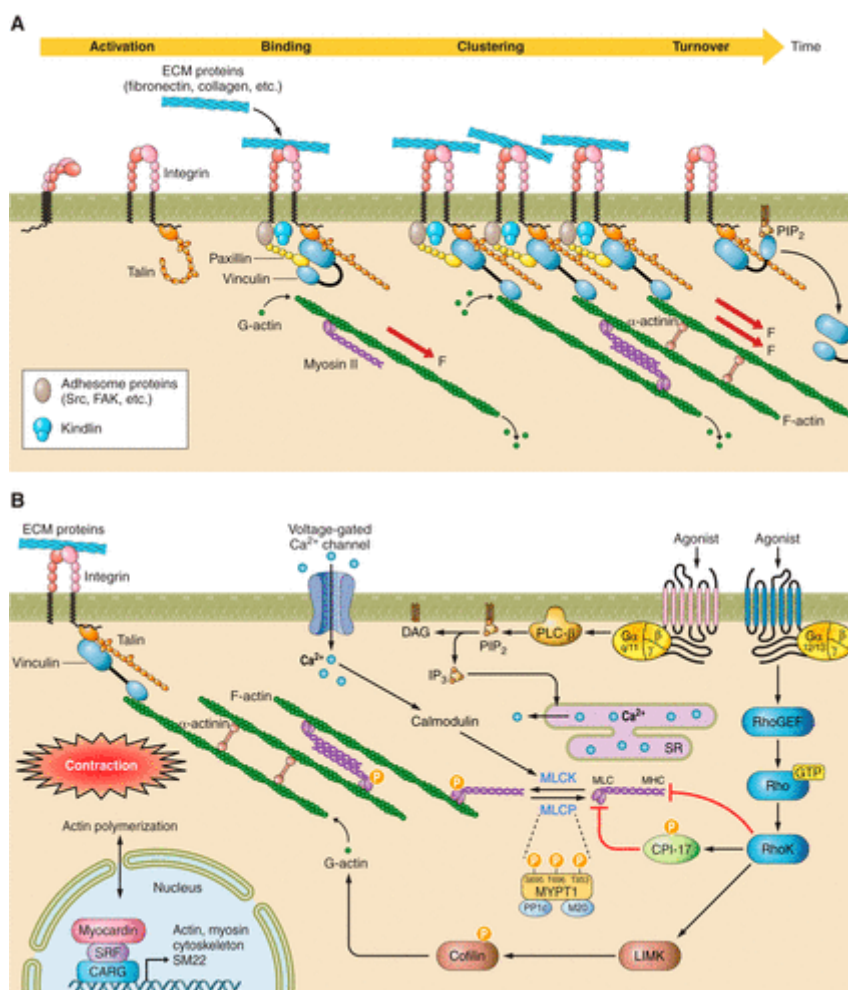


Figure 23 : Principaux mécanismes régulant l'adhérence focale et la contraction des CMLVs.

(A) : dynamique de la formation des adhésions focales. (B) : représentation schématique des voies de signalisation de l'activité acto-myosine du muscle lisse (Lacolley et al. 2017).

La taline comprend une zone principale qui se lie directement aux intégrines β via le site de liaison à l'actine (ABS1-3) et un autre domaine qui se lie à la F-actine par des sites de liaison à l'ABS ou à la vinculine. La phosphorylation de Src des adhérences focales régule le changement de conformation de la vinculine qui passe d'une conformation fermée avec des interactions intramoléculaires entre l'extrémité N-terminale et la queue de l'actine à une conformation ouverte liant la F-actine. Sur un substrat souple, les interactions entre intégrines, taline et actine montrent un comportement de liaison de glissement qui ne nécessite pas de vinculine et dont l'espérance de vie se raccourcit à mesure que la tension augmente. La durée de vie de la liaison vinculine-actine dépend de la direction de l'interaction entre les deux molécules : elle est 10 fois plus longue quand les charges opposées s'attirent entre le (-) de la vinculine et le (+) de l'extrémité opposée de l'actine. Les associations dynamiques entre la MEC, les intégrines, la taline, la vinculine et le cytosquelette d'actine-myosine qui génèrent la force, sont responsables de la transmission des forces des adhésions focales et de la mécanosensibilité. De plus, en utilisant le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, il a été démontré que les variations spatiales sont responsables des variations de tension de la taline, ce qui explique que les adhérences focales ont une force plus importante en périphérie qu'au centre de la cellule (proche du noyau). Outre les forces mécaniques, il a été démontré que l'acide lysophosphatidique modulait les complexes d'adhérences focales. L'adhérence accrue des intégrines à la MEC liée à cet acide dépend de la production des ROS, qui augmente avec l'âge (Lacolley et al. 2018).

Les RCPGs sont impliqués dans le développement de la dysfonction endothéliale et les CMLVs dans la rigidité artérielle. L'activation du récepteur à l'angiotensine II, surtout celui de type 1 (AT1), représente une voie de signalisation conservée dans les CEs et les CMLVs. Les échanges entre le récepteur AT1 et le récepteur minéralocorticoïde ou avec le récepteur aux œstrogènes sont des déterminants majeurs de la rigidité artérielle, du remodelage cardiovasculaire et de la résistance à l'insuline au cours du vieillissement. L'insuline et son facteur de croissance analogue phosphorylent le substrat du récepteur à insuline (IRS-1) ce qui entraîne l'activation des voies PI3K et MAPK. L'angiotensine II et l'aldostérone stimulent la voie rapamycine (mTOR)/S6K1 qui inhibe à son tour la phosphorylation de l'IRS-1 et réduit ainsi la vasodilatation induite par l'insuline. Le récepteur aux œstrogènes couplé aux protéines G (GPR30) atténue la prolifération des CMLVs induite par l'angiotensine II en régulant à la baisse l'expression de AT1.

Dans la paroi vasculaire, les protéines G régulent un large éventail de processus cellulaires physiologiques et pathologiques dont la contractilité des CMLVs, la vasculogénèse, l'angiogénèse, la régulation de la pression artérielle, la perméabilité vasculaire et le remodelage vasculaire au cours de l'athérosclérose et du vieillissement. L'activation des RCPGs et la signalisation via $G_{\alpha q/11}$ qui en découle, sont responsables de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine par une kinase alors que la signalisation via $G_{\alpha 12/13}$ inhibe la déphosphorylation de cette chaîne par une phosphatase. La régulation de la contractilité des CMLVs par la signalisation des RCPGs est nettement modifiée au cours du vieillissement (Figure 24).

Il a été démontré que l'augmentation de l'activité des Rho kinases avec l'âge était associée à des valeurs de VOP (vitesse de l'onde de pouls) plus élevées. De plus, le traitement par Fasudil, un inhibiteur de Rho kinase, augmente la vasodilatation et abaisse la pression artérielle. L'inhibition de la protéine $G_{\alpha 12/13}$ chez des souris déficientes en apolipoprotéine E favorise l'athérosclérose avec une expression réduite des marqueurs de différenciation des CMLVs. Au contraire, l'inhibition de $G_{\alpha q/11}$ diminue l'athérosclérose avec une réexpression des marqueurs de différenciation des CMLVs. (Althoff et al. 2012). Ainsi, ces deux protéines G régulent de manière opposée le changement phénotypique des CMLVs dans un contexte de remodelage vasculaire. En aval de ces protéines G, plusieurs effecteurs de RhoA peuvent déclencher des lésions vasculaires liées à des régulations complexes. Parmi eux, la kinase 2 des GPCRs (GRK2) inhibe la prolifération et la migration des CMLVs suite à une stimulation à l'angiotensine II via la signalisation $TGF\beta$, alors que GRK2 agit comme un interrupteur pour activer ERK par RhoA et ainsi promouvoir la prolifération des CMLVs en réponse aux facteurs de croissance (Tableau 9).

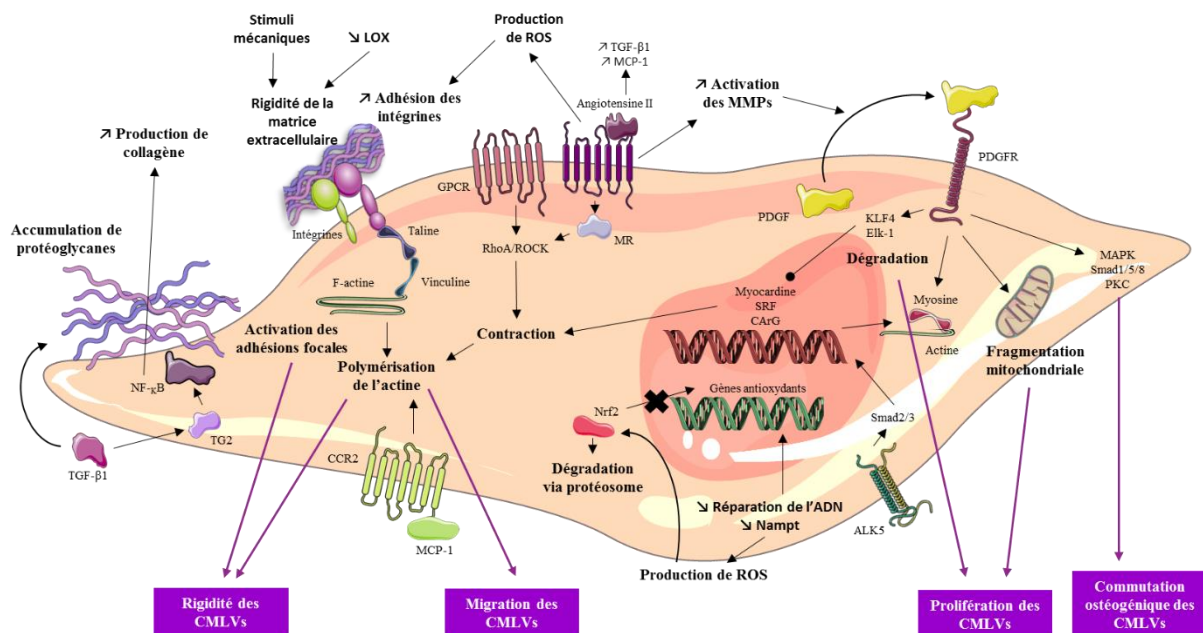


Figure 24 : Rôle et interactions des différentes voies de signalisation moléculaire dans le vieillissement des CMLVs.

Le vieillissement vasculaire agit sur plusieurs éléments : la matrice extracellulaire, les intégrines, les adhésions focales et le cytosquelette en augmentant la rigidité de la matrice extracellulaire et des CMLVs (d'après Lacolley et al. 2018)

Tableau 9 : Voies de signalisation des CMLVs.
(d'après Lacolley and al. 2018)

Récepteurs à la surface des CMLVs	Ligands	Signalisation en aval	Rôle dans les fonctions des CMLVs
Récepteurs au PDGF • PDGFRα • PDGFRβ	PDGF-BB, PDGF-DD	PI3K/Akt, PKA, PKC, MAPKs, Src, Smad1/5/8	Répression du gène codant pour les protéines contractiles du cytosquelette, prolifération et migration des CMLVs, autophagie des CMLVs
Récepteurs au TGF β • Type II (TGFB2) • Type I (TGFB1)	TGF β	MAPKs, Smad2/3, Smad1/5/8	Différenciation des CMLVs, inhibition de la prolifération et de la migration des CMLVs en réponse à l'angiotensine II
Récepteurs à l'élastine (ERC)	Elastine, peptide dérivé de l'élastine	Tyrosine kinase, Src, MAPKs, PDGF	Prolifération et migration des CMLVs

Intégrines	Fibronectine, vitronectine, laminine, collagène, osteopontine, Thrombospondine, fibrinogène, prothrombine, CCN1, EDP, MFG-E8	Taline, α -actine, Src, FAK, RhoA, Rac, PAK, ERK1/2, kindline, ILK	Adhésion, prolifération, migration, différenciation et apoptose des CMLVs, assemblage de la MEC, formation des adhésions focales
Récepteurs Notch	Jagged-1	PI3K/Akt	Différenciation et prolifération des CMLVs, expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$
Récepteur 2 à la chimiokine	MCP-1	$G\alpha_{q/11}$ -PLC β 3-PKC δ , MAPKs	Formation des fibres de stress, prolifération et migration des CMLVs
Récepteur à l'angiotensine de type I	Angiotensine II	PLC-IP3-DAG, MAPKs, tyrosine kinase, tyrosine phosphatase, RhoA/ROCK	Croissance, contraction, adhésion, migration et différenciation des CMLVs, polymérisation de l'actine
PARs	Thrombine, facteur X activé	MAPKs, RhoA/ROCK, JAK-STAT	Prolifération et migration des CMLVs, production de cytokines et de facteurs de croissance, stimulation de l'expression d' $\alpha_v\beta_3$, formation d'adhésions focales
MR	Aldostérone, glucocorticoïdes	MAPKs, tyrosine kinase, PKC, NADPH oxydase, mTOR-S6K1	Tonus vasculaire, régulation des gènes codant pour les protéines impliquées dans la signalisation par le NO, régulation du cycle cellulaire et de la MEC, dialogue bidirectionnel avec AT1R
Récepteur à l'insuline	Insuline, IGF-1	PI3K/Akt, MAPKs	Synthèse du collagène III, migration de prolifération, et survie des CMLVs

IV. Rho et maladies vasculaires

Les GTPases de la famille Rho ont un rôle dans presque tous les aspects de la biologie vasculaire : elles influencent la biologie des CEs, des CMLVs, des leucocytes et des plaquettes et régulent divers processus tels que la vasoréactivité, l'hypertension, l'inflammation, la cicatrisation et la thrombose. Ces protéines peuvent également jouer un rôle dans l'athérosclérose (Rolfe et al. 2005).

A. Pathogenèse de l'athérosclérose

Le premier événement cellulaire de l'athérogenèse est un dysfonctionnement endothélial qui résulte d'une exposition à des agents tels que des lipoprotéines oxydées ou des cytokines proinflammatoires libérées par des plaquettes activées et des leucocytes. Les modifications de l'endothélium comprennent l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, ainsi que des altérations de la fonction de barrière qui se traduisent par une perméabilité accrue aux constituants du sang (lymphocytes, monocytes, macrophages) (Figure 25).

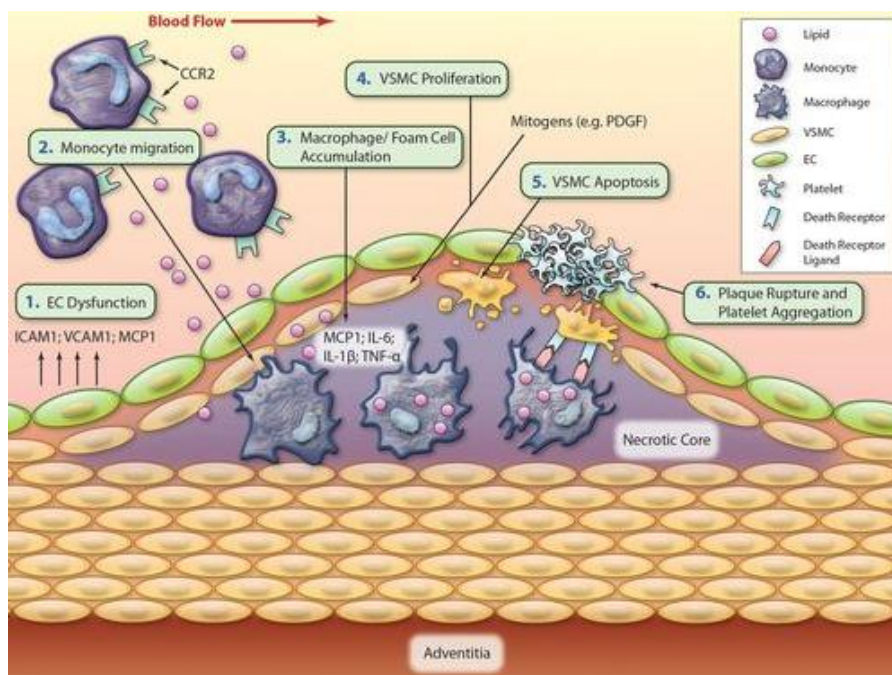


Figure 25 : Représentation schématique de l'athérogenèse et d'une plaque athérosclérotique instable.

(d'après Wang et al. 2012)

L'infiltration de leucocytes activés dans l'espace sous-endothélial et la production ultérieure de cytokines proinflammatoires et de facteurs de croissance servent non seulement à attirer et à activer plus de leucocytes mais conduisent à la libération locale d'enzymes (protéases et héparanases) qui modifient la composition de la MEC et poussent les CMLVs à subir une modulation phénotypique : passage de l'état « contractile » non prolifératif à un état

« synthétique » au cours duquel elles peuvent migrer, proliférer en réponse à des facteurs de croissance, synthétiser des quantités accrues de protéines matricielles et accumuler des lipides. Les maladies vasculaires sont également associées à une altération de la réactivité vasculaire, avec des lésions athérosclérotiques présentant une sensibilité accrue aux vasoconstricteurs et une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium.

B. Inhibition des Rhos et athérosclérose

Les statines sont actuellement les agents anti-athérosclérotiques les plus largement prescrits dans le monde occidental. Les effets bénéfiques non liés à la réduction du cholestérol incluent la réduction de l'inflammation de la plaque et de l'agrégation plaquettaire, une stabilité accrue de la plaque et de la fonction endothéliale et une inhibition de la prolifération des CMLVs. Etant donné que de nombreux effets peuvent être inversés par le géranylgéranyl-pyrophosphate (dérivé de la voie du mévalonate, une voie métabolique de biosynthèse du diméthylallyl-pyrophosphate et de l'isopentényl-pyrophosphate, précurseurs notamment des terpènes, terpénoïdes et stéroïdes), mais pas par le farnésylpyrophosphate (intermédiaire de la voie métabolique de la HMG-CoA réductase, utilisée par les êtres vivants pour la biosynthèse des terpènes, des terpénoïdes et des stérols), la famille Rho est considérée comme une cible majeure de ces médicaments (Ziniel et al. 2013) (Figure 26).

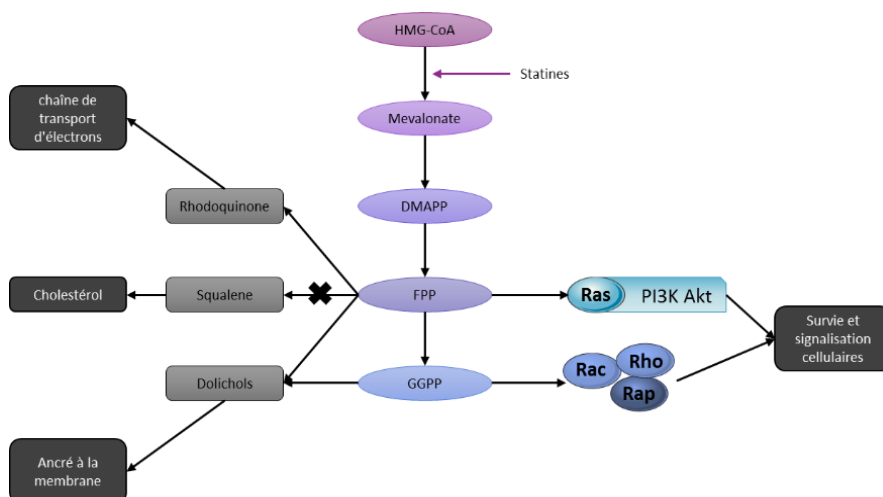


Figure 26 : Représentation schématique de la voie du mévalonate.

La 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA (HMG-CoA), est le produit de la HMG-CoA synthase puis est convertie en mévalonate par la HMG-CoA réductase. Une série de réactions transforme le mévalonate en diméthyle diphosphate (DMAPP) puis en farnésyle diphosphate (FPP) et enfin en géranylgéranyl diphosphate (GGPP). Le FPP est utilisé pour la synthèse de plusieurs quinones, le GGPP pour la synthèse de dolichols, et ils sont essentiels pour la prénylation post traductionnelle de certaines protéines telles que Ras, Rac, Rho et Rap. Cette réaction est cruciale pour la survie et la signalisation cellulaires (d'après Ziniel et al., 2013).

Des preuves supplémentaires concernant le rôle de Rho dans l'athérogenèse ont été fournies par des études chez l'animal qui impliquent des inhibiteurs des Rho kinases en aval. L'inhibiteur sélectif de p160ROCK, Y-27632, empêche le développement précoce de la plaque d'athérosclérose chez des souris KO pour les récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (Mallat *et al.* 2003). Les lésions inflammatoires et le remodelage vasculaire, phénomènes qui apparaissent au cours de l'artériosclérose, sont également inhibés.

C. Les fonctions endothéliales et la voie de signalisation RhoA

a. La barrière endothéliale

L'endothélium artériel forme une barrière perméable, qui en cas de perturbation, augmente le risque de maladies vasculaires. La fonction de barrière endothéliale est maintenue à la fois par des jonctions adhérentes étroitement organisées et par un état contractile intermédiaire qui permettent aux CEs d'ajuster rapidement leur forme en réponse aux variations de la pression artérielle. La stimulation par des toxines bactériennes, des médiateurs inflammatoires ou des molécules athérogènes telles que la thrombine ou l'acide lysophosphatidique est utilisée pour perturber les contacts cellule-cellule ce qui entraîne l'augmentation de la perméabilité vasculaire et expose les composants de la MEC. Il existe une certaine controverse concernant les rôles précis des protéines Rho dans la régulation de la perméabilité endothéliale. L'équipe de Vouret-Craviari suggère que la signalisation par Rho est responsable du maintien de la fonction de la barrière endothéliale, tandis que Rac participe au remodelage du cytosquelette qui conduit à un arrondissement de la cellule et en même temps à une dysfonction de la barrière (Vouret-craviari *et al.* 1998). Van Wetering et ses collaborateurs ont montré que Rac, constitutivement actif, perturbe la localisation de la VE-cadhérine et réduit l'adhérence cellule-cellule par une voie qui implique la production d'espèces réactives de l'oxygène et la phosphorylation de la tyrosine du complexe VE-cadhérine (Van Wetering *et al.* 2003). Wojciak-Stothard et Ridley suggèrent que la fonction de barrière peut être améliorée en augmentant le rapport Rac/Rho (Wojciak-Stothard *et al.* 2002). Plus récemment, il a été démontré que Rac joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium capillaire en modulant la polymérisation des filaments d'actine et en régulant les liens entre la VE-cadhérine et le cytosquelette. Kouklis et son équipe ont suggéré que l'activation retardée de Cdc42 peut jouer un rôle critique dans la restauration de la fonction de barrière endothéliale dépendante des jonctions adhérentes après perturbation par des médiateurs vasoactifs (Kouklis *et al.* 2003). Un traitement prolongé à la simvastatine (inhibiteur HMG-CoA) des CEs pulmonaires réduit de

manière significative le dysfonctionnement de la barrière induit par la thrombine. Alors que la phosphorylation des MLC et la formation des fibres de stress sont inhibées (indiquant l'inhibition de RhoA), l'activation de Rac et la translocation de la cortactine dépendante de Rac sont augmentées, ce qui suggère que la protection de la barrière endothéliale par l'activation de Rac est préservée (Jacobson *et al.* 2004). L'inactivation à long terme de Rho entraîne une perte des jonctions intercellulaires et une augmentation de la perméabilité endothéliale (Hordijk *et al.* 1999). Ainsi, la stabilité des jonctions nécessite un équilibre délicat entre les activités Rho et Rac, ce qui peut à son tour déterminer les molécules effectrices activées en aval (Figure 27).

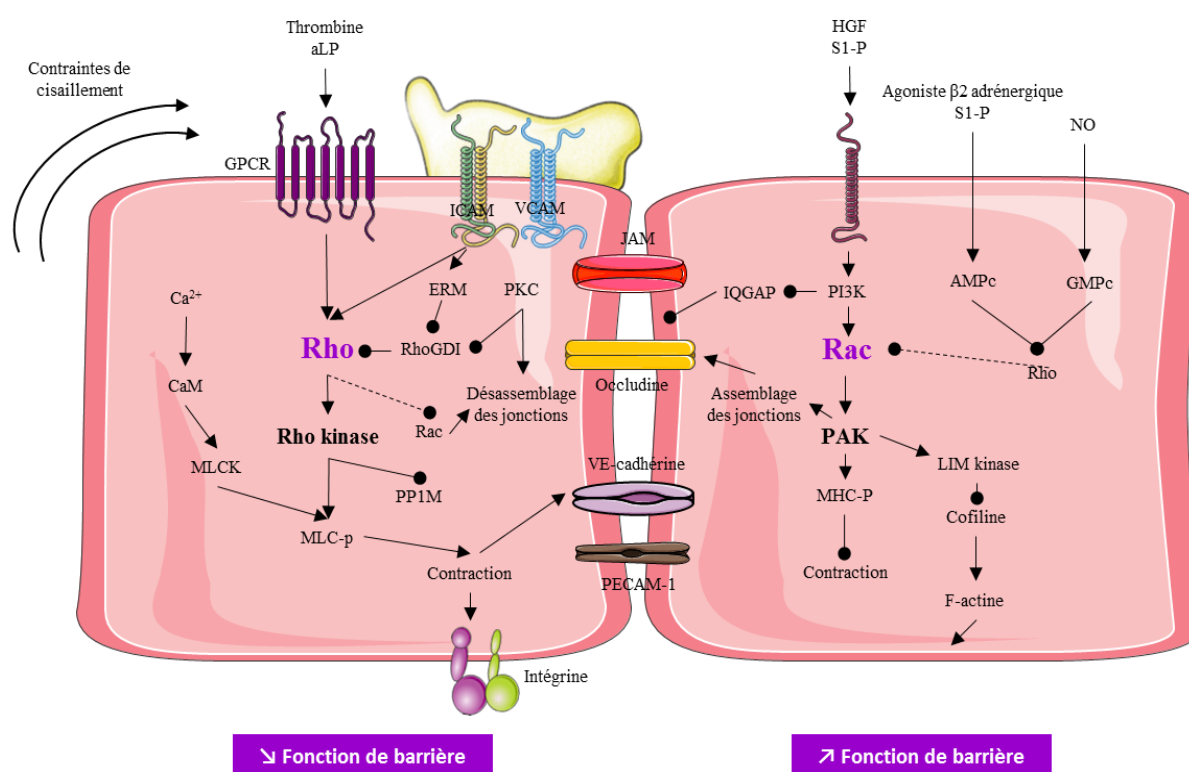


Figure 27 : Un modèle de régulation de la fonction de barrière endothéliale par Rho et Rac. La contractilité du système actomyosine induite par l'activation de Rho contribue à la dégradation des jonctions intercellulaires (à gauche). L'activation de Rac augmente la fonction de barrière endothéliale en stabilisant les jonctions intercellulaires et en diminuant la contractilité de l'actomyosine (à droite) (d'après Duluc *et al.*, 2014).

b. Migration endothéliale

La migration des CE est régulée par les protéines Rho, en particulier au cours de la réparation des plaies et de l'angiogenèse. La signalisation RhoA/Rho kinase intervient durant ces phénomènes via le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (Geerten *et al.* 2003), la sphingosine-1-phosphate et la contrainte de cisaillement (Shiu *et al.* 2004). Rac est activé lors de l'adhésion des CE à la lamine et est essentiel à la propagation et à la migration des cellules induites par les intégrines. Egalement, la molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules

endothéliales (PECAM-1) favorise une migration endothéliale coordonnée, comme cela se produit en cas de lésion, via une voie dépendante de Rho/ROCK (*Gratzinger et al. 2003*).

c. Migration des leucocytes à travers l'endothélium

L'attachement à l'endothélium et l'extravasation des leucocytes induisent la formation de fibres de stress et la contraction de l'endothélium en réponse à l'augmentation de la phosphorylation des MLC. La liaison des leucocytes à la molécule d'adhésion intracellulaire des cellules endothéliales (ICAM-1) déclenche l'activation des Rho ce qui entraîne une adhésion forte des leucocytes et l'ouverture de lacunes intercellulaires permettant ainsi leur entrée. Le regroupement de la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1) active Rac1, ce qui favorise la migration des leucocytes à travers la monocouche endothéliale (*Van Wetering et al. 2003*). Dans les leucocytes, la signalisation Rho/p160ROCK est essentielle pour l'adhésion à l'endothélium via ICAM-1 et VCAM-1 (*Worthylake et al. 2001*). Rac et Cdc42 régulent la polarité des leucocytes, la formation des lamellipodes et la migration dirigée, tandis que la signalisation RhoA/p160ROCK est requise pour la rétraction de la queue des leucocytes au cours de la transmigration (Figure 28). Outre la modification de l'expression des molécules d'adhésion et des chimiokines, la migration des monocytes/macrophages, des CEs et des CMLVs dépend de l'activité des enzymes qui dégradent la matrice, en particulier des métalloprotéinases matricielles (MMP). RhoA est impliqué dans la régulation de l'expression de la MMP-1 par les CEs (*Ikeda et al. 2000*) et la sécrétion de MMP-9 par les monocytes (*Wong et al. 2001*).

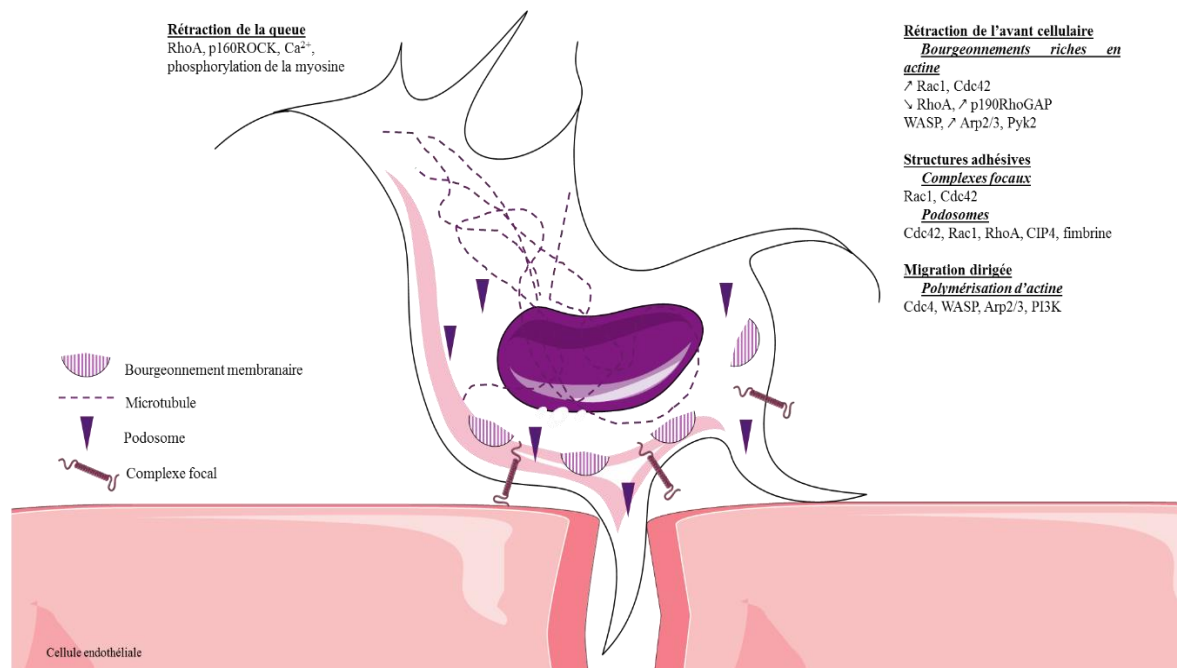


Figure 28 : Régulation intracellulaire et migration d'un leucocyte à travers la barrière endothéliale.

La migration est divisée en quatre composants distincts : le bourgeonnement, la migration dirigée, les structures adhésives et la rétraction de la queue. Les molécules qui régulent chacun de ces événements sont énumérées ci-dessus (d'après Schimmel et al., 2017).

D. Fonctions des macrophages

Un traitement oral par le fasudil, inhibiteur de ROCK, inhibe de façon prononcée l'accumulation et la migration de macrophages et la formation de lésions néo-intimales dans un modèle porcin. Cette inhibition est une preuve que la Rho kinase est impliquée dans la formation des lésions vasculaires coronariennes liées aux macrophages (Miyata et al. 2000). Rho peut également jouer un rôle dans la régulation de la fonction des macrophages. Il a été montré qu'une modulation de l'activité de RhoA pouvait influencer l'expression d'ABCA1 (pour « ATP-binding cassette A1 » appartenant à la famille des transporteurs ABC et intervenant dans le transport du cholestérol), l'efflux du cholestérol par les macrophages et l'induction de la formation de cellules spumeuses par des lipoprotéines athérogènes (Argmann et al. 2005).

