



**HAL**  
open science

# Participation des plaquettes [à] l'hémostase inflammatoire et au microenvironnement tumoral

Soumaya Jadoui

► **To cite this version:**

Soumaya Jadoui. Participation des plaquettes [à] l'hémostase inflammatoire et au microenvironnement tumoral. Hématologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7249 . tel-03588731

**HAL Id: tel-03588731**

**<https://theses.hal.science/tel-03588731>**

Submitted on 25 Feb 2022

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

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

# Université de Paris

**Ecole doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (ED 561)**

***Laboratoire for Vascular Translational Science (LVTS)***

**INSERM UMRS 1148, Paris, France**

## **Participation des plaquettes a l'hémostase inflammatoire et au microenvironnement tumoral**

Par Soumaya JADOUI

Thèse de doctorat en Hématologie

Dirigée par Benoit Ho-Tin-Noé

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 25 Novembre 2020

Devant un jury composé de :

**Dr Cécile Denis**

**Dr Hind Hamzeh-Cognasse**

**Dr Mathias Canault**

**Pr Nathalie Kubis**

**Dr Eric Camerer**

**Dr Benoit Ho-Tin-Noé**

DR, Université Paris SUD Saclay

IGR, Université Jean Monnet

CR, Université de Aix Marseille

PU-PH, Université de Paris

DR, Université de Paris

CR, Université de Paris

**Présidente**

**Rapporteuse**

**Rapporteur**

**Examineuse**

**Examineur**

**Directeur de thèse**



# REMERCIEMENTS

# Table des matières

I.	Réactions Inflammatoires, immunité innée et plaquettes	11
A.	Les réactions inflammatoires	11
B.	Rôle des plaquettes dans les réactions inflammatoires	13
1.	Les plaquettes comme cellules immunitaires	15
2.	Plaquettes et régulation de la perméabilité endothéliale et de l'infiltration des leucocytes	23
a)	Plaquettes et régulation de la perméabilité endothéliale	23
b)	Plaquettes et régulation de l'infiltration leucocytaire	28
c)	Plaquettes et prévention des saignements inflammatoires	34
d)	Récepteurs plaquettaires à motif ITAM et prévention des saignements inflammatoires	37
II.	Microenvironnement tumoral et plaquettes	42
A.	Microenvironnement tumoral	42
1.	Cellules tumorales	44
2.	Fibroblastes	47
3.	Cellules immunitaires	48
4.	Cellules vasculaires	51
5.	La matrice extracellulaire	52
B.	Les plaquettes comme actrices possibles du microenvironnement tumoral	53
1.	Plaquettes et angiogenèse	54
2.	Plaquettes et lymphangiogenèse	57
3.	Plaquettes et maintien de l'intégrité vasculaire dans les tumeurs	58
4.	Plaquettes et métastases	60

OBJECTIFS DE LA THESE	64
RESULTATS EXPERIMENTAUX	65
ARTICLE 1	66
The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent	66
ARTICLE 2	78
Glenzocimab does not impact glycoprotein VI-dependent inflammatory hemostasis	78
ARTICLE 3	97
Contribution of the platelet (hemi)ITAM receptors GPVI and CLEC-2 to the regulation of the tumor vascular and inflammatory microenvironment	97
REVUE 1	121
Spontaneous bleeding in thrombocytopenia: Is it really spontaneous?	121
REVUE 2	131
The reversed passive Arthus reaction as a model for investigating the mechanisms of inflammation-associated hemostasis	131
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	149

# Tables des illustrations

FIGURE 1. LES ETAPES COMMUNES AUX REACTIONS INFLAMMATOIRES AIGUES.	13
FIGURE 2. L'IMMUNOTHROMBOSE.	14
FIGURE 3. LES PLAQUETTES ET LEUR STRUCTURE.	16
FIGURE 4. EVOLUTION DU SYSTEME HEMOSTATIQUE : DES INVERTEBRES AUX MAMMIFERES.	17
FIGURE 5. RECEPTEURS IMMUNITAIRES DES PLAQUETTES.	18
FIGURE 6. LES FACTEURS IMMUNOMODULATEURS STOCKES DANS LES GRANULES DE SECRETION PLAQUETTAIRES.	19
FIGURE 7. LES ROLES CLES DES PLAQUETTES DANS LA MODULATION DES PROCESSUS INFLAMMATOIRES ET IMMUNITAIRES.	20
FIGURE 8. LES PLAQUETTES CIRCULENT DANS LE SANG ET EXAMINENT LE SYSTEME VASCULAIRE POUR DETECTER LES MENACES HEMOSTATIQUES ET IMMUNITAIRES.	21
FIGURE 9. EXEMPLE DE LA CONTRIBUTION DES PLAQUETTES A LA REGULATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE.	22
FIGURE 10. LES PLAQUETTES PREVIENNENT LA FORMATION DE L'ŒDEME DANS LES ORGANES ISOLES PERFUSES.	24
FIGURE 11. PLAQUETTES ET REGULATION DE LA PERMEABILITE ENDOTHELIALE.	25
FIGURE 12. LES PLAQUETTES FAVORISENT LA FORMATION DE L'ŒDEME AU COURS DE L'INFLAMMATION.	26
FIGURE 13. LES PLAQUETTES FAVORISENT LA FORMATION DE L'ŒDEME PAR DIFFERENTS MECANISMES.	27
FIGURE 14. LES ETAPES DE L'EXTRAVASATION DES NEUTROPHILES.	29
FIGURE 15. ŒDEME DE PERMEABILITE ET DIAPÉDESE DES LEUCOCYTES SONT DISSOCIES SPATIALEMENT.	30
FIGURE 16. PERMEABILITE ENDOTHELIALE ET DIAPÉDESE DES LEUCOCYTES SONT DEUX PROCESSUS DISTINCTS.	31
FIGURE 17. REGULATION DE LA PERMEABILITE VASCULAIRE ET DU RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE PAR LES PLAQUETTES.	33
FIGURE 18. LA PREVENTION DES SAIGNEMENTS INFLAMMATOIRES PAR LES PLAQUETTES PEUT SURVENIR INDEPENDAMMENT DES RECEPTEURS COUPLES A LA PROTEINE G ET DE GPIIb/IIIa.	36
FIGURE 19. VUE D'ENSEMBLE DE DIFFERENTS MODELES EXPERIMENTAUX D'INFLAMMATION	37
FIGURE 20. LA GLYCOPROTEINE VI (GPVI).	39
FIGURE 21. LE RECEPTEUR CLEC-2.	41
FIGURE 22. LES COMPOSANTS DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.	43
FIGURE 23. ROLE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL DANS LE PROCESSUS DE TUMORIGENESE.	44
FIGURE 24. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES CELLULES TUMORALES.	45
FIGURE 25. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE DANS LES CELLULES NORMALES ET DE LA GLYCOLYSE AEROBIE (EFFET WARBURG) DANS LES CELLULES TUMORALES.	46
FIGURE 26. EXPRESSION DE LA PODOPLANINE DANS LES FIBROBLASTES ASSOCIES AU CANCER (CAFS).	48
FIGURE 27. FONCTIONS DES CELLULES IMMUNITAIRES AU COURS DU DEVELOPPEMENT D'UN CANCER ASSOCIE A UN ETAT INFLAMMATOIRE.	49

FIGURE 28. ACCUMULATION DE PLAQUETTES EN EXTRAVASCULAIRE DANS LES CANCERS CHEZ L'HOMME.	54
FIGURE 29. LES ETAPES CLES DE L'ANGIOGENESE TUMORALE.	55
FIGURE 30. FACTEURS PLAQUETTAIRE IMPORTANTS POUR L'ANGIOGENESE TUMORALE. [226]	56
FIGURE 31. LES PLAQUETTES REGULENT LA SEPARATION VASCULAIRE SANG-LYMPHATIQUE.	58
FIGURE 32. LES PLAQUETTES PREVIENNENT LES SAIGNEMENTS TUMORAUX CAUSES PAR LES CELLULES IMMUNITAIRES INFILTRANT LES TUMEURS.	60
FIGURE 33. AUGMENTATION DES SAIGNEMENTS TUMORAUX CHEZ LES SOURIS DEFICIENTES EN GPVI.	60
FIGURE 34. EFFETS PRO-METASTATIQUES DES PLAQUETTES.	62
FIGURE 35. RECEPTEURS PLAQUETTAIRES AYANT DES ROLES CONNUS DANS LES METASTASES	63
FIGURE 36. COMPARAISON DE L'EXPOSITION AU SANG CIRCULANT DE LIGANDS DE DIFFERENTS RECEPTEURS PLAQUETTAIRES AU COURS D'UNE INFLAMMATION PULMONAIRE AIGUË INDUITE PAR INHALATION D'ENDOTOXINE	142
FIGURE 37. LA THROMBOPENIE INDUIT DES SAIGNEMENTS DANS LES METASTASES PULMONAIRE MAIS PAS LA DEFICIENCE EN GPVI	147
FIGURE 38. IMPACT DU FAB ANTI-GPVI JAQ1 SUR LE COMPTE PLAQUETTAIRE.	148



# LISTE DES ABREVIATIONS

5-HT : Sérotonine

## **A**

ACT: Adoptive cell therapy

ADP: Adénosine diphosphate

Ang-1/2: Angiopietine 1/2

AVC: Accident vasculaire cerebral

## **B**

bFGF: Basic fibroblast growth factor

## **C**

CAFs: Cancer-associated fibroblast

CEACAM-1: Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule-1

CLEC-2: C-type lectine like type II transmembrane receptor

COX-2: cyclooxygénase 2

CRAMP: Cathelicidin-related Antimicrobial Peptide

CRP: Collagen-related peptide

CSF: Colony stimulating factor

## **D**

DAMP: Damage associated molecular pattern

## **E**

EGF: Endothelial growth factor

EMMPRIN: Extracellular matrix metalloproteinase inducer

## **F**

FT : Facteur tissulaire

## **G**

GPIb : Glycoprotéine Ib

GPVI : Glycoprotéine VI

hCAP-18 : human cathelicidin antimicrobial protein

## **I**

IL : Interleukine

IFN : Interférons de type I

Ip: Injection intrapéritonéale

ITAM: Immunoreceptor tyrosinebased activation motif

ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

## L

LCMV : Virus de la chorioméningite lymphocytaire

LILRB: Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B

LPA : Acide lysophosphatidique

LRR : Leucine-rich repeat proteins

## M

Mac-1 : Macrophage-1 antigen

MEC : Matrice extracellulaire

MET : Microenvironnement tumoral

MIP-1 $\alpha$ : Macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$

MIF: Macrophage migration inhibitory factor

## N

NAP-2: Neutrophil activating peptide 2

NO: Nitric oxide

## O

OCS: Open canalicular system

## P

PAF: Platelet-activating factor

PAR: Proteinase-activated receptors

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

PDGF: Platelet derived growth factor

PF4: Platelet factor 4

PMP: Platelet microparticule

PRR: Pattern recognition receptors

PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1

## R

RANTES: Regulated on activation normal T cell expressed and secreted

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines

## G

ROS: Reactive oxygen species

rPA: Réaction passive d'Arthus

## S

S1P: Sphingosine-1-phosphate

SDF-1 $\alpha$ : Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$

Siglecs: Sialic acid binding immunoglobulin type lectins

## T

TAM: Tumor associated macrophage

TCIPA: Tumor cell-induced platelet activation

TEC: Tumor endothelial cell

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$

TEM: Transition épithelio-  
mésenchymateuse

TLR: Toll-like receptors

TPO: Thrombopoïétine

TxA2: Thromboxane A2

## V

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFC: Vascular endothelial growth factor  
C

VEGFD: Vascular endothelial growth factor  
D

VEGFR2: Vascular endothelial growth  
factor receptor 2

VEGFR3: Vascular endothelial growth  
factor receptor 3

vWF: Von Willebrand factor

# INTRODUCTION

# I. Réactions Inflammatoires, immunité innée et plaquettes

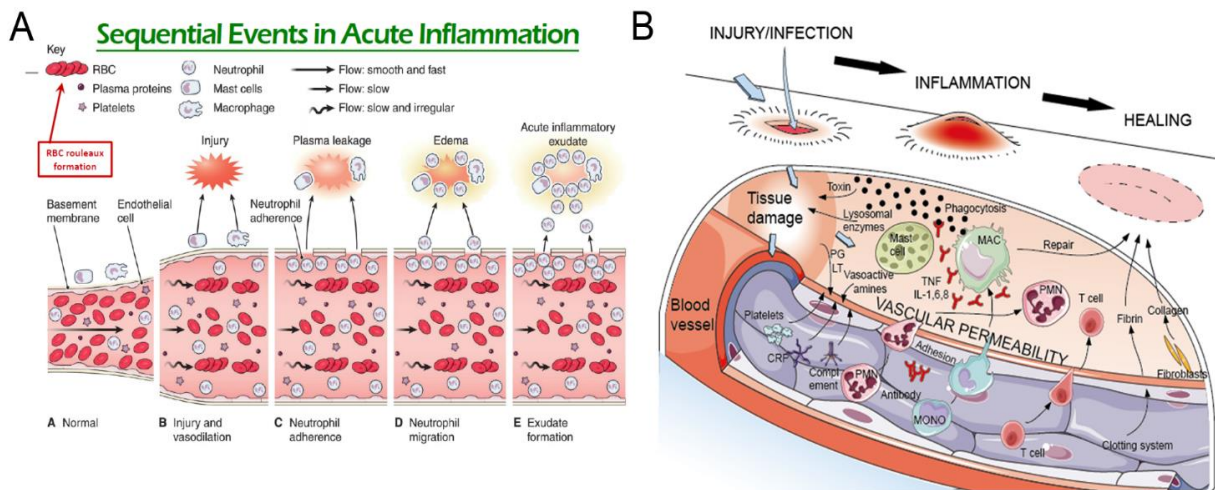
## A. Les réactions inflammatoires

La réaction inflammatoire est l'un des mécanismes de défense par laquelle l'organisme répond à une agression et à toutes substances lui étant étrangères. Ainsi, l'inflammation est un composant essentiel de l'immunité innée dont les causes sont nombreuses et variées. Les causes de réaction inflammatoire incluent notamment les substances étrangères inertes (corps étrangers), des agents physiques (températures, radiations) et chimiques (irritants, poisons), les lésions tissulaires post-traumatiques, les complexes immuns [1], ou encore les agents infectieux (virus, bactéries, parasites, champignons). La réaction inflammatoire se manifeste lorsque la barrière cutanéomuqueuse devient insuffisante pour protéger l'organisme de ces agressions. En tant que composante de l'immunité innée, la réaction inflammatoire est un processus nécessaire au maintien de l'intégrité de l'hôte mais cette réponse doit être limitée dans le temps et correctement régulée. Dans le cas contraire, la réaction aiguë peut devenir chronique et contribuer à des pathologies dites inflammatoires.

Bien que le terme inflammation ou réaction inflammatoire soit communément utilisé, il s'agit d'un terme générique qui englobe et décrit des réactions diverses. Nous faisons donc ici le choix de parler de « réactions inflammatoires » au pluriel. Ces réactions sont complexes, elles mobilisent plusieurs types cellulaires et de nombreux médiateurs dont la nature dépend à la fois de la cause de l'inflammation et de l'organe touché. Par exemple, des expériences chez la souris ont montré que le niveau d'implication du complément dans les réactions inflammatoires induites par complexes immuns était différent suivant que la réaction avait lieu dans la peau ou les poumons [2], [3]. De la même manière, il a été montré que la nature des cytokines inflammatoires produites par les kératinocytes (les principaux constituants cellulaires de l'épiderme) en réponse à une infection cutanée dépendait de l'agent pathogène impliqué et du Toll-like receptor (TLR) stimulé [4]. En effet, les kératinocytes expriment différents TLRs et les données de Lebre *et al.* [5] ont montré que l'activation du TLR-3 des kératinocytes par l'acide polyinosinique-polycytidylique (un analogue synthétique de l'ARN de certains virus) entraînait la production de Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), d'interleukine 8 (IL-8) et d'interférons de type I (IFN), alors que l'activation du

TLR-5 de ces mêmes cellules par la flagelline d'*Escherichia coli* induisait l'expression de S100A7c (psoriasine), un peptide antimicrobien [6].

Malgré leur diversité, les réactions inflammatoires partagent différentes étapes communes parmi lesquelles une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une activation des cellules endothéliales, un recrutement et une activation des leucocytes, ainsi qu'une étape dite de résolution conduisant à un retour aux conditions homéostatiques après l'élimination du stimulus à l'origine de la réaction (détersion) (**Figure 1**). La résolution de l'inflammation est suivie par une étape de réparation tissulaire pouvant aboutir soit à une régénération intégrale du tissu soit à la formation d'une cicatrice fibrotique. Lorsque la détersion est incomplète l'inflammation aiguë peut évoluer en une inflammation chronique. En plus des cellules résidentes tissulaires (ex : macrophages, mastocytes, fibroblastes), des cellules vasculaires et des leucocytes, les plaquettes sont maintenant également reconnues comme des actrices importantes de ces différentes étapes des réactions inflammatoires.

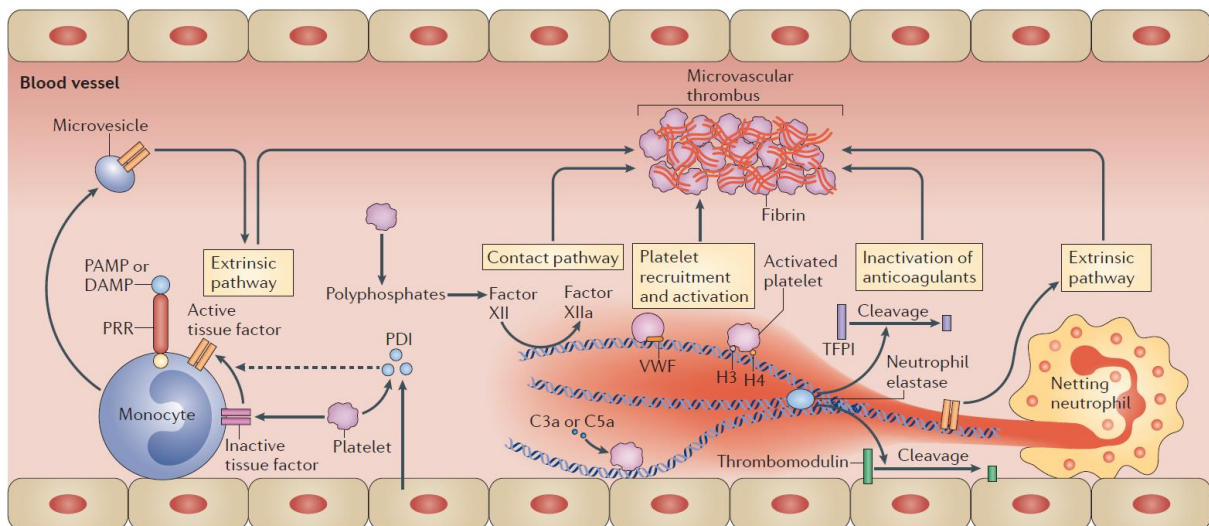


**Figure 1. Les étapes communes aux réactions inflammatoires aiguës. A. La vasodilatation en réponse à la production de différents médiateurs (NO, PGI<sub>2</sub>) par les cellules résidentes constitue une des premières étapes des réponses inflammatoires. La vasodilatation entraîne une augmentation locale du volume sanguin (et donc de la pression hydrostatique sur la paroi vasculaire) et un ralentissement de la vitesse du flux sanguin. Ces 2 événements favorisent la sortie de l'eau et des molécules plasmatiques vers les tissus et l'adhésion des leucocytes à l'endothélium activé. La vasodilatation s'accompagne par ailleurs d'une ouverture des jonctions endothéliales qui elle aussi favorise l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la formation de l'œdème (tumor). L'augmentation de la perméabilité vasculaire permet l'apport local de molécules de l'immunité (ex : protéines du complément et anticorps nécessaires aux phases effectrices des réponses immunitaires) et de l'hémostase (le réseau de fibrine permet notamment de délimiter le foyer inflammatoire). L'afflux de sang et de plasma chaud entraîne les symptômes de rougeur (rubor) et de chaleur (calor). La pression exercée par l'œdème sur les récepteurs nerveux et la libération de médiateurs chimiques sont responsables de la sensation douloureuse (dolor). La sortie des leucocytes est un processus organisé en plusieurs étapes : Tethering (en anglais) ou adhérence faible, Etape 2 : Rolling (roulement), Etape 3 : Margination (adhérence ferme), Etape 4 : Diapédèse ou extravasation. Chacune de ces étapes dépend des interactions entre différents couples ligand-récepteur. Le rolling par exemple est permis par l'adhérence faible entre les leucocytes et les cellules endothéliales et ce grâce à des molécules d'adhésion cellulaire ou CAM pour Cell Adhesion Molécule et des intégrines (LFA-1). La reconnaissance de signaux de danger via les PRR (Pattern recognition receptor) provoque une augmentation de l'expression de ces CAM. L'adhérence des leucocytes augmente d'autant plus que la vitesse du sang diminue (vasodilatation). B. Principaux acteurs cellulaires des réactions inflammatoires aiguës. Les mastocytes sécrètent des facteurs vasodilatateurs et des activateurs des cellules endothéliales permettant une augmentation de l'apport de sang, plasma et de cellules dans la zone lésée. Les neutrophiles sécrètent des facteurs dégradant les pathogènes. Les neutrophiles et les macrophages éliminent les pathogènes par phagocytose. Les macrophages sécrètent des cytokines qui attirent les cellules immunitaires et les cellules nécessaires à la réparation tissulaire au site enflammé. La réponse inflammatoire se poursuit jusqu'à ce que tous les corps étrangers soient éliminés et que la plaie soit réparée [7].**

## B. Rôle des plaquettes dans les réactions inflammatoires

À bien des égards, la participation des plaquettes aux réactions inflammatoires n'est pas surprenante. Les plaquettes sont principalement connues pour leur fonction première qui est d'orchestrer l'hémostase en cas de blessure vasculaire. Cependant, il existe des liens importants entre la thrombose, souvent considérée comme le versant pathologique de l'hémostase (bien qu'hémostase et thrombose reposent sur des mécanismes différents), et les réactions inflammatoires [8]. Au cours des 20 dernières années, différents termes ont ainsi émergé pour désigner ces interactions et leurs conséquences physiopathologiques : thromboinflammation [9], immuno-thrombose [10], ou encore immuno-hémostase [11]. Malgré des différences subtiles, tous ces termes visent à traduire le fait que les réactions inflammatoires et les réponses immunitaires

peuvent déclencher des thromboses dont les acteurs peuvent en retour amplifier l'inflammation (**Figure 2**). Les thromboses associées aux réactions inflammatoires et immunitaires peuvent être initiées par différents mécanismes non-exclusifs tels qu'une activation directe des plaquettes par des composants bactériens ou viraux via des récepteurs spécifiques [12], une activation indirecte via les leucocytes comme les neutrophiles et les monocytes capables d'activer la coagulation et les plaquettes [13], ou encore la génération de microparticules pro-coagulantes [14], [15].