E. Thromboses

Les plaquettes jouent un rôle critique dans les syndromes coronariens aigus, avec une formation accrue de thrombus au niveau de la zone de rupture de la plaque et des lésions vasculaires également augmentées. La signalisation Rho est impliquée dans la phosphorylation des MLC suite à l'activation plaquettaire (Suzuki et al. 1999) et à l'adhésion au fibrinogène (Leng et al. 1998). L'inhibition spécifique de Rho par incubation des plaquettes perméabilisées avec du Rho GDI,

montre un blocage de l'activation plaquettaire en réponse à la thrombine (*Nishioka et al. 2001*). La voie de signalisation Rho/ROCK joue également un rôle dans l'expression de PAI-1 et du FT en activant le complexe MEK/ERK1/2 : l'inhibition de cette voie expliquerait en partie la réduction des événements thrombotiques par les statines.

F. Cellules musculaires et la voie de signalisation RhoA

a. Hypertension

Rho, par son effecteur en aval ROCK, est impliqué dans la physiopathologie de l'hypertension. L'expression et l'activité de Rho sont augmentées dans les aortes des rats spontanément hypertendus (SHR) (*Seasholtz et al. 2001*). De plus, l'inhibition spécifique de ROCK empêche la contraction de la CML induite par un agoniste et réduit la pression artérielle de ces animaux. Les effets antihypertenseurs des statines peuvent être expliqués par leur capacité à inhiber les effets vasoconstricteurs de Rho (*De Sotomayor et al. 2001*).

L'hypertension augmente les contraintes mécaniques dans la paroi vasculaire jusqu'à 15%. L'étirement mécanique conduit à l'activation de ERK, éventuellement via Rho/p160ROCK, une prolifération des CMLVs et une expression de proto-oncogènes par les CMLVs.

b. Prolifération et migration des CMLVs

Des études ont montré que l'inhibition de Rho par un traitement à la C3 transférase (inhibiteur de toutes les formes de Rho) de CMLVs humaines bloquait la migration induite par le PDGF, mais n'avait aucun effet sur la prolifération (*Liu et al. 2002*) ; un traitement prolongé entraîne l'apoptose cellulaire. La signalisation par la voie RhoA est nécessaire pour l'adhésion cellule-cellule via la N-cadhérine. La N-cadhérine est régulée à la baisse lors de la formation de la néointima et cette diminution est associée avec une diminution de la migration des CMLVs et une diminution de l'activité Rho. Il a été également démontré qu'une inhibition à long terme de la Rho kinase inhibe la formation d'une néointima intra-stent par d'autres mécanismes que l'inhibition de la prolifération ou de la migration, notamment une inflammation vasculaire réduite, une diminution du dépôt de collagène et une apoptose accrue. L'inhibiteur de la Rho kinase, le fasudil, inhibe l'hyperplasie intimale après la ligature de l'artère carotide de souris (*Pearce et al. 2004*), tandis que la formation de la néo-intima après lésion par ballonnet des artères fémorales porcines est inhibée par le traitement par Y-27632 (*Sawada et al. 2000*).

c. Survie des CMLVs

Les Rho peuvent également réguler la survie des CMLVs vasculaires. Par exemple, une inhibition prolongée de Rho induit l'apoptose des CMLVs *in vitro* (Liu et al. 2002). L'inhibition de la Rho kinase diminue la formation de la néointima en régulant positivement l'expression de Bax et en induisant l'apoptose des CMLVs (Shibata et al. 2003). Le réarrangement du cytosquelette dépendant de Rho kinase joue également un rôle dans l'assemblage du complexe de signalisation induisant la mort, essentiel à l'activation de la caspase 8 initiateur et de la caspase 3 effectrice en aval (Petrache et al. 2003). Plusieurs rapports indiquent que le traitement par les statines élimine les signaux de survie cellulaire induits par Rho et augmente l'apoptose des CMLVs en régulant à la baisse Bcl-2. Tandis que l'augmentation du taux d'apoptose peut réduire l'épaisseur néointimale, cela peut avoir un effet néfaste sur la stabilité de la plaque (Littlewood et al. 2003).

d. Phénotype des CMLVs

Le changement phénotypique des CMLVs est associé à la réorganisation du cytosquelette ce qui suggère que des changements rapides puissent précéder des modifications à plus long terme et que les voies de signalisation à l'origine de ces changements soient étroitement intégrées à celles qui régulent l'expression des gènes, la synthèse des protéines et le phénotype cellulaire (Worth et al. 2001).

Il a été montré grâce à l'utilisation d'un modèle *in vitro* de modulation du phénotype des CMLVs vasculaires que l'expression et l'activation de RhoA se modifiaient lorsque les cellules modulent leur phénotype. Notamment, les niveaux les plus élevés d'activation de RhoA se produisent à deux moments différents sur le plan fonctionnel : les deux coïncident avec une réorganisation majeure du cytosquelette. Le premier, lorsque les CMLVs fraîchement isolées des tissus adoptent un phénotype synthétique et le second lorsqu'elles reviennent à un phénotype contractile. Il a également été montré qu'une expression élevée de RhoA était nécessaire pour maintenir le phénotype indifférencié des cellules mésenchymateuses, mais que la diminution de l'expression de RhoA induisait l'élongation cellulaire et la translocation nucléaire du facteur de réponse au sérum (SRF). Cependant, une fois que les cellules se différencient en CMLVs, RhoA stimule plutôt la myogenèse. Ainsi, pour le cas des CMLVs vasculaires, l'activation de RhoA peut avoir différents effets en fonction de l'état phénotypique des cellules. L'inactivation de RhoA induit une diminution de la contractilité des CMLVs en culture issues de l'artère coronaire : ce résultat suggère que RhoA joue un rôle essentiel dans la régulation de la contraction de la CML dédifférenciée (Bi et al. 2005). D'autres études ont montré

que, dans des états synthétiques, la surexpression de RhoA dans les CMLVs de façon constitutive chez le lapin ou suite à l'injection de substances endogènes (acide lysophosphatidique ou sphingosine-1-phosphate), induit une morphologie contractile extrême accompagnée d'une réduction de la taille des cellules et des fibres de stress très organisées.

Etant donné que de nombreux facteurs environnementaux (étirement mécanique, interaction intégrine-matrice, angiotensine II, ...) qui régulent le phénotype des CMLVs sont également connus pour activer la voie de signalisation Rho, RhoA joue un rôle essentiel dans la différenciation des CMLVs (*Yamakawa et al. 2000, Zeidan et al. 2003*). L'étirement de la paroi des vaisseaux sanguins maintient le phénotype contractile du muscle lisse et l'expression des marqueurs de différenciation par un mécanisme dépendant de Rho. La thrombine et l'héparine qui sont deux régulateurs connus du phénotype des CMLVs, sont également capables d'activer RhoA.

G. Rho et synthèse de la MEC

La formation d'une néointima est associée à des modifications de la MEC. Celles-ci incluent la rupture ou la perte des fibres élastiques, une expression accrue des collagènes IV et VIII et une expression diminuée des protéoglycanes sulfatés (versicane, biglycane, décorine). Il existe actuellement peu de preuves d'un rôle direct des protéines Rho dans la régulation de la synthèse de la MEC par les cellules vasculaires. Récemment, l'équipe de Siegel a signalé que le traitement par la cérivastatine (inhibiteur de l'HMG CO-A reductase) des CMLVs inhibe l'expression de la thrombospondine, du collagène I et du biglycane et stimule l'expression de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases (TIMP-1) (*Siegel-Axel et al. 2003*). Cependant, l'équipe de Fukumoto a montré que la diminution de l'accumulation du collagène dans l'athérome chez les lapins WHHL après traitement par la fluvastatine est due à une réduction du nombre de CMLVs plutôt qu'à un effet direct sur l'expression des gènes du collagène (*Fukumoto et al. 2001*). Malgré le manque de données expérimentales sur les cellules vasculaires, il est prouvé que les protéines Rho régulent la synthèse du collagène dans d'autres types de cellules (chondrocytes, fibroblastes, cellules mésangiales). Les protéines Rho peuvent également avoir des effets indirects sur la composition de la matrice, par exemple en régulant l'expression des MMPs des cellules vasculaires, qui dégradent la matrice. De plus, si l'activation de RhoA maintient la CMLV dans le phénotype contractile et que l'expression des protéines matricielles dépend du phénotype des CMLVs alors le niveau d'activité de RhoA influencerait sur la composition matricielle de plaque d'athérosclérose.

V. Le facteur d'échange Arhgef1

A. Structure d'Arhgef1

Arhgef1 (Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 1), aussi connu sous le nom Lsc chez la souris ou encore p115RhoGEF chez l'homme, est un activateur de la voie RhoA (Figures 29 et 30).

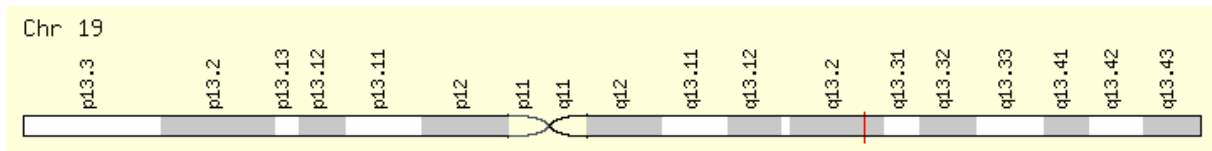


Figure 29 : Localisation génomique d'Arhgef1 sur le chromosome 19.
Signalée par un trait rouge.



Figure 30 : Structure secondaire d'Arhgef1.

La moitié de la partie C-terminale contient des domaines DH et PH agencés en tandem, typiques des RhoGEFs. La partie N-terminale contient un domaine GAP avec une complémentarité de séquence à distance avec les protéines RGS protéiques. Arhgef1 montre une activité GAP spécifique envers $G\alpha_{13}$ et $G\alpha_{12}$ et la liaison à $G\alpha_{13}$ stimule son activité GEF. Ce facteur d'échange est donc capable d'agir à la fois comme régulateur négatif et effecteur en aval de $G\alpha_{13}$. Les domaines RGS ont des séquences d'acide aminés divergents mais partagent un domaine α -hélicoïdal conservé (la « boîte de RGS ») d'environ 120 résidus. Des études biochimiques et cristallographiques montrent que ces domaines forment préférentiellement des complexes avec des sous-unités $G\alpha$ liées au $GDP-Mg^{2+}-AlF_4^-$, un analogue de l'état transitoire de l'hydrolyse du GTP. Les domaines RGS semblent promouvoir l'activité de la GTPase en stabilisant les conformations catalytiques des régions de switch I et II et des résidus d'arginine et de glutamine catalytiques conservés au sein de ces structures (Arg200 et Gln226 dans $G\alpha_{13}$). Les régions RGS d'Arhgef1 et de ses homologues, LARG, Lsc, PDZRhoGEF et GTRAP48 diffèrent des domaines canoniques des RGS. Les boîtes RGS des RhoGEF ont une identité de séquence d'acides aminés < 15% avec celles des autres sous-types de RGS. Contrairement à d'autres protéines contenant des RGS, Arhgef1 nécessite deux éléments en dehors de la boîte RGS pour se lier à $G\alpha$ et GAP. Ceux-ci incluent la séquence EDEDFE dans le segment de 42 résidus qui précède la boîte RGS et l'extension en C-terminale d'environ 70 résidus après la boîte RGS. Pour Arhgef1, cette extension en C-terminale se plie en une couche d'hélices qui

vont se loger au cœur du boîtier RGS via des interactions hydrophobes (Chen et al. 2005) (Figure 31).

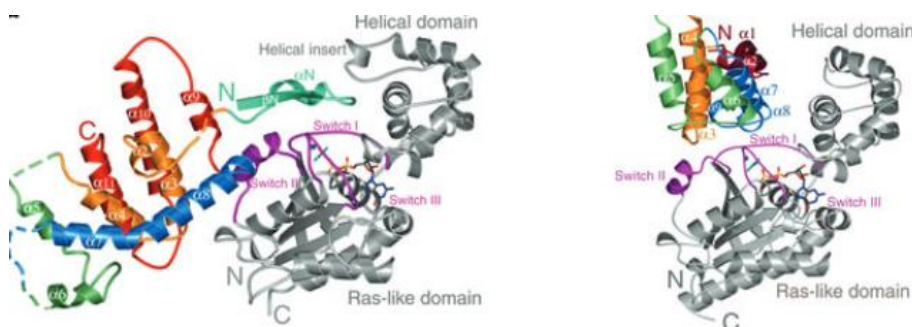


Figure 31 : Structure d'Arhgef1.

En gris, structure du complexe RGS- Ga13 ; en violet, région switch. Les segments N-terminaux sont en cyan et la couche d'hélices en C-terminal est en rouge. Les atomes d'oxygène, d'azote, de carbone et de phosphore sont respectivement rouge, bleu, gris et jaune. Le magnésium est rouge foncé. AIF4- et l'eau axiale sont bleu clair. Les segments désordonnés de la rgRGS sont des lignes en pointillées.

B. Arhgef1 et les pathologies cardio-vasculaires

L'équipe de Gervaise Loirand, à l'institut du thorax, vient de démontrer que l'activation de la protéine Arhgef1 est une cause commune à l'hypertension et à l'athérosclérose qui peuvent avoir pour conséquences un infarctus du myocarde et un accident vasculaire cérébral. Arhgef1 intervient en effet dans l'athérogenèse en permettant l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et leur infiltration dans la paroi vasculaire (Carbone et al. 2017).

Il y a encore peu de temps, le rôle de l'inflammation induite par l'angiotensine II dans le développement de l'athérosclérose n'était pas clairement établi et les mécanismes moléculaires impliqués étaient inconnus. Cependant l'activité anormale du système rénine-angiotensine-aldostérone joue un rôle causal dans le développement de l'hypertension et l'athérosclérose et donc évidemment des événements cardiovasculaires qui en résultent. A l'institut du thorax de Nantes, les chercheurs ont exploré les mécanismes responsables des effets pro-athérogènes et pro-inflammatoires de l'angiotensine II en se concentrant sur le rôle de la signalisation RhoA, dont l'inhibition explique, au moins en partie, les effets pléiotropes des statines et leurs effets bénéfiques sur les maladies cardiovasculaires. Arhgef1 est le facteur d'échange responsable de l'activation de RhoA par l'angiotensine II dans les CMLVs qui déclenche la vasoconstriction et l'augmentation de la pression artérielle (Guilluy et al. 2010). Les chercheurs démontrent le rôle essentiel d'Arhgef1 dans les leucocytes dans les effets pro-inflammatoires et pro-athérogènes de l'angiotensine II. Arhgef1 est responsable du changement de conformation et de l'activation des intégrines leucocytaires induits par l'angiotensine II, et

contrôle ainsi l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et leur infiltration dans la paroi vasculaire. Dans un modèle murin d'athérosclérose, la délétion du gène *Arhgef1* dans les leucocytes suffit à rendre les souris résistantes au développement de l'athérosclérose.

En caractérisant cette protéine comme une cause commune à l'hypertension et l'athérosclérose, ces résultats identifient *Arhgef1* comme une cible thérapeutique d'intérêt pour le développement de nouveaux traitements des maladies cardiovasculaires

HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Les plaquettes sont les médiateurs cellulaires principaux de l'hémostase et de la thrombose. Dans des conditions normales et en cas de lésion d'un vaisseau sanguin, les plaquettes subissent un changement radical de forme, se lient à des substrats protéiques adhésifs et s'agrègent pour former un caillot, interrompant ainsi le saignement. L'hyperactivité des plaquettes sert de précurseur aux maladies thrombotiques telles que l'embolie pulmonaire et l'infarctus du myocarde.

L'activation plaquettaire est régulée par de très nombreux événements moléculaires complexes qui modulent le changement morphologique, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes et ainsi la formation de thrombi. Ces événements sont coordonnés par un certain nombre de médiateurs moléculaires, tels que les petites GTPases. Ces protéines fonctionnent comme des commutateurs de signalisation intracellulaires « on-off ». Plusieurs sous-familles de petites GTPases ont été identifiées dans les plaquettes et sont des régulateurs cardinaux de la dynamique du cytosquelette d'actine, affectant l'agrégation, la sécrétion et donc la propagation et la formation de thrombi plaquettaires. Ils régissent les divers processus cellulaires via un cycle entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Il est important de noter que ce cycle est fortement régulé par les facteurs d'échange nucléotidique de la guanine (GEF) tels que les Arhgef. Bien que la famille de GEFs – dont quelques-uns ont été identifiés dans les plaquettes – ait été étudiée dans d'autres systèmes cellulaires, leur rôle dans les plaquettes n'a pas encore été complètement compris. Il a été rapporté que Arhgef3 n'est pas très important pour la fonction plaquettaire, du moins chez la souris. Arhgef10 régule l'activation plaquettaire *in vitro* (par exemple l'agrégation) et *in vivo* et Arhgef12 est essentiel à la fonction plaquettaire normale. Arhgef1 est un autre membre de cette famille fortement exprimé dans les plaquettes. Son rôle direct dans la fonction plaquettaire n'a pas encore été élucidé. En aval des récepteurs couplés à $G_{12/13}$ et G_q , RhoA est un régulateur crucial des réponses plaquettaires. Il est reconnu que ces protéines G jouent un rôle majeur dans la fonction plaquettaire et qu'Arhgef1 active G_{13} .

Les plaquettes présentes dans le compartiment sanguin sont en interaction avec la paroi des vaisseaux. La paroi artérielle saine exerce un rôle anticoagulant tandis que la paroi lésée possède des propriétés procoagulantes. La modulation phénotypique des CMLVs joue un rôle central dans les maladies athérothrombotiques. La génération de thrombine à la surface de ces cellules (thrombine tissulaire) a tout d'abord été démontrée sur des cellules apoptotiques puis sur des cellules non apoptotiques en l'absence de plaquettes et de microparticules dérivées des

plaquettes. La génération de thrombine intramurale vasculaire pourrait contribuer à la modulation de la prolifération et à la migration des CMLVs et influencer l'étendue des réponses prothrombotiques dans les lésions vasculaires et les plaques athérosclérotiques.

L'hypothèse est donc que le contrôle de la signalisation intracellulaire de RhoA par Arhgef1 est un élément central dans la régulation de l'activité procoagulante des cellules nécessaire à la coagulation plasmatique et tissulaire.

L'objectif général de ma thèse a été d'étudier l'implication d'Arhgef1 dans le contrôle de la fonction plaquettaire *in vitro* et *in vivo* et dans la coagulation. Les objectifs spécifiques ont été de caractériser le rôle d'Arhgef1 sur les fonctions plaquettaires et la génération de thrombine en sang total, à la surface des plaquettes et des CMLVs puis son implication dans un modèle de thrombose tissulaire. Pour cela, les expériences ont été réalisées avec un modèle de souris KO total constitutif pour le facteur d'échange Arhgef1.

MATERIEL ET METHODE

I. Les animaux : souris Arhgef1

Les souris sauvages (contrôle) et knock-out (*Arhgef1* $-/-$) pour *Arhgef1* ont été générées par l'UMR_S 1087 (Institut du thorax de Nantes). Des souris *Arhgef1* lox/lox (créées par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris C57Bl6J) ont été croisées avec des souris exprimant la recombinaase Cre dans le promoteur du cytomégalo virus CMV-Cre (Jackson) (Figure 32).

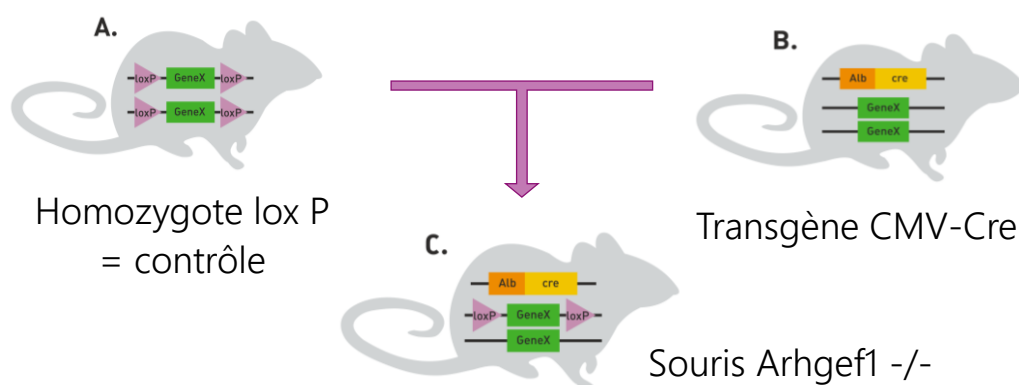


Figure 32 : Génération de souris knock-out (*Arhgef1* $-/-$) totales, constitutives pour *Arhgef1*. Des souris portant le système *LoxP-Arhgef1* sont croisées avec des souris portant le gène *Alb-Cre*. Les souris transgéniques obtenues sont KO pour le gène

Les souris utilisées pour l'ensemble des expériences n'expriment plus la CMV-Cre : elles sont uniquement *Arhgef1* $-/-$ ou *Arhgef1* lox/lox pour les souris contrôles. Elles avaient entre 2 mois et 24 mois. Ce projet a reçu l'aval du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation sous le numéro APAFIS#6591-2016083118317810 v3

Les expériences ont été réalisées conformément aux recommandations de la communauté européenne (directive 2010/63/UE) et du comité d'éthique de la région Lorraine.

Bien-être animal d'après le Décret n°2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques

Notre laboratoire possède l'agrément d'établissement utilisateur (N° A 54-547-26 délivré le 26.02.2015). Les animaux ont été hébergés dans l'animalerie INSERM ayant le numéro d'agrément pour l'hébergement B 54-547-22 (UMR_S 1256 faculté de médecine –Vandoeuvre-lès-Nancy) délivré le 18.11.2010

- La règle des 3 R

En 1959, W.M.S Russel et R.L Burch ont élaboré un programme visant à graduer les souffrances des animaux en expérimentation dans les laboratoires ; appelé la « règle des 3 R ». Celui-ci comprend trois points : réduire, raffiner et remplacer, que nous avons adoptés à toutes nos expérimentations. En effet, nous avons utilisé un nombre d'animaux restreint et limité aux expériences considérées comme indispensables. Un protocole expérimental a été rédigé avant toute expérimentation et le nombre d'animaux nécessaires a été estimé par l'utilisation des statistiques lors de la conception du protocole. Le modèle animal a été choisi avec soin en prenant en compte les connaissances actuelles. Les conditions de transport et d'hébergement répondent à des critères très stricts comprenant l'enrichissement (jeux dans la cage) et le soin (change régulier de la litière, maintien de la température et de l'hygrométrie de la pièce) dans le but d'augmenter leur bien-être. Nos modèles *in vivo* ont été remplacés dès que cela s'est avéré possible par des modèles *in vitro*.

- Les points limites

Afin d'éviter toutes douleurs et souffrances subies par les animaux, il est primordial de fixer des points limites. Si 3 ou plus des points limites sont observés, l'animal est mis à mort : à savoir une perte de poids de 10 à 15% sur 3 jours, un isolement, des yeux fermés, un dos voûté, le poil hérissé, une immobilité, une déshydratation, une température corporelle anormale, un abdomen creux, une automutilation.

II. Préparation des spécimens plasmatiques et prélèvements d'organes

A. Préparation des spécimens plasmatiques murins

Les animaux non à jeun sont anesthésiés à l'isoflurane 4% avec un débit d'oxygène de 1,5 L/min. Le sang est prélevé par écoulement libre après section de la carotide et anticoagulé avec 1 volume de citrate de sodium à 106 mM pour 9 volumes de sang ou 1 volume d'acide citrate dextrose (ACD) (85 mM de $C_6H_5Na_3O_7$, 66,6 mM de $C_6H_8O_7$ et 111 mM de $C_6H_{12}O_6$) pour 6 volumes de sang. Après 10 min au repos à température ambiante, le sang est centrifugé à 190g pendant 4 min à 20°C puis à 1900g pendant 70 s à 20°C. Pour les prélèvements contenant le citrate de sodium, le plasma riche en plaquettes (PRP) est récupéré et il est centrifugé à 1750g pendant 10 min à 20°C. Les plasmas pauvres en plaquettes (PPP) obtenus pourront être immédiatement utilisés pour les expériences ou congelés -80°C. Pour les prélèvements contenant l'ACD, le PRP est récupéré et il est centrifugé à 7300g pendant 4 min à 20°C. Le

culot de plaquettes formé peut être suspendu dans un tampon pour préparer les plaquettes lavées (protocole détaillé plus tard) et le surnageant, PPP, ainsi obtenu peut être conservé à -80°C.

B. Prélèvements de tissus et d'organes

Les animaux sont mis à mort par excès d'isoflurane. L'aorte, les carotides, le foie, la rate et les reins sont ensuite prélevés et dégraissés sur glace dans du sérum physiologique. L'aorte sera utilisée pour la mise en culture de cellules musculaires lisses et/ou en thrombinographie et les autres prélèvements sont conservés à -80°C.

III. Thrombinographie

La thrombinographie est une technique utilisée pour suivre la cinétique de la génération et de l'inhibition de thrombine en sang total ou en plasma *in vitro*. L'activité de la thrombine est suivie au cours du temps grâce à un substrat fluorigène spécifique de cette enzyme. Plusieurs paramètres sont donnés par le thrombinogramme : le temps de latence qui correspond à la durée de la phase d'initiation (min), la quantité maximale de thrombine formée ou pic (nM) et le temps pour atteindre le pic (min). D'autres paramètres peuvent être déduits : la pente maximale de génération de thrombine (nM/min) et le potentiel thrombotique (ETP pour endogenous thrombin potential en nM x min). Ce dernier est calculé comme l'aire sous la courbe de la concentration de thrombine en fonction du temps (Figure 33).

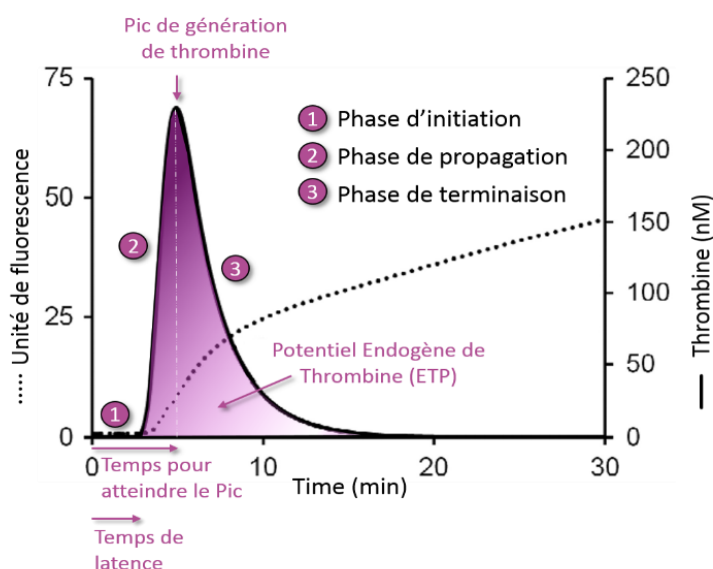


Figure 33 : Schéma des paramètres mesurés et calculés lors de l'analyse de la génération de thrombine.

La courbe de génération de thrombine est la dérivée première de la courbe de fluorescence.

Le suivi de la génération de thrombine dans les plasmas ou à la surface des CMLVs est réalisé dans le fluorimètre Fluoroskan Ascent (LabSystems) avec le logiciel dédié Thrombinoscope® version 3.1.0.55 (Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas) en utilisant le substrat fluorigène de la thrombine Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem). La fluorescence est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 390 nm, une longueur d'onde d'émission à 460 nm et un intervalle de mesure de 15 s. Pour le sang total, le suivi de la génération de thrombine est réalisé dans le fluorimètre avec le logiciel dédié Ascent Software for Fluoroskan® en utilisant le substrat fluorigène de la thrombine P2Rho (Synapse B.V.). La fluorescence est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 485 nm, une longueur d'onde d'émission à 538 nm.

Un calibrant (mélange d'un complexe α_2 -macroglobuline/thrombine humaine ajusté à une activité connue d'environ 600 nM avec de l'antithrombine bovine à 100 nM et de l'héparine à 2 U/mL) (Synapse B.V.) est ajouté sur la plaque en duplicate. Il sert aussi à corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne ainsi que l'influence de facteurs optiques intrinsèques au plasma, de l'appareillage et des consommables. Les mesures sont réalisées en triple dans des microplaques 96 puits en polypropylène, fond rond (Greiner) pour le plasma et fond plat (Polysorp) pour le sang total.

A. Génération de thrombine dans le sang

Pour les expériences en sang total, 30 μ L de sang citraté et 10 μ L de substrat P2Rho à 1,8 mM sont déposés dans une plaque à fond rond (Greiner, Dutscher). Un volume de 20 μ L de facteur tissulaire (FT) (h-rTF, Innovin Dade Behring) à 1,5 pM ou de HBS pH 7,35 constitué d'HEPES (N-[2-hydroxyethyl] pipérazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 20 mM, de NaCl 140 mM et de BSA (Sigma re. A-3912) à 5 g/L ou de calibrant à 300 nM est ajouté au mélange sang total – P2Rho. Un volume de 5 μ L de ce mélange est immédiatement prélevé et déposé dans une plaque à fond plat (Polysorp) préchauffée à 37°C et contenant du papier Whatman (589/1 Grosseron) découpé au diamètre du puits. Après addition de 40 μ L d'huile minérale préchauffée à 37°C, la plaque est placée immédiatement dans le fluorimètre et la lecture cinétique de la fluorescence est lancée.

Pour les expériences en plasma, dans chaque puits sont ajoutés 35 μ L de tampon HBS pH 7,35, 5 μ L d'un mélange de FT à une concentration finale de 0,5 pM, de vésicules phospholipidiques (VP) constituées de phosphatidyl-choline/phosphatidyl-sérine/phosphatidyl-éthanolamine (PC/PS/PE) dans un rapport 60/20/20 moles % à une concentration finale de 4 μ M puis 10 μ L de plasma. Dans deux autres puits, 10 μ L de calibrant,

30 μL de tampon HBS et 10 μL de plasma sont inclus dans la plaque pour chaque plasma étudié. La plaque est placée dans le fluorimètre 10 min avant l'addition de 10 μL d'un mélange de substrat Z-Gly-Arg-AMC à 2,5 mM en Hépès 20 mM, pH 7,35, contenant de la BSA (albumine bovine sérique) à 60 g/L et de CaCl_2 100 mM.

B. Génération de thrombine à la surface des CMLVs

La mesure de génération de thrombine à la surface des cellules est réalisée sans ajout de VP ni de FT. Les CMLVs sont cultivées en plaques 96 puits (MICROTESTTM96) à fond plat à raison de 7500 cellules par puits. Le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées successivement avec 200 μL de PBS (sans Ca^{2+} et sans Mg^{2+}) puis de HBS à 37°C par puits. Le milieu réactionnel final est de 20 μL d'HBS, 80 μL de PPP humain et 20 μL du mélange de substrat fluorigène 2,5 mM et de CaCl_2 100 mM (Figure 34).

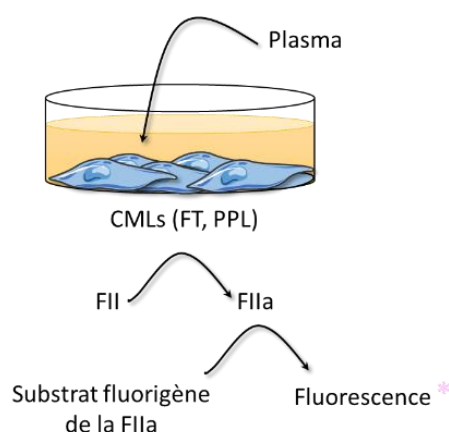


Figure 34 : Génération de thrombine à la surface des CMLVs.

IV. Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire a été mesurée à l'aide d'un thromboagrégomètre photométrique (SD Innovation, Frouard, France) (Figure 35) en utilisant immédiatement des plaquettes lavées de souris ajustées à 200 G/L. L'appareil permet la mesure de la cinétique de l'agrégation plaquettaire d'une suspension de plaquettes lavées en présence de différentes concentrations d'agents agrégeant (agonistes) selon la méthode de Born.

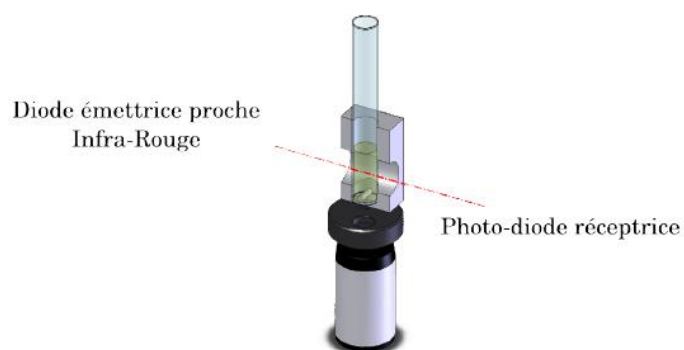


Figure 35 : Principe de Born.

L'agrégation est mesurée par une technique photométrique, où le 0 % de transmission optique correspond au PRP et le 100 % correspond à un plasma pauvre en plaquettes.

Pour la préparation de plaquettes lavées de souris, le PRP issu du sang prélevé sur ACD est centrifugé 4 min à 7300g à 20°C. Le surnageant est ensuite retiré et le plasma restant sur les parois du tube est absorbé avec un coton. Les plaquettes sont ensuite resuspendues avec du tampon Tyrode-BSA (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHCO₃ 12 mM, Na₂HPO₄ 0,4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hépès 5mM, glucose 5,5 mM, albumine 0,35%, pH 7,3). Un comptage est effectué pour pouvoir ajuster la numération plaquettaire à la valeur choisie de 200 G/L.

La mesure de l'agrégation plaquettaire a été réalisée sous agitation (1100 tours/min) dans des cuves à 37°C contenant chacune 300 µL de plaquettes lavées. Elle permet de quantifier l'agrégation des plaquettes en mesurant la transmission de lumière à travers des plaquettes en suspension dans un tampon.

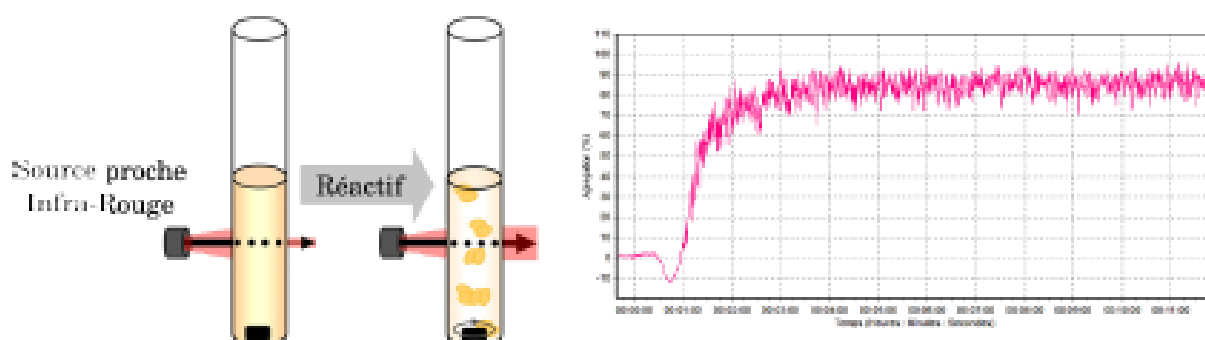


Figure 36 : Principe de mesure, avant et après agrégation.

L'échelle de transmission lumineuse a été réglée à 100% avec le tampon Tyrode et à 0% avec les plaquettes lavées de souris. La transmission de lumière augmente au fur et à mesure que les plaquettes forment des agrégats et les résultats sont exprimés en pourcentage d'agrégation. L'amplitude et la vitesse de cette augmentation dépendent essentiellement de la réactivité des plaquettes. Cinq agonistes ont été utilisés : du collagène à une concentration finale de 10 µg/mL

(SD Innovation, Frouard, France), de l'ADP (SD Innovation, Frouard, France) à 10 μ M, du TRAP (thrombin receptor agonist peptide) (Hart Biological, hartlepool, UK) à 10 μ M, de l'acide arachidonique (aa) (SD Innovation, Frouard, France) à 0,1 mg/mL et de la thrombine à 1 U/mL (Diamed, Cressier, Suisse). L'agrégation débute par l'ajout de l'un de ces agonistes et elle est suivie pendant 10 min. Un logiciel dédié permet de calculer les paramètres d'agrégation (pourcentage d'agrégation à 3 et 6 min, pourcentage d'agrégation maximale, vitesse initiale, aire sous la courbe à 4 min). Le pourcentage d'agrégation maximale a été retenu pour l'interprétation des résultats.

V. Activation plaquettaire

La cytométrie en flux permet l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Elle consiste à passer à grande vitesse chaque cellule devant le faisceau laser ce qui permettra une caractérisation individuelle, quantitative et qualitative des cellules. La lumière réémise permet de classer la population suivant plusieurs critères (taille, granulosité, expression de protéines de surface, ...) et ainsi de le compter en fonction de ces critères.

A. Quantification des glycoprotéines de surface des plaquettes murines

Un volume de 5 μ L de plaquettes lavées à 200 G/L dans 20 μ L de tampon Tyrode est incubé en présence du volume choisi pour chaque anticorps couplé à un fluorochrome (Tableau 10) pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un volume de 300 μ L de PBS est ensuite ajouté et les cellules sont alors passées immédiatement dans le cytomètre. Un contrôle négatif est réalisé pour chaque animal sans l'ajout d'anticorps.

Tableau 10 : Protocole de cytométrie pour caractérisation des plaquettes de souris.

	Fournisseur	Fluorochrome	Volume final d'anticorps
Clec-2	AbD serotec	FITC	1 µL
GPIIb	Emfret analytic	DL 649	1 µL
GPIX	Emfret analytic	FITC	1 µL
GPV	Novus Biologicals	APC	2.5 µL
CD9	Biolegend Alex Fluor®	AF647	2.5 µL
GPVI	R&D systems	PE	1 µL
α_2	Biolegend Pacific Blue™	PB	2,5 µL
β_1	eBio science	APC	1 µL
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Emfret analytic	FITC	1 µL
$\alpha_{IIb}\beta_3$ activé	Emfret analytic	PE	1 µL
$\alpha_v\beta_3$	Bioss	FITC	2,5 µL
PAR1	Santa Cruz Biotechnology	AF405	2,5 µL

B. Evaluation de l'exposition de la phosphatidylsérine, de la P-sélectine et de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des plaquettes

Les plaquettes lavées ajustées à 200 G/L sont stimulées par des concentrations croissantes en thrombine (0,5, 2 et 5 U/mL) (Diamed, Cressier, Suisse) et en collagène (0,25, 5 et 25 µg/mL) (SD Innovation, Frouard, France) pendant 30 min. Un volume de 5 µL d'annexine V (Molecular Probes by Life Technologies, Alexa Fluor®) à 8,3 mg/mL couplé au fluorochrome FITC (fluorescéine isothiocyanate) et 2 µL de l'anticorps anti- α -P-sélectine (Santa Cruz biotechnology) à 200 µg/mL couplé au fluorochrome phycoérythrine (PE) sont ajoutés à 20 µL de plaquettes pour quantifier la fixation d'annexine V (un marqueur de l'exposition de la PS) et l'exposition de P-sélectine à la surface des plaquettes respectivement. Un deuxième tube contenant 1 µL d'anticorps anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ activée (Emfret analytics) couplé au fluorochrome PE est ajouté à 20 µL de plaquettes. Un troisième tube contenant uniquement 20 µL de plaquettes sert de contrôle négatif. Les tubes sont agités puis incubés 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après cette incubation, du tampon PBS sans Ca^{2+} et sans Mg^{2+} est ajouté

au contrôle négatif. Un volume de 300 μL de tampon annexin V (Aposcreen Annexin V®, Beckman-Coulter) est ajouté aux autres tubes. Les tubes sont à nouveau agités. Les échantillons sont analysés avec le cytomètre (Gallios, Beckman-Coulter). La quantité de microparticules libérées par les plaquettes en réponse aux stimulations est estimée par leur taille (0,3 à 0,9 μm) et le résultat est donné en pourcentage d'éléments de cette taille par rapport à la totalité des événements comptés.

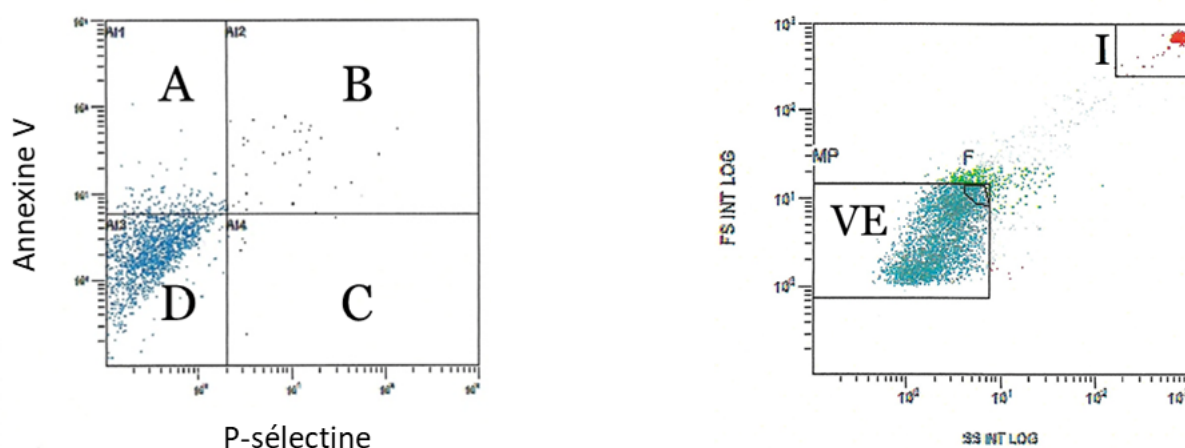


Figure 37 : Marquage des plaquettes à l'annexine V et à la P-sélectine et quantification des vésicules extracellulaires.

(A gauche) Marquage de plaquettes à l'annexine V et à la P-sélectine (A = Annexine V+ ; B = Annexine V+ et P-sélectine+ ; C = P-sélectine+ ; D = Annexine V- et P-sélectine-). (A droite) Quantité de vésicules extracellulaires (VE) libérées par les plaquettes en réponse aux stimulations et estimées par leur taille grâce à l'utilisation de billes (I)

C. Mesure du Ca^{2+} cytosolique suite à une mobilisation du système tubulaire dense

Un volume de 265 μL de tampon Tyrode, 35 μL de plaquettes lavées à 200 G/L et 3,6 μL d'un mélange constitué de 1,2 μL d'acide pluronique (Life Technologie-Invitrogen Pluronic F-127) et de 2,4 μL de Fluo 3AM (Sigma) à 1 mM est mis à incuber sous agitation douce pendant 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. A la fin de ce temps, 1 mL de tampon Tyrode est ajouté et la suspension est centrifugée à 7300g pendant 4 min à 20°C. Le culot est récupéré et suspendu dans 300 μL de Tyrode. Les cellules sont passées dans le cytomètre en flux pendant 1 min pour déterminer le niveau de base, puis l'agoniste est ajouté (5 μL de thrombine à 80 U/mL ou 5 μL de collagène à 1 mg/mL ou 30 μL d'acide arachidonique (5 mg/mL) et la lecture reprend pendant 3 min. Enfin, 5 μL de ionomycine (Lide Technologie-Invitrogen) à 0,15 mM sont ajoutés pour évaluer l'activation maximale.

VI. Dosage par test ELISA des marqueurs pro- et anti-coagulants plasmatiques

Chacun des dosages suivants a été réalisé selon les instructions du fournisseur. Les différentes troussees utilisées sont :

- le kit ACTICHROME® TFPI Activity ref 848 (SEKISUI Diagnostic, Lexington, États-Unis) pour le dosage de l'activité du TFPI
- le kit Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Cloud-Clonde Corp., Houston, Etats-Unis) pour le dosage de la thrombomoduline soluble
- le kit ASSERACHROM® vWF :Ag ref 00942 (Stago, Paris, France) pour le dosage du vWF
- le kit ATP Determination kit réf 122066 (Molecular Probes, Eugene, États-Unis) pour le dosage de l'ATP

Le dosage du CD146 soluble a été mis au point au laboratoire. Un volume de 100 µL d'une solution d'anticorps monoclonal de souris anti-CD146 (US Biological, Swampscott, Etats-Unis) à 1 µg/mL dilué dans un tampon carbonate-bicarbonate pH 9,6 est déposé dans chaque puits d'une plaque COSTAR « high binding ». Après une nuit à 4°C, les puits sont vidés et la saturation est effectuée en distribuant 125 µL de BSA (Sigma) à 1% dans du PBS (NaCl 131 mM, Na₂HPO₄ 5,1 mM, KH₂PO₄ 1,56 mM), dans chaque puits. L'incubation se fait à 4°C pendant au moins une nuit. Les PPP sont dilués au 1/5 et 1/10 dans du PBS contenant du 0,05 % de Tween-20 (Sigma (PBS-Tween) (PBST-T). Un volume de 100 µL de chaque dilution est déposé dans chaque puits. Le mélange est incubé 2 h à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS-T, 100 µL d'anticorps monoclonal de souris anti-CD146, clone 2Q401, marqué à la biotine (USBioLogical), à 1 µg/mL dans du PBS-T, sont ajoutés dans chaque puits. Le mélange est incubé pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS-T, 100 µL de streptavidine-HRP (Horseradish Peroxidase) (Zymed, San Francisco, USA) au 1/1000 dans du PBS-T, sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée 15 min à température ambiante. Après 5 rinçages avec du PBS-T et un lavage avec de l'acétate citrate pH 6, la révélation est réalisée avec 100 µL de substrat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 0,1 mM / H₂O₂ 6 mM par puits. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 µL d'H₂SO₄ à 1 M. La lecture est effectuée à 450 nm. Les résultats sont exprimés en absorbance à 450 nm car les solutions disponibles en CD146 humain ne sont pas reconnues par les anticorps utilisés pour le dosage du CD146 de souris.

VII. Adhérence plaquettaire sur fibrinogène

L'adhérence des plaquettes Arhgef1 $\pm$ et contrôles au repos est étudiée de la manière suivante : une plaque 96 puits (MICROTEST TM₉₆) est couverte de fibrinogène (100 μ g/mL) toute une nuit. Le lendemain, le revêtement est retiré. Un volume de 50 μ L de plaquettes lavées à 200 G/L est déposé en triplicat dans la plaque qui est ensuite placée à 37°C pendant 2h. Les plaquettes non adhérentes sont retirées par un lavage au PBS et les autres plaquettes sont fixées par du paraformaldéhyde à 4% (HT501640-19L, Sigma) pendant 10 min puis lavées avec du PBS. Les plaquettes sont ensuite marquées pendant 15 minutes au bleu de toluidine (Sigma Aldrich) et rincées 2 fois à l'eau distillée. Enfin les plaquettes sont lysées par l'ajout de sulfate dodecyl de sodium à 1% dans de l'eau distillée. L'absorbance est lue à 593 nm.

VIII. Etalement plaquettaire sur fibrinogène

L'étalement des plaquettes Arhgef1 $\pm$ et contrôles au repos et après stimulation avec de la thrombine (1 U/mL) est étudié de la manière suivante : des chambres de culture cellulaire stériles sont couvertes de fibrinogène (100 μ g/mL) toute une nuit à 4°C. Le lendemain, le revêtement est retiré et les plaquettes lavées à 100 G/L sont déposées et incubées pendant 45 min à température ambiante stimulées ou non par la thrombine puis fixées pendant 30 min avec du paraformaldéhyde à 4% (HT501640-19L, Sigma). Les cellules sont rincées avec du PBS puis incubées pendant 10 min dans du PBS-T avec 0,5 % de Triton x100 (PBS-TT) puis rincées 5 min dans du PBS-T. Les chambres de culture sont ensuite incubées dans du PBS-T contenant 5 % de BSA (albumine bovine sérique) pendant 30 min afin de bloquer les sites de liaisons non-spécifiques puis incubées avec de la phalloïdine (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin, Invitrogen) diluée au 1/500 dans du PBS-T contenant 1 % de BSA. Les lames sont à nouveau lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS-T. Après avoir retiré tout l'excédent de liquide, une goutte de Floromount ((F4680, Sigma) est déposée sur chaque lame qui est ensuite recouverte par une lamelle en évitant de créer des bulles d'air. Le montage est laissé à sécher pendant 1 h à température ambiante. Les coins des lames sont recouverts avec du vernis et les lames sont conservées à 4°C ou à -20°C pour une conservation plus longue. L'observation des lames se fait sous microscope confocal (Supercontinuum Leica TCS SP5 X, Leica Microsystems). Par condition, 5 champs sélectionnés aléatoirement sont photographiés et au total 25 plaquettes sont étudiées (comptage des filopodes, des lamellipodes et mesure de la surface cellulaire).

IX. Etude de la voie de signalisation par Western Blot

Les plaquettes lavées Arhgef1 -/- et contrôles sont laissées au repos ou stimulées avec de la thrombine (1 U/mL) pendant 1 min. Les cellules sont ensuite lysées chimiquement avec du tampon NETF NP40. Cette lyse chimique est aidée par une action mécanique (agitation) qui permet de récupérer les lysats cellulaires. Les lysats sont ensuite centrifugés à 14 000 *g* pendant 5 min à 4°C et les concentrations de protéines des surnageants sont dosées par la méthode de Bradford.

Suite au dosage, du tampon de charge (Biorad, Laemmli Sample Buffer 1X) est ajouté aux échantillons et ces derniers peuvent être déposés sur des gels de polyacrylamide dénaturant de 4 à 15 % (Biorad) afin de réaliser des électrophorèses. Les protéines sont ensuite transférées sur des membranes de nitrocellulose (Biorad) afin de réaliser des Western-Blot. Après le transfert, les membranes sont incubées avec différents anticorps ciblant la forme phosphorylée et la forme totale de la protéine MLC (1/500) (Cell signaling, 3674S et 3672S) ainsi qu'avec la β -actine (1/2000) (Sigma, A5316-2mL) pendant toute une nuit à 4°C. Après 3 lavages au TBS-Tween 0,05 % (tampon TBS : Tris 50 mM, NaCl 175 mM, pH 7,9), les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la horseradish peroxidase (HRP) pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, 3 lavages au TBS-Tween 0,05 % sont réalisés et les membranes sont révélées par chimiluminescence en appliquant la solution de *Clarity*, et les protéines sont détectées par une caméra *ChemiDoc MP system*. La quantification de la chimiluminescence est réalisée avec le logiciel ImageJ.

X. Dosage de l'activation de RhoA par pull-down

Les plaquettes lavées Arhgef1 -/- et contrôles sont laissées au repos ou stimulées avec de la thrombine (1 U/mL) pendant 1 min. Du tampon de lyse (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 500 mM NaCl, 1% (vol/vol) Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% déoxycholate et 10 mM MgCl₂) glacé est ajouté aux cellules puis le tout est centrifugé à 14 000 *g* pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. La quantité de protéines totales est ensuite mesurée par le kit Biorad DC protein assay. La quantité de protéines totales est égalisée par l'ajout de tampon de lyse RBD. Un échantillon de 50 μ l du lysat total servira à évaluer la quantité de RhoA total. Le reste du lysat est mis au contact de billes de glutathion-sepharose sur lesquelles ont été préalablement fixé 50 μ g de protéines recombinantes GTS-RBD mimant le site d'interaction de ROCK avec RhoA-GTP. Les tubes sont mis en agitation à 18 rpm à 4°C pendant 1 h. Les billes

sont lavées 3 fois avec le tampon de lavage, le surnageant est aspiré et les billes sont remises en suspension dans 30 μ L de tampon SDS-PAGE. Le tout est mis à bouillir pendant 10 min et centrifugé brièvement pour récupérer l'échantillon qui peut être conservé à -20°C pendant plusieurs jours avant de procéder à la séparation par SDS-PAGE et au transfert. Les lysats des différentes conditions et des différents échantillons sont déposés sur les gels SDS-PAGE. Les échantillons couplés à RBD sont déposés sur des gels à 15 %. Le transfert est réalisé puis la lecture effectuée comme pour le Western Blot

XI. Dosage d'hémoglobine et temps de saignement

Le temps de saignement est mesuré selon la méthode décrite par Grüner et al. (*Grüner et al., 2004*). Une injection en sous-cutanée de buprénorphine (0,05 à 0,1 mg/kg) est réalisée 10 min avant la procédure afin d'éviter la douleur à l'animal au réveil. L'injection est renouvelée au bout de 8h. Les souris sont pesées puis anesthésiées sur une platine chauffante à 37°C avec 2 % d'isoflurane dans 1,5 L/min d'oxygène. La queue est sectionnée à 3 mm de son extrémité à l'aide d'un scalpel. L'écoulement libre du sang est suivi en plongeant la queue dans un tube Falcon® de 15 mL rempli de sérum physiologique chauffé à 37°C . Les arrêts et les reprises des saignements sont assidûment notés. L'expérience est limitée à 30 min (Figure 38). La durée du temps de saignement est exprimée en secondes et elle correspond au temps total de l'expérience (1800 secondes) à laquelle on soustrait le temps de chaque arrêt.

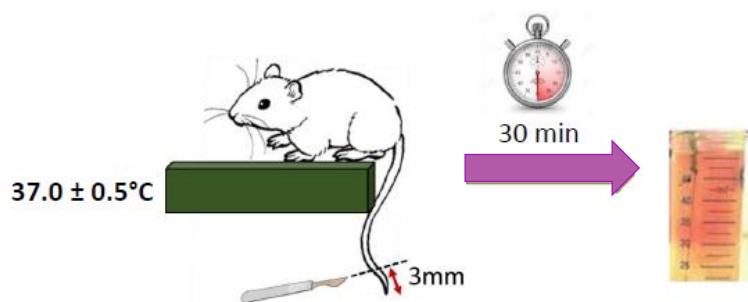


Figure 38 : Schéma du modèle de saignement à la queue.

Le tube de sérum physiologique est récupéré à la fin pour mesurer l'hémoglobine selon le protocole de Liu et al., (2014). Les cellules du sang sont séparées par une centrifugation à 4000 rpm/min pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est retiré et les érythrocytes sont re-suspendus dans 2 mL de tampon de lyse (ABX corporation). Après 10 min d'incubation dans le tampon de lyse, les tubes sont centrifugés à 10 000 rpm/min pendant 5 min

à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 550 nm par spectrophotométrie (SHIMADZU UV-150-02, Kyoto, Japon) et les concentrations d'hémoglobines et les volumes de sang perdus sont calculés à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec du sang de huit souris contrôles dont la concentration en hémoglobine a été déterminée auparavant.

XII. Modèle de caillot physiologique à la queue

Les souris sont pesées puis anesthésiées sur une platine chauffante à 37°C avec 2 % d'isoflurane dans 1,5 L/min d'oxygène. A l'aide d'un scalpel, l'extrémité de la queue de la souris est sectionnée à 3 mm puis la queue dans sa totalité est plongée dans du sérum physiologique (NaCl à 0,9 %) pendant 30 s, 5 min, 10 min ou 20 min. Après ce laps de temps, la queue de la souris est sectionnée à nouveau à l'aide du scalpel afin d'obtenir une section de 5 mm de l'extrémité de la queue. Cette section est plongée immédiatement dans 1 mL de paraformaldéhyde à 4 % pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont rincés dans du PBS (Phosphate Buffered Saline contenant du NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 1,47 mM à pH 7,4) pendant 1 h à température ambiante. Suite à ce rinçage, les sections de queue sont déposées dans des cassettes remplies d'OCT (Optimal Cutting Temperature) qui seront conservées à -80°C (Figure 39).

Les blocs d'OCT contenant les sections de queue de souris sont coupées longitudinalement à une épaisseur de 5 µm grâce à un cryostat (Leica). Les lames sont conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

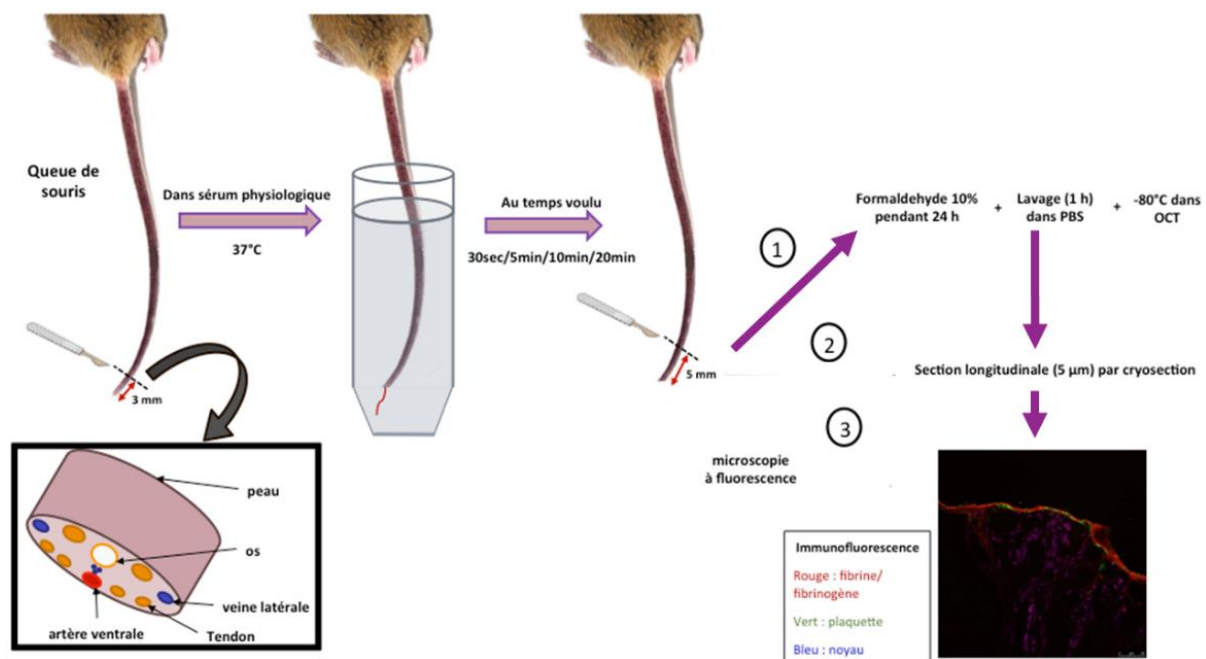


Figure 39 : Schéma récapitulatif de la procédure de formation et de l'imagerie d'un caillot physiologique à la queue.

Les lames sont placées dans une cuve noire et humide puis rincées 10 min avec du PBS pour retirer l'OCT. Les échantillons sont incubés pendant 15 min dans du PBS-TT puis rincés 5 min dans du PBS-T. La zone d'incubation est délimitée à l'aide d'un feutre hydrophobe. Puis, la lame est incubée dans du PBS-T contenant 5 % de BSA pendant 30 min afin de bloquer les sites de liaisons non-spécifiques. L'anticorps primaire de lapin anti-fibrine/fibrinogène (Abcam ab34269) et l'anticorps primaire de rat anti- α_{IIb} (BD Pharmingen 553847 clone MWReg30) sont dilués respectivement au 1/300 et au 1/100 dans du PBS-T contenant 1 % de BSA et centrifugés pendant 10 min à 13000g pour retirer les agrégats. Les lames sont incubées pendant 2 h à température ambiante avec ces anticorps puis rincées 3 fois pendant 5 min dans du PBS-T. Les anticorps secondaires anti-lapin (Dk@RT488) et anti-rat (Dk@Rb549) sont dilués au 1/500 dans du PBS-T contenant 1 % de BSA et centrifugés pendant 10 min à 13000g pour retirer les agrégats. Les lames sont incubées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps et du Dapi pour marquer les noyaux des tous les éléments cellulaires de la queue. Les lames sont à nouveau lavées 3 fois pendant 5 min avec du PBS-T. Après avoir retiré tout l'excédent de liquide, une goutte de Floromount est déposée sur chaque lame qui est ensuite recouverte par une lamelle en évitant de créer des bulles d'air. Le montage est laissé à sécher pendant 1 h à température ambiante. Les coins des lames sont recouverts avec du vernis et les lames sont conservées à 4°C ou à -20°C pour une conservation plus longue. L'observation des lames se fait sous microscope à fluorescence (Nikon eclipse).

XIII. Modèle de thrombose carotidienne induite par du Chlorure de Fer

A. Préparation des animaux

Les animaux sont pesés puis anesthésiés avec 2 % d'isoflurane dans 0,5 L/min d'oxygène en décubitus dorsal sur une platine chauffante à 37°C reliée à une sonde rectale. La carotide droite est exposée par chirurgie puis une bande plastique est déposée en-dessous afin d'isoler la carotide du reste des tissus. Du gel échographique chauffé à 37°C est alors déposé délicatement sur la carotide pour pouvoir suivre l'évolution du flux sanguin par Echo-Doppler et donc l'occlusion de l'artère par la formation d'un thrombus.

B. Visualisation du flux avant l'application du FeCl_3

Grâce à une sonde de 30 MHz, le flux sanguin au travers de la carotide peut être visualisé sur l'appareil d'Echo-Doppler (Vevo770, FUJIFILM Visualsonics Ins, Amsterdam, The Netherlands). Le gel est déposé sur la carotide puis le flux est mesuré avant l'application du FeCl_3 . Le gel est alors retiré, la carotide nettoyée avec une compresse puis séchée avant l'application du FeCl_3 .

C. Visualisation du flux après application du FeCl_3

Du papier Whatman n°1 ayant pour dimensions 1 x 5 mm est saturé avec 10 % de FeCl_3 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). La formation d'un thrombus est initiée en appliquant ce papier-filtre sur l'extérieur de la carotide pendant 2 min. Le papier-filtre est alors retiré et la carotide nettoyée avec du sérum physiologique. Du gel échographique est à nouveau déposé. Le flux est enregistré pendant 30 min (Figure 40).

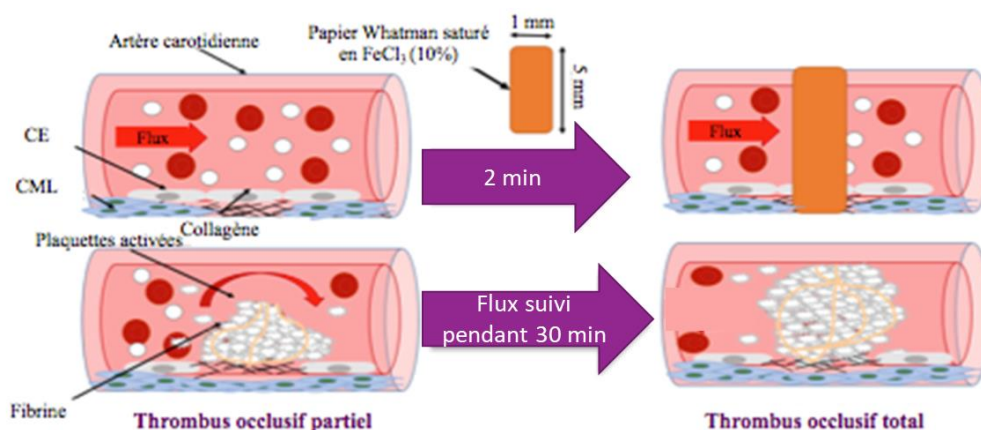


Figure 40 : Schéma de thrombose carotidienne induite par le FeCl_3 chez la souris.

La carotide d'une souris anesthésiée est disséquée et isolée du tissu environnant par un morceau de plastique. Un papier filtre imbibé de FeCl_3 est appliqué sur l'adventice afin d'induire la formation d'un thrombus.

XIV. Culture primaire des CMLVs à partir des aortes thoraciques des souris

A. Isolement des cellules et mise en culture

L'obtention des CMLVs issues de la paroi aortique des souris est réalisée selon le protocole mis au point par l'équipe du Dr. J-B Michel (UMR_S 1148).

Les souris sont anesthésiées avec 2 % d'isoflurane dans 1,5 L/min d'oxygène puis perfusées en intracardiaque/intraaortique avec 5 à 10 mL de PBS supplémenté en antibiotiques (100 U/mL de pénicilline-streptomycine) afin d'éliminer le sang. Les aortes thoraciques sont prélevées en prenant garde à ne pas toucher les organes digestifs afin d'éviter toute contamination bactérienne. Les aortes sont placées sur de la glace dans une boîte de pétri contenant du PBS additionné d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline-streptomycine). Le tissu adipeux et l'adventice sont retirés aseptiquement sous loupe binoculaire. L'artère est alors découpée en anneaux de quelques millimètres de longueur puis transférée dans un tube eppendorf contenant un mélange de collagénase à 1 mg/mL et d'élastase à 0,125 mg/mL (Worthington) et du milieu Low DMEM (Gibco®) qui sera incubé au bain-marie sous agitation pendant 20 min à 37°C. Les anneaux aortiques sont ensuite rincés trois fois avec du milieu DMEM contenant 10 % de SVF (Sigma®) et des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline-streptomycine).