**Figure 2. L'immuno-thrombose.** Les interactions entre la thrombose et l'inflammation impliquent plusieurs voies et se produisent dans diverses situations physiopathologiques telles que la septicémie, la coagulation intravasculaire disséminée (DIC), les accidents vasculaires cérébraux, les cancers, la polyarthrite rhumatoïde, entre autres. La thromboinflammation est provoquée par des interactions mutuelles et une activation réciproque entre les cellules endothéliales, le sous-endothélium, les leucocytes, les plaquettes et le système immunitaire inné humoral, impliquant le complément, la coagulation et les cascades de signalisation fibrinolytique. Il a été montré que parmi les mécanismes de base de l'immuno-thrombose, figure la capacité des leucocytes de répondre aux motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) ou aux motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP). Par exemple, les monocytes ainsi stimulés expriment directement, ou via l'émission de microvésicules, du facteur tissulaire (FT) activé aux sites d'exposition aux agents pathogènes, ce qui initie la voie extrinsèque de coagulation. Les pièges extracellulaires des neutrophiles (« neutrophil extracellular traps », NETs) sont des réseaux composés d'ADN et d'histones, et ils soutiennent l'immuno-thrombose à travers plusieurs voies : 1) les NETs peuvent activer directement le facteur XII (FXII, voie contact de la coagulation), probablement en raison de leur surface chargée négativement, 2) les NETs se lient au facteur von Willebrand (VWF) et soutiennent le recrutement des plaquettes, 3) les histones H3 et H4, présents dans les NETs, peuvent déclencher l'activation des plaquettes, 4) les NETs concentrent localement des enzymes, telles que l'élastase des neutrophiles et la myéloperoxydase, qui clivent et oxydent respectivement les anticoagulants, y compris l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et la thrombomoduline et 5) les NETs peuvent se lier au FT et favoriser l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. Les plaquettes ont un rôle de soutien important dans l'immuno-thrombose. Ce rôle comprend l'activation de la voie contact dépendante du FXII de la coagulation par les polyphosphates dérivés des plaquettes. De plus, la protéine disulfure isomérase (PDI) dérivée des plaquettes et des cellules endothéliales participe à la génération de fibrine, vraisemblablement via l'activation du FT (flèche en pointillés), bien que la base moléculaire exacte du rôle du PDI dans la formation de thrombus reste controversée. Le système du complément (en particulier les composants du complément activé C3a et C5a) est également impliqué dans l'immuno-thrombose, par exemple en déclenchant l'activation des plaquettes. PRR : récepteur de reconnaissance de formes [10].

L'activation des plaquettes et les thromboses associées aux réactions inflammatoires peuvent contribuer aux complications des maladies à composante inflammatoire, comme par



exemple, le sepsis [16], les accidents vasculaires cérébraux ischémiques [17] ou les cancers [18]. Ces thromboses peuvent également participer aux phases effectrices de l'immunité, en promouvant par exemple la capture et l'élimination des agents infectieux [15], [19]. Des études chez la souris ont en effet montré que les thrombi se formant consécutivement à différentes infections ou en cas de sepsis avaient la capacité de capturer et d'immobiliser les bactéries circulantes. Cette propriété des thrombi formés dans ces conditions reposerait notamment sur leur contenu important en « neutrophil extracellular traps » (NETs). Ces observations ont mené à l'hypothèse que les phénomènes de thromboses associées aux infections participeraient à la limitation de la dissémination bactérienne et à la clairance bactérienne [13], [20]. Cependant, différentes études ont montré par la suite que l'inhibition de ces phénomènes thrombotiques par inhibition de l'activation plaquettaire et/ou des neutrophiles n'affectait pas la clairance bactérienne mais permettait de prévenir les défaillances d'organes secondaires aux lésions ischémiques provoquées par ces thromboses microvasculaires [21]. Ces résultats récents suggèrent donc un rôle essentiellement délétère des thromboses associées aux infections (pour revue sur les mécanismes et les conséquences de la thromboinflammation voir [22], [23]).

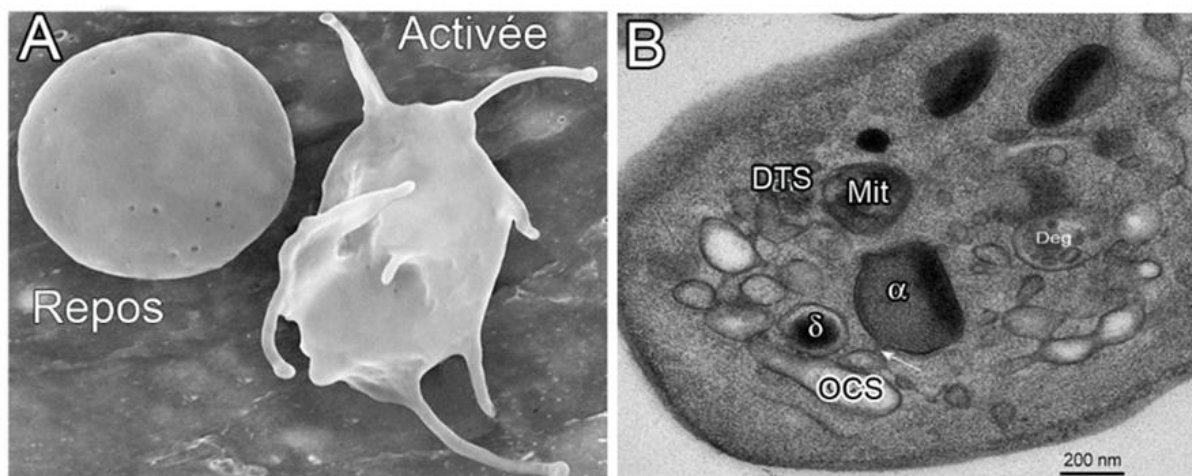
Comme évoqué plus-haut, l'implication des plaquettes au cours des réactions inflammatoires ne se limite pas aux complications thrombotiques de ces réactions et comprend également une participation importante à l'initiation et à la régulation des différentes étapes essentielles à un déroulement harmonieux et optimal de la réponse immunitaire innée. De plus, d'un point de vue mécanistique, les fonctions régulatrices exercées dès les 1<sup>ères</sup> étapes des réactions inflammatoires par les plaquettes reposent en partie sur des mécanismes indépendants de l'agrégation plaquettaire et des voies canoniques de l'hémostase primaire et des thromboses.

Après une brève présentation des plaquettes et de leurs caractéristiques de cellules immunitaires, les chapitres suivants seront consacrés à la description de la régulation par les plaquettes de la perméabilité vasculaire, de l'infiltration leucocytaire et de l'hémostase au cours des réactions inflammatoires aiguës.

## 1. Les plaquettes comme cellules immunitaires

Les plaquettes sont les plus petites cellules de la circulation sanguine avec un diamètre de 2 à 3  $\mu\text{m}$  au repos (**Figure 3**). Ce sont des cellules anucléées produites par la fragmentation des

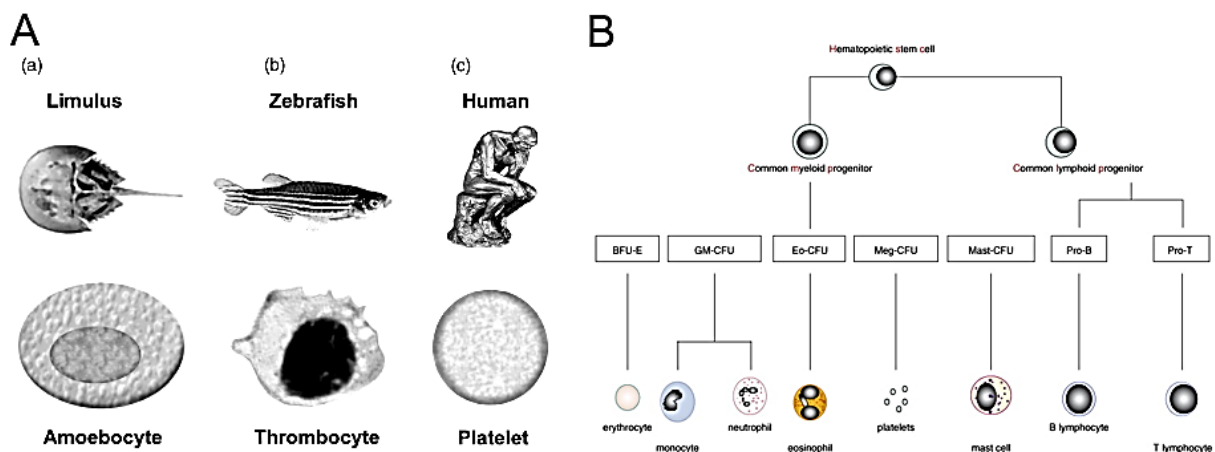
extrusions de mégacaryocytes dans le système vasculaire, formées principalement dans la moelle des os plats (os pelviens, sternum, scapula) chez l'homme adulte, et également dans les os longs chez l'enfant. Chez d'autres mammifères, dont la souris, la « pulpe rouge » de la rate contient également des mégacaryocytes [24], [25]. Différentes études chez l'homme et la souris ont par ailleurs montré la présence de mégacaryocytes dans les poumons, indiquant qu'il s'agirait également d'un site de production des plaquettes [26], [27]. Ayant une durée de vie de 7 à 10 jours chez l'homme en bonne santé et de 5 jours chez la souris [28], on estime qu'environ 100 milliards de plaquettes sont produites chaque jour chez l'homme, contre 2 milliards par jour chez la souris [29]. A la fin de leur cycle de vie, les plaquettes sont éliminées par les macrophages du système réticulo-endothélial dans la rate et le foie. Chez la souris (jusqu'à 1 600 000 plaquettes/ $\mu\text{L}$  sang), la numération plaquettaire est plus élevée que chez l'Homme (100 000-400 000 plaquettes/ $\mu\text{L}$  sang).



**Figure 3. Les plaquettes et leur structure.** **A.** Aspect des plaquettes en microscopie électronique à balayage. Au repos, les plaquettes sont de forme discoïde avec une taille de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre. Une fois activées, les plaquettes deviennent sphériques et émettent des pseudopodes. Image adaptée de « Activated and non-activated platelets, SEM - Stock Image - C036/9861 » s. d.). **B.** Observation des plaquettes au microscope électronique à transmission. Cette image permet d'identifier trois parties : la membrane plasmique, le cytosquelette et les organites intracellulaires parmi lesquels les granules alpha ( $\alpha$ ), les granules denses ( $\delta$ ), les mitochondries (Mit) et des lysosomes. La membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique riche en phospholipides et contient de nombreux récepteurs transmembranaires tels que des glycoprotéines (dont des intégrines) et des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Le feuillet externe de la membrane plasmique présente des invaginations ouvertes sur l'extérieur formant le système caniculaire ouvert (OCS). L'OCS offre une voie de communication entre l'intérieur et l'extérieur de la plaquette et permet l'entrée d'éléments externes par endocytose et la libération du contenu des granules par exocytose après activation. L'OCS représente également un réservoir de glycoprotéines et de membrane plasmique utilisé par les plaquettes pour la formation de filopodes et leur étalement lors de leur activation. Dans le cytoplasme, on retrouve un réseau membranaire clos appelé système tubulaire dense (DTS, reliquat du réticulum endoplasmique des mégacaryocytes) qui constitue une réserve intracellulaire de calcium pouvant être mobilisée lors de l'activation plaquettaire [30]. La formation de cette réserve intracellulaire de calcium est notamment rendue possible par la présence de pompes calciques (SERCA2b et SERCA 3) au sein de la membrane phospholipidique du STD [31].

Différenciés à partir de cellules souches hématopoïétiques et de progénitures myéloïdes, les mégacaryocytes et les plaquettes partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules

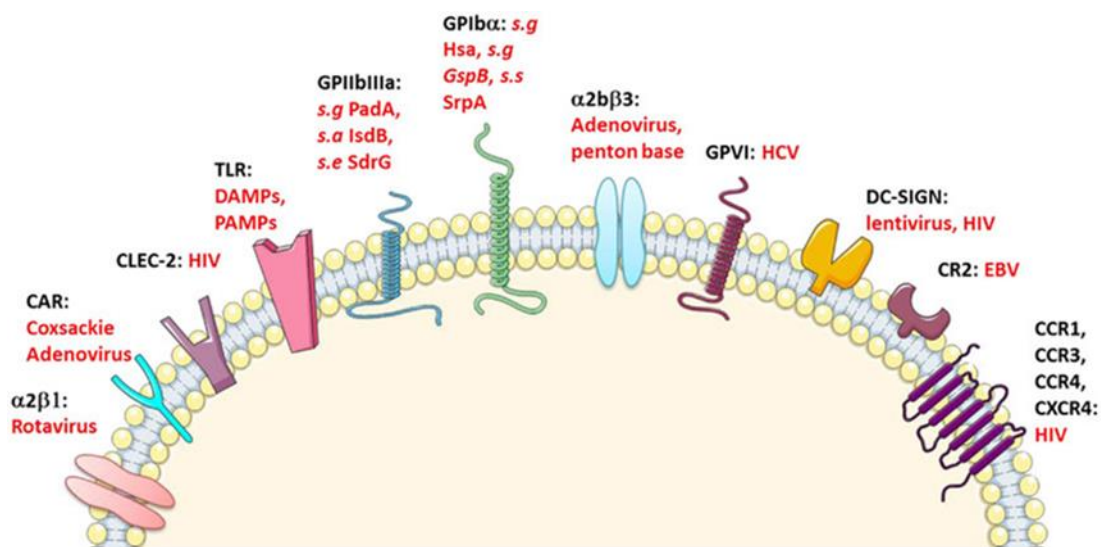
immunitaires également issues de cette lignée (**Figure 4B**). Cette origine commune des cellules immunitaires et des plaquettes nous rappelle que leur ancêtre évolutif, l'hémocyte, orchestre chez certains invertébrés une réponse immunitaire basée sur la coagulation rapide de l'hémolymphe afin de piéger les agents pathogènes et de limiter leur dissémination [32], [33] (**Figure 4A**). Bien que cette réponse basique précoce ait évolué pour devenir plus spécialisée, créant des rôles distincts d'hémostase, d'inflammation et d'immunité, de nombreux chevauchements fonctionnels demeurent donc entre ces différentes fonctions.



**Figure 4. Evolution du système hémostatique : des invertébrés aux mammifères.** A. De l'hémocyte (l'amoebocyte est un sous-type d'hémocyte) chez les arthropodes (a) assurant les fonctions hémostatiques et immunitaires au thrombocyte nucléé chez les poissons (b) et à la plaquette anucléée chez l'Homme (c) qui possèdent essentiellement un rôle hémostatique et conservent un rôle dans l'immunité innée [34]. B. Représentation schématique de l'hématopoïèse montrant l'origine commune des plaquettes et des leucocytes chez les mammifères [35].

Parmi les principales caractéristiques de cellules immunitaires des plaquettes figurent l'expression d'un panel de récepteurs de reconnaissance de formes (pattern recognition receptors ou PRRs, dont les TLRs et les « sialic acid binding immunoglobulin type lectins » (Siglecs)), l'expression de récepteurs au complément et aux chimiokines, la capacité à phagocyter des antigènes exogènes et à interagir avec d'autres cellules immunitaires, ou encore à libérer des chimiokines, des cytokines et des protéines microbicides lors de leur activation. Par ailleurs, en plus de récepteurs PRRs, il a été montré que plusieurs des récepteurs d'adhésion des plaquettes étaient capables d'interagir directement avec des virus et/ou bactéries (**Figure 5**). Il est également intéressant de noter que les plaquettes possèdent trois récepteurs de la famille des immunorécepteurs à motif d'activation basé sur la tyrosine (ITAM) [36], le récepteur à faible affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines G (FcγRIIA), exprimé par les plaquettes humaines (mais pas de souris) [37], la glycoprotéine VI (GPVI) [38], [39] et CLEC-2 (C-type lectin-

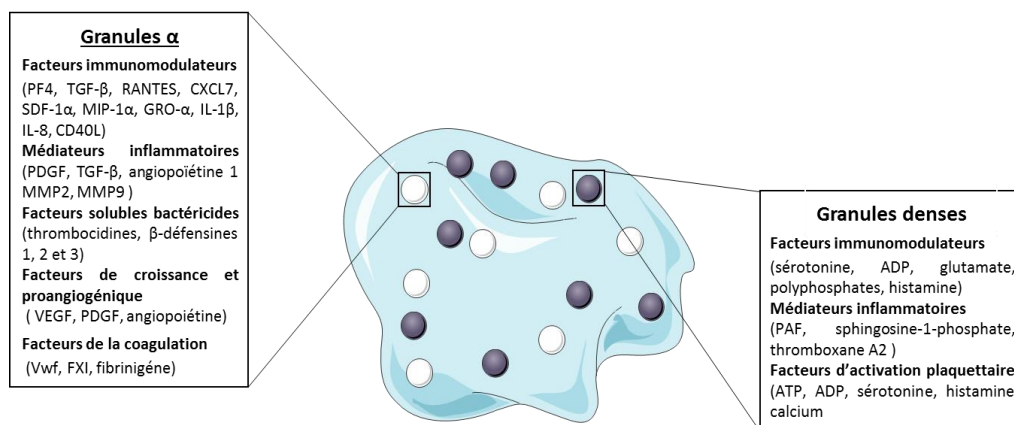
like type II transmembrane receptor) [40] que nous détaillerons plus loin. Les plaquettes possèdent également des immunorécepteurs à motif d'inhibition basé sur la tyrosine (ITIM), tels que le CD31 (ou PECAM-1 pour « Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 ») [41] ou leurs récepteurs Siglecs [42], [43]. Enfin, de la même manière que plusieurs des récepteurs d'adhésion et d'activation des plaquettes peuvent lier des pathogènes, plusieurs de ces récepteurs, comme GPVI, CLEC-2 ou encore la glycoprotéine Ib (GPIb, principal récepteur plaquettaire au facteur von Willebrand (vWF)), possèdent des contre-récepteurs leucocytaires (« Extracellular matrix Metalloproteinase inducer » EMMPRIN, podoplanine, ou « macrophage-1 antigen » MAC-1) et viennent donc s'ajouter à la liste des récepteurs plaquettaires tels que la P-sélectine ou le CD40L permettant des interactions plaquettes-cellules immunitaires.



**Figure 5. Récepteurs immunitaires des plaquettes.** Les plaquettes expriment à leur surface de nombreux récepteurs pouvant interagir soit avec des agents pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les champignons soit avec les effecteurs et/ou les cellules du système immunitaire. Ces récepteurs peuvent être impliqués dans l'hémostase et/ou être des récepteurs spécifiques de l'immunité et classiquement exprimés par les leucocytes. Parmi ces récepteurs, on retrouve les toll like receptors (TLRs) qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP, Pathogene-Associated Molecular Pattern) [44] et des récepteurs spécifiques du complément comme CR2 qui lie à la fraction C3d [45] ou encore C1qRp qui lie la fraction C1 du complément qui peut aussi être reconnue par l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  [46]. Les ITAMs plaquettaires GPVI et CLEC-2 peuvent également interagir avec des pathogènes permettant ainsi leur internalisation [47] et possèdent des contre-récepteurs sur les cellules immunitaires (ex : EMMPRIN exprimé par les monocytes pour la GPVI [48] et la podoplanine exprimée par les macrophages inflammatoires pour CLEC-2 [49]). CR-2, complement receptor type 2; CCR-1, CCR-3, and CCR-4, C-C chemokine receptor type 1, 3, and 4; CXCR-4, C-X-C chemokine receptor type 4; DC-SIGN, dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin; CAR, coxsackie adenovirus receptor; s.a, *Staphylococcus aureus*; s.g, *Streptococcus gordonii*; s.s, *Streptococcus sanguinis*; s.e, *Staphylococcus epidermidis* [42].

En plus de posséder des récepteurs à fonctions immunitaires, les plaquettes peuvent également sécréter des facteurs immunomodulateurs majoritairement contenus dans leurs granules (**Figure 6**). Parmi ces facteurs, on trouve de nombreuses chimiokines et cytokines comme lesquelles le « platelet factor 4 » (PF4 ou CXCL4) [50], « Regulated on activation normal T cell

expressed and secreted » (RANTES ou CCL5) [51], « neutrophil activating peptide 2 » (NAP-2 ou CXCL7) [50], Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$  ou CXCL12) [52], Macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$  ou CCL3) [53], l'interleukine 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et l'IL-8 (ou CXCL8) [54]. Lors des réactions inflammatoires, d'autres médiateurs solubles plaquettaires interviennent dans la réparation tissulaire. On retrouve dans les granules alpha des plaquettes des facteurs de croissance tel que le Platelet-derived growth factor (PDGF), le Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ou le Vascular endothelial growth factor (VEGF) et de l'angiopoïétine 1 (Ang-1). Dans les granules denses, on retrouve des facteurs capables de moduler la réaction inflammatoire tels que la sérotonine, l'adénosine diphosphate (ADP) ou l'histamine [55]. Les plaquettes expriment également un autre facteur important dans les réactions inflammatoires : le CD40L. Ce facteur est impliqué dans les synapses immunologiques impliquant les lymphocytes B et 95% du CD40L soluble présent dans le plasma serait d'origine plaquettaire [56].