La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 rpm/min pendant 5 min. Les cellules sont reprises dans 1,5 mL de milieu complet (contenant du milieu Low DMEM et 10 % de SVF, 100 U/mL de pénicilline-streptomycine) et des fongicides (plasmocine à 2,5 µg/mL (InvivoGene) et primocine à 100 µg/mL (InvivoGene)). Pour parfaitement éliminer les enzymes de digestion, une deuxième centrifugation est effectuée. Les anneaux et les cellules sontensemencés dans 800 µL de milieu par puits dans une plaque 6 puits préalablement incubée avec 400 µL de fibronectine à 50 µg/mL par puits à 37°C pendant 30 min. La plaque est laissée dans l'incubateur jusqu'au lendemain puis 800 µL de milieu complet sont ajoutés. Le milieu de culture est pour la première fois changé au bout d'une semaine afin d'enlever les anneaux et que seules les cellules adhérentes restent dans les puits. Par la suite, tous les deux jours le milieu est changé jusqu'à confluence des cellules.

B. Entretien des cellules

A la confluence, les cellules en culture sont rincées deux fois avec du PBS afin d'éviter une inhibition de la trypsine par le SVF. Un volume de 1 mL de trypsine-EDTA (0,05 %, Gibco®) pour une flasque de 25 cm² est ensuite ajouté et les boîtes sont remises à l'étuve à 37°C pendant

2 min. Après décollement cellulaire, le contenu des boîtes est alors transféré dans des tubes Falcon® de 15 mL avec 5 mL de milieu de culture Low DMEM additionné de 10 % de SVF qui sont ajoutés afin de neutraliser l'action de la trypsine. Une centrifugation à 1500 rpm/min pendant 5 min à température ambiante est ensuite effectuée. Le culot de cellules est suspendu dans 1 mL de milieu complet, puisensemencé dans deux nouvelles flasques de 25 cm² pré-incubées avec 400 µL de fibronectine à 50 µg/mL par flasque pendant 30 min à 37°C et complémenté avec du milieu (5 mL pour les flasques de 25 cm²).

C. Caractérisation des cellules par immunocytochimie

Le phénotype des CMLVs de souris a été vérifié par un marquage de la myosine et de l' α -actine du muscle lisse. Les cellules en culture primaire dans des plaques 48 puits sont rincées avec du PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde à 4% (HT501640-19L, Sigma). Après 3 rinçages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées dans du peroxyde d'hydrogène 1% pendant 15 min. Les cellules sont lavées trois fois avec du TBS-T puis une étape de saturation est réalisée avec une solution de TBS-T contenant 5 % de BSA pendant 30 minutes. Les anticorps primaires anti-myosine (1258841A1-Abcam) au 1/200 et anti- α -actine (A5228, Sigma) au 1/400 sont préparés dans du TBS-T contenant de la BSA à 1%. Les échantillons sont incubés avec les anticorps primaires à 4°C pendant 1 nuit. Après 3 lavages dans du TBS-T sans BSA, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires anti-lapin (Dako) pour la myosine et anti-souris (Dako) pour l'actine au 1/200 pendant 1 h à température ambiante. Des puits sont réservés pour les contrôles négatifs (omission de l'anticorps primaire et présence de l'anticorps secondaire). Après trois lavages au TBS-T, la HRP est ajoutée pendant 30 minutes selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont ensuite rincées quatre fois avec du TBS-T avant d'ajouter le DAB substrate Kit (Vector) selon les recommandations du fournisseur. Pour arrêter la réaction, trois lavages avec de l'eau sont réalisés. Finalement, 50 µL d'eau sont ajoutés dans chaque puits. Les images sont prises à différents grossissements au microscope optique.

XV. Comptage des cellules pour mesurer la prolifération

Les CMLVs ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à 7 500 cellules/puits dans du milieu contenant 20% de SVF en triplicat à 37°C pendant 48h et stimulées ou non pendant 24 h à la thrombine (1 U/mL ou 10 U/mL). Après incubation, les cellules sont rincées au PBS, puis incubées avec de la trypsine afin d'être comptées. Le comptage est fait en chambre de Neubauer.

Les 4 carrés violets ont été comptés (Figure 41), moyennés puis multipliés par 10^4 et par le volume utilisé pour suspendre le culot cellulaire afin d'obtenir le nombre de cellules dans le volume de suspension du puits.

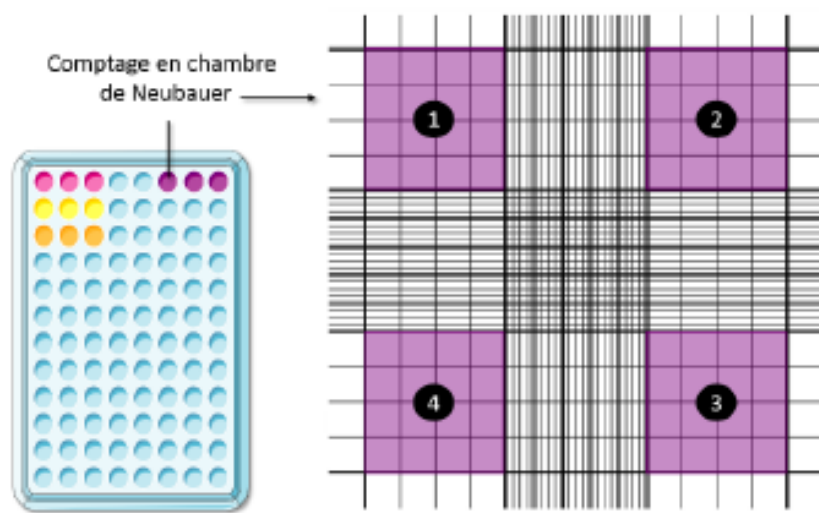


Figure 41 : Représentation schématique du comptage en chambre de Neubauer.

XVI. Détermination de l'activité procoagulante des phospholipides anioniques (APP)

Cette mesure repose sur la nécessité de surfaces phospholipidiques anioniques pour les réactions de la cascade de coagulation. Dans ce test, le complexe prothrombinase est utilisé pour la conversion de prothrombine en thrombine. Tous les facteurs de la coagulation sont ajoutés en excès pour que les phospholipides anioniques soient le facteur limitant de la réaction.

Les CMLVs sont ensemencées 24 h au préalable dans une plaque de culture 96 puits (MICROTEST TM₉₆) à une densité de 7500 cellules par puits dans du milieu contenant 0,5% de SVF.

Une gamme étalon avec des phospholipides (Tableau 11), constituée d'un mélange de PC/PS/PE (60/20/20 mole%) est réalisée dans du Tampon TBS contenant de la BSA à 2 mg/mL.

Tableau 11 : Représentation des concentrations de la gamme étalon utilisée pour mesurer l'activité procoagulante des phospholipides.

Concentration en vésicules phospholipidiques (VP) (nM)	0	150	300	450	600	750	900	1000
VP à 1000 nM (μL)	0	30	60	90	120	150	180	200
Tampon (μ)	200	170	140	110	80	50	20	0

Les dépôts s'effectuent en triplicat de façon séquentielle à raison de (Figure 42) :

- ✓ 50 μ L pour les dilutions servant à établir la gamme étalon dans des puits ne contenant pas de cellules ou 50 μ L de TBS dans les puits contenant les CMLVs
- ✓ 50 μ L d'un mélange de CaCl_2 (15 mM), FXa (1,2 nM) et FVa (2,4 nM)
- ✓ 50 μ L d'un mélange de prothrombine (6 μ M)) (prothrombine, FXa et FVa bovins ; Synapse B.V., Maastricht, Pays-Bas) et de substrat fluorigène (Z-Gly-Gly-Arg-AMC à 0,33 mM) (Bachem).

Dans ces conditions, l'activité de la prothrombinase est linéaire et dépendante de la quantité de phosphatidylsérine sur une gamme de 2 à 20 nM. L'absorbance est lue par un fluorimètre Fluoroskan Ascent (logiciel Ascent software 2.6) à une longueur d'onde d'excitation à 390 nm et d'émission à 460 nm (lecture cinétique pendant 30 min avec un intervalle de mesure toutes les min). Les mesures d'APP sont rapportées au nombre de cellules comptées dans le puits d'une autre plaqueensemencée en parallèle de celle servant pour la mesure de l'APP.

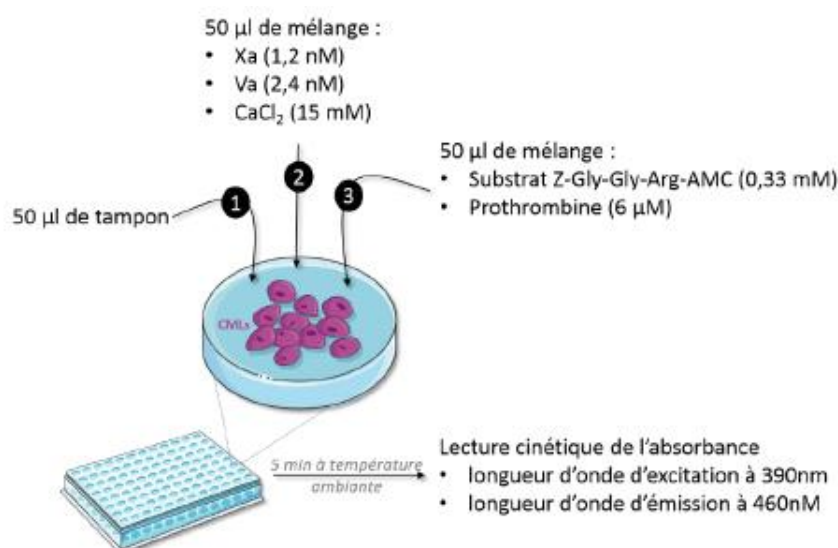


Figure 42 : Représentation schématique de la mesure de l'activité procoagulante des phospholipides.

Cette mesure a également été réalisée avec les surnageants de culture stimulée ou non à la thrombine (1U/mL ou 10U/mL) en remplaçant les 50 μ L de tampon par 50 μ L de surnageant.

XVII.Statistiques

L'ensemble des résultats est exprimé en moyenne $\pm$ SEM. La comparaison de 2 groupes de souris est réalisée par un test de Mann-Whitney. Les différences sont considérées significatives lorsque $p < 0,05$. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.00.

RESULTATS

La suppression du gène a généré une mutation qui a entraîné une perte fonctionnelle et complète d'Arhgef1. Les souris Arhgef1 ^{-/-} sont nées aux ratios prévus et ont un poids corporel normal. Il n'y avait pas de défaut apparent de phénotype chez les souris Arhgef1 ^{-/-}.

I. Hémostase et coagulation

Les souris Arhgef1 ^{-/-} présentaient un nombre normal d'érythrocytes, de leucocytes et de plaquettes (Tableau 12). Ces résultats indiquent la suppression d'Arhgef1 n'a pas entraîné d'anomalie dans la composition sanguine.

Tableau 12 : Composition du sang chez les souris contrôles et les souris Arhgef1 ^{-/-}.

Valeurs exprimées en moyenne $\pm$ SEM. La suppression d'Arhgef1 n'a pas d'effet sur le nombre de plaquettes, de leucocytes et d'érythrocytes ni les autres données apportées par la numération (VGM : volume globulaire moyen ; TGMH : teneur moyenne en hémoglobine ; CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; IDR : indice de distribution en globules rouges ; VMP : volume plaquettaire moyen ; IDP : indice de distribution plaquettaire). $n = 26$ pour les souris contrôles et $n = 34$ pour les souris Arhgef1 ^{-/-}.

	Contrôle Moyenne $\pm$ SEM	Arhgef1 ^{-/-} Moyenne $\pm$ SEM	P
Plaquettes (1000 uL ⁻¹)	632 $\pm$ 49	713 $\pm$ 50	NS
Leucocytes (1000 uL ⁻¹)	3,1 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,4	NS
Erythrocytes (10 ⁶ uL ⁻¹)	5,4 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,3	NS
Hématocrite (%)	26 $\pm$ 1	28 $\pm$ 1	NS
Hémoglobine (g/dL)	8,9 $\pm$ 0,3	9,5 $\pm$ 0,3	NS
THT (%)	0,38 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,05	NS
VGM ((μ m ³)	48,29 $\pm$ 1,34	46,96 $\pm$ 1,08	NS
TGMH (pg)	17,19 $\pm$ 0,77	16,28 $\pm$ 0,61	NS
CCMH (g/dL)	35,22 $\pm$ 0,61	34,50 $\pm$ 0,5	NS
IDR (%)	14,75 $\pm$ 0,36	14,77 $\pm$ 0,35	NS
VMP (μ m ³)	6,65 $\pm$ 0,2	6,68 $\pm$ 0,21	NS
IDP (%)	5,67 $\pm$ 0,58	5,34 $\pm$ 0,59	NS

A. Agrégation plaquettaire

L'agrégation a été étudiée avec des plaquettes lavées ajustées à 200 G/L en présence d'agonistes forts (collagène à 2 ou 10 μ g/mL ou thrombine à 1 U/mL) ou faibles (ADP à 10 μ M) pour activer les différentes voies de signalisation intracellulaires de l'agrégation plaquettaire. Les figures 43 A, B et C présentent les profils typiques d'agrégation, obtenus avec ces agonistes. La diminution de la transmission de lumière observée juste après l'addition des agonistes correspond au changement de forme (1ère étape de l'activation) des plaquettes qui deviennent

plus étalées avec la formation de pseudopodes. L'agrégation plaquettaire en réponse au collagène à la plus forte concentration (10 $\mu\text{g/mL}$) et la thrombine est irréversible alors qu'elle est réversible avec le collagène à 2 $\mu\text{g/mL}$ et avec l'ADP.

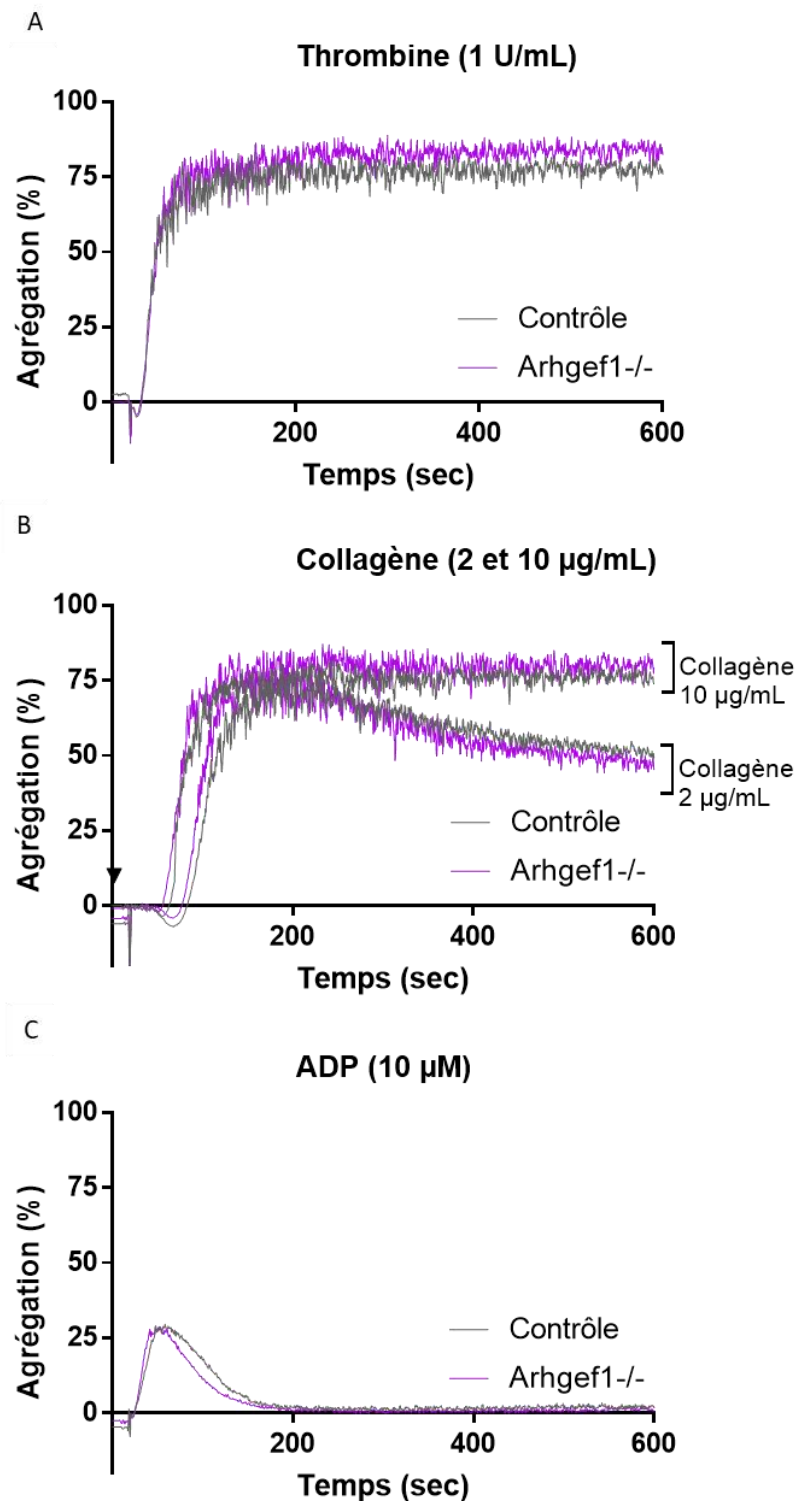


Figure 43 : Courbes typiques d'agrégation plaquettaire.

En réponse à une stimulation par la thrombine à 1 U/mL (A), le collagène à 2 et 10 $\mu\text{g/mL}$ (B) et l'ADP à 10 μM (C) en concentration finale.

Quel que soit l'agoniste plaquettaire, l'agrégation à 3 min (Figure 44 A), à 6 min (Figure 44 B) ou maximale (Figure 44 C) ainsi que la vélocité (Figure 44 D) ne sont pas significativement différentes entre les 2 groupes de souris.

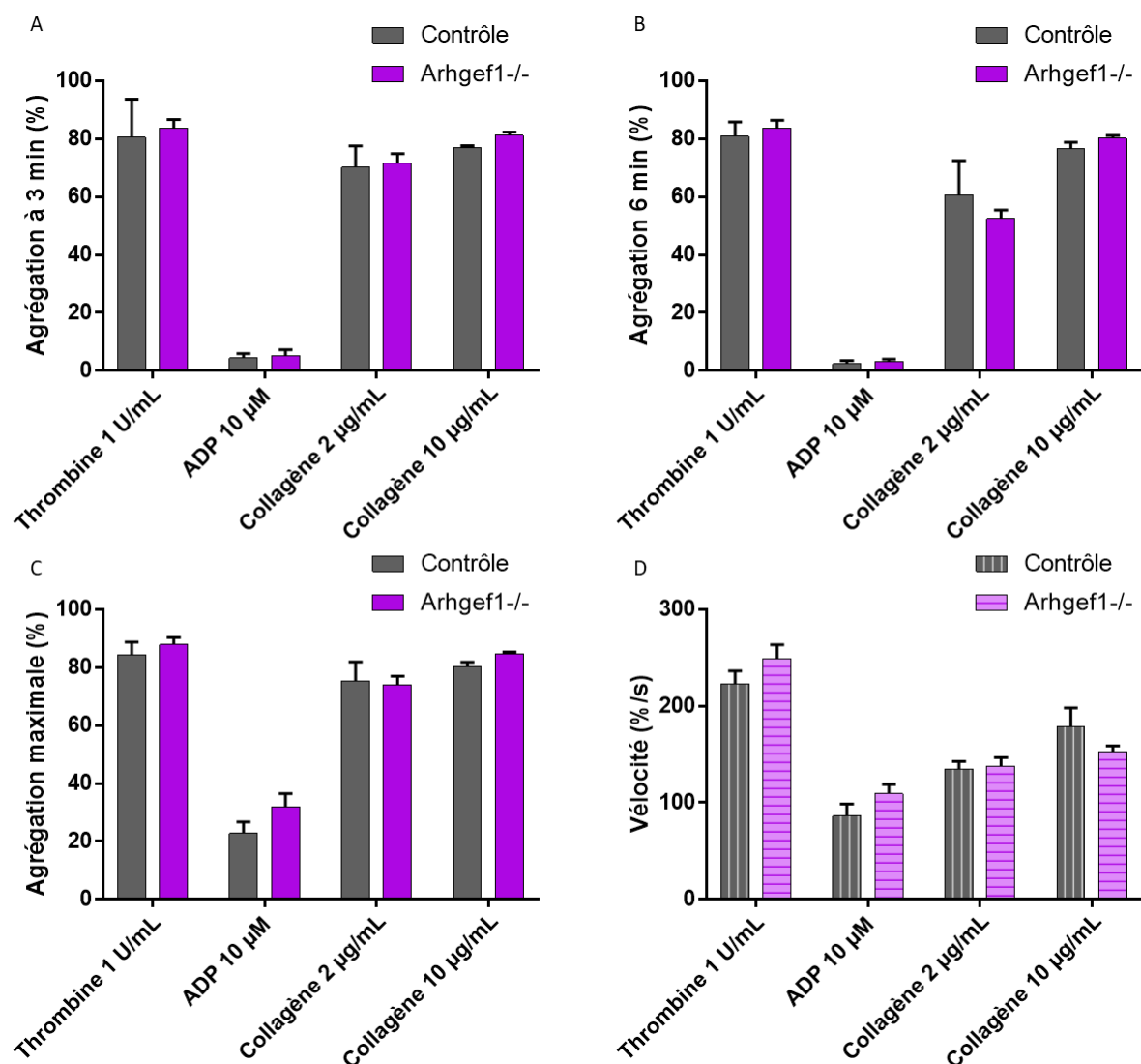


Figure 44 : Aggrégation plaquettaire.

L'agrégation à 3 min (A) ou 6 min (B) après la stimulation des plaquettes par les différents agonistes, l'agrégation maximale (C) et la vélocité (D) ne sont pas différentes entre les souris contrôles et les souris Arhgef1^{-/-}. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM ; n=5 pour les souris contrôles et n=7 pour les souris Arhgef1^{-/-}.

B. Activation plaquettaire

a. Quantification des glycoprotéines de surface des plaquettes murines

Les glycoprotéines membranaires ont été étudiées par cytométrie en flux. Les valeurs mesurées sont exprimées en intensité moyenne de fluorescence et peuvent être classées en 3 groupes (Figure 45) : les glycoprotéines impliquées dans l'adhésion des plaquettes (GPIb, PGV, GPIX), celles qui induisent la granulation plaquettaire (Clec2) et celles qui stabilisent l'adhésion et

l'agrégation (CD9, la sous-unité α_2 et la sous-unité β_1 des intégrines et les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$) et également le récepteur PAR1.

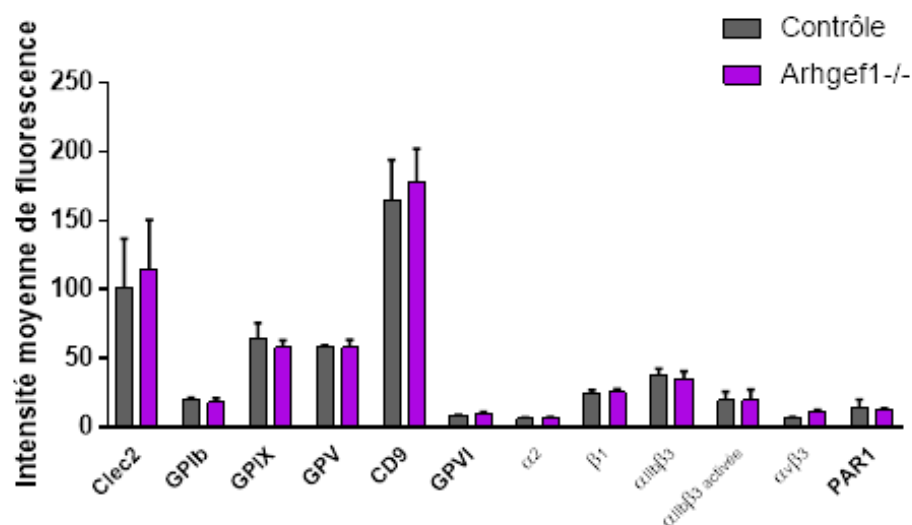


Figure 45 : Expression par cytométrie en flux des glycoprotéines et intégrines impliquées dans la granulation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, et du récepteur activé par les protéases PAR1 (protease activated receptor).

Les valeurs sont exprimées en moyennes $\pm$ SEM ; $n=5$ pour les souris contrôles et $n=3$ pour les souris *Arhgef1* $-/-$.

Aucune différence significative d'expression de ces glycoprotéines plaquettaires n'a été mise en évidence entre les souris *Arhgef1* $-/-$ et les contrôles. Il en est de même pour le récepteur PAR1.

b. Evaluation de l'exposition de la phosphatidylsérine, de la P-sélectine et de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des plaquettes

Après activation plaquettaire, le contenu des granules denses est libéré et le dosage de l'ATP a été utilisé pour quantifier la sécrétion de ces granules denses. Aucune différence dans les quantités d'ATP libérées en réponse à une stimulation par les 3 agonistes étudiés n'a été observée entre les 2 groupes de souris.

La sécrétion des granules α est évaluée par la quantification de la P-sélectine à la surface des plaquettes, car cette protéine, qui est contenue dans les granules α , est dirigée vers la membrane en réponse à l'activation. L'expression de la P-sélectine en réponse à une stimulation par des agonistes étant variable d'une expérience à l'autre, nous avons choisi d'exprimer les résultats en rapport des valeurs obtenues en présence de l'agoniste sur les valeurs en absence de l'agoniste. La figure 46 montre les rapports des résultats obtenus en intensité moyenne de fluorescence. La sécrétion des granules α en réponse à l'activation des plaquettes par des

concentrations fortes de thrombine (2 et 5 U/mL) est significativement moins importante pour les plaquettes des souris *Arhgef1*^{-/-} par rapport aux plaquettes des souris contrôles. Une même tendance est observée en utilisant le collagène comme agoniste bien que les différences ne soient pas significatives entre les deux groupes de souris.

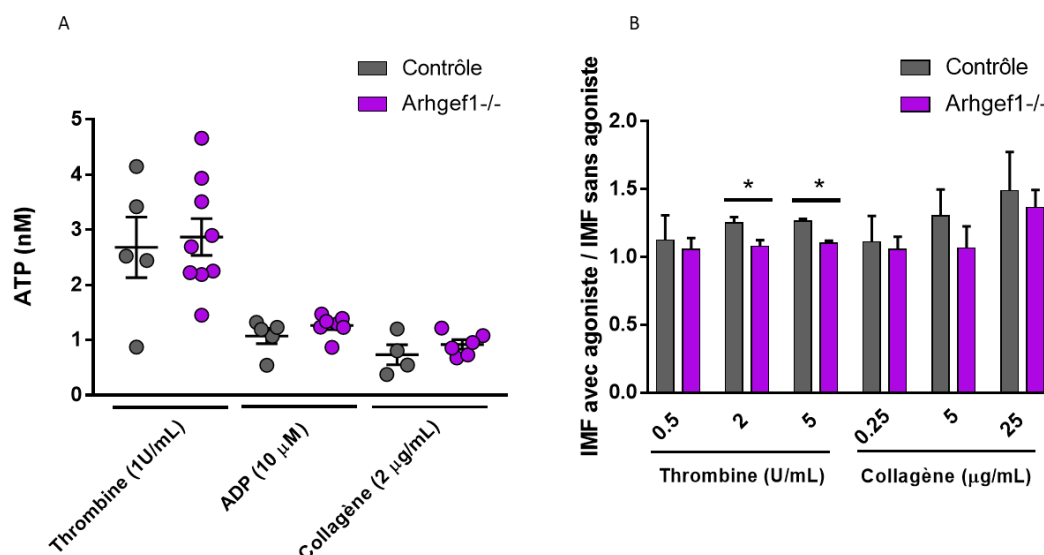


Figure 46 : Quantité d'ATP relargué et marquage de la P-sélectine.

(A) Valeurs moyennes d'ATP relargué en réponse à une stimulation par de la thrombine à 1 U/mL, de l'ADP à 10 μM ou du collagène à 2 μg/mL ; *n*=5 pour les souris contrôles et *n*=9 pour les souris *Arhgef1*^{-/-}. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. **(B) Quantification par cytométrie en flux de la P-sélectine en réponse à une stimulation par la thrombine ou par le collagène.** Les résultats sont exprimés en rapport des intensités moyennes de fluorescence (IMF) ; *n*=5 pour les souris contrôles et *n*=6 pour les souris *Arhgef1*^{-/-} ; * *p* < 0,05 versus contrôle.

L'exposition des phospholipides anioniques induite par le flip-flop membranaire est mise en évidence par la fixation d'annexine V en cytométrie en flux. En réponse à l'activation par le collagène ou la thrombine, cette liaison est diminuée pour les plaquettes des souris *Arhgef1*^{-/-} par rapport aux souris contrôles. Cette diminution est significative pour les plus fortes concentrations en agonistes (5 U/mL pour la thrombine et 5 et 25 μg/mL pour le collagène). La capacité des plaquettes des souris *Arhgef1*^{-/-} à générer des VE est également diminuée de façon significative en réponse aux fortes concentrations de ces 2 agonistes (Figure 47).

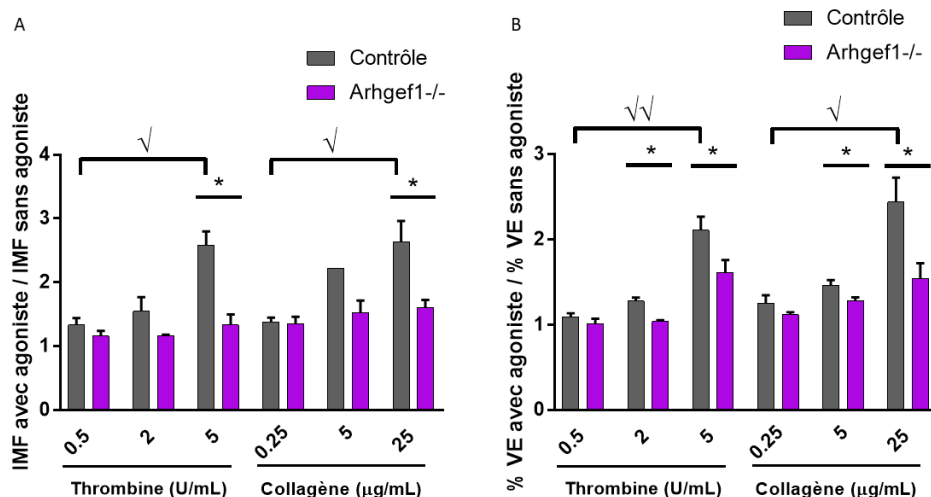


Figure 47 : (A) Quantification par cytométrie en flux de la fixation d'annexine V et (B) de la libération de vésicules extracellulaires (VE).

Les résultats sont exprimés en rapport des intensités de fluorescences (IMF) pour l'annexine V et en % d'événements de taille comprise entre 0,3 et 0,9 µm pour les VE ; n=9 pour les souris contrôles et n=12 pour les souris Arhgef1^{-/-}. * p < 0,05 versus contrôle avec la même condition de stimulation ; √ p < 0,05 et √√ p < 0,005 versus contrôle avec la plus faible concentration d'agoniste.

Les cytogrammes typiques montrent que la stimulation des plaquettes par la thrombine ou le collagène entraîne l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface de la population plaquettaire comme en témoigne le décalage du tracé en rouge par rapport au contrôle négatif en pointillé dans les deux groupes de souris. Le nombre d'intégrines sous forme activée par plaquette est moins important pour les souris Arhgef1^{-/-} que pour les souris contrôles bien que la différence ne soit pas significative (Figure 48).

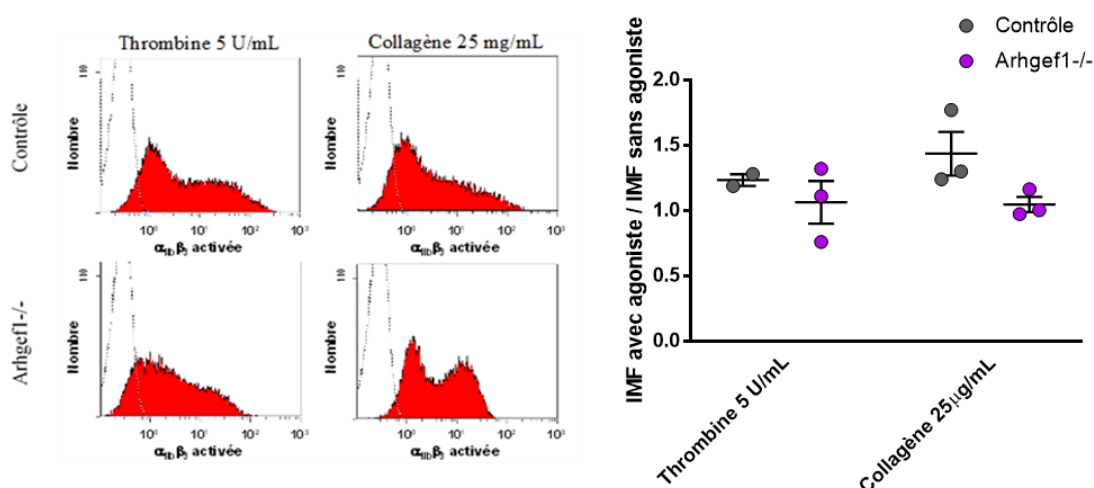


Figure 48 : Quantification de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en réponse à une stimulation par de la thrombine ou du collagène.

Les histogrammes en pointillé sur les cytogrammes représentent les valeurs obtenues pour le contrôle négatif ; n=3 dans chaque groupe de souris.

c. Mesure du calcium intracellulaire libéré par les plaquettes suite à une stimulation

La mesure du calcium intracellulaire libéré en réponse à une stimulation a été réalisée pour 2 souris de chaque groupe. La stimulation des plaquettes par la thrombine (5 U/mL) entraîne une plus faible augmentation du calcium intracellulaire que l'acide arachidonique (Figure 49). En réponse à ces agonistes plaquettaires, le taux de calcium intracellulaire semble moins important chez les souris *Arhgef1*^{-/-} que chez les souris contrôles.

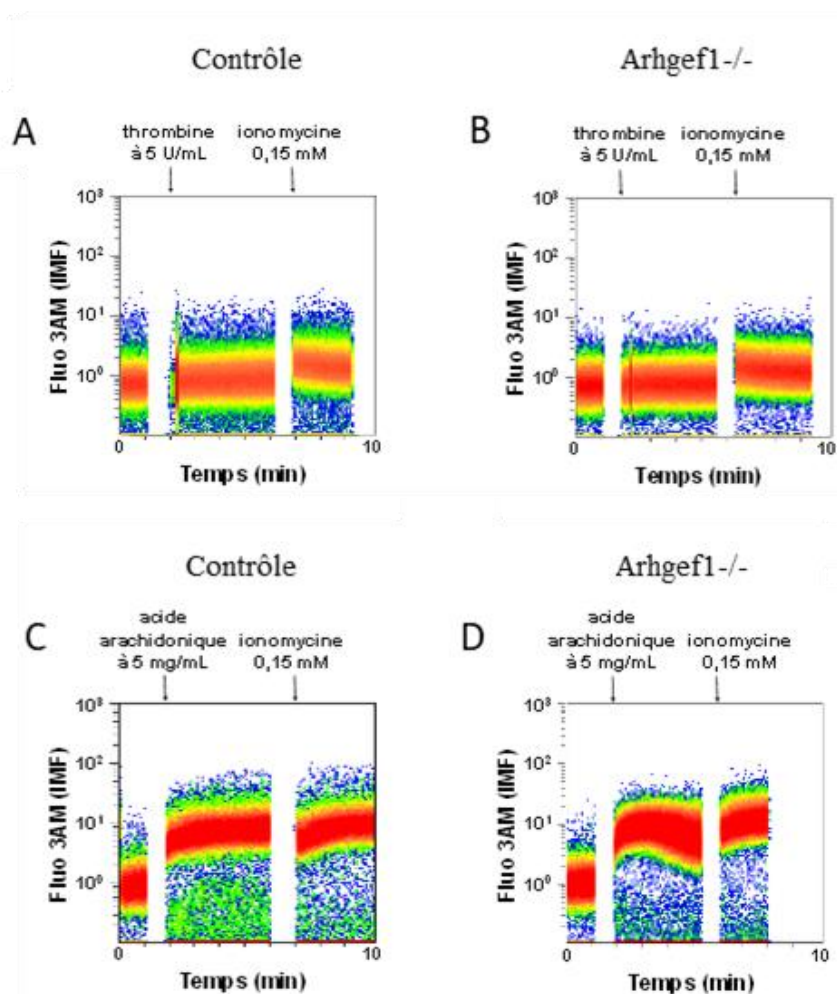


Figure 49 : Mesure du calcium intracellulaire libéré par les plaquettes des souris *Arhgef1* en réponse à différents agonistes.

Le niveau de base du calcium intracellulaire est mesuré avant ajout de l'agoniste puis de la ionomycine est ajoutée pour évaluer l'activation maximale. Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence de la sonde Fluo 3AM en réponse à une liaison au Ca^{2+} . (A) Profil typique du calcium intracellulaire libéré par les plaquettes d'une souris contrôle suite à une stimulation par de la thrombine. (B) Profil typique du calcium intracellulaire libéré par les plaquettes d'une souris *Arhgef1*^{-/-} suite à une stimulation à la thrombine. (C) Profil typique du calcium intracellulaire libéré par les plaquettes d'une souris contrôle suite à une stimulation par de l'acide arachidonique. (D) Profil typique du calcium intracellulaire libéré par les plaquettes d'une souris *Arhgef1*^{-/-} suite à une stimulation par de l'acide arachidonique. $n=2$ pour chaque groupe de souris

C. Réorganisation du cytosquelette

Suite à une activation, les plaquettes subissent des modifications au niveau de l'organisation de leur cytosquelette. Ces changements peuvent avoir un impact sur l'adhérence et l'étalement plaquettaire.

a. Adhérence plaquettaire

L'adhérence plaquettaire est significativement plus faible pour les plaquettes lavées des souris *Arhgef1*^{-/-} par rapport aux plaquettes lavées des souris contrôles sur une surface couverte de fibrinogène (Figure 50).

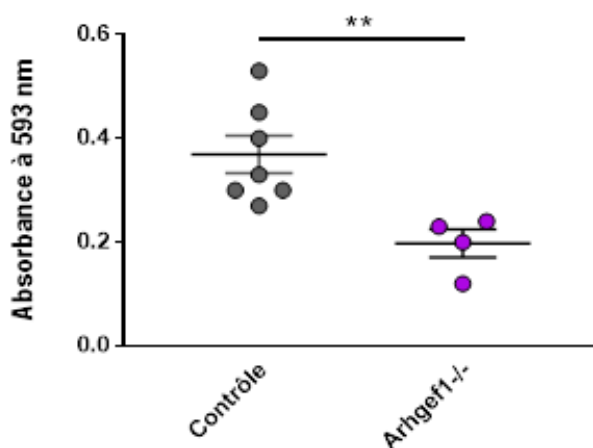


Figure 50 : Mesure de l'adhérence plaquettaire pour les souris contrôles et *Arhgef1*^{-/-}.

L'adhérence est étudiée sans stimulation sur une plaque couverte de fibrinogène. $n=7$ pour les souris contrôles et $n=4$ pour les souris *Arhgef1*^{-/-}. Le résultat est exprimé en moyenne $\pm$ SEM. ** $p < 0,005$ versus contrôle.

b. Etalement plaquettaire

Suite à une activation plaquettaire, le cytosquelette se réorganise en augmentant le nombre d'excroissances cellulaires (filopodes et lamellipodes) et en diminuant la surface circulaire plaquettaire. Ces phénomènes ont été explorés en réponse à la thrombine (1 U/mL) chez les souris contrôles et *Arhgef1*^{-/-} par le marquage de l'actine à la phalloïdine fluorescente. Les résultats de la figure 51 montrent que de base, le déploiement plaquettaire (formations de filopodes et lamellipodes) est moins important pour les plaquettes des souris *Arhgef1*^{-/-} par rapport aux souris contrôles. En réponse à la thrombine, les plaquettes des souris des 2 groupes présentent une augmentation des excroissances cellulaires et une diminution de la surface circulaire plaquettaire. Ces changements sont significativement moins importants pour les plaquettes des souris *Arhgef1*^{-/-} comparées aux plaquettes des souris contrôles.

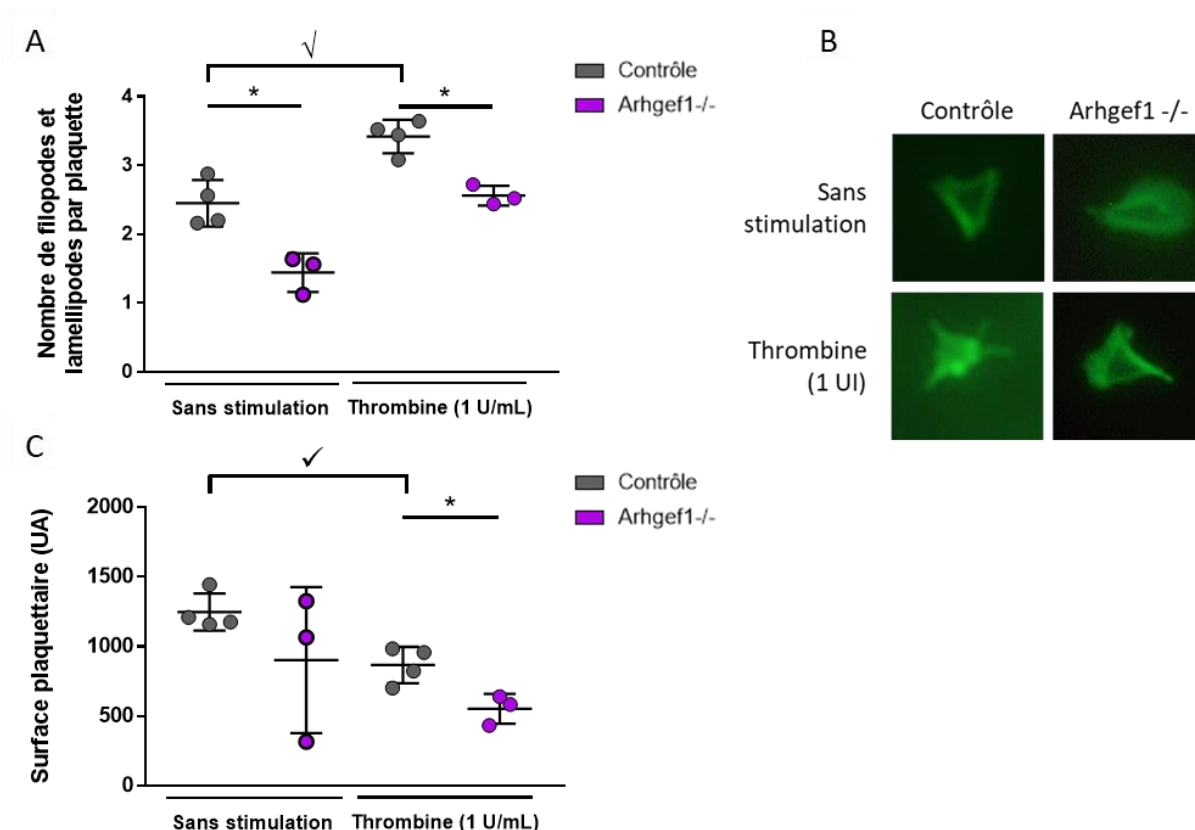


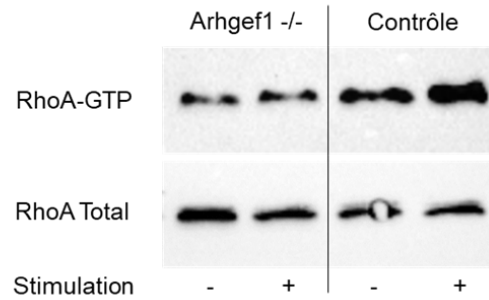
Figure 51 : Etude de l'étalement plaquettaire.

(A) Moyenne du nombre de filopodes et lamellipodes pour 20 plaquettes d'une souris stimulées ou non par de la thrombine (1 U/mL). (B) Marquage du cytosquelette plaquettaire par la phalloïdine en réponse ou non à la thrombine (1 U/mL). (C) Surface plaquettaire hors filopodes et lamellipodes adhérente à la surface du puits de culture couvert de fibrinogène (100 µg/mL). $n=4$ pour les souris contrôles et $n=3$ pour les souris Arhgef1^{-/-}. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ versus contrôle avec la même condition de stimulation ; $\checkmark p < 0,05$ versus contrôle sans stimulation.

D. Mesure de l'activation de RhoA et étude de la voie de signalisation RhoA/Arhgef1

Afin de vérifier qu'Arhgef1 régule les fonctions plaquettaires par la voie RhoA, j'ai étudié l'impact de la délétion de cette petite protéine G sur la voie de signalisation RhoA/ROCK par pull down et Western Blot (Figure 52). L'activation de Rho (liaison au GTP) est moins importante à l'état basal et suite à une stimulation par la thrombine (1 U/mL) pendant 1 min pour les plaquettes des souris Arhgef1^{-/-} par rapport aux plaquettes des souris contrôles. Le niveau de phosphorylation de la MLC est également moins important à l'état basal et suite à la même stimulation des plaquettes des souris Arhgef1^{-/-} par rapport aux plaquettes des souris contrôles. Cependant pour les souris contrôles, le niveau de phosphorylation a augmenté, preuve que la stimulation a bien fonctionné.

A



B

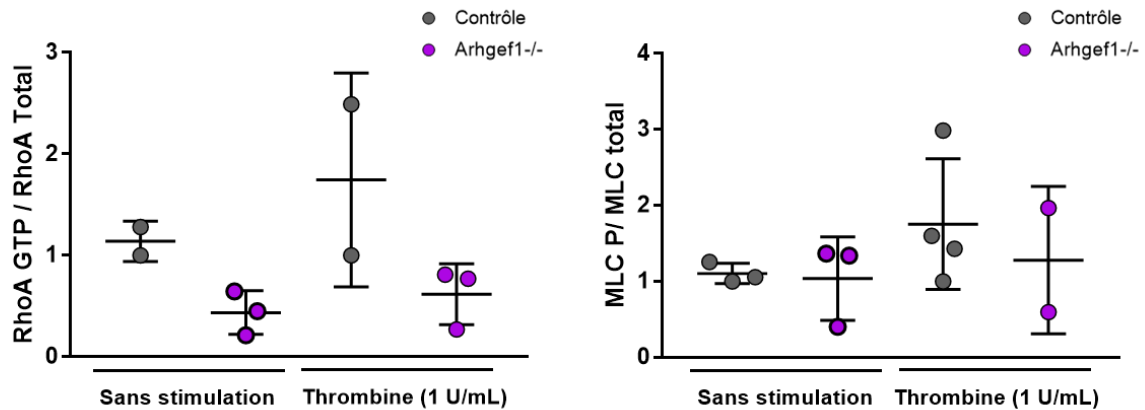


Figure 52 : La délétion d'*Arhgef1* inhibe l'activation de *RhoA* et la phosphorylation de *MLC* dans les plaquettes.

(A) Les plaquettes lavées des souris contrôles et *Arhgef1*^{-/-} sont stimulées ou non par la thrombine (1 U/mL) pendant 1 min avant le dosage de *RhoA*-GTP (pull down). (B) La procédure est réalisée pour quantifier l'activation de la *MLC* mais cette fois-ci en mesurant le niveau de phosphorylation par Western-Blot. $n=2$ pour les souris contrôles et $n=3$ pour les souris *Arhgef1*^{-/-}.

E. Génération de thrombine

a. En sang total

La figure 53 A montre des courbes typiques ou thrombinogrammes de génération en sang total pour les deux groupes de souris contrôles et *Arhgef1*^{-/-}. La génération de thrombine est significativement diminuée pour la souris *Arhgef1*^{-/-} par rapport aux souris contrôles (Figure 53 B). Cette diminution est en accord avec la diminution du pic de thrombine (Figure 53 C) sans modification des temps de latence avant la génération explosive de thrombine, de la vitesse maximale de génération de thrombine et du temps pour atteindre le pic.

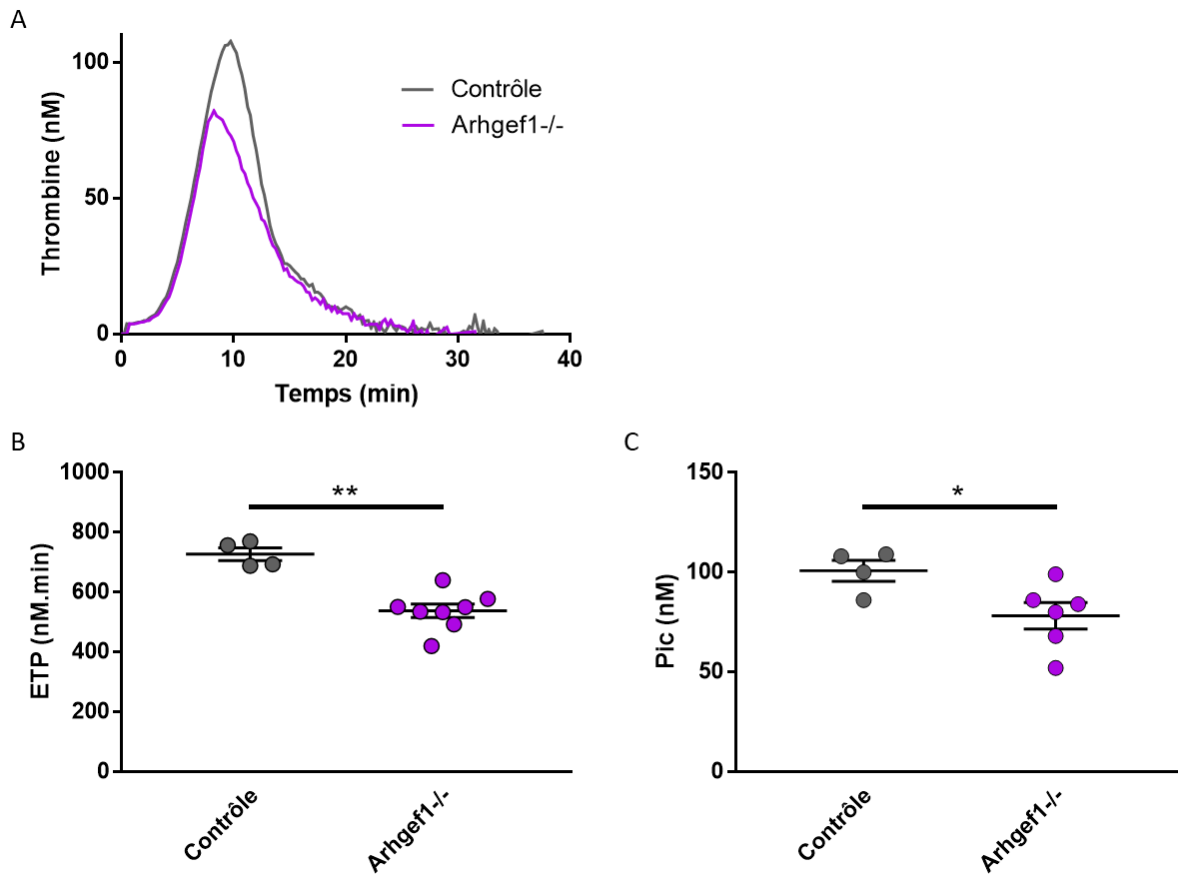


Figure 53 : Génération de thrombine en sang total chez les souris Arhgef1.

A) Profil typique de génération de thrombine en sang total. B) Valeurs de l'aire sous la courbe de génération de thrombine (ETP pour endogenous thrombin potential). C) Valeurs du pic de génération de thrombine ; $n=4$ pour les souris contrôles et $n=8$ pour les souris Arhgef1^{-/-}. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,005$ versus contrôles

b. En plasma riche en plaquette

Contrairement à l'étude de la génération de thrombine en sang total, la génération de thrombine en plasma riche en plaquettes permet d'étudier uniquement un seul type cellulaire : les plaquettes.

La génération de thrombine est significativement diminuée pour la souris Arhgef1^{-/-} par rapport aux souris contrôles (Figure 54 A). Cette diminution est mise en évidence par la diminution de l'ETP (Figure 54 B) et du pic de thrombine (Figure 54 C) sans modification des temps de latence avant la génération explosive de thrombine, de la vitesse maximale de génération de thrombine et du temps pour atteindre le pic.

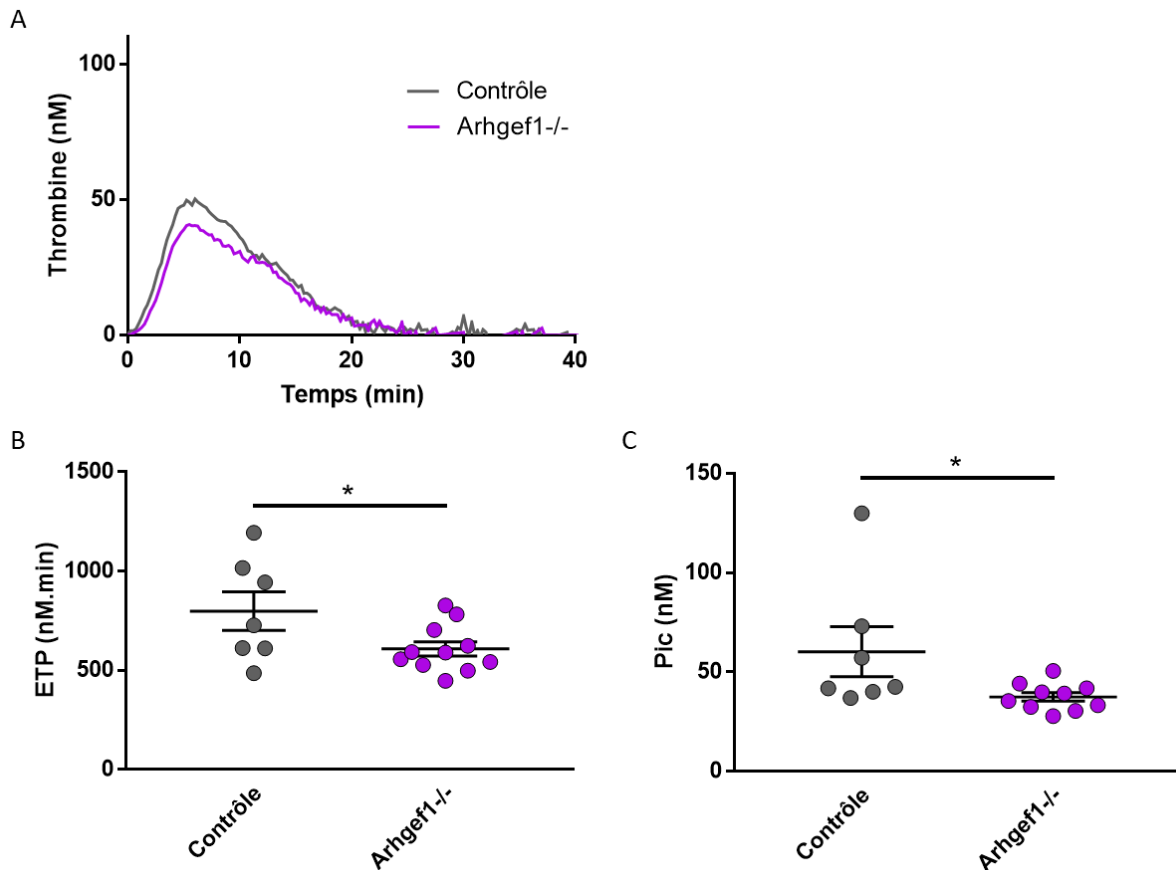


Figure 54 : Génération de thrombine en plasma riche en plaquettes chez les souris *Arhgef1*. A) Profil typique de génération de thrombine en plasma riche en plaquettes. B) Valeurs de l'aire sous la courbe de génération de thrombine (ETP pour endogenous thrombin potential). C) Valeurs du pic de génération de thrombine ; $n=7$ pour les souris contrôles et $n=11$ pour les souris *Arhgef1* $-/-$. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ; * $p < 0,05$ versus contrôles

c. En plasma pauvre en plaquettes

Pour confirmer que la diminution de génération observée précédemment en plasma riche en plaquettes était bien liée aux plaquettes, la génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes a ensuite été réalisée. Ainsi plus aucun élément cellulaire n'est présent.

La figure 55 A montre des courbes typiques de génération de thrombine pour les deux groupes de souris en plasma pauvre en plaquettes. La génération de thrombine n'est pas modifiée entre les deux groupes de souris. Les valeurs du pic de thrombine, de la vitesse maximale de génération de thrombine, du temps pour atteindre le pic et du temps de latence avant la génération explosive de thrombine sont identiques entre les souris *Arhgef1* $-/-$ et contrôles ; ainsi l'ETP est identique entre les 2 groupes (Figure 55 B).

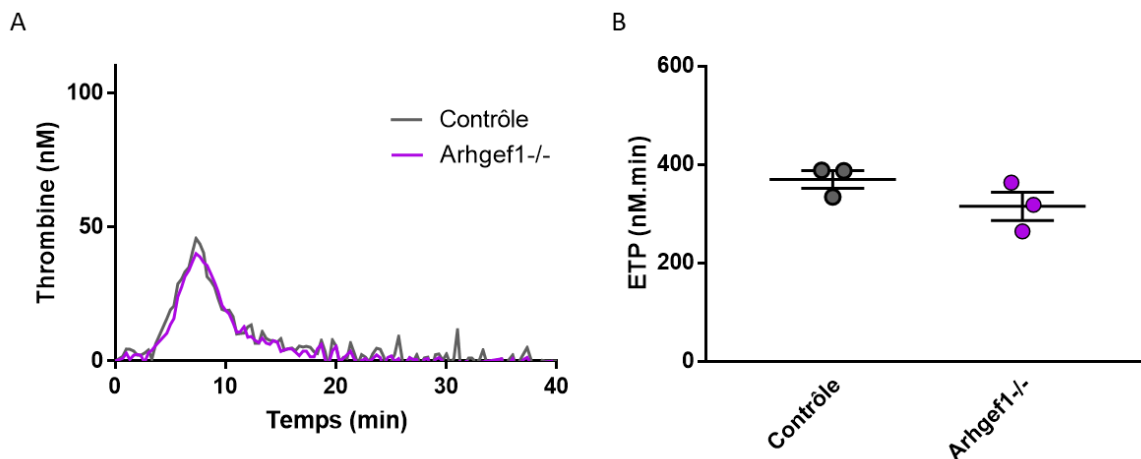


Figure 55 : Génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes.

A) Profils typiques de génération de thrombine en plasma pauvre en plaquettes. B) Valeurs de l'aire sous la courbe de génération de thrombine (ETP pour endogenous thrombin potential) ; $n=3$ pour les souris *Arhgef1* $+/+$ et $n=3$ pour les souris *Arhgef1* $-/-$. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM.

d. Génération de thrombine tissulaire

Pour chaque expérience à un instant t , la génération de thrombine a été mesurée sur un lot de cellules contrôles par rapport à un lot de cellules *Arhgef1* $-/-$ et au même passage cellulaire (P3 à P4) pour éliminer toutes différences liées au phénotype cellulaire. Un phénotype hypocoagulant à la surface des CMLVs issues des aortes des souris *Arhgef1* $-/-$ a été mis en évidence (Figure 56 A). En effet, l'ETP (Figure 56 B) et le pic de thrombine (Figure 56 C) sont significativement diminués pour les CMLVs *Arhgef1* $-/-$ par rapport aux contrôles.

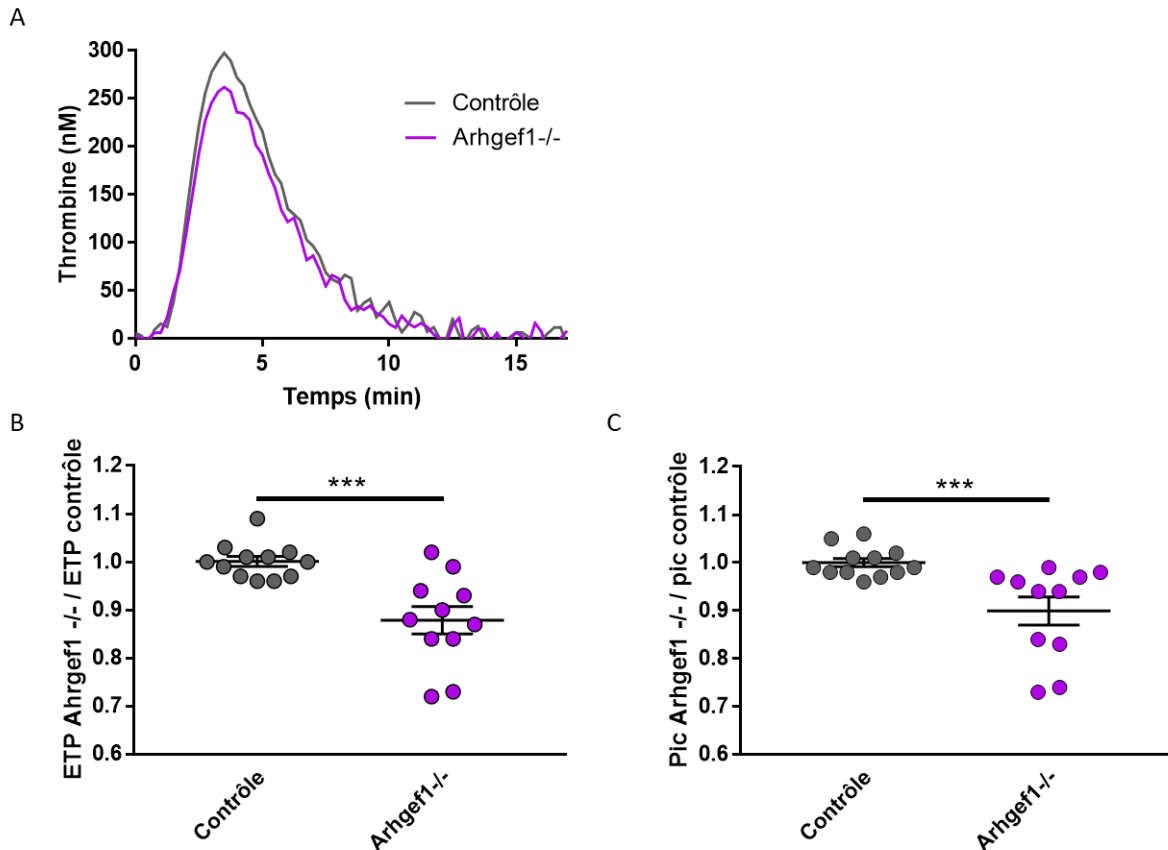


Figure 56 : Génération de thrombine tissulaire.

A) Profils typiques de génération de thrombine à la surface des CMLVs issues des aortes des souris contrôles et *Arhgef1* $-/-$. B) Quantification du potentiel endogène de thrombine (ETP) et (C) du pic de thrombine à la surface des cellules. $n=12$ pour les contrôles et $n=11$ pour les *Arhgef1* $-/-$. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. *** $p<0.0005$ versus contrôles.

F. Dosages des facteurs pro- et anticoagulants dans le plasma par ELISA

Les concentrations en forme soluble de la thrombomoduline et en forme libre du TFPI, qui ont des propriétés anticoagulantes, sont augmentées dans le plasma des souris *Arhgef1* $-/-$ par rapport aux souris contrôles (respectivement pour chacun des groupes : 112 ± 17 pg/mL et 87 ± 18 pg/mL de thrombomoduline et $2,95 \pm 0,42$ U/mL et $2,42 \pm 0,05$ U/mL de TFPI) (Figures 57 A et B). Les concentrations en facteur Von Willebrand (VWF) et en CD146 soluble semblent identiques dans les deux groupes de souris, *Arhgef1* $-/-$ et contrôles (VWF : $19,6 \pm 1,7$ % et $19,7 \pm 3,5$ % respectivement ; CD146 : $0,24 \pm 0,01$ et $0,22 \pm 0,01$ respectivement) (Figure 57 C et D). Les résultats ne sont pas significatifs.