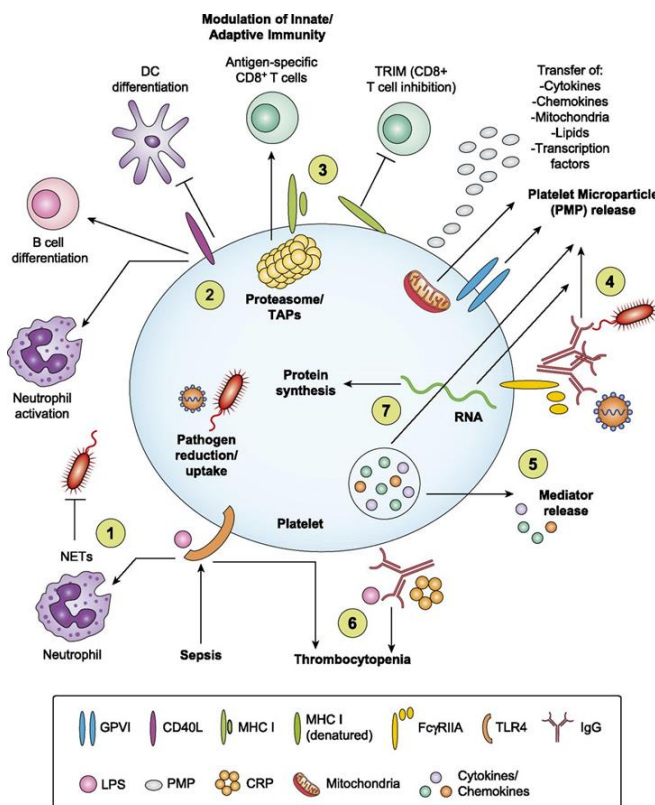


**Figure 6. Les facteurs immunomodulateurs stockés dans les granules de sécrétion plaquettaires.** Les plaquettes peuvent sécréter des facteurs immunomodulateurs majoritairement contenus dans leurs granules. Parmi ces facteurs, on trouve des cytokines et chimiokines tels que le facteur plaquettaire 4 (PF4), le (TGF- $\beta$ ), RANTES (Regulated on activation normal T cell expressed and secreted ou CCL5), la  $\beta$ -thromboglobuline (ou CXCL7), SDF-1 $\alpha$  (Stromal cell derived factor 1 $\alpha$  ou CXCL12), MIP-1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$  ou CCL3), GRO- $\alpha$  (Growth related oncogene  $\alpha$  ou CXCL1), l'interleukine-1 $\beta$  et l'interleukine-8 (ou CXCL8) [54], [57], [58]. Le CD40L, impliqué dans les synapses immunologiques avec les lymphocytes B, est également présent dans les granules  $\alpha$  qui contiennent en plus des bactéricides (thrombocidines) et les  $\beta$ -défensines 1, 2 et 3 [10], [59]. Dans les granules alpha, on trouve également d'autres médiateurs solubles qui interviennent lors des réactions inflammatoires : les facteurs de croissance PDGF et VEGF, l'angiopoïétine 1 [60], [61], les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 [62]. Les granules denses contiennent principalement les facteurs activateurs des plaquettes tels que des nucléotides (ATP, ADP), des catécholamines (sérotonine, histamine) et du calcium. La sérotonine [63], le glutamate, les polyphosphates, l'ADP ou encore l'histamine [64] sont capables de moduler les réactions inflammatoires [65]. Le PAF (Platelet-activating factor) [66], le thromboxane A2 et la sphingosine-1-phosphate [67], [68] sont aussi des médiateurs inflammatoires présents dans les plaquettes.

L'activation des plaquettes par des agonistes physiologiques tels que le collagène ou la thrombine mais également par des facteurs immunitaires tels que les lipopolysaccharides, les

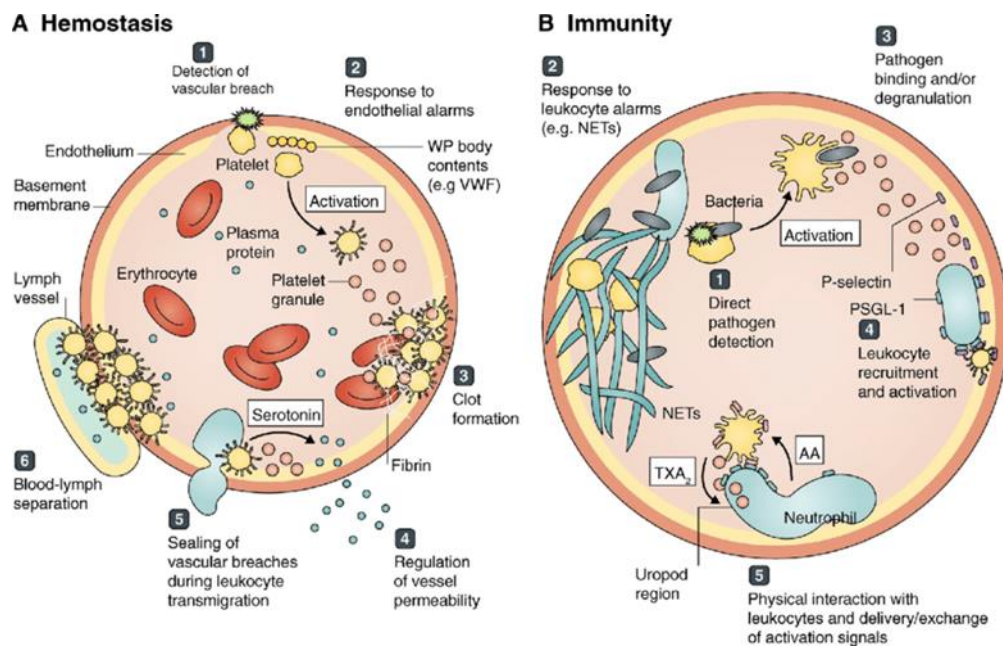
complexes immuns et les virus déclenche également la libération de microparticules. Ces microparticules plaquettaires dont le contenu est très hétérogène, peuvent elles-aussi contenir ou exprimer à leur surface des médiateurs immunitaires. Ainsi, de manière similaire aux plaquettes, les microparticules participeraient activement aux réponses immunitaires.

L'expression par les plaquettes de nombreux immunomodulateurs et récepteurs immunitaires indiquent donc un rôle clé des plaquettes dans la régulation de la phase effectrice des processus inflammatoires et immunitaires (**Figure 7**).



**Figure 7. Les rôles clés des plaquettes dans la modulation des processus inflammatoires et immunitaires.** (1) Les plaquettes peuvent assimiler des agents infectieux et stimuler l'activation des neutrophiles et la production de NETs antimicrobiens. (2) L'expression de CD40L par les plaquettes leur permet d'interagir avec différentes cellules du système immunitaire et de les activer et/ou de les inhiber. (3) Les molécules de classe I du CMH sont localisées en intracellulaire, lors de l'activation plaquettaire, elles sont exprimées à la surface des plaquettes et peuvent activer les lymphocytes T CD8+. En revanche, les molécules du CMH de classe I à la surface des plaquettes au repos sont dénaturées et entraînent une inhibition des lymphocytes T CD8+. (4) Les plaquettes libèrent des microparticules plaquettaires (PMP) en condition de stress et ces PMP peuvent transporter différentes molécules vers d'autres cellules et sites inflammatoires. (5) Les plaquettes contiennent de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qu'elles libèrent dans l'espace extracellulaire en cas d'activation. (6) Les interactions immunitaires avec les plaquettes peuvent conduire à des thrombocytopies sévères, comme dans le cas de la septicémie, où les pathogènes peuvent se lier aux plaquettes et provoquer leur agrégation, séquestration et/ou destruction. (7) Les plaquettes contiennent plusieurs types d'ARN qui peuvent être exportées par des PMP et peuvent alors être traduits en protéines [69].

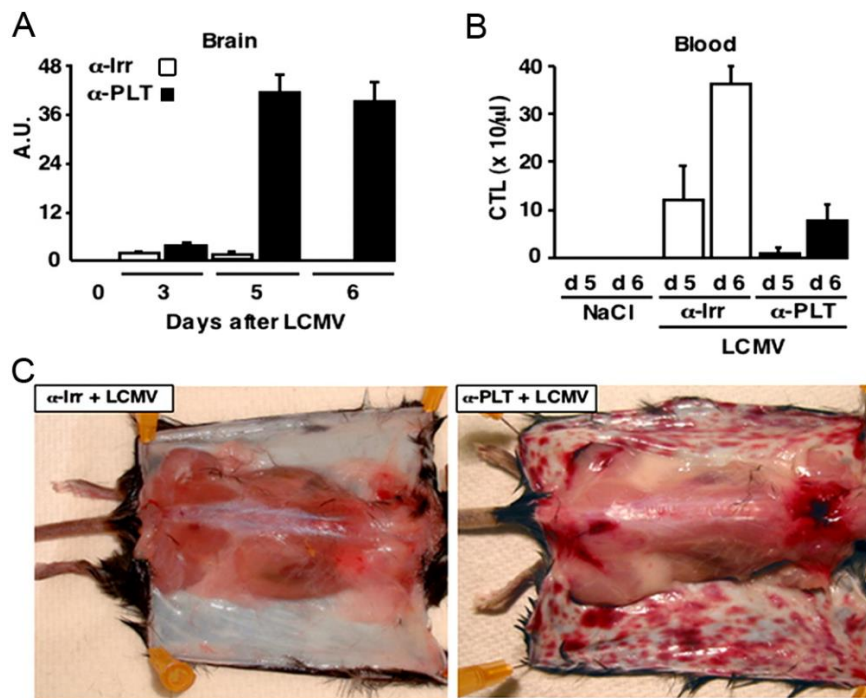
En raison des nombreuses caractéristiques immunitaires des plaquettes, il a été proposé que les plaquettes seraient de puissants patrouilleurs scannant constamment l'endothélium vasculaire et les leucocytes circulants de manière « touch and go » afin de faciliter la détection et la destruction des agents pathogènes, d'alerter les cellules immunitaires et d'amplifier l'inflammation [70], [71] (**Figure 8**).



**Figure 8. Les plaquettes circulent dans le sang et examinent le système vasculaire pour détecter les menaces hémostatiques et immunitaires.** (A) Les plaquettes détectent les brèches vasculaires en utilisant une variété de récepteurs, tels que ceux qui se lient au collagène (1). Elles réagissent à des signaux de danger tels que l'ADP ou le contenu des corps de Weibel-Palade (WP), libérés par des cellules endothéliales endommagées ou activées (2). Lors de l'activation, les plaquettes peuvent initier la formation d'un clou plaquettaire (3) tout en régulant la perméabilité des vaisseaux (4). Elles agissent également en tant que gardiennes, empêchant physiquement la perte d'érythrocytes pendant la transmigration leucocytaire (5), et également à la jonction lympho-veineuse au repos ou pendant la lymphangiogenèse (6). (B) Les plaquettes peuvent reconnaître les menaces immunitaires directement en utilisant des récepteurs de modèle conservés de manière évolutive (1) ou indirectement via des signaux leucocytaires, tels que des Neutrophil extracellular traps (NET) ou des cytokines (2). Les plaquettes peuvent se lier autour des pathogènes, déclenchant une dégranulation provoquant la destruction du pathogène (3) et le recrutement direct / indirect des leucocytes (4). De plus, les plaquettes interagissent souvent physiquement avec les leucocytes pour délivrer ou échanger des signaux qui entraînent une inflammation, par exemple en absorbant l'acide arachidonique (AA) des neutrophiles pour synthétiser le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). [72]

L'importance de la contribution des plaquettes à la régulation des réponses immunitaires a été démontrée à l'aide de différents modèles expérimentaux chez la souris en appui de données cliniques. Par exemple, il a été montré la présence de microparticules plaquettaires à activité pro-inflammatoire dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde auto-immune [73], [74]. En effet, ces microparticules plaquettaires riches en IL-1 mises au contact de fibroblastes synoviaux étaient capables de stimuler la production d'IL-8 et de cytokine pro-inflammatoire par ces cellules [73]. Dans la même étude, il était montré que la déplétion des plaquettes ou le déficit génétique en GPVI permettait de réduire significativement la sévérité de l'inflammation articulaire dans un modèle d'arthrite rhumatoïde chez la souris. Une autre étude chez la souris a montré que les plaquettes pouvaient jouer un rôle clé dans la réponse antivirale. Dans cette étude utilisant un modèle d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), il a été montré qu'en absence de plaquettes, les souris infectées par le LCMV développaient une anémie hémorragique et ne parvenaient pas à produire une réponse

lymphocytaire anti-LCMV efficace (**Figure 9**) [75]. Dans ce modèle, l'absence de plaquettes conduisait en effet à une moindre mobilisation des lymphocytes T cytotoxiques responsables de l'élimination du virus. De la même manière, l'absence de plaquettes entraîne une diminution de l'infiltration intrahépatique des lymphocytes T cytotoxiques dans un modèle d'hépatite virale [75]. Ces études ne sont que des exemples des nombreuses situations inflammatoires dans lesquelles a été démontré un rôle majeur des plaquettes dans la régulation de la réponse immunitaire.



**Figure 9. Exemple de la contribution des plaquettes à la régulation de la réponse immunitaire adaptative.** La participation des plaquettes à la réponse immunitaire anti-Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) a été démontrée en comparant la clairance virale (A) et la mobilisation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (B) post-infection entre des souris contrôles ( $\alpha$ -Irr) et des souris rendues sévèrement thrombopéniques par immunodéplétion des plaquettes ( $\alpha$ -PLT). A. Titre infectieux mesuré dans le cerveau de souris contrôles ou thrombopéniques infectées au LCMV. B. Quantification des lymphocytes T cytotoxiques dans le sang de souris contrôles ou thrombopéniques après 5 et 6 jours suivant l'infection par le LCMV. C. Photographies de peau de souris contrôles et thrombopéniques 6 jours après infection par le LCMV. On peut constater qu'en absence de plaquettes, l'infection par le LCMV conduit à d'importants saignements, soulignant l'importance des plaquettes dans la prévention des saignements au cours de cette infection virale. [75].



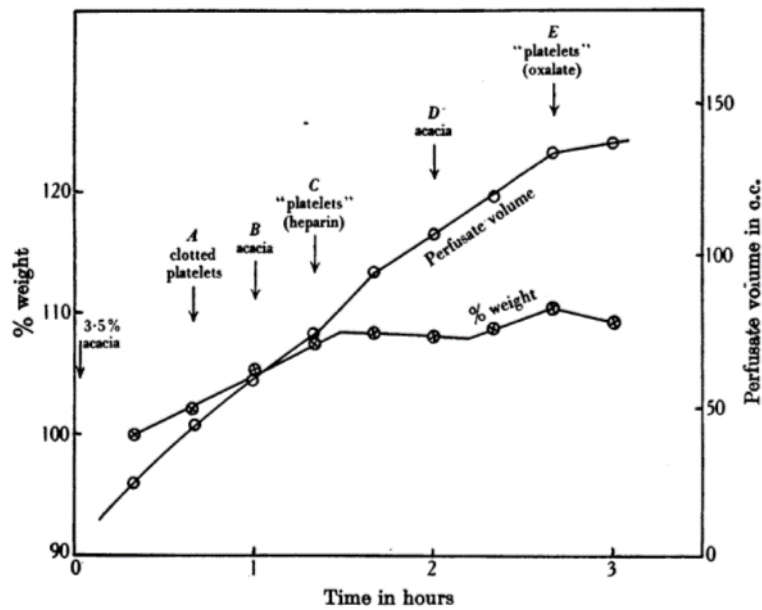
## 2. Plaquettes et régulation de la perméabilité endothéliale et de l'infiltration des leucocytes

En plus d'être des actrices importantes des phases effectrices et de réparation des réactions inflammatoires et immunitaires adaptatives, les plaquettes interviennent également dès les stades les plus précoces de ces réactions, lors de la phase vasculaire et de recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation.

### *a) Plaquettes et régulation de la perméabilité endothéliale*

Les plaquettes ont longtemps été suspectées de jouer un rôle dans la régulation de la perméabilité endothéliale. Alors que des études anciennes ont suggéré un rôle des plaquettes dans le maintien de la fonction de barrière semi-perméable de l'endothélium quiescent [76], des études plus récentes ont montré que les plaquettes favorisaient l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la formation de l'œdème au cours de l'inflammation [77].

En 1940, James Frederic Danielli publie un article sur la perméabilité capillaire et la formation de l'œdème dans un modèle de perfusion de fluide dans la patte de grenouille. Dans cette étude, Danielli compare la réponse capillaire à différentes solutions de perfusion. Ses résultats montrent que l'ajout de plaquettes à une solution physiologique (solution de Ringer) permet de diminuer drastiquement la formation de l'œdème durant la perfusion (**Figure 10**), effet qu'il attribue à une action mécanique des plaquettes qui boucheraient les pores au sein des capillaires [78]. Il note que la capacité des plaquettes à prévenir l'œdème est 100 fois supérieure à celles des globules rouges.

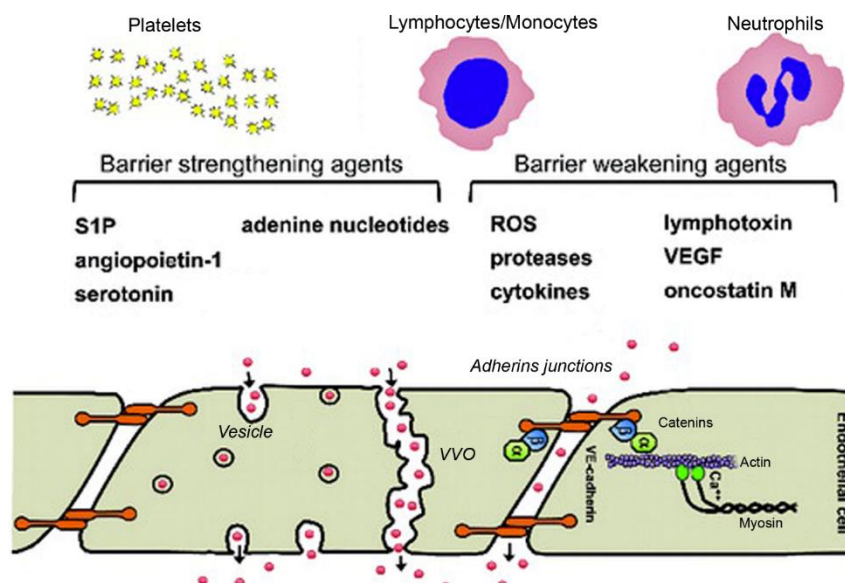


**Figure 10. Les plaquettes préviennent la formation de l'œdème dans les organes isolés perfusés.** Impact de l'ajout de plaquettes agrégées (A) ou au repos (B) à une solution de perfusion contenant 3.5 % de gomme d'acacia sur la formation de l'œdème lors de la perfusion d'une patte de grenouille. % weight : l'augmentation du poids de la patte en fonction du volume perfusé (perfusate volume) au cours du temps traduit la formation de l'œdème [78].

La capacité des plaquettes à prévenir la formation de l'œdème dans les organes perfusés a par la suite été confirmée dans différentes études [79], [80]. Par exemple, en 1969, Gimbrone *et al.* montre que par rapport à une perfusion de plasma pauvre en plaquettes, la perfusion de plasma riche en plaquettes (PRP) permet de limiter la formation de l'œdème et des lésions endothéliales dans des lobes thyroïdiens de chien isolés [73]. Il est conclu de ces différentes études que les plaquettes exerceraient une action protectrice et nutritive vis-à-vis de l'endothélium, action potentiellement intéressante dans le but de préserver des organes isolés en vue de transplantations. Cependant, le concept d'une action bénéfique de perfusions à base de plaquettes a depuis été remis en question en raison du rôle délétère joué par les plaquettes lors des lésions d'ischémie-reperfusion [82]–[84].

Des observations faites chez des animaux et des patients thrombopéniques ont également suggéré une action nutritive des plaquettes en faveur de la fonction de barrière semi-perméable de l'endothélium. Il a été montré une plus grande perméabilité vasculaire pulmonaire aux protéines plasmatiques en réponse à une augmentation de la pression de l'oreillette gauche chez des moutons rendus thrombopéniques par rapport à des moutons contrôles ou à des moutons thrombopéniques ayant été transfusés avec du PRP [85]. En 1975, Kitchens et Weiss montrent par microscopie électronique que des lapins rendus thrombopéniques présentent des anomalies endothéliales par rapport à des lapins ayant un compte plaquettaire normal [86]. Les

principales anomalies constatées correspondent à un amincissement marqué des cellules endothéliales et à l'apparition de fenestrations dans les microvaisseaux. Kitchens et Pendergast font ensuite des observations similaires chez des patients thrombopéniques à partir de biopsies cutanées ou musculaires [87]. Il est à noter néanmoins que plusieurs autres études n'ont pas constaté d'anomalies ultrastructurelles endothéliales associées à la thrombopénie [63], [88]. Différentes études *in vitro* ont analysé la capacité des plaquettes à promouvoir la fonction de barrière semi-perméable de l'endothélium. Ces études basées sur l'ajout de plaquettes et/ou de surnageant de plaquettes à des cellules endothéliales en cultures [85] ont mis en évidence l'action de différents facteurs plaquettaires dont la sphingosine-1-phosphate (S1P) [68] et l'acide lysophosphatidique (LPA) [89], l'angiopoïétine-1 [61], [90], la sérotonine [91], ou les nucléotides à adénosine [92] (**Figure 11**). La contribution de ces différents facteurs au maintien de la fonction de barrière de l'endothélium quiescent par les plaquettes *in vivo* reste à ce jour à démontrer.



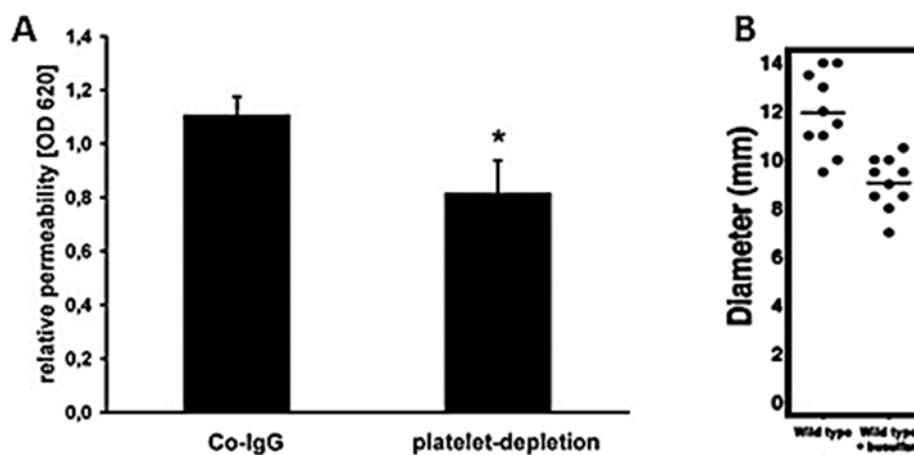
**Figure 11. Plaquettes et régulation de la perméabilité endothéliale.** La barrière endothéliale est composée de cellules endothéliales jointes latéralement par une structure jonctionnelle paracellulaire qui régule la répartition de l'eau et des solutés entre le sang et l'interstitium. Les solutés et l'eau peuvent également traverser la barrière endothéliale via une voie transcellulaire notamment par le processus de transcytose. Différents médiateurs libérés par les plaquettes agissent sur les cellules endothéliales pour renforcer cette barrière semi-perméable en agissant sur les jonctions paracellulaires, via des modifications des protéines jonctionnelles (VE-cadhérines,  $\beta$ -caténine,  $\alpha$ -caténine) et/ou du cytosquelette (caveoline-1) des cellules endothéliales. Adapté de [93].

D'un point de vue clinique, la perte d'intégrité et de fonction de la barrière endothéliale supposément associée à un compte plaquettaire bas a depuis longtemps été considérée comme étant à l'origine des saignements dits « spontanés » (ex : épistaxis, pétéchie) pouvant survenir

chez les patients thrombopéniques [94], [95]. Pourtant, de nombreuses études expérimentales et observations cliniques ont montré que le seul compte plaquettaire ne pouvait expliquer la survenue de saignements.

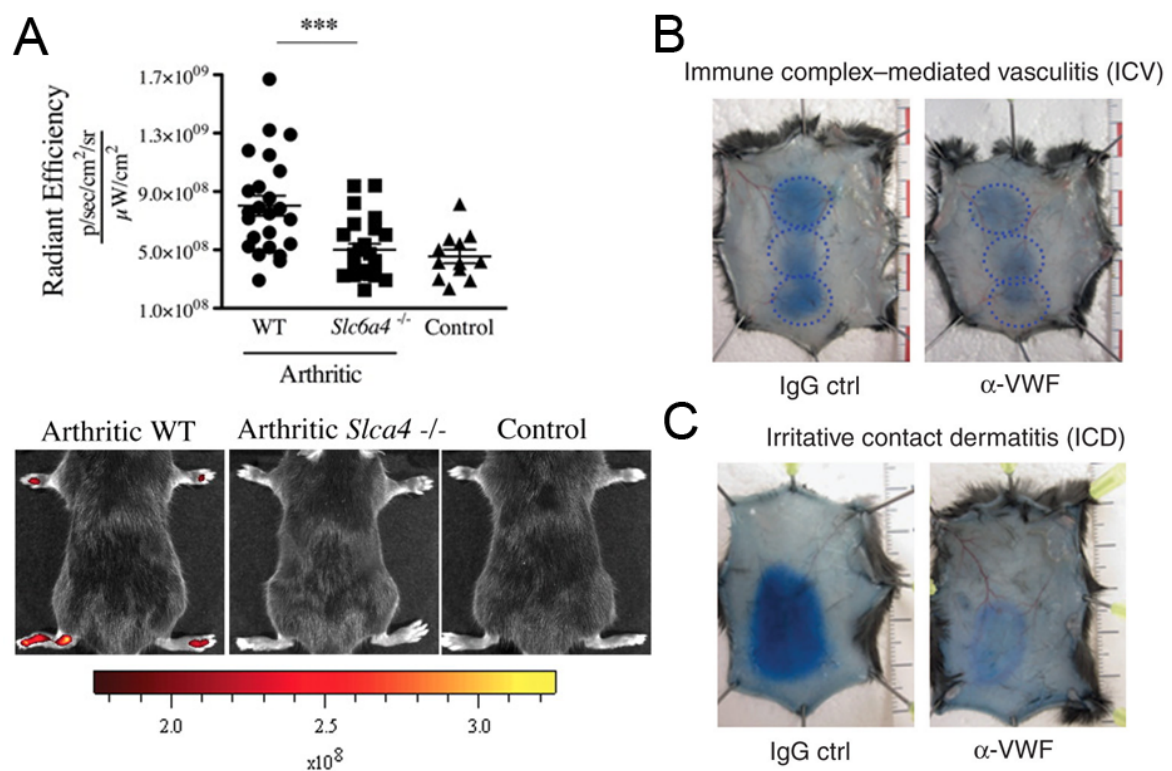
Ces données relativisant l'importance de la fonction de support des plaquettes vis-à-vis de l'endothélium quiescent sont discutées en détail dans une revue à laquelle j'ai participé en tant que 1<sup>ère</sup> auteure et qui est présentée page 131 dans la section « Articles et Résultats Expérimentaux » de ce manuscrit.

Au contraire de leur effet en faveur de la fonction de barrière semi-perméable de l'endothélium quiescent, de nombreuses études indiquent que les plaquettes stimuleraient l'ouverture des jonctions endothéliales au cours des réactions inflammatoires. Il a en effet été montré dans différents modèles d'inflammation une diminution de la formation de l'œdème de perméabilité en cas de thrombopénie. Par exemple, l'immunodéplétion des plaquettes inhibe l'efflux de bleu Evans des veinules mésentériques dans un modèle de péritonite induite par injection intrapéritonéale (ip) de thioglycolate chez la souris [96]. De la même manière, la thrombocytopénie conduit à une réduction de l'œdème et de l'infiltration des neutrophiles, des éosinophiles et des mastocytes dans un modèle d'inflammation cutanée induite par formation de complexes immuns [97], [98] (**Figure 12**).



**Figure 12. Les plaquettes favorisent la formation de l'œdème au cours de l'inflammation.** A. Comparaison de l'extravasation de bleu Evans dans la cavité péritonéale 1h après injection intrapéritonéale de thioglycolate à des souris contrôles (Co-Ig) ou à des souris rendues thrombocytopéniques (platelet-depletion) [96]. B. Effet de la déplétion plaquettaire (induite par du busulfan) sur la formation de l'œdème et le recrutement leucocytaire au cours de la réaction cutanée passive d'Arthus chez la souris. L'œdème a été évalué après 4 heures de réaction par mesure du diamètre de la tâche de Bleu Evans formée au site réactionnel [97].

Les mécanismes à l'origine de la capacité des plaquettes à promouvoir l'œdème et la perméabilité endothéliale dans les organes inflammés sont variés et impliqueraient à la fois les récepteurs d'adhésion des plaquettes et le contenu soluble granulaire des plaquettes [99]. La nature des récepteurs d'adhésion et des facteurs granulaires responsables de cette fonction dépendrait de la situation inflammatoire considérée. En effet, alors que dans un modèle d'arthrite rhumatoïde la GPVI et la sérotonine ont été décrites comme étant essentielles à l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans les articulations inflammés [77] (**Figure 13**), la GPIb et le vWF seraient responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans le modèle de péritonite induite par injection ip de thioglycolate [96]. Le vWF, avec la P-sélectine, serait également impliqué dans la formation de l'œdème au cours de la réaction passive d'Arthus inversée cutanée [97], [100] ainsi que dans un modèle de dermatite de contact induite par application d'un irritant (huile de croton) [100] (Figure 13).



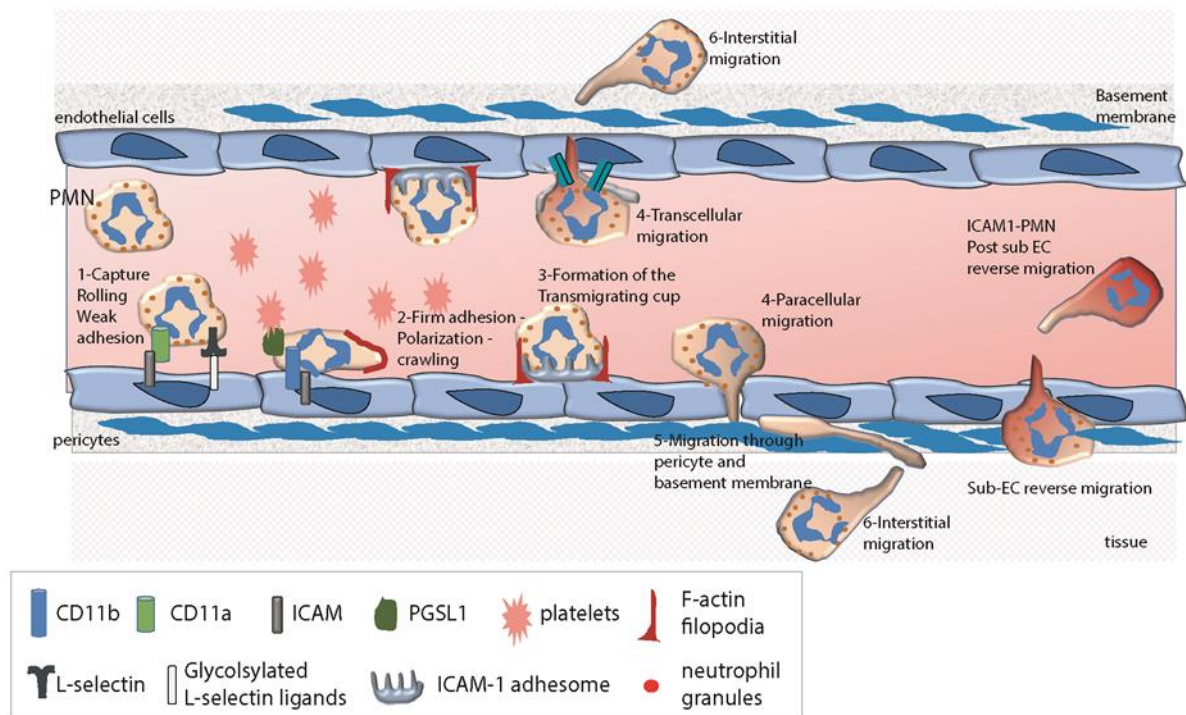
**Figure 13. Les plaquettes favorisent la formation de l'œdème par différents mécanismes.** **A.** Comparaison de l'augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau des articulations de la patte entre des souris sauvages (WT) et des souris ayant un déficit en sérotonine plaquettaire (souris *Slc6a4*<sup>-/-</sup>) soumises à un modèle d'arthrite rhumatoïde [77]. **B-C.** Comparaison de l'augmentation de la perméabilité vasculaire au bleu Evans au niveau de la peau inflammée entre des souris sauvages traitées par un anticorps contrôle non-relevant (IgG ctrl) et des souris traitées par un anticorps anti-vWF ( $\alpha$ -vWF) soumises à un modèle de dermatite induite soit par des complexes immuns (**B**) soit par un agent irritant (**C**) [100]

Alors que les plaquettes contiennent des facteurs limitant la perméabilité endothéliale (ex : S1P, angiotensine-1), elles contiennent également différents facteurs favorisant la perméabilité endothéliale tels que le VEGF ou l'histamine qui contribueraient à augmenter la perméabilité endothéliale en conditions inflammatoires [101]. Comment l'action des plaquettes vis-à-vis des cellules endothéliales est orientée vers un effet pro- ou anti-perméabilité reste à ce jour inconnu. Cette dichotomie observée par une même cellule, pouvant exercer l'un ou l'autre de ces effets reste à déterminer. Cependant, il est intéressant de noter que cette dichotomie d'effet décrite à l'échelle de la plaquette entière se retrouve même à l'échelle d'un médiateur plaquettaire donné. En effet, selon les études, la sérotonine a été décrite comme pouvant soit favoriser [77], [102] soit réduire la perméabilité endothéliale [103], [104]. Qu'un même médiateur plaquettaire puisse exercer des effets opposés suggère que l'un des facteurs qui pourrait déterminer l'effet des plaquettes sur la perméabilité endothéliale soit le phénotype de la cellule endothéliale (quiescente ou activée).

#### *b) Plaquettes et régulation de l'infiltration leucocytaire*

L'extravasation et l'infiltration des leucocytes, et plus particulièrement des neutrophiles, dans les tissus sont des étapes nécessaires à une réponse immunitaire efficace. En réponse à un stimulus pro-inflammatoire (histamine, facteur d'activation plaquettaire (PAF)) libéré par les cellules immunitaires résidentes (mastocytes, macrophages, cellules dendritiques) suite à la reconnaissance de signaux de dangers (« Pathogen associated molecular pattern » PAMP et (« Damage associated molecular pattern » DAMP) dont certains peuvent être directement détectés par l'endothélium, les cellules endothéliales s'activent localement ce qui induit une élévation du calcium cytoplasmique et le déclenchement de diverses voies de signalisation [105]. Ces voies intracellulaires aboutissent à une vasodilatation par la production d'oxyde nitrique et de prostacycline, à une augmentation de la perméabilité endothéliale par une ouverture des jonctions serrées et adhérentes, et à une exocytose des corps de Weibel-Palade qui contiennent de nombreuses molécules d'adhésion comme la P-sélectine et le vWF qui permettent la capture et l'adhésion des leucocytes notamment via des interactions P-sélectine/PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) et vWF/PSGL-1 [106] (**Figure 14**). Cette première association de faible affinité entre les leucocytes et les cellules endothéliales permet le changement de conformation des intégrines vers une forme de haute affinité pour leurs ligands. Les intégrines dans leur conformation active permettent alors l'adhésion stable et l'étalement des leucocytes qui rampent

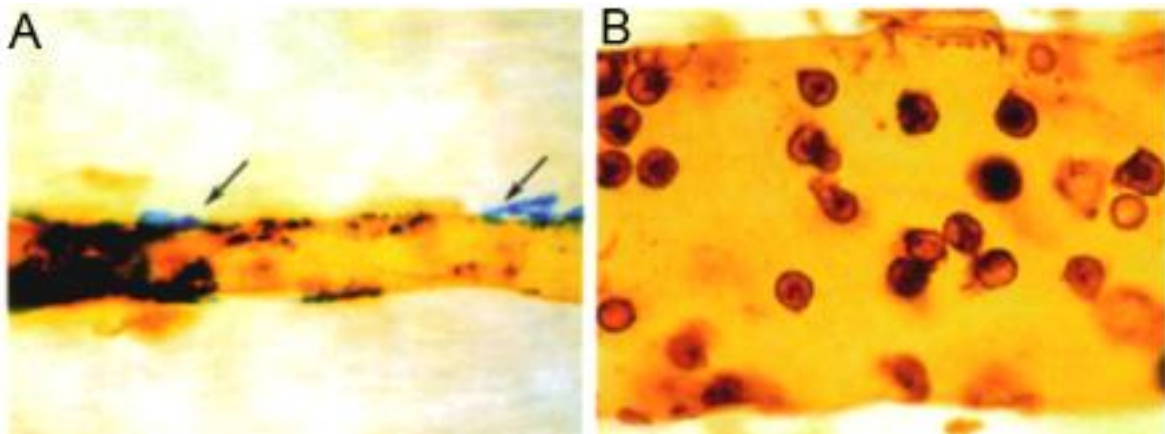
alors à la surface de l'endothélium et migrent vers des sites de transmigration où le sous-endothélium est plus permissif [107]–[109]. L'adhésion dépendante des intégrines  $\beta 2$  permet aux leucocytes de s'extravaser et de s'infiltrer dans les tissus lésés : c'est la diapédèse [106], [110] qui peut avoir lieu de façon paracellulaire ou transcellulaire.



**Figure 14. Les étapes de l'extravasation des neutrophiles.** L'extravasation des leucocytes est contrôlée par des interactions adhésives séquentielles entre les leucocytes et les cellules endothéliales (CE). Ce schéma décrit les différentes étapes de l'extravasation des leucocytes et certaines des molécules adhésives impliquées à chaque étape. En réponse à un stimulus inflammatoire, l'activation des CE permet le recrutement des neutrophiles à l'endothélium. Leur extravasation implique une séquence d'adhésion instable via la liaison de CD11a/CD18 (intégrine  $\alpha L\beta 2$ ) et ICAM-1/2 et de roulement le long de l'endothélium, suivie d'une adhésion stable via la liaison de CD11b/CD18 (MAC-1) et ICAM-1/2, et d'un arrêt sur l'endothélium. Par la suite, les neutrophiles subissent une migration latérale ou rampent sur les CE pour trouver un site permissif pour la transmigration. Lorsqu'ils rampent sur les CE, les neutrophiles se lient à la P-sélectine des plaquettes activées via leurs uropodes possédant des microdomaines riches en PSGL-1. Au cours de cette étape, la formation de l'adhésome ICAM-1 et des filopodes riches en F-actine émergeant des CE est déterminante pour la diapédèse. La diapédèse peut se produire au niveau des sites jonctions des CE (migration paracellulaire) ou à travers les CE (migration transcellulaire). Une fois qu'ils ont traversé la membrane basale périvasculaire, les neutrophiles migrent dans le tissu interstitiel. Ils peuvent également revenir à la circulation sanguine via un processus de migration inverse. PMN, neutrophile polymorphonucléaire.[107]

La diapédèse des leucocytes ne doit pas être confondue avec la perméabilité vasculaire à l'eau et aux autres molécules plasmatiques. Plusieurs études ont en effet démontré que ces deux phénomènes caractéristiques des réactions inflammatoires étaient découplés et contrôlés indépendamment [111]. Plusieurs études ont montré que l'augmentation de la perméabilité vasculaire était spatialement dissociée de l'extravasation des neutrophiles. Par exemple, dans un

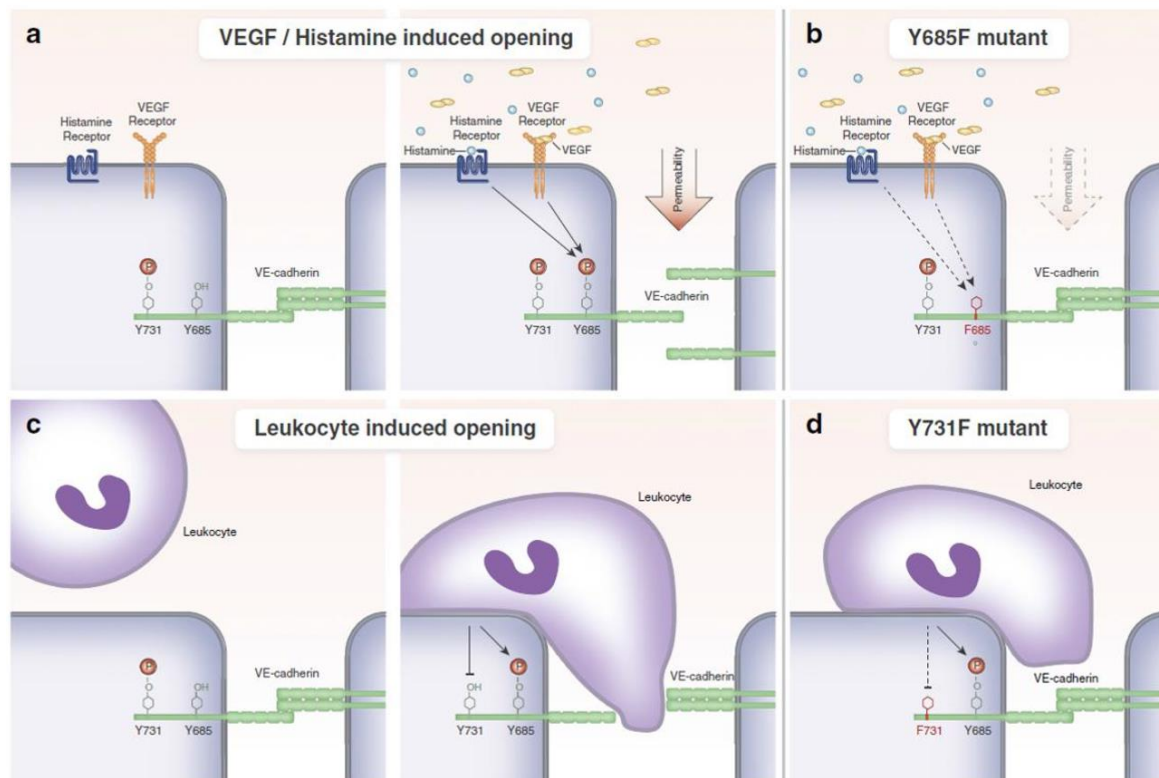
modèle d'inflammation des voies aériennes chez le rat, Baluk *et al.* ont montré que l'augmentation de la perméabilité vasculaire avait pour origine les veinules post-capillaires, alors que la margination et l'extravasation des leucocytes étaient observées principalement aux niveaux des veinules collectrices (**Figure 15**) [112]. Ces résultats étaient en accord avec les études plus anciennes de Hurley montrant également une dissociation spatiale et temporelle entre émigration des leucocytes et augmentation de la perméabilité vasculaire [113], [114]. De plus, il a également été montré dans différents modèles d'inflammation aiguë (ex : péritonite, inflammation de la plèvre) que la déplétion des neutrophiles n'impactait pas l'augmentation de la perméabilité vasculaire [96], [115].



**Figure 15. Œdème de perméabilité et diapédèse des leucocytes sont dissociés spatialement.** Images montrant la localisation des fuites extravasculaires de bleu Monastral injecté par voie intraveineuse et le recrutement des leucocytes dans un modèle d'inflammation de la trachée chez le rat Wistar. **A.** 4 heures après avoir initié une réaction allergique déclenchée par inhalation d'ovalbumine chez des rats préalablement immunisés contre l'ovalbumine, on peut observer des fuites de bleu Monastral (indiquées par des flèches) au niveau des veinules post-capillaires de la trachée. On note qu'aucun leucocyte n'est présent dans ce vaisseau. **B.** Au même moment, la margination et l'extravasation des leucocytes ne sont visibles qu'au niveau des veinules collectrices qui ne présentent cependant pas de fuites de bleu Monastral. [112].

Les bases mécanistiques du découplage entre augmentation de la perméabilité vasculaire et diapédèse ont été mises en évidence dans une étude récente montrant que ces 2 paramètres étaient régulés différemment via la phosphorylation de résidus tyrosine distincts de la VE-cadhérine (**Figure 16**) [116].





**Figure 16. Perméabilité endothéliale et diapédèse des leucocytes sont deux processus distincts.** La VE-cadhérine est impliquée à la fois dans le contrôle de la perméabilité endothéliale et dans la diapédèse des leucocytes mais selon des régulations différentes : l'augmentation de la perméabilité vasculaire est contrôlée par la phosphorylation du résidu tyrosine Y685 tandis que la diapédèse des leucocytes dépend de la déphosphorylation du résidu tyrosine Y731. In vivo, à l'état basal, la VE-cadhérine est phosphorylée sur son résidu Y731, mais pas sur Y685. Les facteurs solubles tels que le VEGF ou l'histamine augmentant la perméabilité endothéliale induisent la phosphorylation de Y685 (a). L'utilisation de souris portant la mutation Y685F sur la VE-cadhérine démontre que seul le résidu Y685 est requis pour induire une augmentation de la perméabilité endothéliale (b). Les leucocytes induisent une déphosphorylation rapide de Y731 par la phosphatase SHP-2, entraînant l'endocytose de la VE-cadhérine (c). L'utilisation de souris portant la mutation Y731F sur la VE-cadhérine confirme que Y731 et non Y685 permet la diapédèse des leucocytes (d) [116], [117].