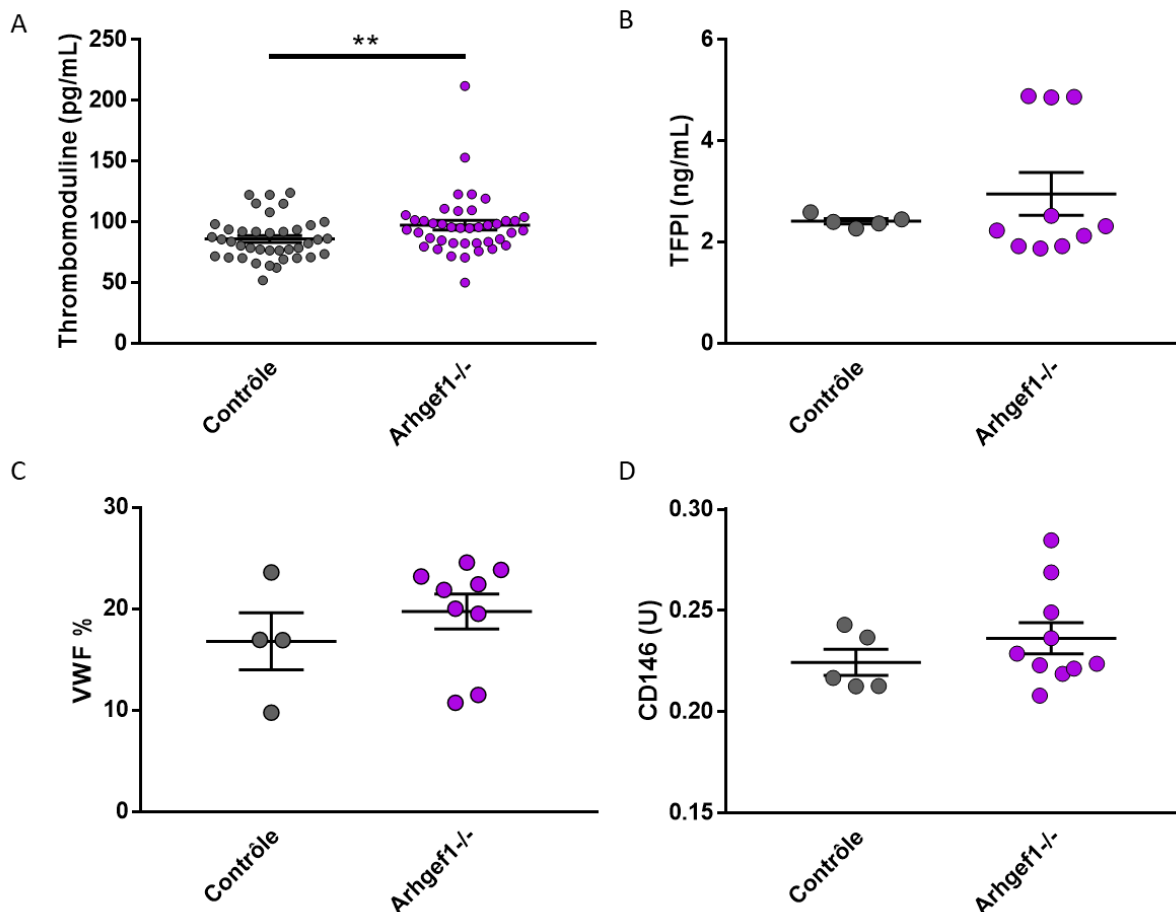


Figure 57 : Quantification par ELISA de la concentration en thrombomoduline (A), en TFPI (B), en VWF (C) et en CD146 soluble (D) dans le plasma des souris contrôles et *Arhgef1*^{-/-}. Thrombomoduline : n=39 pour les souris contrôles et n=41 pour les souris *Arhgef1*^{-/-} ; TFPI : n=5 pour les souris contrôles et n=10 pour les souris *Arhgef1*^{-/-} ; VWF : n=4 pour les souris contrôles et n=9 pour les souris *Arhgef1*^{-/-} ; CD146 : n=5 pour les souris contrôles et n=10 pour les souris *Arhgef1*^{-/-}. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. ***p* < 0,005 versus contrôles.

G. Modèles in vivo

a. Temps de saignement

Afin de caractériser l'effet de la délétion de *Arhgef1* sur la coagulation *in vivo*, le temps de saignement à la queue a été étudié. Les résultats montrent que le temps de saignement n'est pas différent entre les deux groupes de souris (Figure 58 A) mais que le nombre d'arrêts transitoires est plus important chez les souris *Arhgef1*^{-/-} que chez les souris contrôles (Figure 58 B). Le volume sanguin perdu par les deux groupes n'est pas significativement différent (Figure 58 C).

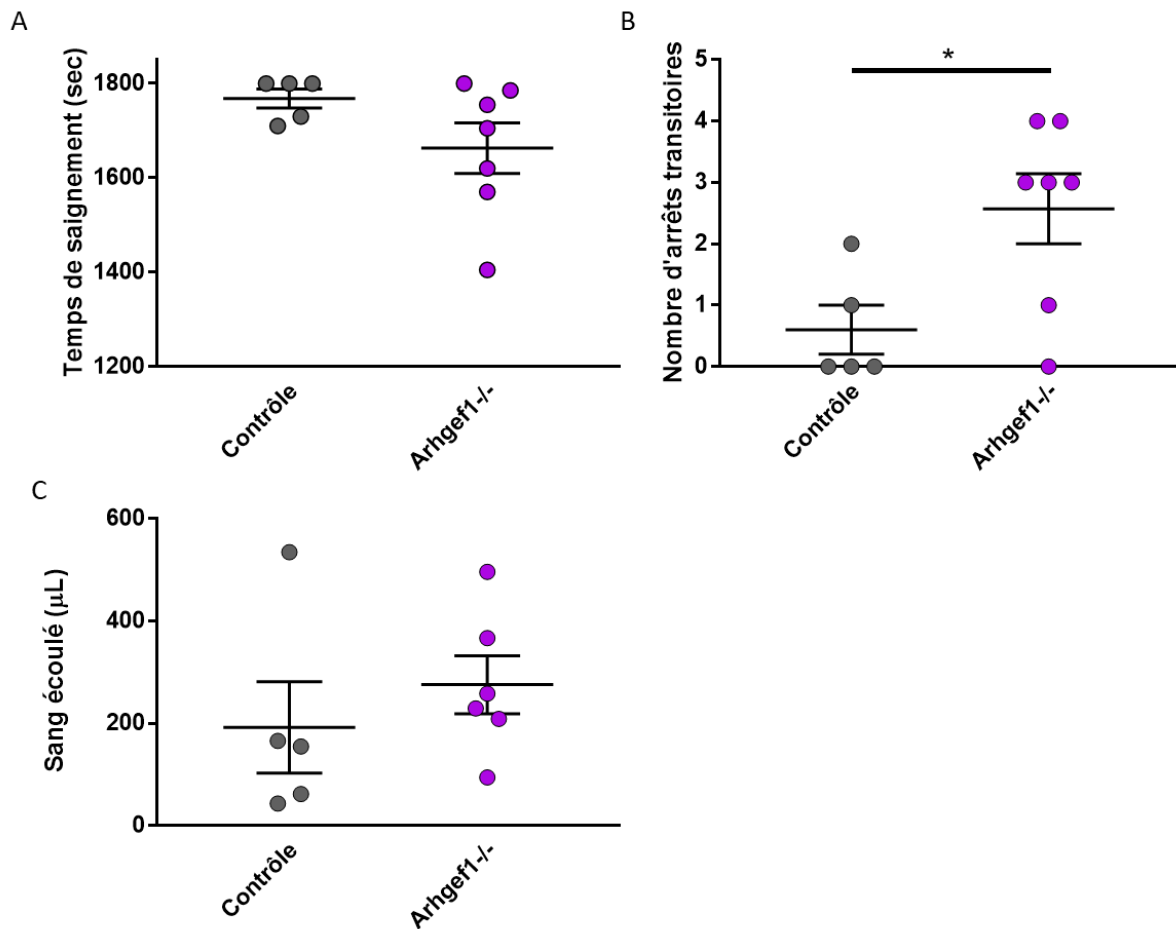


Figure 58 : Modèle de saignement à la queue.

(A) Temps de saignement. (B) Nombre d'arrêts transitoires (arrêt inférieur à 1 min). (C) Volume de sang perdu au cours des 30 min d'expériences. $n=5$ pour les souris contrôles et $n=6$ pour les souris *Arhgef1*^{-/-}. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ versus contrôles.

b. Composition du caillot physiologique à la queue

L'étude de la composition du caillot physiologique *in vivo* montre une quantité significativement plus faible de CD41 (marqueur des plaquettes) dans le caillot des sections des queues des souris *Arhgef1*^{-/-} par rapport aux contrôles 1200 secondes après le début de l'expérience. La quantité de fibrine n'est pas différente entre les deux groupes et reste stable au cours du temps (Figure 59).

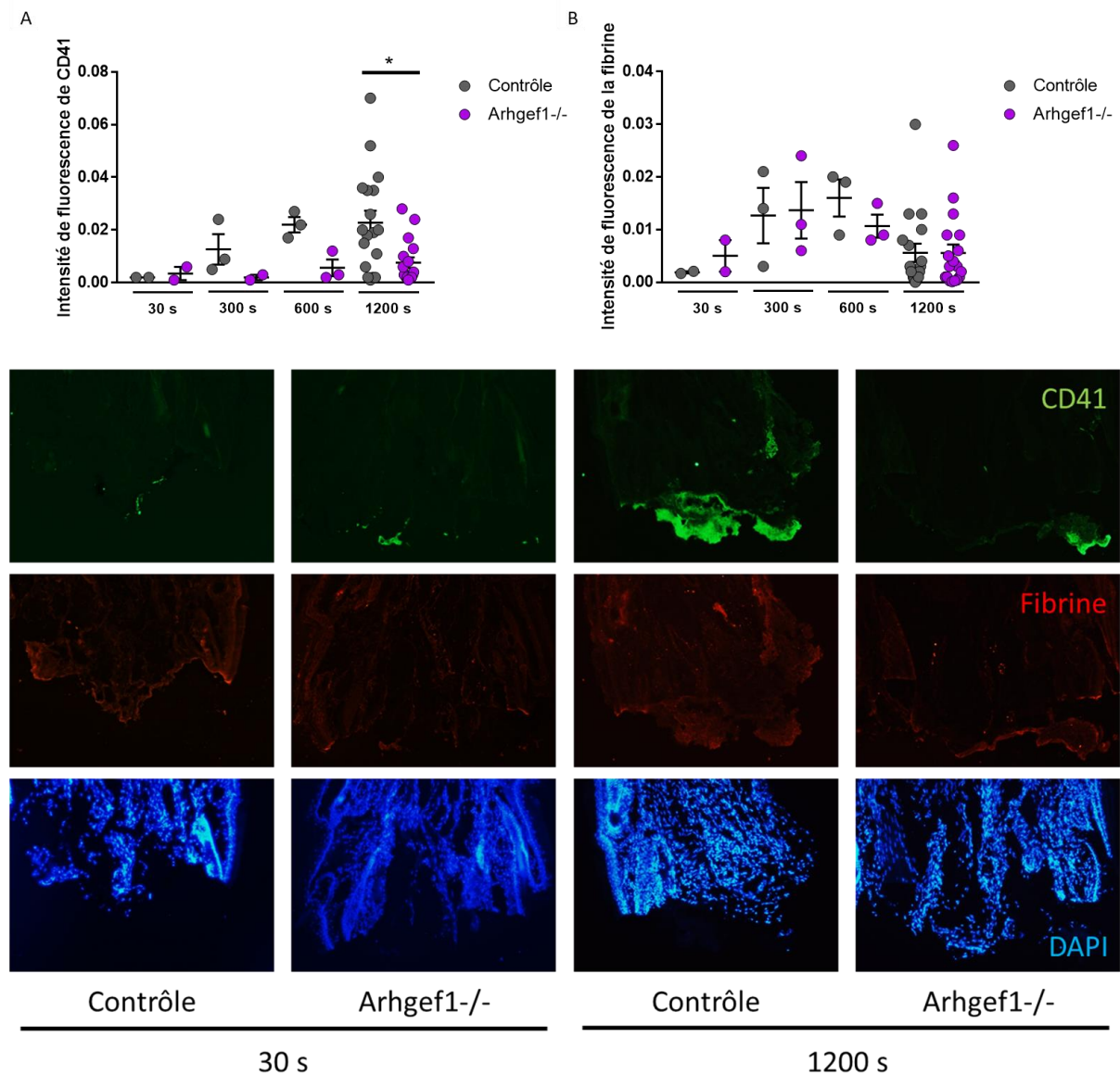


Figure 59 : Etude de la composition du caillot formé à la queue.

(A) Dosage des plaquettes et (B) de la fibrine dans le caillot. $n=2$ pour les 2 groupes à 30 s, $n=3$ pour les 2 groupes à 300 s et 600 s et $n=18$ pour les 2 groupes à 1200 s. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $*p < 0,05$ versus contrôles.

c. Modèle de thrombose carotidienne induite par le FeCl₃

- Visualisation du flux avant l'application du FeCl₃

L'échographie en mode M des carotides des souris a permis la mesure des diamètres et épaisseurs systoliques et diastoliques (Figure 60).

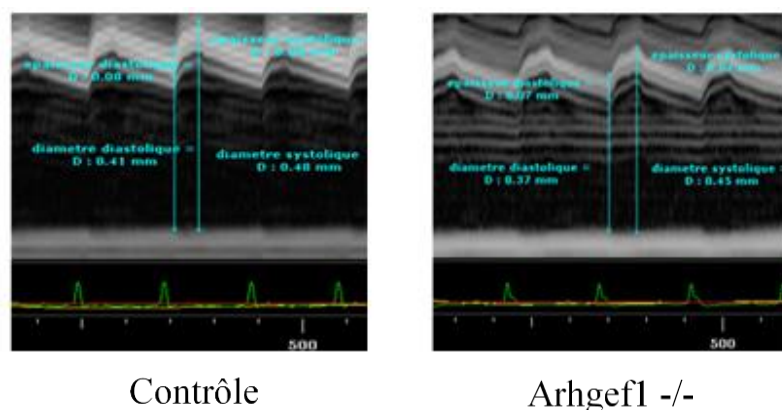


Figure 60 : Image échographique en mode M des carotides de souris avec mesure des diamètres et des épaisseurs systoliques et diastoliques.

Les diamètres et les épaisseurs de la carotide ne sont pas différents entre les 2 groupes (Tableau 13).

Tableau 13 : Diamètre et épaisseur de la carotide des souris contrôles et Arhgef1 -/-.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM ; n=6 dans chaque groupe.

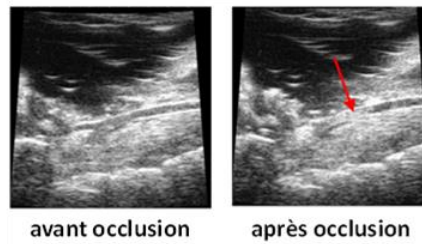
	Diamètre diastolique (en mm)	Diamètre systolique (en mm)	Épaisseur diastolique (en mm)	Épaisseur systolique (en mm)
Contrôle	0,42 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
Arhgef1 -/-	0,43 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00

- Visualisation du flux après l'application du FeCl₃

L'aspect de la carotide avant et après formation du thrombus a été observé par échographie en mode B.

La figure 61 montre les mesures du flux sanguin dans la carotide droite des souris avant et à différents temps après application du FeCl₃.

A



B

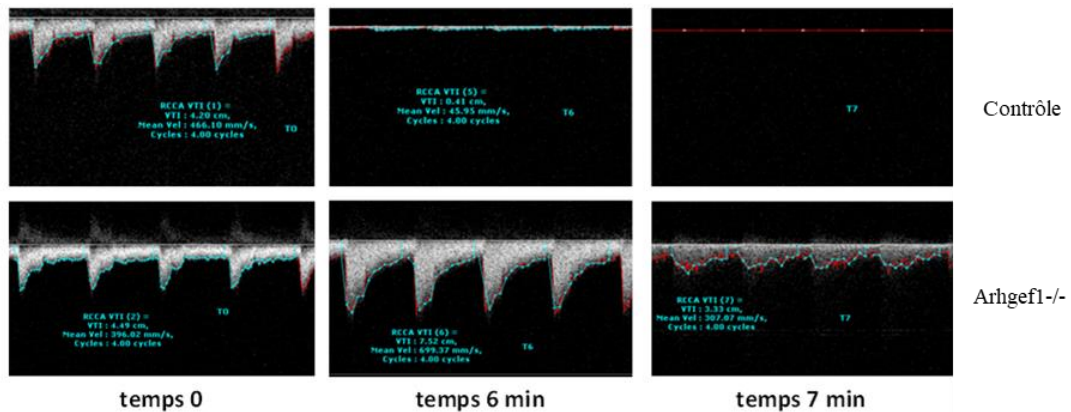
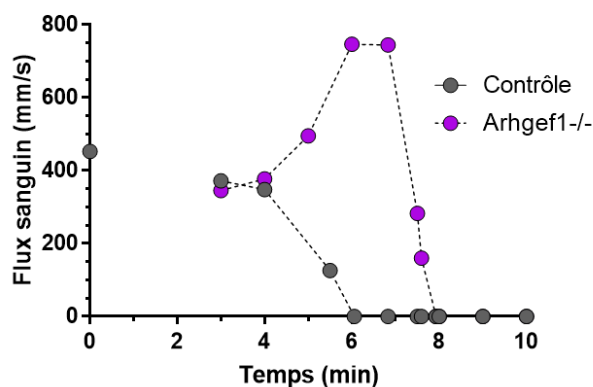


Figure 61 : Formation du thrombus suite à l'application de chlorure de fer pendant 2 min. (A) Images en mode B d'une carotide de souris avant et après formation du thrombus (flèche rouge). (B) Exemples de mesure échographique du flux sanguin dans la carotide droite des souris avant application de FeCl₃ à 10 % pendant 2 min (temps 0) et à 6 min et 7 min.

Des profils typiques du flux sanguin au cours du temps obtenus avec les deux groupes de souris sont présentés sur la figure 62 A. Le temps moyen de formation d'un thrombus occlusif est plus élevé pour les souris Arhgef1^{-/-} que pour les souris contrôles (figure 62 B).

A



B

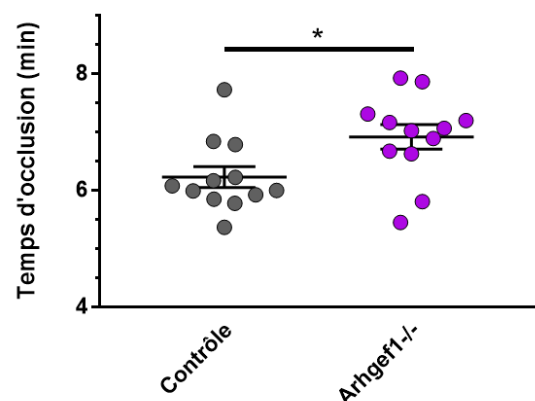


Figure 62 : (A) Profils typiques du flux sanguin au niveau de la carotide, avant et après application de FeCl₃. (B) Temps moyen d'occlusion totale. (Occlusion totale de la carotide = diminution de plus de 90% du flux sanguin pendant au moins 1 min). Le résultats est exprimé en moyenne $\pm$ SEM.

Chez la souris *Arhgef1* $-/-$, une augmentation du flux sanguin a été mesurée. Ce changement peut être dû à des caillots instables qui se sont formés dans la carotide et qui perturbent l'écoulement sanguin.

II. Culture primaire de cellules musculaires lisses vasculaires à partir des aortes thoraciques des souris

Avant de réaliser les expériences sur les cellules mises en culture à partir des aortes thoraciques des souris, nous avons vérifié leur phénotype et démontré, comme le montre la figure 63, que les CMLVs en culture primaire expriment bien l' α -actine et la chaîne lourde de la myosine dans les deux génotypes.

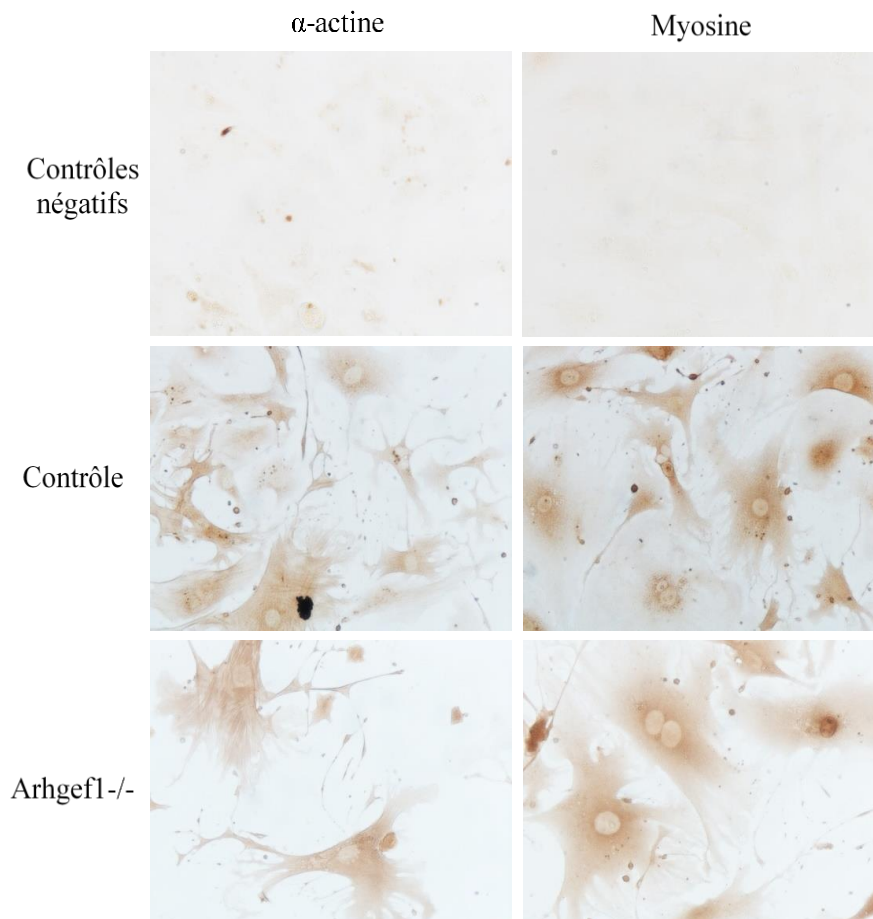


Figure 63 : *Caractérisation des cultures primaires issues des aortes thoraciques des souris. Marquage de l' α -actine et de la chaîne lourde de la myosine des cellules. Observation au microscope optique au grossissement x200.*

A. Prolifération des CMLVs

Il est connu que RhoA est impliquée dans la stimulation de la prolifération. En absence d'Arhgef1, la figure 64 montre que les CMLVs issues des aortes thoraciques des souris Arhgef1 -/- prolifèrent moins que les CMLVs issues des aortes thoraciques des souris contrôles. Cette observation est étayée par le comptage des CMLVs 48h après leur ensemencement et stimulées ou non pendant 24h à la thrombine (1 U/mL). Stimulée à la thrombine (qui active la voie de signalisation RhoA/Arhgef1), les CMLVs des souris contrôles prolifèrent plus qu'à l'état basal et cela de manière significative. Cependant, pour les CMLVs des souris Arhgef1 -/-, la thrombine ne modifie pas la prolifération. La diminution de prolifération est maintenue entre les deux groupes de souris dans les trois conditions de culture.

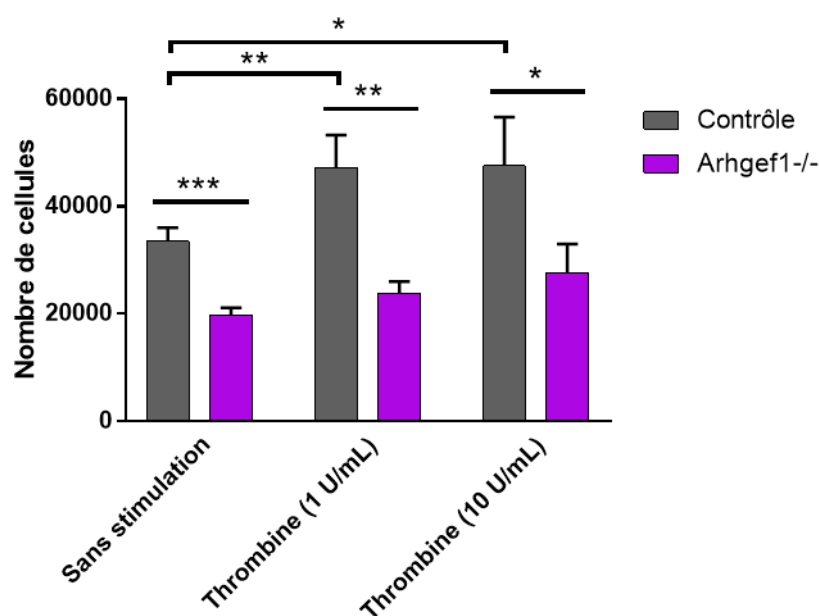


Figure 64 : Prolifération des CMLVs issues d'aortes thoraciques de souris contrôles et de souris Arhgef1 -/- comptées 48h après ensemencement et stimulées ou non par de la thrombine (1 U/mL) pendant 24h.

Comptage dans une chambre de Neubauer. $n = 4$ pour les souris contrôles et $n = 3$ pour les souris Arhgef1 -/- ; *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$ versus contrôle.

B. Détermination de l'activité procoagulante des phospholipides anioniques

Les phospholipides anioniques, et principalement la phosphatidylsérine, disposent d'une forte APP. Cette dernière est mesurée à la surface des CMLVs. L'APP est significativement moins importante à la surface des CMLVs issues des souris Arhgef1 -/- par rapport aux souris contrôles (Figure 65 A). Ces phospholipides anioniques sont également présents à la surface des VE secrétées par les cellules dans le milieu de culture. L'APP est mesurée dans le milieu de CMLVs stimulées ou non à la thrombine (1 U/mL) pendant 24h. Elle n'est pas différente

entre les 2 types de CMLVs de base (Figure 65 B) mais elle est significativement plus faible dans le surnageant des CMLVs *Arhgef1* ^{-/-} par rapport aux contrôles suite à la stimulation à la thrombine (Figure 65 C).

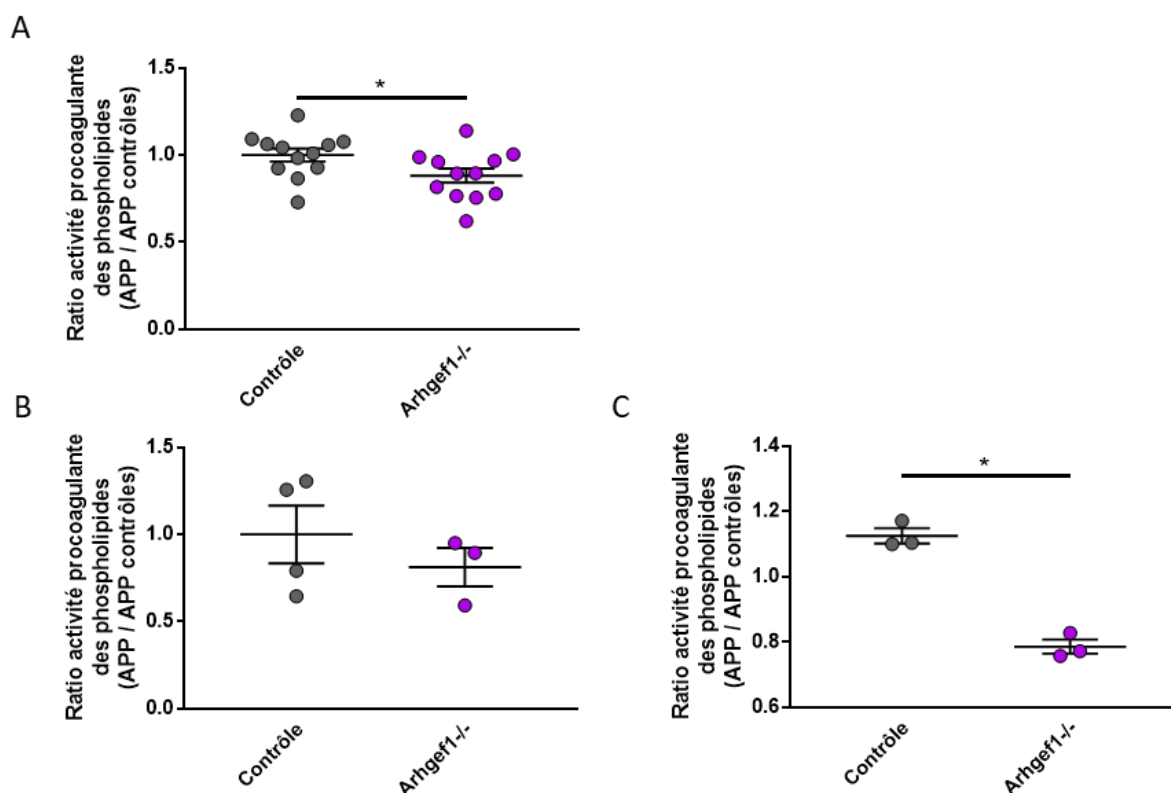


Figure 65 : Mesure de l'APP.

A la surface des 2 types de CMLVs aux passages 3-4 (A) ($n=12$ dans chaque groupe), dans le surnageant des CMLVs sans stimulation (B) ($n=4$ pour le groupe des souris contrôles et $n=3$ pour le groupe des souris *Arhgef1* ^{-/-}) et dans le surnageant des CMLVs suite à une stimulation par la thrombine ($n=3$ dans chaque groupe) ; * $p < 0,05$ versus contrôle.

DISCUSSION

Afin d'étudier l'implication d'Arhgef1 dans le contrôle de la fonction plaquettaire *in vitro* et *in vivo*, sur la coagulation sanguine et sur la régulation des propriétés procoagulantes des CMLVs, des souris KO total pour Arhgef1 ont été utilisées. Les souris Arhgef1 -/- ont une numération plaquettaire normale mais présentent une diminution significative de l'activation plaquettaire (baisse du marquage de la P-sélectine, de l'annexine V et du nombre de vésicules extracellulaires relarguées en réponse à une stimulation par la thrombine). La réactivité plaquettaire est diminuée, et la génération de thrombine est significativement réduite chez les souris Arhgef1 -/- par rapport aux souris contrôles en sang total et en plasma riche en plaquettes mais pas en plasma pauvre en plaquettes. Toutes ces modifications se traduisent, *in vivo*, par un plus grand nombre d'arrêts transitoires de l'écoulement sanguin dans le modèle de saignement à la queue et un allongement du temps de survenue d'un thrombus occlusif carotidien en réponse au FeCl₃ chez les souris Arhgef1 -/- comparées aux contrôles. Les CMLVs des souris Arhgef1 -/- génèrent moins de thrombine à leur surface, ont une activité procoagulante et une prolifération diminuées par rapport aux CMLVs des souris contrôles.

❖ Hémostase primaire et coagulation

Etant donné l'importance des plaquettes dans la genèse des maladies cardiovasculaires, leurs mécanismes d'activation et de signalisation font depuis des années l'objet d'études approfondies.

L'absence d'Arhgef1 n'a pas d'impact sur la numération et la taille plaquettaire. Bien que cela corresponde à ce qui a pu être observé chez les souris Arhgef10 -/- (Lu *et al.* 2017) et Arhgef12 -/- (Williams *et al.* 2015), ce résultat contraste avec le phénotype de macrothrombocytopénie observé chez des souris RhoA -/- dans les mégacaryocytes et aussi à l'augmentation du volume moyen plaquettaire chez les souris Arhgef3 -/- (Zou *et al.* 2017). Ces données confortent l'idée qu'il existe des rôles spécifiques des différents Arhgef dans la fonction plaquettaire et leur signalisation en aval. Tous ces Arhgef ont une localisation chromosomique, une masse moléculaire et une taille différentes. Notre conclusion est que le phénotype hypocoagulant des souris Arhgef1 -/- par rapport aux souris contrôles n'est pas dû à une thrombopoïèse anormale. Les valeurs de numération plaquettaire que nous avons obtenues dans les deux groupes de souris sont inférieures à celles données dans la littérature (Teruko Fukuda *et al.* 2017). Cette divergence est probablement expliquée par l'automate utilisé pour réaliser ces mesures qui peut impacter le résultat.

Afin de comprendre le mécanisme expliquant les défauts de l'hémostase et de la thrombogenèse des souris *Arhgef1* ^{-/-}, la première étape a été d'étudier l'impact de la suppression d'*Arhgef1* sur les réponses fonctionnelles des plaquettes. En effet, l'importance de la voie G₁₃-RhoA dans l'agrégation plaquettaire (*Jin et al. 2009*) a été largement décrite. Nos données ont démontré que l'agrégation plaquettaire induite par différents agonistes n'était pas modifiée entre les deux groupes de souris (tendance à une diminution avec la plus faible concentration en collagène) mais que l'activation plaquettaire (sécrétion des granules α , retournement membranaire et sécrétion de vésicules extracellulaires) était réduite dans les plaquettes *Arhgef1* ^{-/-} en réponse à une stimulation par la thrombine ou le collagène. L'absence de différence d'agrégation suite à une stimulation par le TRAP entre les souris contrôles et *Arhgef1* ^{-/-} peut s'expliquer par l'emploi d'une concentration trop importante en agoniste, ce qui masquerait une différence possible (*Qasim et al. 2019*). Cependant, l'activation plaquettaire réduite observée dans notre étude concorde avec une étude précédente montrant que la sécrétion en granules α par les plaquettes RhoA ^{-/-} est diminuée (marquage à la P-sélectine (*Pleines et al. 2012*)) ainsi que le marquage de l'annexine V (*Huang et al. 2019*)). Dans les plaquettes, les réarrangements du cytosquelette sont réputés être critiques pour la dégranulation (*Reed et al. 2000*), et des observations dans différents types de cellules ont montré que RhoA était associée à la sécrétion de granules denses et à des protéines du complexe de l'exocytose (*Ory et al. 2011*). Les mécanismes exacts par lesquels RhoA participe à la libération des granules plaquettaires restent à déterminer.

La polymérisation d'actine est nécessaire au changement de forme des plaquettes, à la sécrétion des granules et à la stabilité des thrombi sous écoulement. Comprendre les mécanismes qui contrôlent la polymérisation est essentiel pour comprendre comment maintenir l'efficacité de l'hémostase. La petite GTPase RhoA est cruciale pour ces événements, comme en témoigne le déficit en plaquettes chez des souris déficientes pour RhoA dans les mégacaryocytes : elles présentent une fonction et une forme plaquettaire altérées (*Pleines et al. 2012*). Une autre équipe a montré une nouvelle diaphonie entre les voies de signalisation NO-cGMP-PKG et RhoA / ROCK pour contrôler le remodelage de l'actine plaquettaire (*Aburima et al. 2017*). D'autre part, la stimulation des plaquettes par la thrombine entraîne la relocalisation membranaire de RhoA et la formation d'un complexe de signalisation RhoA/ROCK2/MYPT1 qui stimule l'activité de la phosphatase de la MLC et ainsi la contraction plaquettaire (*Aburima et al. 2013*). L'étalement plaquettaire et l'adhérence sont significativement plus faibles chez les souris *Arhgef1* ^{-/-} par rapport aux souris contrôles en réponse à une stimulation par la thrombine. Le même résultat avait été obtenu chez les souris *Arhgef10* ^{-/-} alors que les souris

Arhgef12 $-/-$ ne présentent pas de modification d'étalement et de l'adhésion. Ces résultats suggèrent un rôle essentiel pour le facteur d'échange nucléotidique Arhgef1 de RhoA, similaire à Arhgef10, dans la formation des filopodes et lamellipodes suite au remaniement du cytosquelette d'actine.

A ce jour, la mesure de la génération de thrombine est considérée comme l'approche la plus globale du phénotypage biologique *in vitro* de la coagulation car elle est la résultante de réactions pro- et anticoagulantes. L'intérêt de la thrombinographie pour les principales thrombophilies constitutionnelles ainsi que pour les déficits constitutionnels en facteurs de la coagulation, est établi par plusieurs équipes (Membre *et al.* 2007). Il existe une cohérence entre le test *in vitro* et la clinique, qu'il s'agisse de saignement ou de thrombose. La thrombinographie mesure la génération de thrombine en sang total ou en plasma. Dans le premier cas, les plaquettes et d'autres cellules apportent des phospholipides anioniques et des récepteurs membranaires. Les facteurs de la coagulation sont également présents. En plasma riche en plaquettes, seules ces cellules fournissent les éléments cellulaires nécessaires à la génération de thrombine et en plasma pauvre en plaquettes, des vésicules synthétiques sont ajoutées et donc les voies de signalisation cellulaire ne sont plus présentes. La génération de thrombine est significativement plus faible chez les souris Arhgef1 $-/-$ par rapport aux souris contrôles en sang total et en plasma riche en plaquettes mais il n'y a pas de différence en plasma pauvre en plaquettes. Ces trois différentes conditions et ces résultats permettent de montrer un rôle prépondérant des plaquettes dans la différence de génération de thrombine observée entre les deux groupes de souris. La diminution de l'exposition des phospholipides anioniques à la face externe des membranes plaquettaires et la diminution de la libération de vésicules extracellulaires en réponse à la stimulation par la thrombine représentent deux mécanismes impliquant les récepteurs PARs et la voie RhoA, ce qui contribue à l'hypocoagulabilité de la souris Arhgef1 $-/-$ par rapport à la souris contrôle *in vitro*. Cependant, tous les aspects du fonctionnement du système hémostatique ne sont pas explorés, notamment l'adhérence plaquettaire initiale au sous endothélium, la réactivité des plaquettes aux agonistes comme le collagène, l'action de la plasmine (enzyme clé du système fibrinolytique) (Lecompte *et al.* 2006). De plus, les conditions expérimentales utilisées dans le test de thrombinographie ne prennent pas en compte la participation endothéliale dans l'inhibition de la thrombine.

Classiquement, la caractérisation moléculaire d'une hypocoagulabilité est réalisée par la mesure de facteurs individuels impliqués dans la génération ou l'inhibition de la thrombine. Nous nous sommes intéressés aux facteurs pro- et anticoagulants de l'endothélium. Une

diminution des facteurs procoagulants (VWF et CD146 soluble) ou une augmentation des molécules anticoagulantes (thrombomoduline soluble ou TFPI libre) amène à suggérer un état hypocoagulable. Dans notre modèle murin, la thrombomoduline soluble est significativement augmentée et le TFPI libre tend à augmenter chez les souris *Arhgef1* $-/-$. Cette augmentation en facteurs anticoagulants pourrait participer à l'allongement du temps de saignement et à l'augmentation du temps de formation d'un thrombus occlusif. Toutefois, la concentration plasmatique en un ou plusieurs facteurs ne rend pas compte de ses capacités à interagir avec les autres facteurs de la coagulation et n'apporte qu'une information très limitée et fragmentaire ne permettant pas de conclure sur l'état de la cascade de coagulation.

Une activation exacerbée des mécanismes de l'hémostase peut conduire à une thrombose artérielle qui aboutit à l'obstruction totale du vaisseau (*Lip et al. 1999*). L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des thromboses est facilitée par l'utilisation de modèles animaux. Chez l'homme, les études utilisent des marqueurs biologiques ou des échantillons de tissus (vaisseaux) mais il n'est pas possible de modifier génétiquement, ou d'examiner *in vivo* les mécanismes biologiques. L'obtention maîtrisée des souris génétiquement modifiées permet désormais de manipuler et d'évaluer le rôle des différents acteurs de l'hémostase. De nombreux modèles expérimentaux de thromboses dans cette espèce se sont développés (*Denis et al. 2007*). La structure du thrombi chez la souris, donnée par analyse histologique, est identique à celle de l'homme (*Farrehi et al. 1998*). L'inactivation de gènes codants pour une pathologie humaine dans ces animaux (hémophilie, thrombasthénie de Glanzmann, afibrinogénémie...) a permis de mimer les principaux phénotypes trouvés dans les pathologies. Le modèle de thrombose en réponse au FeCl_3 qui est un modèle pathologique, reflète la formation d'un thrombus car il met en jeu de nombreux mécanismes complexes d'altération d'endothéliale non physiologique. A l'origine ce modèle utilisait une application d'un courant électrique avec des électrodes en fer qui sont placées à la surface externe de la carotide de rat (*Kurz et al. 1990*). Le modèle de thrombose artérielle le plus fréquemment utilisé chez la souris est l'application directe de FeCl_3 sur la carotide qui résulte généralement en la formation d'un thrombus occlusif total entre 5 et 20 minutes (*Wang et al. 2005*). Les réponses au FeCl_3 résultent de l'exposition du sous endothélium suite à une déstructuration de la monocouche de cellules endothéliales et une exposition des couches plus profondes de la paroi qui contiennent, des CMLVs, des glycoprotéines de la matrice extracellulaire, des collagènes I, III et IV interstitiels et du facteur tissulaire permettant l'adhésion et l'activation des plaquettes (*Eckly et al. 2011*). Le modèle de thrombose induite par le FeCl_3 présente l'avantage d'être simple

d'utilisation, reproductible et, quand il est couplé à une sonde, permet le suivi en temps réel et extemporanément de la formation du thrombus. Chez des souris C57Bl6, l'injection d'anticorps anti PAR4 (1 mg/kg) prolonge de manière significative le délai de formation d'un thrombus occlusif dans le modèle de thrombose de l'artère carotidienne induite par du FeCl₃ à 7,5%. Cela avait suggéré que le modèle de thrombose induite par le FeCl₃ pouvait être utilisé pour évaluer les effets des agents antiplaquettaires et pour caractériser les stratégies thérapeutiques potentielles (Li et al. 2016). La limite principale de ce modèle est que le mécanisme n'est pas clair et reste controversé (formation de ROS, adhérence des plaquettes et des globules rouges...). En accord avec la diminution de la génération de thrombine *in vitro*, le temps d'occlusion totale de la carotide suite à une application de FeCl₃ est allongé chez les souris Arhgef1 -/- par rapport aux souris contrôles. La quantité de thrombine générée étant plus faible, la transformation du fibrinogène en fibrine est plus lente et le caillot est stabilisé moins rapidement par la fibrine. Cependant, cela ne s'est pas traduit par une augmentation du nombre d'embols visualisés par des modifications de flux sanguin. La thrombomoduline en fixant la thrombine l'empêche d'interagir avec le fibrinogène. L'augmentation de thrombomoduline observée chez les souris Arhgef1 -/- pourrait également participer à l'allongement du temps d'occlusion.

Pour étudier l'hémostase physiologique, une coupure à la queue a été réalisée (Law et al. 1999). Elle permet d'obtenir le temps de formation d'un caillot, de déterminer sa stabilité et sa composition et de mesurer la quantité de sang écoulé. La section entière d'un morceau de queue n'est pas forcément complètement physiologique mais aujourd'hui ce modèle reste classique. Le caillot formé chez les souris Arhgef1 -/- est moins stable : le nombre de reprise de saignement est significativement plus élevé chez les souris mutées par rapport aux souris contrôles. Le temps de formation d'un caillot stable est également prolongé et le volume de sang perdu est augmenté. Dans notre modèle, le compte plaquettaire n'est pas modifié mais le nombre de plaquettes dans le réseau de fibrine diminue fortement chez les souris Arhgef1 -/-. Des résultats similaires sont également trouvés chez les souris déficientes pour Arhgef10 : augmentation du temps de saignement et du nombre d'arrêts transitoires. En conclusion, cibler Arhgef1 pourrait prévenir certains événements thrombotiques.

Nous avons également démontré que Arhgef1 jouait un rôle important dans l'activation de la voie de signalisation RhoA. Son activation est altérée, de même que la phosphorylation d'un effecteur en aval : la chaîne légère de myosine (MLC) en réponse à une stimulation par la thrombine. La MLC est impliquée dans le changement de forme des plaquettes. Cela explique au moins en partie le défaut d'étalement et d'adhérence des plaquettes Arhgef1-/- par rapport

aux contrôles. Ce résultat est similaire au phénotype des souris *Arhgef10* $-/-$ (Lu et al. 2017). En revanche, *Arhgef12* n'a pas de rôle apparent dans l'activation de RhoA en réponse à la stimulation de plaquettes par la thrombine (Williams et al. 2015). Chez les patients souffrant d'une insuffisance cardiaque, le niveau de protéines ROCK1 et ROCK2 est augmenté ainsi que l'activité de RhoA par rapport à des sujets contrôles (Dong et al. 2012). Chez d'autres patients ayant eu un AVC ischémique, l'activité de ROCK est augmentée par rapport aux sujets contrôles (Feske et al. 2009). Les effets physiopathologiques de la voie de signalisation RhoA/ROCK exercée sur le système cardiovasculaire sont très complexes et présentent un intérêt clinique. Au cours des décennies précédentes, de plus en plus de preuves ont démontré de manière constante que cette voie de signalisation est impliquée dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires et que des résultats favorables sont observés avec des inhibiteurs spécifiques de ROCK. *Arhgef1* fait partie de cette voie de signalisation et pourrait donc également être une cible thérapeutique tant sur le plan de la prévention que celui du traitement de pathologies telles que l'hypertension artérielle, la prévention de la resténose des vaisseaux et l'amélioration du remodelage cardiaque (Cai et al. 2015).

Pris ensemble, ces résultats indiquent que la voie RhoA joue clairement un rôle essentiel dans l'activation plaquettaire dépendante d'*Arhgef1*. Cependant, il est difficile d'exclure la présence d'une voie alternative et/ ou d'un rôle non canonique dans la fonction plaquettaire. Le dosage d'autres facteurs d'échanges nucléotidiques, protéines G et kinases suite à différentes stimulations (thrombine ou collagène) permettrait de regarder si d'autres voies de signalisation sont impactées ou prennent le relais suite à la délétion du facteur *Arhgef1*.

En 2019, une équipe américaine a publié un travail assez identique sur le rôle d'*Arhgef1* dans les plaquettes (Qasim et al. 2019). A deux reprises, les travaux de cette thèse sont mentionnés dans les références. Les résultats dans cette publication sont pour partie similaire à ceux trouvés au cours des 3 années de travail mais également différents pour une autre part. Les doses d'agonistes utilisées sont probablement une des explications aux différences observées. L'originalité de mon travail par rapport à celui de l'équipe de Qasim est le rôle d'*Arhgef1* dans l'activité procoagulante de plaquettes et dans la génération de thrombine.

❖ Les cellules musculaires lisses : impact sur l'hémostase

Les CMLVs ne sont jamais en contact direct avec le sang sauf dans certaines pathologies (anévrismes, rupture d'une plaque d'athérosclérose). Mais il existe un gradient entre le compartiment sanguin et le compartiment pariétal : des molécules plasmatiques franchissent la barrière endothéliale et ce phénomène est amplifié dans certaines pathologies où cette barrière est lésée et activée.

Il a été mis en évidence que les CMLVs sont un support cellulaire approprié pour la génération de thrombine en présence d'un plasma défibriné (*Pathak et al. 2006*). La synthèse endogène de prothrombine par les CMLVs permet de former une quantité de thrombine suffisante pour exercer des effets cellulaires (~1 nM) mais pas les effets coagulants qui surviennent pour des concentrations supérieures à 10 nM. A cette concentration d'environ 1 nM, la thrombine permet notamment d'induire la prolifération des cellules, leur migration ou encore la machinerie de synthèse protéique matricielle (*Jeong et al. 2015, McNamara et al. 1993*). Les CMLVs issues des aortes thoraciques des souris *Arhgef1* ^{-/-} ont un phénotype moins coagulant que les CMLVs issues des aortes thoraciques des souris contrôles en générant des quantités de thrombine moins importantes à leur surface en présence de plasma. Le rôle des cellules dans la coagulation est, dans un premier temps, d'apporter des surfaces phospholipidiques chargées négativement qui permettent la liaison des facteurs de coagulation via les résidus Gla et ont un rôle catalyseur des réactions enzymatiques de la cascade de coagulation. L'exposition de la phosphatidylsérine à la surface des plaquettes et des cellules de la paroi vasculaire est régulée par un mécanisme de flip-flop membranaire. Nos résultats ont montré une diminution de l'activité procoagulante des phospholipides à la surface des CMLVs et également dans le surnageant des cellules en réponse à une stimulation à la thrombine à une concentration comparable à celle produite par les CMLVs chez les souris *Arhgef1* ^{-/-} par rapport aux contrôles. L'APP diminuée à la surface des CMLVs issues des souris *Arhgef1* ^{-/-} par rapport aux souris contrôles pourrait expliquer la différence de propriétés procoagulantes des CMLVs issues des deux groupes de souris. Les CMLVs ont la capacité de sécréter des vésicules extracellulaires enrichies en phospholipides anioniques (*Schechter et al. 2000*). La plus faible quantité d'APP mesurée dans les surnageants de culture des CMLVs issues des souris *Arhgef1* ^{-/-} par rapport aux CMLVs des souris contrôles suggère que leur capacité à sécréter des vésicules extracellulaires est diminuée. Toutefois, il est peu probable que dans nos conditions expérimentales, la génération de thrombine soit influencée par ces vésicules car les CMLVs ont été préalablement rincées et ainsi ces vésicules ont été éliminées. De plus, les CMLVs ont la capacité de synthétiser du facteur tissulaire. Ainsi, une autre explication pourrait être que la quantité de facteur tissulaire présent sur les membranes

cellulaires est moins importante à la surface des CMLVs issues des souris *Arhgef1* ^{-/-}. Ce dosage reste à réaliser.

Lorsque la thrombine est formée à la surface des CMLVs, elle peut contribuer à la formation de fibrine en clivant le fibrinogène, et elle peut surtout se fixer sur son récepteur PAR-1. Les effets cellulaires déclenchés par la liaison de la thrombine à son récepteur sont déjà bien établis dans la littérature. Ces effets comprennent une augmentation de la sécrétion de MMP2 (*Galis et al. 1997*), un remaniement du cytosquelette, une augmentation de la prolifération cellulaire, de la contractilité ou encore de l'activation des intégrines contribuant à la fibrose vasculaire. Des souris déficientes pour PAR-1 traitées avec de l'angiotensine II présentent une atténuation de la fibrose vasculaire démontrant l'implication de PAR-1 au niveau cellulaire (*Antoniak et al. 2017*). Les CMLVs *Arhgef1* ^{-/-} prolifèrent moins que les CMLVs contrôles. Au sein de notre laboratoire, un autre travail de thèse (Dr Mélusine Didelot) a montré que l'activation de PAR-1 par la thrombine intervient dans la phase d'initiation de la génération de thrombine en augmentant l'activité procoagulante des phospholipides à la surface des CMLVs. Ce système d'autoamplification pourrait être partiellement éteint chez la souris *Arhgef1* ^{-/-}, ce qui contribuerait à la diminution de génération de thrombine à la surface des CMLVs par rapport aux CMLVs issues de souris contrôles.

Cibler *Arhgef1* pourrait contribuer à limiter le développement de fibroses vasculaires en maintenant un phénotype contractile et non prolifératif.

❖ Conclusion générale des travaux de la thèse

L'hypothèse de ce travail était que le contrôle de la signalisation intracellulaire de RhoA par *Arhgef1* était un élément central dans la régulation de l'activité procoagulante des cellules nécessaire à la coagulation plasmatique et tissulaire. Les résultats obtenus ont permis de répondre en grande partie à cette hypothèse. En effet, ce travail de thèse a mis en évidence un phénotype hypocoagulable chez les souris KO pour *Arhgef1* par rapport aux souris contrôles, qui met en jeu deux types cellulaires : les plaquettes et les CMLVs. Un point commun entre ces cellules est la voie de signalisation RhoA et surtout son facteur d'échange nucléotidique *Arhgef1*.

❖ Perspectives

L'article de l'équipe de Qasim présente des résultats similaires à ceux obtenus durant mon travail de thèse et cela nous conforte sur la fiabilité et l'interprétation des données. Nos travaux apportent toutefois des résultats supplémentaires originaux qui n'ont pas été étudiés pour aucun autre facteur d'échanges nucléotidiques, en particulier sur la génération de thrombine. Des expériences permettant de démontrer le rôle d'Arhgef1 dans d'autres pathologies vasculaires sont également envisagés. Il est connu que les plaques d'athérome peuvent conduire à la formation de caillots. Si ces derniers se forment dans une artère qui nourrit le cerveau, ils peuvent engendrer un accident vasculaire cérébral. Chez des souris déficientes pour RhoA dans les mégacaryocytes, la zone cérébrale ischémisée suite à un modèle d'AVC murin (tMCAO) est significativement diminuée par rapport aux souris contrôles. Nous aimerions savoir si l'abolition d'Arhgef1 permettrait également de protéger les souris d'un infarctus cérébral et des anomalies neurologiques qui en découlent.

Le travail présent a été réalisé avec des souris KO totales pour Arhgef1 mais il serait intéressant d'utiliser des souris KO conditionnelles pour Arhgef1 dans les mégacaryocytes ou dans les CMLVs afin de déterminer une différence potentielle de rôle sur l'hémostase physiologique et la thrombose en fonction du type cellulaire (plaquette ou CMLV). Cela pourrait également contribuer à établir si des modifications de la coagulation plasmatique sont la cause ou la conséquence d'altérations de la paroi vasculaire.

Malgré l'absence de défaut dans le compte plaquettaire chez la souris invalidée pour Arhgef1, ceci n'exclut pas l'existence d'une différence dans la formation des plaquettes au niveau fonctionnel. Les plaquettes proviennent de la fragmentation du cytoplasme de précurseurs médullaires : les mégacaryocytes. La génération de plaquettes sanguines est le résultat d'un mécanisme à deux étapes : la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse. La mégacaryopoïèse implique l'orientation de la cellule hématopoïétique, puis la prolifération, différenciation et maturation de progéniteurs mégacaryocytaires. Cette étape pourrait être étudiée au niveau de la moelle osseuse des tibias qui ont été conservés. Également la thrombopoïétine, synthétisée par le foie, pourrait être mesurée dans les plasmas congelés. Ce facteur de croissance est le plus important de la mégacaryopoïèse. Cette glycoprotéine oriente la différenciation des progéniteurs pluripotents et stimule la croissance des progéniteurs primitifs multipotents, favorisant ainsi la croissance et la différenciation des mégacaryocytes, ce qui *in fine* augmente la production des plaquettes *in vivo*. Si cette protéine est synthétisée en excès chez les souris Arhgef1 *-/-*, elle pourrait compenser une légère thrombopénie.

La fibrinolyse est un versant de l'hémostase qui n'a pas été étudié dans ce travail mais également dans aucun des travaux sur PAR ou RhoA ou les facteurs d'échanges nucléotidiques. Cette étude pourrait être menée sur les coupes de queue de souris mais également sur les thrombi carotidiens. En effet, le défaut de la stabilité du caillot n'est peut-être pas seulement dû aux modifications de sa formation et de sa composition mais peut être également expliqué par une augmentation de la fibrinolyse.

Dans les conditions physiologiques, les plaquettes, le système de la coagulation et l'endothélium fonctionnent de façon concertée. Les plaquettes maintiennent l'intégrité de l'endothélium, tandis que ce dernier libère de l'oxyde nitrique et de la prostacycline et exprime l'ectonucléotidase CD39 pour maintenir les plaquettes au repos. Dans des états inflammatoires, le dialogue entre les plaquettes, le système de la coagulation et l'endothélium n'est plus favorable et les acteurs ne sont pas encore tous connus. Un aspect clé de l'interférence semble être l'effet stimulant des plaquettes et des vésicules extracellulaires dérivées des plaquettes sur la migration transendothéliale des leucocytes, qui est un médiateur connu de l'athéro-progression. Un véritable défi pour l'avenir est d'identifier les principaux acteurs du cross-talk en étudiant les interactions cellule-cellule entre les plaquettes et l'endothélium (Coenen *et al.* 2017). Pour cela, la perspective est d'utiliser des chambres en flux couvertes de cellules endothéliales pour étudier l'interaction entre ces cellules et les plaquettes murines lavées et stimulées par la thrombine.

Ces expériences permettraient de préciser les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du phénotype hypocoagulable des souris *Arhgef1* *-/-* par rapport aux souris contrôles et ciblés sur l'interaction plaquettes-endothélium et sur la dernière étape de la coagulation qui est la fibrinolyse. En plus de l'identification du rôle d'*Arhgef1* dans les plaquettes et dans les CMLVs, son inhibition pourrait constituer une stratégie anti-plaquettaire efficace pour la prévention de thromboses pathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Aburima, Ahmed, S. Wraith, Raslan, Law, Magwenzi, et M. Naseem. 2013. « CAMP Signaling Regulates Platelet Myosin Light Chain (MLC) Phosphorylation and Shape Change through Targeting the RhoA-Rho Kinase-MLC Phosphatase Signaling Pathway ». *Blood* 122, n° 20: 3533-45.
- Aburima, Walladbegi, Wake, et Naseem. 2017. « CGMP Signaling Inhibits Platelet Shape Change through Regulation of the RhoA-Rho Kinase-MLC Phosphatase Signaling Pathway ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 15, n° 8: 1668-78.
- Akbar, Kim, Funk, Cancelas, Shang, Chen, Johnson, Williams, et Zheng. 2007. « Genetic and Pharmacologic Evidence That Rac1 GTPase Is Involved in Regulation of Platelet Secretion and Aggregation ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, n° 8: 1747-55.
- Allahverdian, Chaabane, Boukais, Francis, et Bochaton-Piallat. 2018. « Smooth Muscle Cell Fate and Plasticity in Atherosclerosis ». *Cardiovascular Research* 114, n° 4: 540-50.
- Alshbool, Karim, Vemana, Conlon, Lin, et Khasawneh. 2015. « The Regulator of G-Protein Signaling 18 Regulates Platelet Aggregation, Hemostasis and Thrombosis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 462, n°4: 378-82.
- Althoff, Juárez, Troidl, Tang, Wang, Wirth, Takefuji, Wettschureck, et Offermanns. 2012. « Procontractile G Protein-Mediated Signaling Pathways Antagonistically Regulate Smooth Muscle Differentiation in Vascular Remodeling ». *The Journal of Experimental Medicine* 209, n° 12: 2277-90.
- Antoniak, Cardenas, Buczek, Church, Mackman, et Pawlinski. 2017. « Protease-Activated Receptor 1 Contributes to Angiotensin II-Induced Cardiovascular Remodeling and Inflammation ». *Cardiology* 136, n° 4: 258-68.
- Arciniegas, Sutton, Allen, et Schor. 1992. « Transforming Growth Factor Beta 1 Promotes the Differentiation of Endothelial Cells into Smooth Muscle-like Cells in Vitro ». *Journal of Cell Science* 103, n° 2: 521-29.
- Argmann, Edwards, Sawyez, O'Neil, Hegele, Pickering, et Huff. 2005. « Regulation of Macrophage Cholesterol Efflux through Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibition: A ROLE FOR RhoA IN ABCA1-MEDIATED CHOLESTEROL EFFLUX ». *Journal of Biological Chemistry* 280, n° 23: 22212-21.
- Aslan, Joseph E. 2019. « Platelet Rho GTPase Regulation in Physiology and Disease ». *Platelets* 30, n° 1: 17-22.
- Badimon, Lina, Padró, et Vilahur. 2012. « Atherosclerosis, Platelets and Thrombosis in Acute Ischaemic Heart Disease ». *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care* 1, n° 1: 60-74.
- Bi, Dan, Nishimura, Niuro, Hirano, et Kanaide. 2005. « Contractile Properties of the Cultured Vascular Smooth Muscle Cells: The Crucial Role Played by RhoA in the Regulation of Contractility ». *Circulation Research* 96, n° 8: 890-97.

- Bishop, Hall. 2000. « Rho GTPases and Their Effector Proteins ». *The Biochemical Journal* 348 Pt 2: 241-55.
- Borissoff, Spronk, Heeneman, et Cate. 2009. « Is Thrombin a Key Player in the “coagulation-Atherogenesis” Maze? » *Cardiovascular Research* 82, n° 3: 392-403.
- Bouchard, Orfeo, Keith, Lavoie, Gissel, Fung, et. Mann. 2018. « Microparticles Formed during Storage of Red Blood Cell Units Support Thrombin Generation »: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 84, n° 4: 598-605.
- Burkhart, Vaudel, Gambaryan, Radau, Walter, Martens, Geiger, Sickmann, et Zahedi. 2012. « The First Comprehensive and Quantitative Analysis of Human Platelet Protein Composition Allows the Comparative Analysis of Structural and Functional Pathways ». *Blood* 120, n° 15.
- Burnier, Laurent, Fontana, R. Kwak, et Angelillo-Scherrer. 2009. « Cell-Derived Microparticles in Haemostasis and Vascular Medicine ». *Thrombosis and Haemostasis* 101, n° 3: 439-51.
- Byzova, Plow. 1998. « Activation of $\alpha V\beta 3$ on Vascular Cells Controls Recognition of Prothrombin ». *The Journal of Cell Biology* 143, n° 7: 2081-92.
- Cai, Zhou, et Li. 2015. « Rho-GTPase and Atherosclerosis: Pleiotropic Effects of Statins ». *Journal of the American Heart Association* 4, n° 7.
- Carbone, Chadeuf, Heurtebise-Chrétien, Prieur, Quillard, Goueffic, Vaillant, et al. 2017. « Leukocyte RhoA Exchange Factor Arhgef1 Mediates Vascular Inflammation and Atherosclerosis ». *Journal of Clinical Investigation* 127, n° 12: 4516-26.
- Cesarman-Maus, et Hajjar. 2005. « Molecular Mechanisms of Fibrinolysis ». *British Journal of Haematology* 129, n° 3: 307-21.
- Chen, Singer, Sternweis, et Sprang. 2005. « Structure of the P115RhoGEF RgRGS Domain–Gα13/I1 Chimera Complex Suggests Convergent Evolution of a GTPase Activator ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12, n° 2: 191.
- Cherfils, Zeghouf. 2013. « Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs ». *Physiological Reviews* 93, n° 1: 269-309.
- Cintorino, Vindigni, Del Vecchio, Tosi, Frezzotti, Hadjistilianou, Leoncini, Silvestri, Skalli, et Gabbiani. 1989. « Expression of Actin Isoforms and Intermediate Filament Proteins in Childhood Orbital Rhabdomyosarcomas ». *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 21, n° 3: 409-19.
- Coenen, Mastenbroek, et Cosemans. 2017. « Platelet Interaction with Activated Endothelium: Mechanistic Insights from Microfluidics ». *Blood* 130, n° 26: 2819-28.
- Coughlin. 2000. « Thrombin Signalling and Protease-Activated Receptors ». *Nature* 407, n° 6801: 258-64.
- Coughlin. 2005. « Protease-Activated Receptors in Hemostasis, Thrombosis and Vascular Biology ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, n° 8: 1800-1814.
- Dash, Aepfelbacher, et Siess. 1995. « Integrin Alpha IIb Beta 3-Mediated Translocation of CDC42Hs to the Cytoskeleton in Stimulated Human Platelets ». *The Journal of Biological Chemistry* 270, n° 29: 17321-26.