Les neutrophiles constituent le sous-groupe de leucocytes prédominant recruté dans les tissus lors de la phase inflammatoire initiale des réponses immunitaires innées. Leur principale fonction consiste à combattre et à éliminer les agents pathogènes envahissants. Comme mentionné plus-haut, les réactions inflammatoires sont hétérogènes et les mécanismes d'infiltration des neutrophiles peuvent varier du schéma général présenté plus-haut, en particulier selon l'organe et/ou le stimulus (**Figure 14**). Concernant le rôle des plaquettes dans le recrutement et l'extravasation des leucocytes, de nombreuses études expérimentales dans différents modèles d'inflammation ont montré que, comme pour la formation de l'œdème, l'induction d'une thrombocytopenie ou un défaut fonctionnel des plaquettes s'accompagne d'une réduction significative du recrutement et de l'infiltration des leucocytes, en particulier des

neutrophiles [99]. La capacité des plaquettes à promouvoir l'infiltration des neutrophiles repose sur 3 mécanismes distincts et non-exclusifs :

1) l'interaction entre la P-sélectine des plaquettes activées et son ligand PSGL-1 exprimé par les leucocytes circulants stimule la sécrétion des corps de Weibel-Palade, favorisant ainsi le roulement des neutrophiles [118], [119].

2) la sécrétion de différentes cytokines chimiotactiques par les plaquettes activées (ex : PF4 [120], macrophage migration inhibitory factor (MIF) [121], RANTES (CCL5) [122], [123])

3) les plaquettes activées liées aux leucocytes les font bénéficier de leurs propriétés adhésives augmentant ainsi leurs possibilités d'interactions avec l'endothélium activé et le sous-endothélium [124].

Comme pour la régulation de la perméabilité vasculaire, la régulation du recrutement des leucocytes par les plaquettes fait donc intervenir à la fois les molécules d'adhésion plaquettaires et les facteurs solubles sécrétés par les plaquettes activées (**Figure 17**).

	<b>Inflammatory model</b>	<b>Receptors and/or soluble factors involved</b>	<b>References</b>
Vascular permeability	Arthritis	<u>GPVI</u> /Serotonin	Cloutier et al. (10)
	Peritonitis	<u>GPIIb</u> /vWF	Petri et al. (2)
	Leukocytoclastic vasculitis	<u>P-selectin</u> /PSGL-1	Hara et al. (3)
	Chronic cutaneous hypersensitivity	<u>ND</u>	Tamagawa-Mineoka et al. (4)
Leukocyte recruitment	Acute lung inflammation	<u>P-selectin</u>	Hidalgo et al. (7), Zarbock et al. (5)
	Glomerulonephritis	<u>P-selectin</u> /PSGL-1	Kuligowski et al. (17)
		<u>P-selectin</u>	Devi et al. (19)
	Atherosclerosis	<u>GPVI</u> /EMMPRIN	Schulz et al. (22)
		<u>CD40L</u> and MCP-1	Lievens et al. (23)
		<u>GPIIb</u> , <u>GPIIb/IIIa</u>	Massberg et al. (12)
		<u>P-selectin</u>	Huo et al. (24)
	Cerebral I/R	<u>GPIIb/IIIa</u>	Massberg et al. (15)
		<u>CD40/CD40L/sCD40L</u>	Ishikawa et al. (14)
	Intestinal I/R	<u>P-selectin</u>	Ishikawa et al. (14)
	Abdominal sepsis	<u>Serotonin</u>	Duerschmied et al. (25)
		<u>ND</u> /Mac-1	Asaduzzaman et al. (6)
	Peritonitis	<u>GPIIb</u> /vWF	Petri et al. (2)
		<u>Serotonin</u>	Duerschmied et al. (25)
	Experimental colitis	<u>CD40L</u>	Vowinkel et al. (20)
		<u>P-selectin</u> /PSGL-1	Vowinkel et al. (20)
Aseptic wound	<u>Serotonin</u>	Duerschmied et al. (25)	
Acute Lung inflammation	<u>Serotonin</u> , <u>TXA<sub>2</sub></u> , <u>P-selectin</u>	Duerschmied et al. (25), Hidalgo et al. (7), Zarbock et al. (5)	
Leukocytoclastic vasculitis	<u>P-selectin</u> /PSGL-1	Hara et al. (3)	
Chronic cutaneous hypersensitivity	<u>P-selectin</u>	Tamagawa-Mineoka et al. (4)	
Allergic asthma	<u>P-selectin</u> , <u>Serotonin</u>	Pitchford et al. (21), Durk et al. (26)	

**Figure 17. Régulation de la perméabilité vasculaire et du recrutement leucocytaire par les plaquettes.** Exemples de différentes situations inflammatoires dans lesquelles les plaquettes interviennent pour réguler la perméabilité vasculaire et/ou le recrutement des leucocytes. Pour chaque modèle, les récepteurs d'adhésion et/ou les facteurs solubles impliqués sont indiqués. Les facteurs d'origine plaquettaire sont soulignés. CD40, cluster of differentiation 40, CD40L, cluster of differentiation 40 ligand, EMMPRIN, extracellular matrix metalloproteinase inducer, Mac-1, macrophage-1 antigen, MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1, ND, non-determined, PAF, platelet-activating factor, PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1, sCD40L, soluble cluster of differentiation 40 ligand, TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>, VEGF, vascular endothelial growth factor, vWF, von Willebrand factor [99].

### *c) Plaquettes et prévention des saignements inflammatoires*

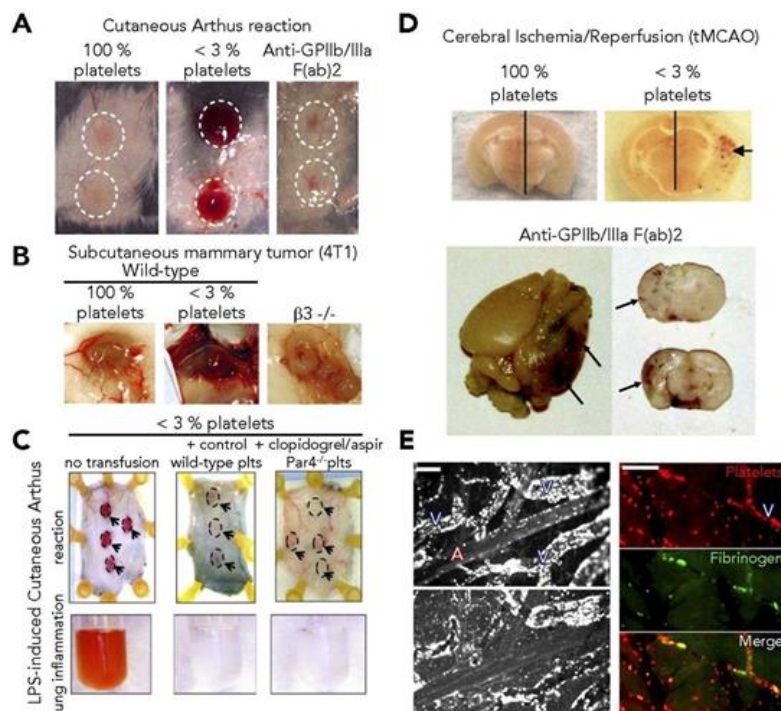
L'intégrité vasculaire est un terme utilisé pour désigner la capacité de l'endothélium à retenir les fluides, les macromolécules et les leucocytes mais aussi la capacité du vaisseau à retenir structurellement tous les composants du sang. Comme nous venons de le voir, l'extravasation contrôlée de fluides et macromolécules repose sur des mécanismes différents de ceux de l'extravasation des leucocytes. Au contraire de ces 2 processus qui sont finement régulés et impliquent des changements réversibles et transitoires des cellules endothéliales, l'extravasation des globules rouges résulte de saignements consécutifs à des dégâts vasculaires. Depuis un peu plus d'une dizaine d'années, il a été montré que les plaquettes intervenaient en permanence afin de prévenir les saignements au cours des réactions inflammatoires. Un modèle d'inflammation cutanée induite par complexes immuns chez la souris a été particulièrement utilisé afin d'étudier les mécanismes de l'hémostase associée à l'inflammation. Une revue dédiée à la description de ce modèle, la réaction d'Arthus passive inversée (rpA), est présentée dans la section « Articles et Résultats Expérimentaux ».

L'action hémostatique des plaquettes au cours des réactions inflammatoires a initialement été mise en évidence chez des souris rendues thrombopéniques par immunodéplétion de plaquettes et soumises à différents modèles de réactions inflammatoires : rpA, inflammation pulmonaire induite par inhalation de LPS et ischémie/reperfusion cérébrale [125]. Dans ces 3 modèles d'inflammation aiguë, il a été montré que la réaction inflammatoire s'accompagnait systématiquement de saignements au site réactionnel chez les souris thrombocytopéniques. Au contraire, aucun saignement n'était visible chez les souris contrôles ayant un compte plaquettaire normal et soumises aux mêmes réactions inflammatoires, ni même chez des souris thrombopéniques n'ayant pas subi de stimulus inflammatoire [125]. Ces résultats montrant que les plaquettes interviennent en permanence pour prévenir les saignements en cas de réaction inflammatoire ont depuis été confirmés dans de nombreux autres modèles inflammatoires dont des modèles de glomérulonéphrite [126], d'infection virale ou bactérienne [75], [127]–[129], de dermatite de contact [98], d'irradiation aux ultraviolets [98], d'immunisation [130], ou de tumeurs solides [131]–[134].

Selon les situations, les mécanismes sous-jacents à la fonction hémostatique des plaquettes dans les organes inflammés peuvent présenter des différences notables par rapport à

ceux responsables de l'hémostase primaire consécutive à une blessure traumatique. Tout d'abord, ces saignements inflammatoires ne sont observés que dans les cas de thrombocytopénie très sévère. En effet, il a été montré que respectivement 15 %, 10 % ou même 2 % du compte plaquettaire normal de souris était suffisant pour prévenir les saignements au cours d'une infection par le LCMV [127], de la rPA cutanée [125], ou d'une pneumonie à *Klebsiella* [128]. Le faible besoin quantitatif en plaquettes pour permettre l'hémostase dans les organes inflammés pourrait s'expliquer par le type d'interactions entre plaquettes et paroi vasculaire à l'origine de cette action hémostatique. En effet, des études anciennes s'intéressant aux interactions entre plaquettes et paroi vasculaire au cours des réactions inflammatoires ont montré qu'aux stades précoces de ces réactions, des plaquettes non-agrégées étaient liées aux cellules endothéliales, au sous-endothélium, ou aux leucocytes [135]–[137]. En plus de montrer que les plaquettes étaient recrutées précocement aux sites inflammatoires, ces observations ont suggéré que l'action hémostatique pourrait s'y exercer indépendamment de l'agrégation plaquettaire, mécanisme pourtant central à l'hémostase post-traumatique. En accord avec ces données observationnelles, il a été montré dans certains modèles d'inflammation (dermatite, tumeurs solides, immunisation) que l'action hémostatique des plaquettes dans les organes inflammés était préservée chez des souris ayant un déficit génétique total en intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (ou GPIIb-IIIa) [125], [132] ou ayant été traitées avec un anticorps bloquant cette intégrine essentielle à l'agrégation plaquettaire [130], [138] (**Figure 18, Figure 19**). De plus, une étude ayant exploré l'implication de différentes voies d'activation plaquettaires dépendantes de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dans la prévention des saignements inflammatoires a révélé que ces voies classiques d'activation plaquettaire n'étaient pas indispensables à la fonction hémostatique des plaquettes lors de la rPA cutanée ou en cas d'inflammation aiguë des poumons induite par inhalation d'endotoxine [139]. En effet, contrairement aux souris thrombocytopéniques, des souris ayant un déficit génétique en PAR-4 (le principal récepteur plaquettaire à la thrombine chez la souris) et ayant été traitées par de l'aspirine (inhibiteur de l'axe thromboxane A<sub>2</sub>/TP) et du clopidogrel (inhibiteur de l'axe ADP/P2Y<sub>12</sub>) ne développent pas de saignements inflammatoires dans ces modèles [139] (**Figure 18**). Dans leur ensemble, ces résultats ont montré que la fonction hémostatique des plaquettes au cours des réactions inflammatoires pouvait dans certains cas être assurée indépendamment des mécanismes et des voies d'activation classiquement décrits comme étant responsables de la participation des plaquettes à l'hémostase primaire et à la

thrombose. Cependant, des expériences dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale ont montré que l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  était nécessaire à la prévention de la transformation hémorragique de l'infarctus cérébral [138], [140] (**Figure 18, Figure 19**). Ainsi, il apparaît que la fonction hémostatique des plaquettes au sein des organes inflammés repose sur des mécanismes variant avec la situation inflammatoire considérée. Le type et la sévérité des dégâts vasculaires générés au cours de la réaction inflammatoire en question sont probablement des déterminants importants du mécanisme de réparation impliqué.



**Figure 18. La prévention des saignements inflammatoires par les plaquettes peut survenir indépendamment des récepteurs couplés à la protéine G et de GPIIb/IIIa.** (A) Images représentatives de l'aspect de la peau après 4 heures de réaction passive d'Arthus inversée (rpA) cutanée montrant que, contrairement aux souris thrombocytopéniques, les souris traitées avec un fragment d'anticorps bloquant F(ab')2 dirigé contre GPIIb-IIIa ne développaient pas de saignement dans la peau inflammée. (B) Images représentatives de tumeurs mammaires 4T1 de souris montrant que, contrairement aux souris thrombocytopéniques, les souris présentant un déficit génétique en intégrines  $\beta\text{3}$  ne développent pas de saignement tumoral. (C) Des souris transgéniques hIL-4Ra/GPIba ont été immunodéplétées pour les plaquettes et transfusées ou non avec des plaquettes contrôles de souris sauvage ou des plaquettes de souris PAR4<sup>-/-</sup> traitées à l'aspirine et au clopidogrel. Ces souris ont ensuite été soumises à la rpA cutanée ou à une inflammation des poumons induite par inhalation de LPS, comme indiqué. Des images représentatives du site de la rpA et de l'aspect du liquide de lavage broncho-alvéolaire sont montrées. On note que comme les plaquettes contrôles de souris sauvage, les plaquettes PAR4<sup>-/-</sup> traitées au clopidogrel et à l'aspirine protègent contre les saignements inflammatoires dans la peau et les poumons. (D) Images représentatives montrant des coupes de cerveau de souris soumises à une ischémie cérébrale transitoire. Les photographies ont été prises 24 heures après la reperfusion. Des transformations hémorragiques sont visibles dans l'hémisphère ischémique de souris thrombocytopéniques et de souris traitées avec un anticorps bloquant anti-GPIIb-IIIa. (E) imagerie intravitale de microvaisseaux corticaux au cours d'une ischémie cérébrale chez le rat. À gauche : Le marquage à la rhodamine 6G montre qu'une occlusion proximale provoque une margination rapide et marquée des leucocytes dans les veinules en aval de l'artère occluse qui persiste et continue de se développer après recanalisation (panel inférieur). À droite : L'ischémie cérébrale conduit finalement à des occlusions secondaires des microvaisseaux cérébraux causées par une accumulation de plaquettes et de fibrinogène. [80]

	Bleeding phenotype		Bleeding cause	Primary pathways for bleeding prevention	Dispensable/secondary pathways for bleeding prevention
	100% platelets	<2.5% platelets			
<b>Abnormal inflammatory bleeding</b>					
Immune complex-induced dermatitis (rpA)	No bleeding	Bleeding	Neutrophils	GPVI, (CLEC-2)	GPib, VWF, GPIIb/IIIa, (P2Y12), (TXA2), (PAR4), S1P, platelet granules
Irritant contact dermatitis	No bleeding	Bleeding	Neutrophils	ND	ND
UVB-induced dermatitis	No bleeding	Bleeding	Neutrophils	ND	ND
LPS-induced lung inflammation	No bleeding	Bleeding	Neutrophils	(GPVI), (CLEC-2)	GPIIb/IIIa, S1P, (P2Y12), (TXA2), (PAR4), platelet granules
<i>Klebsiella</i> -induced pneumonia	No bleeding	Bleeding	ND	ND	ND
Immunization (OVA/CFA)	No bleeding	Bleeding	Lymphocytes	CLEC-2, podoplanin	GPIIb/IIIa, platelet S1P
Immune complex-induced glomerulonephritis	No bleeding	Bleeding	Neutrophils	ND	GPib
Cerebral IRI (tMCAO)	No bleeding	Bleeding	ND	GPIIb/IIIa, platelet granules	GPVI, GPib, VWF
Viral infection (LCMV)	No bleeding	Bleeding	ND	GPIIb/IIIa	GPib, P-Selectin
Solid tumors (4T1, B16F10, LLC)	No bleeding	Bleeding	Macrophages and neutrophils	(Platelet granules)	GPib, VWF, GPIIb/IIIa
<b>No abnormal inflammatory bleeding</b>					
Arthritis	No bleeding	No bleeding	NA	NA	NA
Thioglycolate-induced peritonitis	No bleeding	No bleeding	NA	NA	NA
Immune complex-induced peritonitis	No bleeding	No bleeding	NA	NA	NA
Endotoxemia	No bleeding	No bleeding	NA	NA	NA

**Figure 19. Vue d'ensemble de différents modèles expérimentaux d'inflammation dans lesquels l'immunodéplétion des plaquettes (<2,5% de plaquettes) provoque ou non des saignements inflammatoires anormaux.** Pour chaque modèle, lorsqu'ils sont connus, les causes des saignements inflammatoires ainsi que les voies impliquées ou non pour la prévention des saignements sont indiquées. Les voies candidates dont le rôle a été étudié à l'aide de méthodes de transfusion plaquettaire sont indiquées entre parenthèses et en italique. IRI, lésion d'ischémie-reperfusion; LCMV, virus de la chorioméningite lymphocytaire, ND, non déterminé; LPS, lipopolysaccharide; NA, Non disponible; OVA/CFA, ovalbumine/adjuvant complet de Freund; rpA, réaction passive passive d'Arthus; tMCAO, occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne. [80]

Concernant la cause des dégâts vasculaires au cours des réactions inflammatoires, il a été montré qu'ils étaient associés à l'infiltration leucocytaire (**Figure 19**). La déplétion en neutrophiles permet par exemple de prévenir les saignements inflammatoires dans différents modèles de dermatite [100], [141], dans un modèle de glomérulonéphrite [126] et dans certaines tumeurs solides [132], [134]. De la même manière, la déplétion en lymphocytes permet de prévenir les saignements dans un modèle d'immunisation [130]. Si l'on considère l'implication des plaquettes dans le recrutement des leucocytes qu'elle favorise, il apparaît un rôle ambivalent des plaquettes qui réparent des dégâts qu'elles contribuent à générer au cours des réactions inflammatoires [142].

#### d) Récepteurs plaquettaire à motif ITAM et prévention des saignements inflammatoires

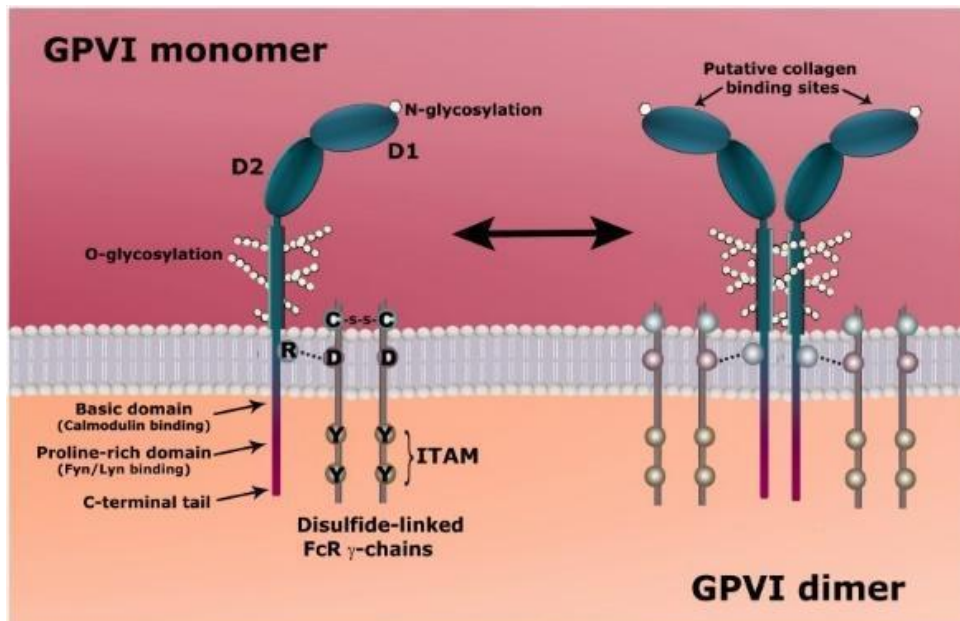
De façon intéressante, des études ont suggéré un rôle prépondérant de 2 des récepteurs plaquettaire à motif ITAM, GPVI (**Figure 20**) et CLEC-2 (**Figure 21**), dans la prévention des saignements inflammatoires dans les situations où l'agrégation plaquettaire n'est pas essentielle. Il a en effet été montré que les souris ayant un déficit en GPVI ou en CLEC-2 présentaient des

saignements anormaux au cours de la rpA cutanée [139], [141] ou en cas d'inflammation pulmonaire aiguë induite par inhalation d'endotoxine [139].

Concernant la GPVI, principal récepteur plaquettaire au collagène, il a été montré qu'elle jouait un rôle dans le recrutement précoce des plaquettes au niveau des sites d'extravasation des neutrophiles dans les veinules post-capillaires et collectrices de la peau inflammée [141]. Le collagène fibrillaire est le principal ligand de la GPVI mais il a été montré que la GPVI pouvait se lier à d'autres protéines matricielles comme les laminines [143], [144] ainsi qu'à des récepteurs exprimés par les leucocytes comme EMMPRIN [48] ou même à des peptides antimicrobiens sécrétés par les leucocytes comme la « human cathelicidin antimicrobial protein » (hCAP-18) chez l'homme, « Cathelicidin-related Antimicrobial Peptide» (CRAMP) chez la souris [145]. Il est intéressant de noter que bien que les neutrophiles constituent la source cellulaire majeure de cathélicidine, cette protéine non exprimée dans la peau saine est induite dans les kératinocytes localisés dans les zones inflammatoires au cours de divers troubles cutanés inflammatoires [146]. A ce jour, le(s) ligand(s) responsable(s) du recrutement plaquettaire dépendant de la GPVI au cours de la rpA cutanée n'a pas été identifié.

En plus des propriétés adhésives de la GPVI, il a été montré que ses propriétés de signalisation étaient également impliquées dans son action hémostatique au niveau de la peau inflammée. Il a été montré que les plaquettes présentant un défaut dans les cascades de signalisation de GPVI et CLEC-2 en raison d'un déficit en SLP-76, un effecteur commun de GPVI et de CLEC-2, ou d'un traitement par des inhibiteurs des tyrosines kinases Syk et de Bruton (BTK), avaient une capacité réduite à prévenir les saignements inflammatoires dans la peau ou les poumons inflammés [139], [141]. Quelle(s) réponse(s) plaquettaire(s) résultant de cette signalisation contribu(en)t à l'arrêt des saignements au cours de l'inflammation cutanée est un aspect qui reste à déterminer. Parmi les réponses dépendantes de la signalisation GPVI pouvant participer à la réparation endothéliale et vasculaire aux sites d'extravasation des neutrophiles figurent la sécrétion de facteurs solubles pour renforcer les jonctions endothéliales ou encore l'étalement et/ou la migration des plaquettes afin de couvrir au mieux les brèches vasculaires [147].



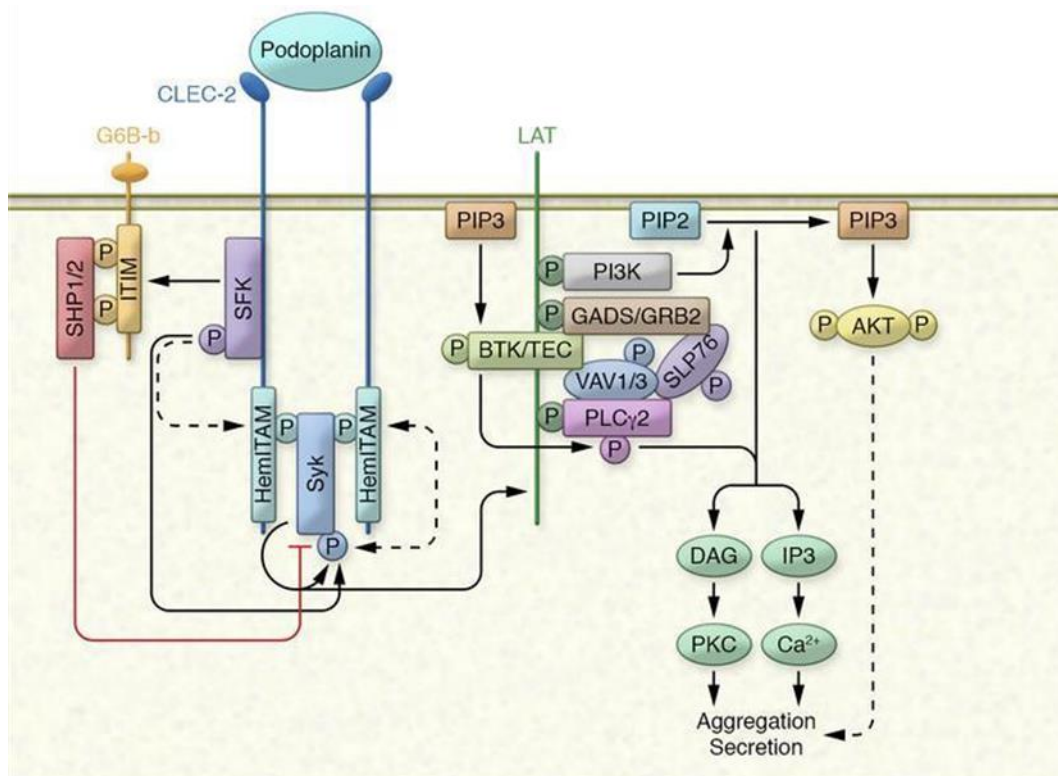


**Figure 20. La glycoprotéine VI (GPVI).** La GPVI, est une protéine transmembranaire de 62 kDa. Elle est exprimée uniquement par les plaquettes et la lignée mégacaryocytaire. Son gène est situé sur le chromosome 19 du génome humain. Le domaine extracellulaire de la GPVI comporte deux boucles « immunoglobulin-like », les domaines D1 et D2 et un domaine riche en Ser/Thr-like liant D1 / D2 au domaine transmembranaire. Le domaine D1 est impliqué dans la liaison du collagène alors que le domaine D2 permet la dimérisation de la GPVI [148]. Chaque monomère de GPVI est associé de manière non covalente à deux chaînes FcR $\gamma$ , chaque chaîne contenant une séquence ITAM qui, lorsqu'elle est phosphorylée, se lie à la tyrosine kinase Syk. Une fois phosphorylée, Syk initie la voie de signalisation ITAM. Le domaine intracellulaire court de GPVI contient un domaine de base qui se lie à la calmoduline ; un domaine riche en proline qui se lie aux kinases Src Fyn et Lyn, qui participent à la phosphorylation de ITAM ; et une queue terminale [149]. Seul le dimère de GPVI a une haute affinité pour le collagène, alors que le monomère le lie faiblement ou pas du tout [148], [150]. La présence de dimères de GPVI à la surface des plaquettes au repos reste sujet à controverse. Selon le groupe de S. Jung et al, les dimères constitutifs de la GPVI représentent environ 20% de la GPVI totale dans les plaquettes au repos et l'activation des plaquettes augmente le nombre de dimères [151]. Une autre étude suggère au contraire que la GPVI ne serait présente que sous la forme monomérique à la surface des plaquettes au repos et sa dimérisation est induite par la liaison du complexe GPIb-V-IX au collagène via le facteur von Willebrand lors de l'activation des plaquettes.[149]

Le rôle de CLEC-2 dans la prévention des saignements inflammatoires a jusqu'ici été beaucoup moins étudié. Le récepteur CLEC-2 est un héli-ITAM possédant sur sa queue cytosolique un seul motif YXXL/I appartenant à la famille des protéines transmembranaire de type II (**Figure 21**). CLEC-2 est exprimé sur les plaquettes et les mégacaryocytes et à faible concentration sur les cellules dendritiques inflammatoires et les cellules myéloïdes après leur passage dans les organes lymphoïdes secondaires [152]. Le seul ligand endogène connu à ce jour de CLEC-2 est la podoplanine, une glycoprotéine exprimée par les cellules endothéliales lymphatiques [153], certaines cellules cancéreuses [154]–[156], les macrophages [157] et les lymphocytes Th17 en situation inflammatoire [158]. *In vitro*, CLEC-2 peut être activé par la rhodocytine, une toxine contenue dans le venin de la vipère asiatique Calloselasma [49]. La stimulation de CLEC-2 par la podoplanine permet la phosphorylation de la Tyr du motif ITAM et active ainsi les plaquettes et leur agrégation via des voies de signalisation similaires à celles mises en jeu par la stimulation de la GPVI. Les souris déficientes constitutivement en CLEC-2 ou en

podoplanine sont caractérisées par des hémorragies cérébrales et des vaisseaux lymphatiques remplis de sang à mi-gestation, et par une mortalité périnatale proche de 100 % due à un problème pulmonaire [159], [160]. Il a été récemment démontré que la liaison de CLEC-2 à la podoplanine sur les cellules endothéliales lymphatiques était nécessaire au développement du poumon et qu'elle est impliquée dans la différenciation des cellules mésothéliales du poumon en myofibroblastes du canal alvéolaire via la sécrétion de TGF- $\beta$  par les plaquettes chez la souris [161]. L'interaction de CLEC-2 avec son ligand la podoplanine exprimée par les cellules stromales artériolaires de la moelle osseuse favoriserait également la maturation des mégacaryocytes et la formation de pro-plaquettes [162]. Chez les souris déficientes en CLEC-2 uniquement sur la lignée mégacaryocytaire (générées par la technologie Cre-Lox : *Clec2fl/fIPF4Cre+*), le degré de mélange sang-lympe est réduit et les souris sont viables, avec toutefois une réduction de 30% du nombre de plaquettes. Néanmoins, les temps de saignement et de formation d'un thrombus induit par une lésion par le chlorure de fer ne sont pas augmentés [163]. CLEC-2 ne serait donc requis ni dans l'hémostase post-traumatique ni dans la thrombose artérielle. Cependant dans un modèle murin de thrombose veineuse profonde (DVT) provoquée par une sténose de la veine cave inférieure, une étude récente a montré que l'interaction de CLEC-2 avec la podoplanine favoriserait la formation du thrombus [164].

L'étude du rôle de CLEC-2 dans la prévention des saignements inflammatoires a constitué l'un des objectifs de mes travaux de thèse. Les résultats de cette étude sont présentés dans la section «Articles et Résultats Expérimentaux » page 66 de ce manuscrit.



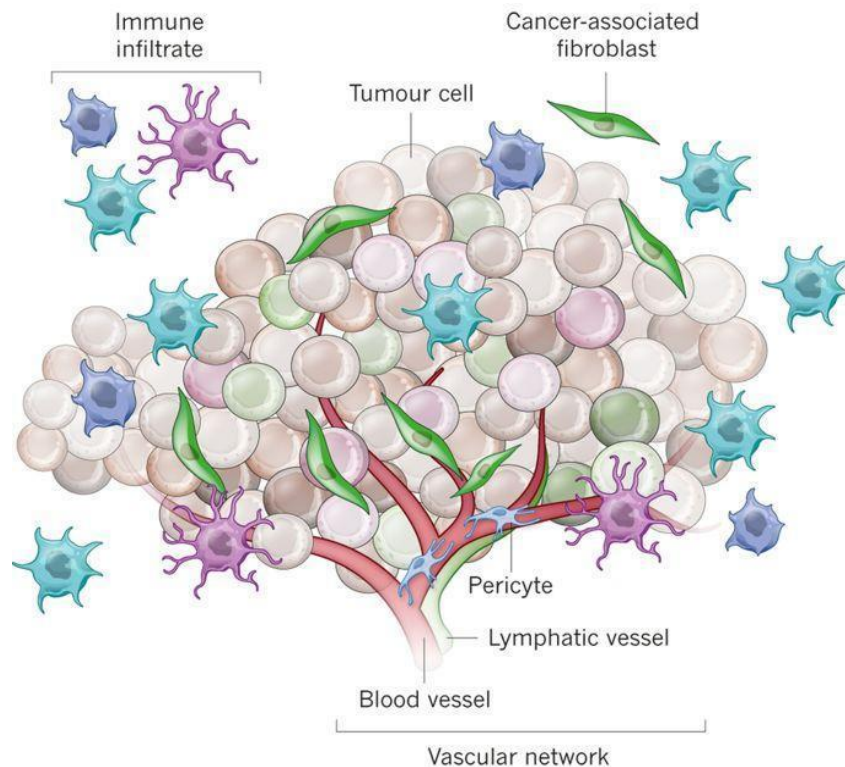
**Figure 21. Le récepteur CLEC-2.** Le gène codant pour CLEC-2, CLEC1B, est situé sur le chromosome 12 dans le génome humain. L'activation de CLEC-2 par son ligand la podoplanine induit une phosphorylation de l'hemi-ITAM, permettant le recrutement de Syk. Une fois recruté, Syk subit une série d'auto-phosphorylations et de trans-phosphorylations par SFK, aboutissant au recrutement et à la phosphorylation de la protéine adaptatrice LAT et au recrutement des effecteurs de cette voie, tels que GRB2, GADS, SLP76, VAV1 / 3, PIP3, etc. BTK / TEC. La cascade de signalisation aboutit à la phosphorylation et à l'activation de la PLC $\gamma$ 2, qui se lie aux LAT et PIP3 phosphorylés sur la membrane plasmique. PIP3 recrute également BTK et TEC, qui phosphorylent le PLC $\gamma$ 2. L'activation de la PLC $\gamma$ 2 induit la formation des messagers secondaires inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et 1,2-diacylglycérol (DAG), entraînant la mobilisation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'activation de la PKC, respectivement. Ces modifications se traduisent par la sécrétion de granules  $\alpha$  et de granules denses intracellulaires et par une activation des intégrines plaquettaires, y compris  $\alpha$  IIb  $\beta$  3, conduisant à une agrégation plaquettaire. La signalisation CLEC-2 dans les plaquettes humaines dépend de la polymérisation de l'actine et des médiateurs secondaires, ADP et TxA 2. Adapté de [49]

## II. Microenvironnement tumoral et plaquettes

### A. Microenvironnement tumoral

Les tumeurs résultent de la prolifération anarchique des cellules du tissu dans lequel elles sont situées suite à des altérations génétiques spontanées ou provoquées de gènes contrôlant le cycle cellulaire et/ou l'apoptose [165]. Cependant, la croissance des tumeurs ne dépend pas uniquement des cellules cancéreuses elles-mêmes. Dès 1889, un chirurgien anglais, Stephen Paget introduit la notion de microenvironnement tumoral (MET) en montrant que la dissémination cancéreuse se fait non pas au hasard mais dans des organes et environnements précis. En étudiant la localisation des métastases chez des patientes décédées de cancer du sein ou d'autres types de cancer, il constate que le foie constitue le site préférentiel de développement des métastases de cancer du sein comparé à d'autres organes tels que la rate, les reins ou les poumons. Ses observations soutiennent l'hypothèse de Fuchs [166] que certains organes seraient prédisposés au développement de certains cancers secondaires et propose alors la théorie graine-sol (« Seed and Soil theory ») selon laquelle les cellules cancéreuses, la graine », envahissent préférentiellement certains tissus dont l'environnement, « le sol », leur est favorable [167].

Depuis, le MET a été défini comme étant l'ensemble des composantes cellulaires, moléculaires et les contraintes mécaniques qui entourent les cellules tumorales et qui interagissent avec celles-ci [156]. La composante cellulaire du microenvironnement tumoral comporte des cellules tumorales, des cellules fibroblastiques, des cellules du système immunitaire et des cellules vasculaires (**Figure 22**). Outre le comportement anormal des cellules tumorales, les cellules non-tumorales avoisinantes présentent des morphologies et des fonctionnements différents de ceux qu'elles auraient eus dans un tissu sain. Ces changements cellulaires impliquent une modification de la composition moléculaire du milieu extracellulaire.

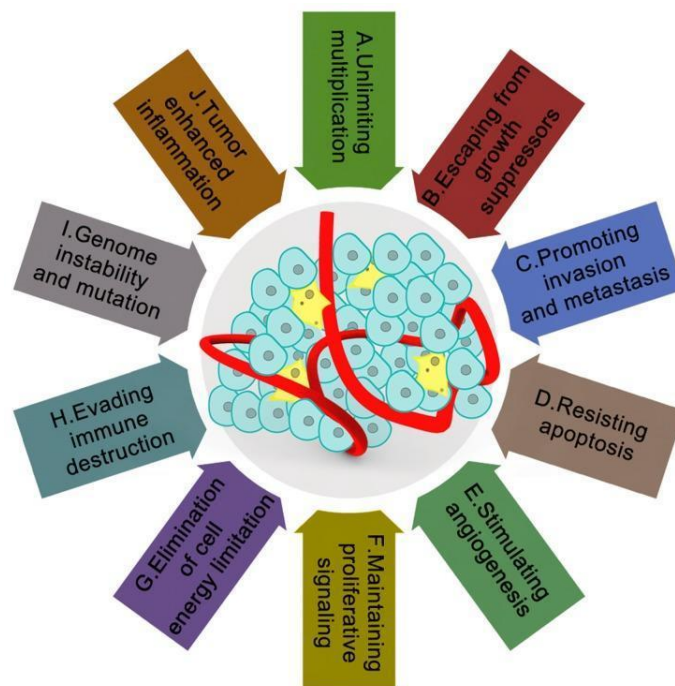


**Figure 22. Les composants du microenvironnement tumoral.** La formation des tumeurs implique l'évolution des cellules néoplasiques avec la matrice extracellulaire et les cellules vasculaires, stromales et immunitaires. La niche tumorale est un ensemble physique et dynamique dans laquelle le support structurel, l'accès aux facteurs de croissance, l'approvisionnement vasculaire et les interactions des cellules immunitaires peuvent varier considérablement, même au sein d'une même tumeur. L'infiltrat immun peut comprendre plusieurs types de cellules, ces populations cellulaires peuvent avoir à la fois des fonctions pro- et anti-tumorales et peuvent varier dans leur statut d'activation et leur localisation dans la tumeur. Le réseau vasculaire peut différer selon le tissu d'origine du vaisseau, la maturité (étendue de la couverture en péricyte), la pression interstitielle et la fonctionnalité. Les fibroblastes associés au cancer peuvent avoir une plasticité importante et diverger par leur statut d'activation et leur localisation dans le tissu [168].

Le milieu extracellulaire comporte la matrice extracellulaire (MEC) qui consiste en un réseau tridimensionnel de macromolécules insolubles. Au sein de ce maillage, baignent des molécules solubles telles que des enzymes et des médiateurs solubles de la communication cellulaire. Le MET est un milieu complexe qui évolue en permanence au cours de la progression tumorale [169].

L'importance du MET dans l'apparition et la progression des tumeurs primaires et secondaires a été largement confirmée [158]. On sait en effet désormais que le MET est impliqué dans l'acquisition des caractéristiques principales des tumeurs et notamment, la stimulation de l'angiogenèse, l'immunosuppression, la promotion de l'invasion tumorale et des métastases, la résistance à l'apoptose, le maintien des signaux de prolifération, l'instabilité et la mutation du génome et une inflammation accrue au sein de la tumeur (**Figure 23**). L'étude du MET au cours

des dernières décennies a permis de mieux comprendre la progression tumorale mais également de développer de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

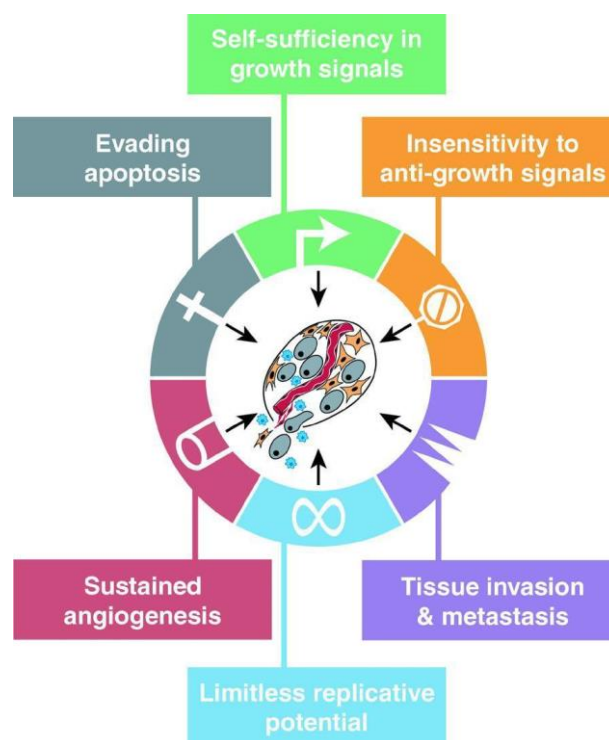


**Figure 23. Rôle du microenvironnement tumoral dans le processus de tumorigenèse.** Il est actuellement largement reconnu que le micro-environnement tumoral influence fortement dix des principales caractéristiques du cancer: A. multiplication illimitée; B. échappement aux signaux anti-prolifératives; C. promotion de l'invasion et des métastases; D. résistance à l'apoptose; E. stimulation de l'angiogenèse; F. maintien des signaux proliférative; G. Dérégulation du métabolisme énergétique; H. Evasion de la destruction par les cellules immunitaires; I. instabilité et mutation du génome; J. Promotion de l'inflammation tumorale. [170]

## 1. Cellules tumorales

Les cellules tumorales sont des cellules ayant subi des altérations génétiques spontanées ou provoquées par exposition à un agent génotoxique tel que des radiations, une substance chimique, des virus ou des métabolites endogènes tels que les espèces réactives à l'oxygène (ROS) ou les agents de méthylation de l'ADN. Ces altérations peuvent toucher des oncogènes (gènes dont la surexpression favorise la cancérogénèse, tels que BRAF codant pour une kinase), des gènes suppresseurs de tumeurs (ou anti-oncogènes tels que PTEN ou p53), ou des gènes du système de réparation de l'ADN (tels que BRCA1 et BRCA2) [171]. En plus de mutations touchant directement la séquence de tels gènes, il a été mis en évidence que des modifications épigénétiques de la régulation de l'expression des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs favorisaient également l'apparition des cancers [172].

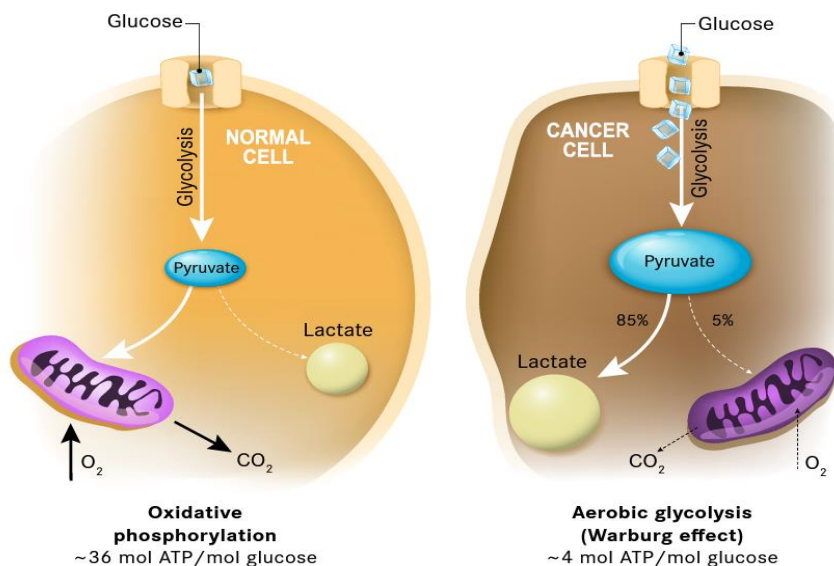
Malgré l'existence de nombreux types de cancers, en 2000, dans une étude fondatrice, Hanahan et Weinberg ont pu établir une liste des 6 principales caractéristiques phénotypiques acquises communes aux cellules tumorales (**Figure 24**): 1) leur capacité à proliférer indépendamment de signaux de prolifération, 2) leur insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, 3) leur capacité à échapper à la mort cellulaire par apoptose 4) leur capacité à proliférer de manière illimitée, 5) leur forte activité pro-angiogénique et 6) leur capacité à envahir de nouveaux tissus et ainsi former des métastases [165]. Dans le cas des carcinomes qui constituent la grande majorité des cancers solides, cette dernière capacité est en partie acquise lors de la transition épithelio-mésenchymateuse au cours de laquelle les cellules cancéreuses passent d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux notamment par la diminution de l'expression de molécules d'adhésion [173]. Comme nous le verrons plus loin, les plaquettes ont la capacité de promouvoir cette transition.