- De Sotomayor, Pérez-Guerrero, Dolores Herrera, et Marhuenda. 2001. « Effect of simvastatin on vascular smooth muscle responsiveness: involvement of Ca^{2+} homeostasis ». *European Journal of Pharmacology* 415, n° 2: 217-24.
- Denis, et Wagner. 2007. « Platelet Adhesion Receptors and Their Ligands in Mouse Models of Thrombosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, n° 4: 728-39.
- Dewerchin, Liang, Moons, Carmeliet, Castellino, Collen, et Rosen. 2000. « Blood Coagulation Factor X Deficiency Causes Partial Embryonic Lethality and Fatal Neonatal Bleeding in Mice ». *Thrombosis and Haemostasis* 83, n° 2: 185-90.
- Dong, Liao, Fang, Lee, Yan, Liu, et Yu. 2012. « Increased Rho Kinase Activity in Congestive Heart Failure ». *European Journal of Heart Failure* 14, n° 9: 965-73.
- Duluc, Wojciak-Stothard. 2014. « Rho GTPases in the Regulation of Pulmonary Vascular Barrier Function ». *Cell and Tissue Research* 355, n° 3: 675-85.
- Dzau, Braun-Dullaeus, et Sedding. 2002. « Vascular Proliferation and Atherosclerosis: New Perspectives and Therapeutic Strategies ». *Nature Medicine* 8, n° 11: 1249-56.
- Eckly, Hechler, Freund, Zerr, Cazenave, Lanza, Mangin, et Gachet. 2011. « Mechanisms Underlying FeCl_3 -Induced Arterial Thrombosis ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 9, n° 4: 779-89.
- Elvers, Beck, Fotinos, Ziegler, et Gawaz. 2012. « The GRAF Family Member Oligophrenin1 Is a RhoGAP with BAR Domain and Regulates Rho GTPases in Platelets ». *Cardiovascular Research* 94, n° 3: 526-36.
- Faix, Grosse. 2006. « Staying in Shape with Formins ». *Developmental Cell* 10, n° 6: 693-706.
- Farrehi, Ozaki, Carmeliet, et Fay. 1998. « Regulation of Arterial Thrombolysis by Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Mice ». *Circulation* 97, n° 10: 1002-8.
- Félétou, Vanhoutte, et Verbeuren. 2010. « The Thromboxane/Endoperoxide Receptor (TP): The Common Villain ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 55, n° 4: 317-32.
- Feske, Sorond, Henderson, Seto, Hitomi, Kawasaki, Sasaki, Asano, et Liao. 2009. « Increased Leukocyte ROCK Activity in Patients after Acute Ischemic Stroke ». *Brain Research* 1257: 89-93.
- Fitch-Tewfik, Flaumenhaft. 2013. « Platelet Granule Exocytosis: A Comparison with Chromaffin Cells ». *Frontiers in Endocrinology* 4: 77.
- Flevaris, Panagiotis, Stojanovic, Gong, Chishti, Welch, et Du. 2007. « A Molecular Switch That Controls Cell Spreading and Retraction ». *The Journal of Cell Biology* 179: 553-65.
- Flynn, Byrne, Baglin, Weissberg, et Bennett. 1997. « Thrombin Generation by Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cells », *Blood* 89: 4378-84
- Fritsma, George A. 2015. « Platelet Structure and Function », *American Society for Clinical Laboratory Science* 28: 125-131

- Fukuda, Asou, Nogi, et Goto. 2017. « Evaluation of Mouse Red Blood Cell and Platelet Counting with an Automated Hematology Analyzer ». *Journal of Veterinary Medical Science* 79, n° 10: 1707-11.
- Fukumoto, Libby, Rabkin, Hill, Enomoto, Hirouchi, Shiomi, et Aikawa. 2001. « Statins Alter Smooth Muscle Cell Accumulation and Collagen Content in Established Atheroma of Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits ». *Circulation* 103, n° 7: 993-99.
- Gachet. 2008. « P2 Receptors, Platelet Function and Pharmacological Implications ». *Thrombosis and Haemostasis* 99, n° 03: 466-72.
- Galis, Kranzhöfer, Fenton, et Libby. 1997. « Thrombin Promotes Activation of Matrix Metalloproteinase-2 Produced by Cultured Vascular Smooth Muscle Cells ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17, n° 3: 483-89.
- Gao, Smith, Ker, Campbell, Cheng, Zou, Lin, Wang, Halene, et Krause. 2012. « Role of RhoA-Specific Guanine Exchange Factors in Regulation of Endomitosis in Megakaryocytes ». *Developmental Cell* 22, n° 3: 573-84.
- Goggs, Harper, Pope, Savage, Williams, Mundell, Heesom, Bass, Mellor, et Poole. 2013. « RhoG Protein Regulates Platelet Granule Secretion and Thrombus Formation in Mice ». *Journal of Biological Chemistry* 288, n° 47: 34217-29.
- Goggs, Savage, Mellor, et Poole. 2013. « The Small GTPase RhoA Is Dispensable for Platelet Filopodia Generation in Mice ». Édité par Pontus Aspenstrom. *PLoS ONE* 8, n° 1
- Goggs, Williams, Mellor, et Poole. 2015. « Platelet Rho GTPases-a Focus on Novel Players, Roles and Relationships ». *The Biochemical Journal* 466, n° 3: 431-42.
- Gratzinger, Canosa, Engelhardt, et Madri. 2003. « Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Modulates Endothelial Cell Motility through the Small G-Protein Rho ». *The FASEB Journal* 17, n° 11: 1458-69.
- Gresele, Falcinelli, Sebastiano, et Momi. 2017. « Matrix Metalloproteinases and Platelet Function ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 147: 133-65.
- Guilluy, Bregeon, Toumaniantz, Rolli-Derkinderen, Retailleau, Loufrani, Henrion, Scalbert, Bril, Torres, Offermanns, Pacaud et Loirand. 2010. « The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure ». *Nature Medicine* 16: 183-90
- Hall. 2012. « Rho Family GTPases ». *Biochemical Society Transactions* 40, n° 6: 1378-82.
- Heasman, Ridley. 2008. « Mammalian Rho GTPases: New Insights into Their Functions from in Vivo Studies ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, n° 9: 690-701.
- Heerkens, Shaw, Ryding, Brooker, Mullins, Austin, Ohanian, et Heagerty. 2006. « AV Integrins Are Necessary for Eutrophic Inward Remodeling of Small Arteries in Hypertension ». *Hypertension* 47, n° 2: 281-87.
- Heiman, Meadow, Gupta, S. Khan, E. Vaughan, et D. Shapiro. 2017. « Complete Plasminogen Activator Inhibitor 1 Deficiency ». In *GeneReviews®*,

- Hemker, Béguin. 1985. « The Generation of Thrombin in Whole Plasma. Biochemical Possibilities and Physiological Realities ». *Verhandelingen - Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van België* 47, n° 5: 321-39.
- Hensch, Karim, Druey, Tansey, et Khasawneh. 2016. « RGS10 Negatively Regulates Platelet Activation and Thrombogenesis ». Édité par Christian Schulz. *PLOS ONE* 11, n° 11.
- Hernández-Perera, Pérez-Sala, Soria, et Lamas. 2000. « Involvement of Rho GTPases in the Transcriptional Inhibition of Preproendothelin-1 Gene Expression by Simvastatin in Vascular Endothelial Cells ». *Circulation Research* 87, n° 7: 616-22.
- Hirsch, Bosco, Tropel, Laffargue, Calvez, Altruda, Wymann, et Montrucchio. 2001. « Resistance to Thromboembolism in PI3Kgamma-Deficient Mice ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, n° 11: 2019-21.
- Hodge, Ridley. 2016. « Regulating Rho GTPases and Their Regulators ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17, n° 8: 496-510.
- Hordijk, P L. 1999. « VE-Cadherin Modulates Endothelial Permeability »
- Huang, Bi, Su, Huang, Miao, Ma, Gao, Hou, et Peng. 2019. « Enhancing autophagy protects platelets in immune thrombocytopenia patients ». *Annals of Translational Medicine* 7, n° 7.
- Ikeda, Shimpō, Ohki, Inaba, Takahashi, Yamamoto, et Shimada. 2000. « Fluvastatin Inhibits Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Human Vascular Endothelial Cells ». *Hypertension* 36, n° 3: 325-29.
- Jackson. 2007. « The Growing Complexity of Platelet Aggregation ». *Blood* 109, n° 12: 5087-95.
- Jacobson, Dudek, Birukov, Ye, Grigoryev, Girgis et Garcia. 2004. « Cytoskeletal activation and altered gene expression in endothelial barrier regulation by simvastatin ». *American Journal of Respiratory cell and Molecular Biology* vol 30 n°5
- Jeong, Son, Kim, Eo, Rhim, et Kim. 2015. « Multiple Signaling Pathways Contribute to the Thrombin-Induced Secretory Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells ». *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19, n° 6: 549-55.
- Jin, Mao, Thomas, Kim, Daniel, et Kunapuli. 2009. « RhoA Downstream of G(q) and G(12/13) Pathways Regulates Protease-Activated Receptor-Mediated Dense Granule Release in Platelets ». *Biochemical Pharmacology* 77, n° 5: 835-44.
- Johnson, Tahamont, et Malik. 1983. « Thrombin-Induced Lung Vascular Injury. Roles of Fibrinogen and Fibrinolysis ». *The American Review of Respiratory Disease* 128, n° 1: 38-44.
- Jurk, Kehrel. 2005. « Platelets: Physiology and Biochemistry ». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 31, n° 4: 381-92.
- Kakar, et Lip. 2007. « Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy ». *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 5, n° 3: 441-50.
- Korff, Pfisterer, et Schorpp-Kistner. 2013. « MiR-663 and the MiRaculous Vascular Smooth Muscle Phenotypic Switch ». *Circulation Research* 113, n° 10: 1102-5.

- Kouklis, Panos, Konstantoulaki, Vogel, Broman, et B. Malik. 2004. « Cdc42 Regulates the Restoration of Endothelial Barrier Function ». *Circulation Research* 94, n° 2: 159-66.
- Kulkarni, Suhasini, M. Dopheide, L. Yap, Ravanat, Freund, Mangin, A. Heel, et al. 2000. « A Revised Model of Platelet Aggregation ». *Journal of Clinical Investigation* 105, n° 6: 783-91.
- Kurz, Main, et Sandusky. 1990. « Rat Model of Arterial Thrombosis Induced by Ferric Chloride ». *Thrombosis Research* 60, n° 4: 269-80.
- Lacolley, Regnault, et Avolio. 2018. « Smooth Muscle Cell and Arterial Aging: Basic and Clinical Aspects ». *Cardiovascular Research* 114, n° 4: 513-28.
- Lacolley, Regnault, Nicoletti, Li, et Michel. 2012. « The Vascular Smooth Muscle Cell in Arterial Pathology: A Cell That Can Take on Multiple Roles ». *Cardiovascular Research* 95, n° 2: 194-204.
- Lacolley, Regnault, Segers, et Laurent. 2017. « Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease ». *Physiological Reviews* 97, n° 4: 1555-1617.
- Laufs, Liao. 1998. « Post-Transcriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability by Rho GTPase ». *Journal of Biological Chemistry* 273, n° 37: 24266-71.
- Law, DeGuzman, Heiser, Ministri-Madrid, Killeen, et Phillips. 1999. « Integrin Cytoplasmic Tyrosine Motif Is Required for Outside-in AlphaIIb beta3 Signalling and Platelet Function ». *Nature* 401, n° 6755: 808-11.
- Lecompte, et Salignac. 2006. « New complete blood count parameter to evaluate iron status of haemodialysis patients ». *Nephrologie & Therapeutique* 2 Suppl 5: S327-332.
- Leng, Kashiwagi, Ren, et Shattil. 1998. « RhoA and the Function of Platelet Integrin AlphaIIb beta3 ». *Blood* 91, n° 11: 4206-15.
- Lhermusier, Chap, et Payrastre. 2011. « Platelet Membrane Phospholipid Asymmetry: From the Characterization of a Scramblase Activity to the Identification of an Essential Protein Mutated in Scott Syndrome ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 9, n° 10: 1883-91.
- Li, Nieman, et Gupta. 2016. « Ferric Chloride-Induced Murine Thrombosis Models ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 115.
- Lip, G. Y., et Blann. 1999. « Association of Platelet Function in Hypertensive Patients with Left Ventricular Hypertrophy ». *Platelets* 10, n° 1: 71-72.
- Littlewood, T. et M. Bennett. 2003. « Apoptotic Cell Death in Atherosclerosis ». *Current Opinion in Lipidology* 14, n° 5: 469-75.
- Liu, Itoh, Louie, Kubota, et Kent. 2002. « The Signaling Protein Rho Is Necessary for Vascular Smooth Muscle Migration and Survival but Not for Proliferation ». *Surgery* 132, n° 2: 317-25.
- Loirand et Pacaud. 2010. « The role of Rho protein signaling in hypertension ». *Nature Reviews Cardiology*, vol 7: 637-647.

- Lu, Hsu, Huang, Tu, Huang, Liou, Liao, Chen, Fu, et. Gau. 2017. « ARHGEF10 Knockout Inhibits Platelet Aggregation and Protects Mice from Thrombus Formation ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 15, n° 10: 2053-64.
- Ma, et Dorling. 2012. « The Roles of Thrombin and Protease-Activated Receptors in Inflammation ». *Seminars in Immunopathology* 34, n° 1: 63-72.
- Ma, Qin, et Plow. 2007. « Platelet Integrin $\text{AIIb}\beta 3$: Activation Mechanisms ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, n° 7: 1345-52.
- Mallat, Gojova, Sauzeau, Brun, Silvestre, Esposito, Merval, Groux, Loirand, et Tedgui. 2003. « Rho-Associated Protein Kinase Contributes to Early Atherosclerotic Lesion Formation in Mice ». *Circulation Research* 93, n° 9: 884-88.
- Mao, Xianqing, Said, Louis, Max, Bourhim, Challande, Wahl, Li, Regnault, et Lacolley. 2012. « Cyclic Stretch-Induced Thrombin Generation by Rat Vascular Smooth Muscle Cells Is Mediated by the Integrin $\text{Av}\beta 3$ Pathway ». *Cardiovascular Research* 96, n° 3: 513-23.
- Mariano, Martin-Loeches, Pallas, Abad, Lloret, et Lopez-Galvez. 2011. « Coagulation Factor XII Congenital Deficiency in Women with Recurrent Miscarriage ». *International Journal of Clinical Medicine* 02, n° 04: 469-72.
- Martin, Weiss, Metharom, Schmeckpeper, Hynes, O'Sullivan, et Caplice. 2009. « Thrombin Stimulates Smooth Muscle Cell Differentiation From Peripheral Blood Mononuclear Cells via Protease-Activated Receptor-1, RhoA, and Myocardin ». *Circulation Research* 105, n° 3: 214-18.
- Marx, Christophe, Lenting, Rupin, Vallez, Verbeuren, Denis. 2008. « Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIbIIIa ». *Blood*: 603-9
- McCarty, Larson, Auger, Kalia, Atkinson, Pearce, Ruf, et al. 2005. « Rac1 Is Essential for Platelet Lamellipodia Formation and Aggregate Stability under Flow ». *Journal of Biological Chemistry* 280, n° 47: 39474-84.
- McNamara, Sarembock, Bachhuber, Stouffer, Ragosta, Barry, Gimple, Powers, et Owens. 1996. « Thrombin and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation: Implications for Atherosclerosis and Restenosis ». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 22, n° 02: 139-44.
- McNamara, Sarembock, Gimple, Fenton, Coughlin, et Owens. 1993. « Thrombin Stimulates Proliferation of Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells by a Proteolytically Activated Receptor. » *Journal of Clinical Investigation* 91, n° 1: 94-98.
- McVey, Boswell, Mumford, Kembell-Cook, et Tuddenham. 2001. « Factor VII Deficiency and the FVII Mutation Database ». *Human Mutation* 17, n° 1: 3-17.
- Membré, Bounameaux, Boehlen, Genné, Pouplard, Regnault, et de Moerloose. 2007. « Heparin-Induced Thrombocytopenia Associated with Interleukin-8-Dependent Platelet Activation in a Patient with Antiphospholipid Syndrome ». *European Journal of Haematology* 79, n° 6: 550-53.
- Michel, Li, et Lacolley. 2012. « Smooth Muscle Cells and Vascular Diseases ». *Cardiovascular Research* 95, n° 2: 135-37.

- Miyata, Shimokawa, Kandabashi, Higo, Morishige, Eto, Egashira, Kaibuchi, et Takeshita. 2000. « Rho-Kinase Is Involved in Macrophage-Mediated Formation of Coronary Vascular Lesions in Pigs in Vivo ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20, n° 11: 2351-58.
- Monroe, et Hoffman. 2006. « What Does It Take to Make the Perfect Clot? » *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, n° 1: 41-48.
- Monroe, Hoffman, et Roberts. 2002. « Platelets and Thrombin Generation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22, n° 9: 1381-89.
- Nagy, Zoltan, Wynne, von Kriegsheim, Gambaryan, et Smolenski. 2015. « Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases Target ARHGAP17 and ARHGEF6 Complexes in Platelets ». *Journal of Biological Chemistry* 290, n° 50: 29974-83.
- Napolitano, et Siragusa. 2017. « Coronary Artery Stenosis Treatment in Aging Patients with Inherited Factor VII Deficiency: Where Do We Stand? » *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis* 56, n° 6: 867-69.
- Navarrete, Casari, Legendre, Marx, Hu, J. Lenting, D. Christophe, et V. Denis. 2012. « A Murine Model to Characterize the Antithrombotic Effect of Molecules Targeting Human von Willebrand Factor ». *Blood* 120, n° 13: 2723-32.
- Nguyen, Frye, Eskin, Patterson, Runge, et McIntire. 2001. « Cyclic Strain Increases Protease-Activated Receptor-1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells ». *Hypertension* 38, n° 5 : 1038-43.
- Nishioka, Horiuchi, Tabuchi, Yoshioka, Shirakawa, et Kita. 2001. « Small GTPase Rho Regulates Thrombin-Induced Platelet Aggregation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, n° 4: 970-75.
- Noda-Heiny, et Sobel. 1995. « Vascular smooth muscle cell migration mediated by thrombin and urokinase receptor ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 268, n°5: C1195-1201.
- Nygaard, Herfindal, Asrud, Bjørnstad, Kopperud, Oveland, Berven, et al. 2017. « Epac1-Deficient Mice Have Bleeding Phenotype and Thrombocytes with Decreased GPIIb/IIIa Expression ». *Scientific Reports* 7, n° 1: 8725.
- Offermanns, Stefan. 2006. « Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors ». *Circulation Research* 99, n° 12: 1293-1304.
- Ory, Gasman. 2011. « Rho GTPases and Exocytosis: What Are the Molecular Links? » *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, n° 1: 27-32.
- Palta, Saroa, et Palta. 2014. « Overview of the Coagulation System ». *Indian Journal of Anaesthesia* 58, n° 5: 515-23.
- Pan, Amison, Riffo-Vasquez Spina, Cleary, Wakelam, Page, Pitchford, et Welch. 2015. « P-Rex and Vav Rac-GEFs in Platelets Control Leukocyte Recruitment to Sites of Inflammation ». *Blood* 125, n° 7: 1146-58.
- Pathak, Zhao, Monroe, Roberts, Sheridan, Selzman, et Stouffer. 2006. « Thrombin Generation in Vascular Tissue ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4, n° 1: 60-67.

- Pearce, Li, Edwards, English, et Geary. 2004. « Differential Effects of Rho-Kinase Inhibition on Artery Wall Mass and Remodeling ». *Journal of Vascular Surgery* 39, n° 1: 223-28.
- Pérez-Gómez, et Bover. 2007. « The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage ». *Revista Espanola De Cardiologia* 60, n° 12: 1217-19.
- Petrache, T Crow, Neuss, et G.N Garcia. 2003. « Central Involvement of Rho Family GTPases in TNF- α -Mediated Bovine Pulmonary Endothelial Cell Apoptosis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306, n° 1: 244-49.
- Pleines, Eckly, Elvers, Hagedorn, Eliautou, Bender, Wu, et al. 2010. « Multiple Alterations of Platelet Functions Dominated by Increased Secretion in Mice Lacking Cdc42 in Platelets ». *Blood* 115, n° 16: 3364-73.
- Pleines, Hagedorn, Gupta, May, Chakarova, van Hengel, Offermanns, et al. 2012. « Megakaryocyte-Specific RhoA Deficiency Causes Macrothrombocytopenia and Defective Platelet Activation in Hemostasis and Thrombosis ». *Blood* 119, n° 4: 1054-63.
- Pula, et W. Poole. 2008. « Critical Roles for the Actin Cytoskeleton and Cdc42 in Regulating Platelet Integrin $\alpha_2\beta_1$ ». *Platelets* 19, n° 3: 199-210.
- Qasim, Hanan, Karim, Hernandez, Lozano, Khasawneh, et Z. Alshbool. 2019. « Arhgef1 Plays a Vital Role in Platelet Function and Thrombogenesis ». *Journal of the American Heart Association* 8, n° 9
- Reed, Fitzgerald, et Polgár. 2000. « Molecular Mechanisms of Platelet Exocytosis: Insights into the “Secrete” Life of Thrombocytes ». *Blood* 96, n° 10: 3334-42.
- Rodgers. 1988. « Vascular Smooth Muscle Cells Synthesize, Secrete and Express Coagulation Factor V ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 968, n° 1: 17-23.
- Rolfe, Worth, World, Campbell, et Campbell. 2005. « Rho and Vascular Disease ». *Atherosclerosis* 183, n° 1: 1-16.
- Ruggeri. 2007. « The Role of von Willebrand Factor in Thrombus Formation ». *Thrombosis Research* 120: S5-9.
- Sartore, Chiavegato, Faggin, Franch, Puato, Ausoni, et Pauletto. 2001. « Contribution of Adventitial Fibroblasts to Neointima Formation and Vascular Remodeling: From Innocent Bystander to Active Participant ». *Circulation Research* 89, n° 12: 1111-21.
- Sawada, Itoh, Ueyama, Yamashita, Doi, Chun, Inoue, et al. 2000. « Inhibition of Rho-Associated Kinase Results in Suppression of Neointimal Formation of Balloon-Injured Arteries ». *Circulation* 101, n° 17: 2030-33.
- Schechter, Spirn, Rossikhina, Giesen, Bogdanov, Fallon, Fisher, Schnapp, Nemerson, et Taubman. 2000. « Release of Active Tissue Factor by Human Arterial Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 87, n° 2: 126-32.
- Schimmel. 2017. « The endothelium in regulating vascular leakage and leukocyte extravasation »

- Schmeck, Brunsch, Seybold, Krüll, Eichel-Streiber, Suttorp, et Hippenstiel. 2003. « Rho Protein Inhibition Blocks Cyclooxygenase-2 Expression by Proinflammatory Mediators in Endothelial Cells ». *Inflammation* 27, n° 2: 89-95.
- Schoenwaelder, Hugan, Boniface, Fernando, Holdsworth, Thompson, Salem, et Jackson. 2002. « RhoA Sustains Integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$ Adhesion Contacts under High Shear ». *Journal of Biological Chemistry* 277, n° 17: 14738-46.
- Schrör, Bretschneider, Fischer, Fischer, Pape, Rauch, Rosenkranz, et Weber. 2010. « Thrombin Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells - Function and Regulation by Vasodilatory Prostaglandins ». *Thrombosis and Haemostasis* 103: 884-90.
- Seasholtz, Zhang, Morissette, Howes, Yang, et Brown. 2001. « Increased Expression and Activity of RhoA Are Associated with Increased DNA Synthesis and Reduced P27(Kip1) Expression in the Vasculature of Hypertensive Rats ». *Circulation Research* 89, n° 6: 488-95.
- Shibata, Kai, Seki, Kusaba, Takemiya, Koga, Jalalidin, et al. 2003. « Rho-Kinase Inhibition Reduces Neointima Formation after Vascular Injury by Enhancing Bax Expression and Apoptosis ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 42
- Shiu, Li, Marganski, Usami, Schwartz, Wang, Dembo, et Chien. 2004. « Rho Mediates the Shear-Enhancement of Endothelial Cell Migration and Traction Force Generation ». *Biophysical Journal* 86, n° 4: 2558-65.
- Siegel-Axel, Runge, Seipel, et Riessen. 2003. « Effects of Cerivastatin on Human Arterial Smooth Muscle Cell Growth and Extracellular Matrix Expression at Varying Glucose and Low-Density Lipoprotein Levels ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41, n° 3: 422-33.
- Stewart. 2014. « Regulator of G protein signaling 6 (RGS6), a multifarious and pleiotropic modulator of G protein coupled receptor signaling in brain ». *Theses and Dissertations*.
- Suzuki, Shin, Wang, Min, Poncz, Choi, Discher, et al. 2013. « RhoA Is Essential for Maintaining Normal Megakaryocyte Ploidy and Platelet Generation ». Édité par Kathleen Freson. *PLoS ONE* 8, n° 7
- Suzuki, Yoshinori, Yamamoto, Wada, Ito, Nakano, Sasaki, Narumiya, Shiku, et Nishikawa. 1999. « Agonist-Induced Regulation of Myosin Phosphatase Activity in Human Platelets Through Activation of Rho-Kinase ». *Blood*, 3408-17
- Tai, Herzog, Margaritis, Arruda, Chu, Golden, Labosky, et. High. 2008. « A Viable Mouse Model of Factor X Deficiency Provides Evidence for Maternal Transfer of Factor X ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 6, n° 2: 339-45.
- Taubman, Marmur, Rosenfield, Guha, Nichtberger, et Nemerson. 1993. « Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. » *Journal of Clinical Investigation* 91, n° 2: 547-52.
- Tsopanoglou, et Maragoudakis. 2009. « Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes ». *European Cytokine Network* 20, n° 4: 171-79.

- Van Nieuw Amerongen, Koolwijk, Versteilen, et van Hinsbergh. 2003. « Involvement of RhoA/Rho Kinase Signaling in VEGF-Induced Endothelial Cell Migration and Angiogenesis in Vitro ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23, n° 2: 211-17.
- Van Wetering et al. 2002. « Rac Induces Loss of VE-Cadherin Function », *J. Cell. Sci.* 1837-46
- Versteeg, Heemskerk, Levi, et Reitsma. 2013. « New Fundamentals in Hemostasis ». *Physiological Reviews* 93, n°1: 327-58.
- Vidwan, Param, Pathak, Sheth, Huang, M. Monroe, et A. Stouffer. 2010. « Activation of Protease-Activated Receptors 3 and 4 Accelerates Tissue Factor–Induced Thrombin Generation on the Surface of Vascular Smooth Muscle Cells ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, n° 12: 2587-96.
- Vouret-Craviari, Boquet, Pouysségur, et Van Obberghen-Schilling. 1998. « Regulation of the Actin Cytoskeleton by Thrombin in Human Endothelial Cells: Role of Rho Proteins in Endothelial Barrier Function ». Édité par Thomas D. Pollard. *Molecular Biology of the Cell* 9, n° 9: 2639-53.
- Wang et Bennett. 2012. « Aging and Atherosclerosis. Mechanisms, Functional Consequences, and Potential Therapeutics for Cellular Senescence ». *Circulation Research* 111: 245-259.
- Wang, Gao, Yue, Zhou, et Chu. 2005. « On-Line Optical Determination of Floc Size of Fe(III) Coagulants ». *Journal of Environmental Sciences* 17, n° 6: 921-25.
- Wetering, van den Berk, van Buul, Mul, Lommerse, Mous, ten Klooster, Zwaginga, et Hordijk. 2003. « VCAM-1-Mediated Rac Signaling Controls Endothelial Cell-Cell Contacts and Leukocyte Transmigration ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285, n° 2: C343-52.
- Williams, Harper, Goggs, Walsh, Offermanns, et Poole. 2015. « Leukemia-Associated Rho Guanine-Nucleotide Exchange Factor Is Not Critical for RhoA Regulation, yet Is Important for Platelet Activation and Thrombosis in Mice ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13, n° 11: 2102-7.
- Wojciak-Stothard, Ridley. 2002. « Rho GTPases and the Regulation of Endothelial Permeability ». *Vascular Pharmacology* 39, n° 4-5: 187-99.
- Wong, Lumma, Smith, Sisko, Wright, et Cai. 2001. « Statins Suppress THP-1 Cell Migration and Secretion of Matrix Metalloproteinase 9 by Inhibiting Geranylgeranylation ». *Journal of Leukocyte Biology* 69, n°6: 959-62.
- Woodcock-Mitchell, J., J. J. Mitchell, Low, Kieny, Sengel, Rubbia, Skalli, Jackson, et Gabbiani. 1988. « Alpha-Smooth Muscle Actin Is Transiently Expressed in Embryonic Rat Cardiac and Skeletal Muscles ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 39, n° 3: 161-66.
- Worth, Rolfe, Song, et Campbell. 2001. « Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Modulation in Culture Is Associated with Reorganisation of Contractile and Cytoskeletal Proteins ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 49, n° 3: 130-45.
- Worthylake, BurrIDGE. 2001. « Leukocyte Transendothelial Migration: Orchestrating the Underlying Molecular Machinery ». *Current Opinion in Cell Biology* 13, n° 5: 569-77.

- Yamakawa, Tanaka, Numaguchi, Yamakawa, Motley, Ichihara, et Inagami. 2000. « Involvement of Rho-Kinase in Angiotensin II-Induced Hypertrophy of Rat Vascular Smooth Muscle Cells ». *Hypertension* 35, n° 1: 313-18.
- Yang, Wu, Jiang, Mortensen, Austin, Manning, Woulfe, et Brass. 2002. « Signaling through Gi Family Members in Platelets. Redundancy and Specificity in the Regulation of Adenylyl Cyclase and Other Effectors ». *The Journal of Biological Chemistry* 277, n° 48: 46035-42.
- Yu, Cantor. 2012. « Megakaryopoiesis and Thrombopoiesis: An Update on Cytokines and Lineage Surface Markers ». *Methods in Molecular Biology* 788: 291-303
- Zeidan, Nordström, Albinsson, Malmqvist, Swärd, et Hellstrand. 2003. « Stretch-Induced Contractile Differentiation of Vascular Smooth Muscle: Sensitivity to Actin Polymerization Inhibitors ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 284, n° 6: 1387-96.
- Ziniel, Desai, Cass, Gatto, Oldfield, et Williams. 2013. « Characterization of Potential Drug Targets Farnesyl Diphosphate Synthase and Geranylgeranyl Diphosphate Synthase in *Schistosoma mansoni* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, n° 12: 5969-76.
- Zlamal, Bakchoul. 2018. « Acquired Immune Thrombocytopenia: An Update on Pathophysiology, Diagnosis and Management ». *Annals of Blood* 3, n° 0
- Zou, Teixeira, Kostadima, Astle, Radhakrishnan, Simon, Truman, et al. 2017. « SNP in Human ARHGEF3 Promoter Is Associated with DNase Hypersensitivity, Transcript Level and Platelet Function, and Arhgef3 KO Mice Have Increased Mean Platelet Volume ». *PloS One* 12, n° 5.
- Zou, Teixeira, Yin, Xiang, Xavier-Ferruccio, Zhang, Hwa, Min, et Krause. 2016. « Leukaemia-Associated Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (LARG) Plays an Agonist Specific Role in Platelet Function through RhoA Activation ». *Thrombosis and Haemostasis* 116, n° 3: 506-16.

Mots-clés : Arhgef1, thrombine, plaquettes, cellules musculaires lisses vasculaires

Une des propriétés majeures de la thrombine est le caractère pléiotropique de ses effets physiologiques et pathologiques à la fois dans le compartiment sanguin et tissulaire de la paroi. La voie de signalisation RhoA est activée par la fixation de la thrombine aux récepteurs PARs et cette voie est un régulateur principal de la mécanotransduction et de la plasticité cellulaire. Le facteur d'échange de RhoA, Arhgef1, est impliqué dans le développement de l'hypertension dépendante de l'angiotensine II et dans l'athérothrombose. **Notre hypothèse** est que le contrôle de la signalisation intracellulaire de RhoA par Arhgef1 est un élément régulateur de la coagulation plasmatique et pourrait participer aux modifications phénotypiques des plaquettes et des cellules vasculaires et ainsi contribuer à l'augmentation de la génération de thrombine tissulaire. **Les objectifs** ont été de caractériser la génération de thrombine et la fonction plaquettaire depuis leur activation jusqu'à leurs implications dans un modèle de thrombose tissulaire et d'étudier le rôle prothrombotique des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) chez des souris Arhgef1 $-/-$. **Résultats :** Les souris Arhgef1 $-/-$ ont une numération plaquettaire normale mais présentent une diminution significative de l'activation plaquettaire, de la génération de thrombine en sang total et en présence de plaquettes (mais pas en plasma pauvre en plaquettes) et de l'adhérence plaquettaire par rapport aux souris contrôles. Ces modifications se traduisent, *in vivo*, par un plus grand nombre d'arrêts transitoires de l'écoulement sanguin dans le modèle de saignement à la queue et un allongement du temps de survenue du thrombus occlusif carotidien en réponse au FeCl₃ chez les souris Arhgef1 $-/-$ comparées aux contrôles. Les CMLVs des souris Arhgef1 $-/-$ génèrent moins de thrombine à leur surface et ont une prolifération diminuée par rapport aux CMLVs des souris contrôles. **En conclusion**, les résultats démontrent le rôle d'Arhgef1 dans les fonctions plaquettaires et dans la régulation du phénotype des CMLVs. Le mécanisme principal fait intervenir la Rho GTPase dans l'adhésion plaquettaire et la génération de thrombine à la surface CMLVs qui contrôlent la formation du thrombus. Ces résultats suggèrent que ce facteur d'échange est capable d'amplifier la thrombose artérielle et pourrait être impliqué via les récepteurs à la thrombine dans le couplage thrombine tissulaire-rigidité cellulaire via les plaquettes et les CMLVs dans les pathologies vasculaires.

Keywords: Arhgef1, thrombin, platelets, vascular smooth muscle cells

One of the major properties of thrombin is the pleiotropic character of its physiological and pathological effects in both the blood and the tissue compartment of the vessel wall. The RhoA signaling pathway is activated by the binding of thrombin to the PARs receptors and this pathway is a major regulator of mechanotransduction and cellular plasticity. The RhoA exchange factor, Arhgef1, is involved in the development of angiotensin II-dependent hypertension and in atherothrombosis. **Our hypothesis** is that the control of intracellular RhoA signaling by Arhgef1 is a regulatory element of plasma coagulation and could participate in phenotypic modifications of platelets and vascular cells and thus contribute to the increase of tissue thrombin generation. **The objectives** were to characterize thrombin generation and platelet function from their activation to their implications in a model of tissue thrombosis, and to study the prothrombotic role of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in Arhgef1 $-/-$ mice. **Results:** Arhgef1 $-/-$ mice had a normal platelet count but showed a significant decrease in platelet activation, thrombin generation in whole blood and in the presence of platelets (but not in platelet poor plasma) and platelet adhesion compared to control mice. These modifications result, *in vivo*, by a greater number of transitory stopping of the blood flow in the tail bleeding model and an increase in the time of occurrence of the carotid occlusive thrombus in response to FeCl₃ in Arhgef1 $-/-$ mice compared to controls. The VSMCs of Arhgef1 $-/-$ mice generate less thrombin at their surface and have decreased proliferation compared to VSMCs of the control mice. **In conclusion**, the results demonstrate the role of Arhgef1 in platelet function and in the regulating of the phenotype of VSMCs. The main mechanism involves Rho GTPase in platelet adhesion and in thrombin generation at the VSMC surface that control thrombus formation. These results suggest that this exchange factor is able to amplify arterial thrombosis and could be involved via thrombin receptors in tissue thrombin-cell stiffness coupling via platelets and VSMCs in vascular pathologies.