**Figure 24. Principales caractéristiques des cellules tumorales.** La croissance maligne est permise par six altérations essentielles de la physiologie des cellules tumorales qui sont : l'autosuffisance des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'évasion de la mort cellulaire programmée (apoptose), le potentiel de réplication illimité, l'angiogenèse soutenue et enfin l'invasion et les métastases tissulaires. Cette multiplicité de défenses peut expliquer pourquoi le cancer est relativement rare au cours d'une vie humaine moyenne. [165]

En plus de ces caractéristiques, la majorité des cellules tumorales présentent également une dérégulation de leur métabolisme énergétique. L'identification de cette altération

phénotypique des cellules cancéreuses remonte au début du 20<sup>ème</sup> siècle et aux travaux d’Otto Warburg et de son équipe qui ont comparé le métabolisme de tissus sains à celui de différents carcinomes et sarcomes humains [174]. Ils ont mis en évidence le fait que contrairement aux cellules de tissus sains qui génèrent de l’énergie à partir du couplage glycolyse/respiration mitochondriale, les cellules de tumeurs primaires utilisent excessivement la glycolyse indépendamment de la disponibilité en oxygène (**Figure 25**). Ils ont également montré que cette altération phénotypique était plus prononcée dans les tumeurs malignes que dans les tumeurs bénignes. Ce phénomène appelé « effet Warburg » a depuis été largement confirmé et on sait maintenant que les anomalies du phénotype métabolique des cellules cancéreuses et les mécanismes et/ou mutations sous-jacents varient selon le type de tumeur et leur stade [175].



**Figure 25. Représentation schématique de la phosphorylation oxydative dans les cellules normales et de la glycolyse aérobie (effet warburg) dans les cellules tumorales.** En phase quiescente et en absence d’oxygène, les cellules catabolisent le pyruvate issu de la glycolyse en acide lactique (fermentation lactique ou glycolyse anaérobie). En présence d’oxygène, le pyruvate subit une décarboxylation oxydative suivie du cycle de Krebs au sein des mitochondries (respiration, glycolyse aérobie). L’énergie libre dégagée durant ces deux réactions chimiques est utilisée pour la synthèse d’ATP. L’effet Warburg décrit une propriété cellulaire particulière par laquelle les cellules en phase de croissance métabolisent préférentiellement le glucose en lactate indépendamment de la disponibilité en oxygène, bien que ce mécanisme produise 18 fois moins d’ATP que la phosphorylation oxydative. De nombreuses anomalies et mutations d’enzymes métaboliques ont été découvertes dans de nombreux cancers. Par exemple l’augmentation de plusieurs enzymes, telles que la glucose 6-phosphate déshydrogénase, la pyruvate kinase M2, Rad6, ou la déficience en la succinate déshydrogénase, peuvent contribuer directement ou indirectement à l’augmentation de la teneur en lactate associée à l’effet Warburg [176].

Les cellules tumorales ont la capacité de promouvoir l’angiogenèse notamment en réponse au stress hypoxique qui consiste en un manque en oxygène et en nutriments au niveau de la masse tumorale généré par la croissance tumorale. Les cellules tumorales produisent des molécules proangiogéniques tels que le VEGF et l’angiopoïétine qui déclenchent la vascularisation



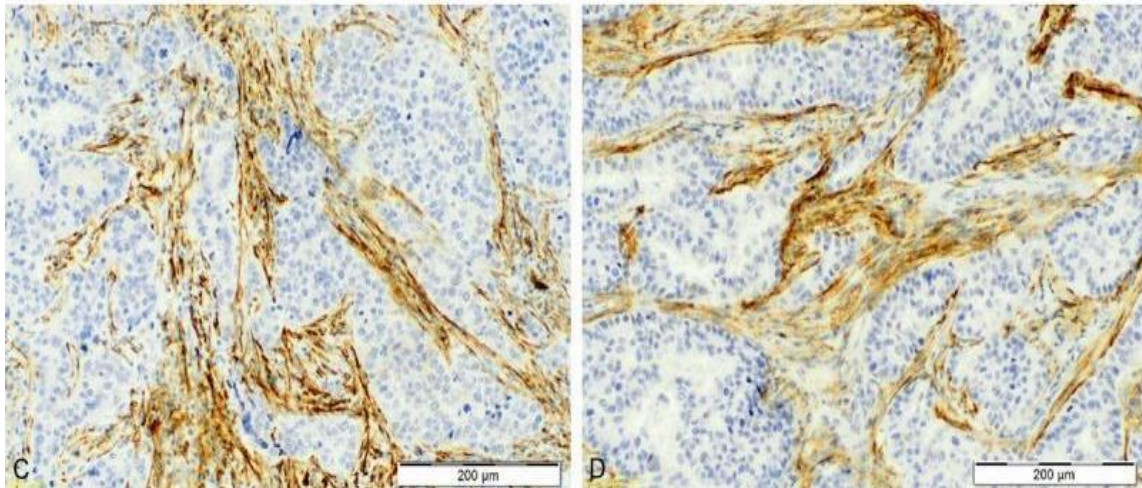
de la tumeur [177]. Ce phénomène permet la formation de nouveaux capillaires sanguins dans la masse tumorale à partir des capillaires préexistants au voisinage de la tumeur. Les capillaires formés permettent de rétablir l'irrigation sanguine et d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires au développement de la tumeur [178]. Les cellules tumorales ont la capacité de recruter des cellules du système immunitaire en faveur du développement de la tumeur. En effet les cellules tumorales ont la capacité de libérer des facteurs telles que le VEGF et le facteur de stimulation des colonies (CSF) qui provoque l'expansion d'une population de cellules myéloïdes immatures qui peuvent non seulement aider les tumeurs à supprimer la réaction immunitaire mais aussi aider à la construction de nouveaux vaisseaux sanguins pour la croissance tumorale [179], [180]. Elles promeuvent également la lymphangiogenèse, par la sécrétion de VEGF-C et VEGF-D, qui est essentielle à l'élimination des déchets et métabolites et à la formation de métastases [181]. Enfin, il a été montré dans un modèle de cancer épithélial de l'ovaire que les cellules tumorales pouvaient stimuler la thrombopoïèse via la sécrétion d'IL-6 conduisant à une augmentation de la production hépatique de thrombopoïétine (TPO) [182].

## 2. Fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes possédant de longs prolongements cytoplasmiques et normalement présentes au niveau des tissus conjonctifs dans un état de quiescence. Ils synthétisent de la MEC (macromolécules, facteurs de croissance) et jouent un rôle important dans la réparation tissulaire ou lors des réactions inflammatoires notamment via la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.

Les fibroblastes associés aux cancers (CAFs), sont des fibroblastes activés, c'est-à-dire qu'ils présentent une capacité de prolifération et de motilité augmentée. L'activation des CAFs comme celle des fibroblastes de manière générale se fait en réponse à différents signaux tels que des facteurs de croissance (TGF $\beta$ , EGF et PDGF) sécrétés par exemple par des cellules épithéliales lésées, des monocytes et des macrophages [183]. Les CAFs possèdent un phénotype myofibroblastique, expriment donc de l'actine  $\alpha$  de muscle lisse et présenterait une augmentation de l'expression de la podoplanine [184] (**Figure 26**). Les CAFs ont des fonctions importantes dans la progression tumorale. Ils participent notamment au remodelage de la MEC [185], [186] et ont la capacité d'induire l'angiogenèse en sécrétant des niveaux élevés de SDF-1,

un facteur pro-angiogénique [187] et possèdent également une fonction immunomodulatrice via la sécrétion de cytokines [156].



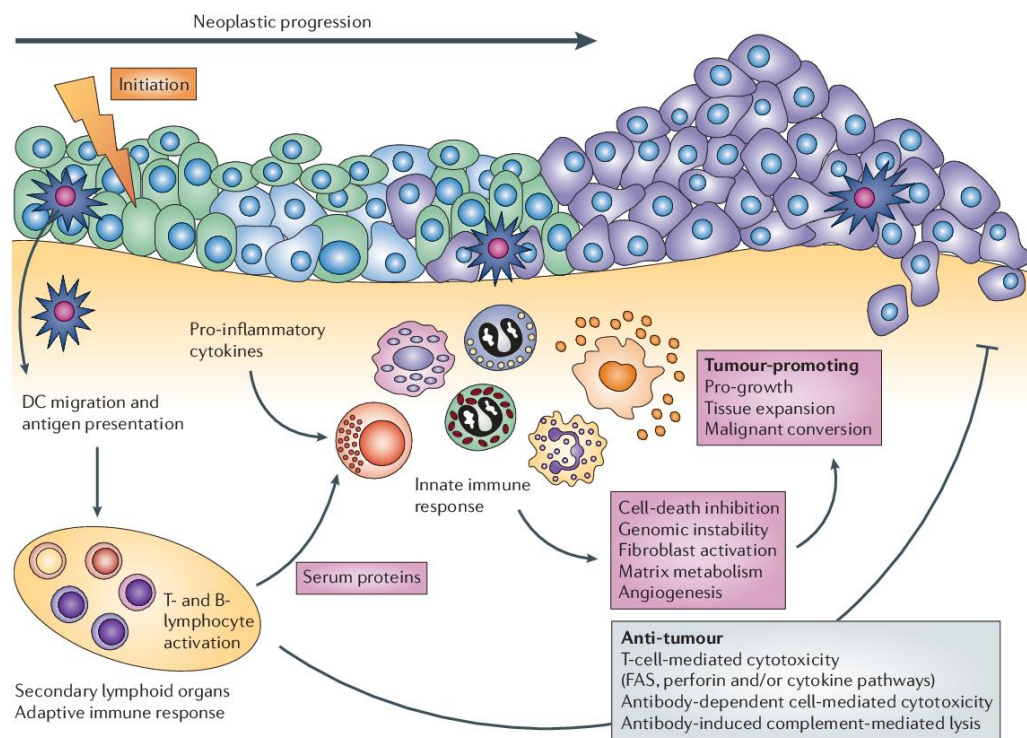
**Figure 26. Expression de la podoplanine dans les fibroblastes associés au cancer (CAFs).** CAFs exprimant la podoplanine au sein d'un adénocarcinome du poumon (gauche) et d'un carcinome canalaire invasif du sein (droite) adapté de [188]. L'impact des plaquettes activées par les cellules tumorales sur la formation de fibroblastes associés au cancer et sur leur fonction dans le microenvironnement tumoral est actuellement inconnu. Cependant, les facteurs plaquettaires qui activent les fibroblastes sont les mêmes facteurs qui semblent favoriser la prolifération et la différenciation des CAFs, et comprennent le bFGF, le TGF- $\beta$ 1 et le PDGF [189].

### 3. Cellules immunitaires

La présence de leucocytes dans les tumeurs, observée au 19<sup>ème</sup> siècle par Rudolf Virchow, a fourni la première indication d'un lien possible entre inflammation et cancers. Cependant, ce n'est que durant la dernière décennie que l'on a clairement démontré que l'inflammation jouait un rôle critique dans la tumorigenèse et que certains des mécanismes moléculaires sous-jacents ont été élucidés [190].

Le MET contient des cellules immunitaires innées (macrophages, neutrophiles, mastocytes) et des cellules immunitaires adaptatives (lymphocytes T et B). Ces diverses cellules communiquent entre elles par contacts directs ou par production de cytokines et de chimiokines pour contrôler la croissance tumorale (**Figure 27**). L'expression de ces médiateurs et modulateurs immunitaires, ainsi que l'abondance et l'état d'activation des différents types de cellules dans le MET, déterminent si cet état inflammatoire favorise la croissance tumorale ou l'immunité anti-

tumorale [191]. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les lymphocytes T sont les cellules immunitaires les plus abondantes du MET.



**Figure 27. Fonctions des cellules immunitaires au cours du développement d'un cancer associé à un état inflammatoire.**

Les antigènes qui sont présents dans les tissus néoplasiques précoces sont transportés vers les organes lymphoïdes par les cellules dendritiques (DC) qui activent les réponses immunitaires adaptatives entraînant à la fois des effets pro-tumoraux et anti-tumoraux. L'activation des cellules B et des réponses immunitaires humorales entraîne une activation chronique des cellules immunitaires innées dans les tissus néoplasiques. Les cellules immunitaires innées activées, telles que les mastocytes, les granulocytes et les macrophages, favorisent le développement des tumeurs par la libération de molécules solubles pro-survie puissantes (MMP-7/9, COX2, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-1/6) qui modulent les programmes d'expression génique dans les cellules néoplasiques, aboutissant à une progression du cycle cellulaire altérée et à une survie accrue. Les cellules inflammatoires influencent positivement le remodelage des tissus et le développement du système vasculaire angiogénique par la production de médiateurs pro-angiogéniques et de protéases extracellulaires. Les tissus dans lesquels ces voies sont chroniquement engagées présentent un risque accru de développement tumoral. En revanche, l'activation de l'immunité adaptative induit également des réponses anti-tumorales par le biais d'une toxicité médiée par les lymphocytes T en plus de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps et de la lyse induite par le système du complément [191].

Les TAM peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse tumorale et une concentration élevée de TAM est généralement corrélée à un mauvais pronostic [192]. Les TAM ont notamment la capacité de favoriser la croissance tumorale par la production de facteurs de croissance tels que l'EGF et le PDGF. Ils ont également une activité pro-angiogénique via la sécrétion de VEGF et de métalloprotéinases (MMP7, MMP9 et MMP12) [193]. Les TAM contribuent également au remodelage de la matrice extracellulaire par l'expression d'enzymes hydrolytiques et ils

participent à la suppression de l'immunité anti-tumorale [194]. A ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant de possibles interactions entre TAMs et plaquettes.

Les lymphocytes sont le deuxième type de cellules immunitaires les plus abondantes au sein des tumeurs. Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) et auxiliaires (CD4+) sécrètent de l'INF- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL17 leur conférant des effets anti-tumoraux et leur augmentation est liée à une meilleure survie dans certains cancers tels que le mélanome [195]. Cependant, il a également été prouvé que différents types de cellules T trouvées dans les tumeurs solides, y compris des cellules T CD8 +, pouvaient promouvoir la croissance tumorale [196]. Ainsi, de façon surprenante, il a été montré dans un modèle de carcinogénèse chimique chez la souris que la délétion des lymphocytes CD8 limitait la croissance et le nombre des tumeurs [196]. Les lymphocytes B joueraient également un rôle important dans la croissance tumorale notamment via la production de cytokines et en exerçant une fonction immunosuppressive [197].

Les polynucléaires neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) ont été suggérés comme pouvant avoir des fonctions anti-tumorales ou pro-tumorales selon le stade de développement de la tumeur. Alors que les TAN sont cytotoxiques envers les cellules tumorales via la production de TNF- $\alpha$ , NO et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aux stades précoces des cancers, ces fonctions cytotoxiques des TAN sont par la suite régulées négativement, au contraire de leurs fonctions pro-tumorales, dans les cancers avancés. En effet, il a été montré dans des modèles de tumeurs implantées en sous-cutanée chez la souris que la déplétion des neutrophiles permettait d'inhiber la croissance tumorale uniquement lorsque la déplétion était induite après plusieurs jours de développement tumoral [198]. De plus, il apparaît que les TAN peuvent fonctionner comme des cellules immunosuppressives via la sécrétion de CCL17 qui permet le recrutement de lymphocytes T régulateurs immunosuppresseurs. Les TAN ont également la capacité de recruter les macrophages et les plaquettes via la sécrétion de MPO, contribuant ainsi à la progression du cancer [199]. Enfin, plusieurs études expérimentales récentes chez la souris ont suggéré que les neutrophiles participeraient à la formation de l'environnement favorable à la métastase dans un organe secondaire, environnement également appelé niche pré-métastatique [200], [201].

#### 4. Cellules vasculaires

Parmi les constituants du MET, on retrouve les cellules formant le système vasculaire et notamment les cellules endothéliales tumorales (CET) et les péricytes. Les cellules endothéliales formant les vaisseaux tumoraux présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes des cellules endothéliales normales. Plusieurs études ont montré que des CET circulaient en association avec des cellules tumorales dans différents types de cancer (ex : cancers de la tête et du cou [202], cancer du côlon [203], cancer de la prostate [204]). Il a été suggéré que cette association entre CE et cellules tumorales favoriserait les métastases tumorales. En effet, il a été montré que l'association entre CET et cellules tumorales favoriserait la résistance des cellules tumorales à un type d'apoptose appelé anoïkis et déclenché par la perte des interactions entre cellules adhérentes et MEC [202].

Les péricytes sont des cellules mésenchymateuses spécialisées enveloppant le tube de cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Dans les tissus normaux, les péricytes stabilisent les cellules endothéliales et aident les parois des vaisseaux à résister à la pression hydrostatique du flux sanguin. Dans les vaisseaux tumoraux, ils sont moins nombreux et présentent une morphologie anormale ce qui déstabilise les vaisseaux tumoraux et provoque des fuites de sang [205]. Les fuites vasculaires augmentent la pression du liquide interstitiel de la tumeur, ce qui limite la perfusion et réduit l'apport en oxygène et en nutriments. Le microenvironnement hypoxique qui en résulte favorise la sélection de clones cellulaires capables de résister à ces conditions difficiles. Les cellules tumorales des microenvironnements hypoxiques présentent souvent un phénotype plus agressif, activant les oncogènes et subissant une TEM, ce qui augmente leur potentiel métastatique [206]. Les péricytes sécrètent également des facteurs (VEGF, Ang-1) et expriment des molécules d'adhésion qui contribuent au maintien des CET et favorisent ainsi la croissance tumorale [207]. L'impact des plaquettes sur les péricytes et leurs interactions avec les cellules endothéliales au sein du microenvironnement tumoral est inconnu. Cependant, les plaquettes stockent et sécrètent un certain nombre de facteurs (ex : TGF- $\beta$ , PDGF et Ang-1) susceptibles d'influer sur la différenciation, la prolifération, le recrutement et les interactions des péricytes avec les cellules endothéliales. Dans une étude de Li *et al.*, l'induction d'une thrombocytopenie chez des souris ayant des tumeurs établies B16F10 a entraîné une

diminution de la couverture en péricytes et de la densité des vaisseaux sanguins de la tumeur, ainsi qu'une augmentation des fuites vasculaires [208].

## 5. La matrice extracellulaire

La communication entre les cellules tumorales et les différentes cellules du MET implique un grand nombre de molécules qui sont sécrétées dans le milieu liquide extérieur entre les maillages de MEC. La MEC est un ensemble de macromolécules extracellulaires organisées autour des cellules au sein duquel les cellules stromales et tumorales sécrètent différents médiateurs dont des cytokines, des facteurs de croissance et des hormones. La MEC joue un rôle très important dans la progression tumorale en régulant la disponibilité des molécules de signalisation solubles.

La MEC des tumeurs est composée de protéines comme l'élastine et de glycoprotéines telles que le collagène et la laminine. Dans les tumeurs, l'élastine interagit avec les cellules tumorales via des récepteurs spécifiques (EBP) et semble contribuer à leur phénotype métastatique [209]. Il a été montré que le front invasif du mélanome était caractérisé par une fragmentation intense des fibres élastiques conduisant à la libération de fragments d'élastine appelés élastokines. Les élastokines font parties de la famille des matrikines, qui sont des fragments de matrice ayant des propriétés analogues à celles des cytokines. Celles-ci stimulent plusieurs aspects de la progression du mélanome, tels que l'augmentation de l'invasion des cellules tumorales par le collagène de type I ou l'augmentation de l'angiogenèse [210]. Le collagène joue un rôle structural et confère une résistance à la tension ; il est retrouvé en quantité anormalement élevée dans les tumeurs. Les laminines participent à une multitude de processus biologiques physiologiques mais aussi à la progression tumorale, notamment via l'induction de la production d'enzymes protéolytiques par les cellules tumorales [211]. La MEC est également composée de polysaccharides impliqués dans différents processus physiologiques et tumoraux, notamment dans la migration cellulaire, l'angiogenèse et les métastases. Elle est riche en molécules solubles telles que les protéases (cathepsines, métalloprotéinases,...) qui sont retrouvées à des concentrations élevées au sein des tumeurs [212].

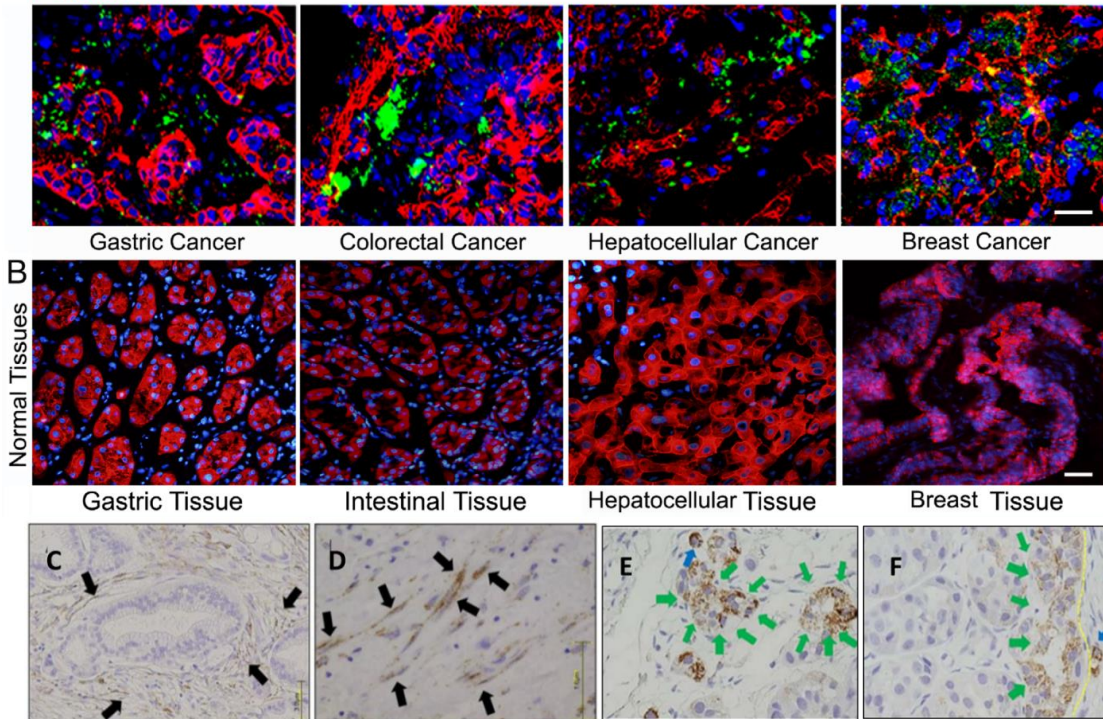
La prolifération des cellules tumorales est ralentie lorsque la tumeur atteint une certaine taille. Les concentrations en oxygène et nutriments au sein du tissu tumoral dépendent de la

distance des capillaires sanguins et peuvent atteindre des valeurs extrêmement faibles dans les zones profondes de la tumeur [213].

## B. Les plaquettes comme actrices possibles du microenvironnement tumoral

Dès 1865, Armand Trousseau a diagnostiqué chez certains patients et notamment lui-même, une coagulation sanguine excessive causée par une tumeur [214]. Il est maintenant admis qu'une augmentation du nombre de plaquettes est associée à une faible survie et à une diminution de la réponse à la chirurgie et à la chimiothérapie dans les cancers du poumon, du sein, du colon, du rein et de l'estomac [215]. Cette augmentation du nombre de plaquettes est associée à un risque accru de développer une thrombose veineuse [216]. Cependant, la contribution possible des plaquettes à la thrombose veineuse maligne n'est pas seulement due à l'augmentation du nombre de plaquettes mais pourrait également être liée à une altération de la fonction plaquettaire. Il a notamment été montré que les plaquettes de sujets atteints de cancers métastatiques avancés ont une réactivité accrue à l'ADP et à l'épinéphrine [217]. Différentes études suggèrent que le rôle des plaquettes dans les cancers ne se limiterait pas au phénomène de thromboses associées aux cancers. Ainsi, les plaquettes contribueraient également à la croissance et à la propagation des cancers. En effet, il a été montré que les plaquettes étaient capables de promouvoir différents processus essentiels à la croissance et à la progression des cancers tels que l'angiogenèse, la lymphangiogenèse, ou encore le processus métastatique. Il a également été montré que comme les plaquettes, les microparticules dérivées des plaquettes peuvent également jouer un rôle important dans la prolifération des cellules cancéreuses, les interactions entre cellules cancéreuses, la progression métastatique, l'angiogenèse et l'inflammation [18]. Enfin, alors que beaucoup des effets potentiels des plaquettes vis-à-vis des cellules tumorales ont été mis en évidence *in vitro* ou *in vivo*, il est intéressant de noter que plusieurs études ont décrit la présence de plaquettes extravasculaires au contact des cellules tumorales ou des CAFs de différents types de cancers (cancer du sein, du colon, de l'estomac, du foie et du pancréas) (**Figure 28**) [218]–[221].

A Platelets/CK8/DAPI

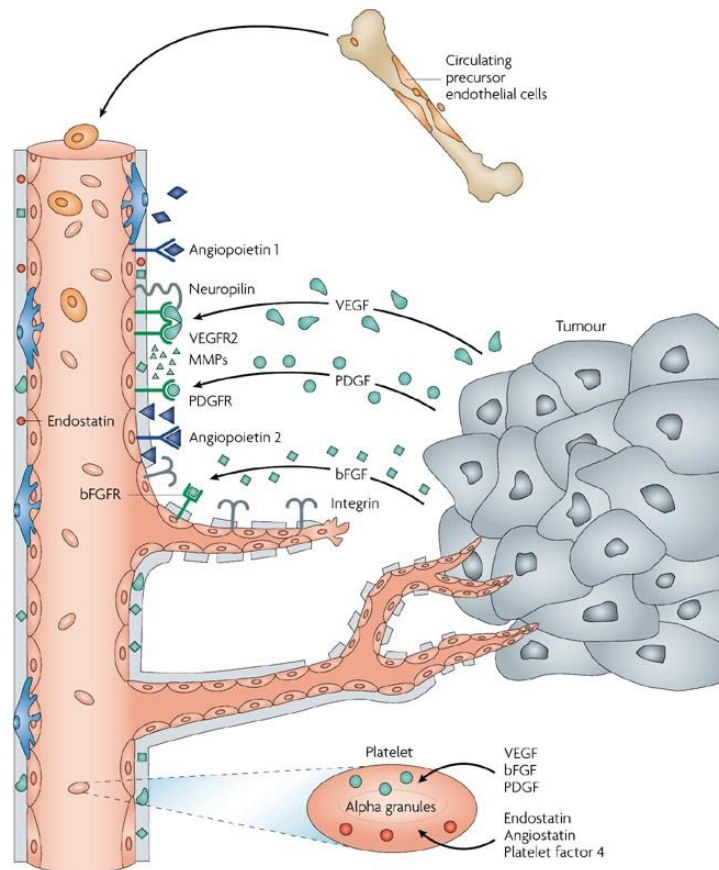


**Figure 28. Accumulation de plaquettes en extravasculaire dans les cancers chez l'Homme.** A-B Marquage immunofluorescent de la GPIIb/IIIa pour les plaquettes (platelets), la cytokeratine 8 (CK8) pour les cellules tumorales et DAPI pour l'ADN nucléaire. Barre = 20  $\mu$ m. **A** Dépôt de plaquettes dans les tissus tumoraux. **B** Les agrégats plaquettaires sont complètement absents dans les tissus normaux. Adapté de [219]. **C-D** Marquages immunohistologiques des plaquettes CD42b-positives (flèches noires). L'expression de CD42b a été observée dans les fibroblastes associés au cancer (FAC) chez des patients atteints du cancer du pancréas. Adapté de [220]. **E-F** Analyse immunohistochimique de l'expression de CD42b (plaquettes) dans des échantillons de biopsie de patientes atteintes d'un cancer du sein **E** Expression de CD42b autour des cellules tumorales ayant acquis un profil mésenchymateux [c'est-à-dire une perte de polarité baso-apicale (flèche verte) et migration des cellules tumorales (flèche bleue)]. **F** Les plaquettes ont été détectées sur le front invasif (ligne pointillée jaune). Grossissement, x400. Adapté de [218].

## 1. Plaquettes et angiogenèse

L'angiogenèse est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un système vasculaire préexistant (**Figure 29**). Dans le contexte tumoral, ce processus devient essentiel lorsque la tumeur atteint une taille supérieure à 2 mm de diamètre. En effet, il prévient l'hypoxie et la nécrose de la tumeur, mais il permet également la délivrance de protéases et de cytokines qui contribuent à l'intravasation, à l'extravasation et à la dissémination des cellules tumorales [222].





**Figure 29. Les étapes clés de l'angiogenèse tumorale.** L'angiopoïétine 1 (Ang-1), exprimée par de nombreuses cellules et présente en abondance dans les granules  $\alpha$  des plaquettes, se lie au récepteur endothélial TIE2 et aide à maintenir un état normalisé dans les vaisseaux sanguins. Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est sécrété par les cellules tumorales et se lie à son récepteur (VEGFR2) et à la neuropiline sur les cellules endothéliales (CE). Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont libérées par les cellules tumorales, mais aussi par les CE stimulées par le VEGF. Les MMPs mobilisent les protéines pro-angiogéniques du stroma mais peuvent également générer des facteurs anti-angiogéniques comme l'endostatine à partir du collagène de type XVIII présent dans la paroi vasculaire et de l'angiostatine à partir du plasminogène circulant. Les cellules tumorales sécrètent de l'angiopoïétine 2 (Ang-2) qui entre en compétition avec Ang-1 pour se lier au récepteur endothélial TIE2. L'ANGPT2 augmente la dégradation de la membrane basale vasculaire et la migration des CE, facilitant ainsi la formation de bourgeons vasculaires. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), une protéine angiogénique également sécrétée par certaines tumeurs, peut réguler positivement son propre récepteur (PDGFR) sur les CE. Le facteur de croissance des fibroblastes basique (Bfgf ; également connu sous le nom de FGF2) est sécrété par d'autres tumeurs. Différents facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques sont stockés dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et sont libérés dans le système vasculaire tumoral [223].

Les plaquettes contiennent différents facteurs angiogéniques présentés dans la **Figure 30** dont le VEGF, l'angiopoïétine-1 et le PDGF qui sont contenus dans leurs granules  $\alpha$ . La présence de ces facteurs dans les granules plaquettaire vient en partie de leur capture par les plaquettes après leur sécrétion par les cellules tumorales dans le MET. Il a en effet été montré que le contenu en facteurs de croissance au sein des plaquettes, et notamment en VEGF, était augmenté chez les patients atteints de différents types de cancer et que ce contenu variait avec l'évolution des cancers [224]. De plus, une étude chez la souris a montré que les plaquettes participaient à l'angiogenèse dans différents modèles expérimentaux. Il a été mis en évidence une réduction

significative de l'activité angiogénique en absence de plaquettes dans le test de micropoche de la cornée de souris ou encore au sein de matrigels implantés en sous-cutanées chez la souris [225]. La contribution des plaquettes à l'angiogenèse dans des modèles expérimentaux de tumeurs reste cependant à démontrer.

	Effet sur l'angiogenèse	Molécule
Granules alpha	Pro-angiogénique	SERPINE-1
		EGF
		PDGF
		bFGF
		IGF
		VEGF
		TP (PD-ECGF)
		IL-1 $\beta$
		SDF-1
	Anti-angiogénique	ANGTP1
		S1P
		PF4
		TSP1
		PGK
		Endostatine
TIMP (TIMP-1, -2, -4)		
Pro- et anti-angiogénique	MMP (MMP-1, -2, -3, -9, -14)	
	TGF $\beta$	
	HGF	
Granules denses	Pro-angiogénique	Épinéphrine
		ATP, ADP
	Anti-angiogénique	TFIP
	Pro- et anti-angiogénique	Histamine
		Sérotonine

**Figure 30. Facteurs plaquettaire importants pour l'angiogenèse tumorale. [226]**

Les tumeurs peuvent activer les plaquettes en sécrétant et/ou en activant des protéases telles que la thrombine et la cathepsine B [227], ou encore en produisant des microparticules contenant du facteur tissulaire (TF) [14]. L'activation plaquettaire induite par les cellules tumorales (TCIPA) conduisant à l'expression de marqueurs d'activation plaquettaire, tels que la P-sélectine et à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques dérivés des plaquettes tels que le VEGF, le PDGF ou l'angiopoietine-1, favoriserait en retour l'angiogenèse tumorale [228]. Les

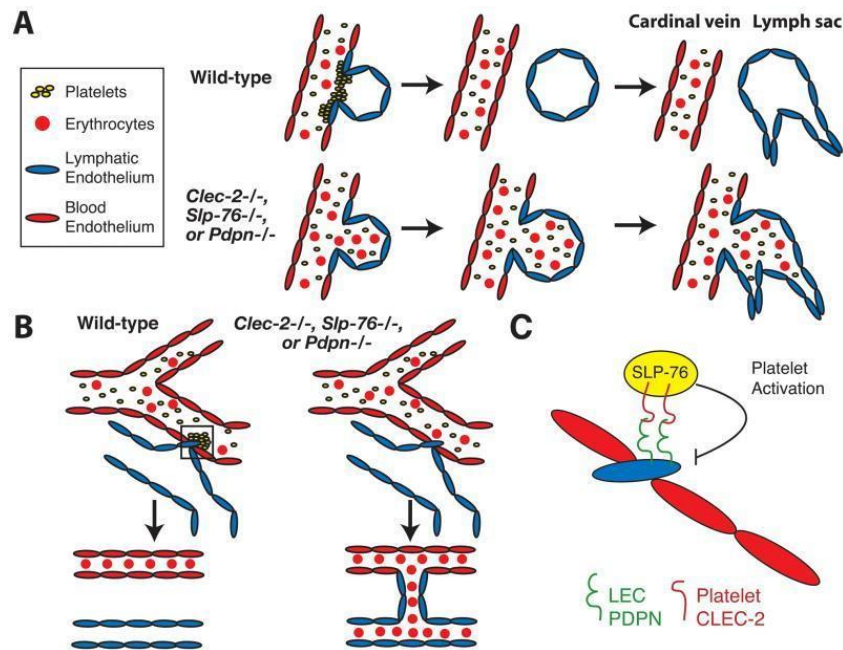
plaquettes peuvent notamment activer la prolifération et la migration des cellules endothéliales via la sécrétion de facteurs de croissance (VEGF et PDGF) qui permettent la formation de tubes vasculaires [222]. En plus de ces effets potentiels directs, les plaquettes pourraient avoir un impact indirect sur l'angiogenèse tumorale par le biais des fibroblastes [229]. En effet, les CAFs qui peuvent également avoir un rôle dans la stabilisation des vaisseaux tumoraux, voient leur état d'activation régulée par des facteurs de croissance dérivés des plaquettes, tels que le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF), le TGF $\beta$  et le PDGF [230].

## 2. Plaquettes et lymphangiogenèse

La lymphangiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène se produit pendant le développement embryonnaire, la cicatrisation et dans divers contextes pathologiques, y compris le cancer. La lymphangiogenèse est un processus opérant de façon similaire à l'angiogenèse. Il nécessite la coordination d'événements cellulaires complexes, notamment la prolifération, la migration et la formation de tubes vasculaires par les cellules endothéliales lymphatiques. La survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales lymphatiques dépendent du récepteur 2 du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGFR2) et du VEGFR3 qui sont activés par les facteurs de croissance VEGFC ou VEGFD [181].

Les plaquettes sont essentielles à la formation et au maintien des vaisseaux lymphatiques, et notamment par le biais de leur récepteur hémi-ITAM « C-type lectin » CLEC-2 [231]. CLEC-2 est activé par la PDPN exprimée notamment par les cellules endothéliales lymphatiques. Au cours du développement, lorsque les cellules endothéliales se détachent pour former les sacs lymphatiques, la PDPN est exposée ce qui favorise l'adhésion et l'accumulation des plaquettes permettant ainsi la séparation des vaisseaux lymphatiques et sanguins [232] (**Figure 31**). D'autres facteurs de croissance contenus et sécrétés par les plaquettes sont également capables de stimuler la lymphangiogenèse tumorale. Ainsi, il a été montré que le PDGF-BB, une isoforme du PDGF transportée par les plaquettes induit une lymphangiogenèse tumorale chez la souris [233]. Le PDGF-BB ne vient cependant pas uniquement des plaquettes, il peut également être produit par des cellules tumorales établies à partir de gliome ou de sarcome [234]. Une étude histopathologique chez des patients atteints de cancer de l'œsophage a par ailleurs montré une corrélation positive entre présence de plaquettes et lymphangiogenèse tumorale. Dans cette

même étude, il a été montré que les plaquettes avaient la capacité de stimuler directement la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques *in vitro* [235]. Enfin, une étude clinique a montré que l'augmentation du facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF-BB reflète l'implication des ganglions lymphatiques chez les patients atteints de cancer de l'œsophage indépendamment du nombre de plaquettes [236]. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les plaquettes pourraient avoir un rôle dans la lymphangiogenèse tumorale.

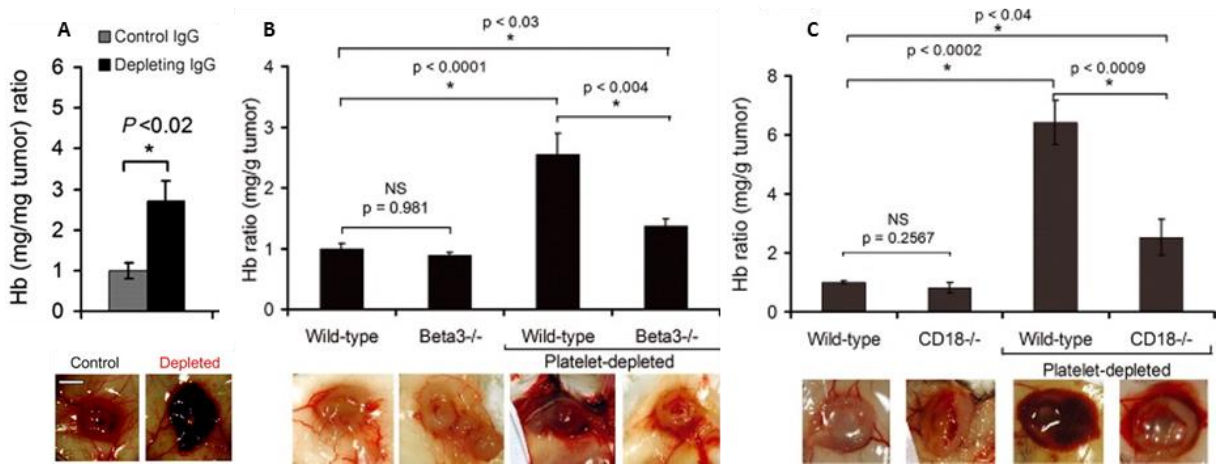


**Figure 31. Les plaquettes régulent la séparation vasculaire sang-lymphatique.** **A** Le développement vasculaire lymphatique commence au niveau de la veine cardinale de l'embryon, lorsque les cellules endothéliales veineuses donnent naissance aux premières cellules endothéliales lymphatiques pour former les sacs lymphatiques. Les micro thrombi plaquettaires sont présents sur les cellules endothéliales lymphatiques au niveau de la veine cardinale dans les embryons de type sauvage, mais sont absents dans les embryons *Clec-2*<sup>-/-</sup>, *Slp-76*<sup>-/-</sup> et *Pdpn*<sup>-/-</sup> qui développent des sacs lymphatiques remplis de sang. Ces erreurs de connexion primaire conduisent à des lymphatiques remplis de sang en aval. **B** Des connexions vasculaires sanguines et lymphatiques anormales se forment dans les intestins de *Clec-2*<sup>-/-</sup>, *Slp-76*<sup>-/-</sup> et de *Pdpn*<sup>-/-</sup> des souris. On propose un mécanisme de mélange sang-lymphatique intestinal, dans lequel des erreurs de connexion vasculaire surviennent en raison d'une invasion angiogénique entre le sang et le système vasculaire lymphatique. **C** La Podoplanine (*Pdpn*) à la surface de l'endothélium lymphatique se lie aux plaquettes par le biais du récepteur CLEC-2, menant à l'activation plaquettaire dépendante de SLP-76. L'activation plaquettaire intervient dans la séparation vasculaire par un mécanisme inconnu [237].

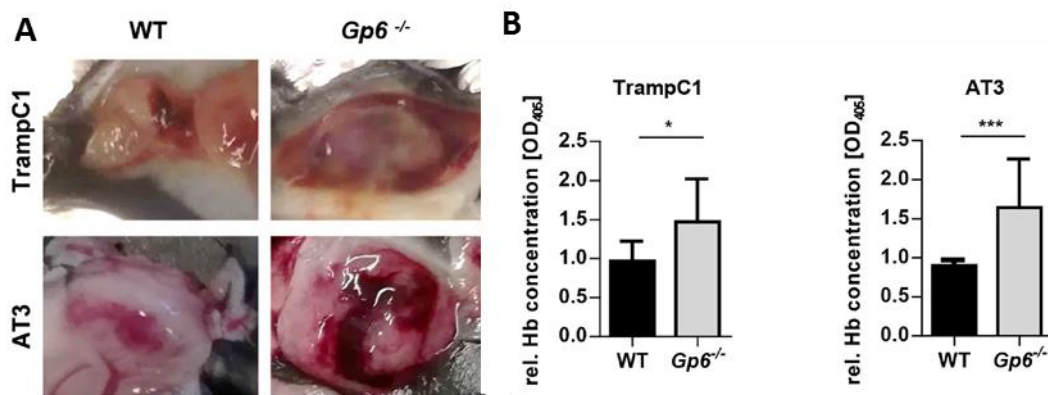
### 3. Plaquettes et maintien de l'intégrité vasculaire dans les tumeurs

En plus de réguler l'angiogenèse et possiblement la lymphangiogenèse, des études chez la souris ont montré que les plaquettes participaient au maintien de l'intégrité vasculaire dans différents tissus et organes inflammés dont les tumeurs solides [131], [132], [238]. Il a notamment été montré que les plaquettes préviennent en continu les saignements tumoraux dans différents

modèles de tumeurs solides (ex : cellules de mélanome B16F10 implantées en sous-cutané ou injectées par voie intraveineuse pour former des métastases pulmonaires, carcinome pulmonaire de Lewis (LLC), tumeurs mammaires AT3 et 4T1) chez la souris [131], [132], [134], [238] (**Figure 32**). Comme dans les organes inflammés, il a été montré que l'agrégation plaquettaire n'était pas indispensable au maintien de l'intégrité vasculaire dans différents types de tumeurs. Ainsi, contrairement aux tumeurs de souris rendues thrombopéniques par immunodéplétion des plaquettes, les tumeurs LLC de souris ayant un déficit total en GPIIb/IIIa ou les tumeurs mammaires 4T1 des souris ayant un déficit en intégrine beta3 ne présentent pas de saignements anormaux [131], [132] (**Figure 32**). Il a également été montré que, comme dans les organes inflammés, l'effet protecteur des plaquettes vis-à-vis des vaisseaux tumoraux impliquait une prévention et/ou une réparation des dégâts vasculaires causés par les neutrophiles et macrophages infiltrant la tumeur [132] (**Figure 32**). Le mécanisme exact de prévention des saignements tumoraux par les plaquettes reste à déterminer mais une étude récente suggère un rôle de la GPVI dans cette fonction (**Figure 33**) [134]. En effet, l'inhibition de ce récepteur au cours du développement tumoral conduit à une hémorragie intratumorale et à une réduction de la croissance tumorale [134]. Des résultats précédents suggèrent également une possible contribution des facteurs libérés par les plaquettes activées [238]. Ainsi, il a été montré que les plaquettes représentaient la principale source du puissant facteur vasculoprotecteur l'angiopoiétine-1 [131], [239], [240] et que la déplétion plaquettaire chez les souris porteuses de tumeurs s'accompagnait d'une disparition de ce facteur.



**Figure 32. Les plaquettes préviennent les saignements tumoraux causés par les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs.**  
**A.** Photographies et contenu en hémoglobine de tumeurs 8 jours après l'implantation sous-cutanée de cellules tumorales LLC, les souris ont été injectées avec des anticorps contrôles (control) ou des anticorps déplaçant les plaquettes (Depleted). Barre d'échelle : 5 mm. Extrait de [131]. **B** Les souris  $\beta 3^{-/-}$  caractérisées par un contenu intratumoral en macrophages diminué sont protégées des saignements tumoraux induits par la thrombocytopénie. Comparaison de la teneur en hémoglobine intratumorale carcinome du sein 4T1 âgé de 8 jours chez les souris sauvages ou  $\beta 3^{-/-}$  thrombocytopéniques ou non ( $n = 8-14$ ). Des photographies représentatives de tumeurs sont présentées en dessous. Extrait de [132]. **C** Les souris  $CD18^{-/-}$  caractérisées par un contenu intratumoral en neutrophiles diminué sont protégées des saignements tumoraux induits par la thrombocytopénie. Comparaison de la teneur en hémoglobine intratumorale dans une tumeur LLC de 10 jours chez des souris témoins ou  $CD18^{-/-}$  et rendues thrombocytopénique ou non ( $n = 6-11$ ). Des photographies représentatives de tumeurs sont présentées en-dessous [132].



**Figure 33. Augmentation des saignements tumoraux chez les souris déficientes en GPVI.** Des cellules de cancer de la prostate TrampC1 (A) et de cancer du sein AT-3 (B) ont été implantées chez des souris sauvages (WT) ou déficientes en GPVI ( $Gp6^{-/-}$ ). A Images représentatives des tumeurs. B La teneur relative en hémoglobine (rel. Hb) a été mesurée 31 ou 21 jours après l'implantation ( $n = 8$  ; moyenne  $\pm$  SEM). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  et \*  $P < 0.05$  ; test de Kruskal-Wallis. [134].

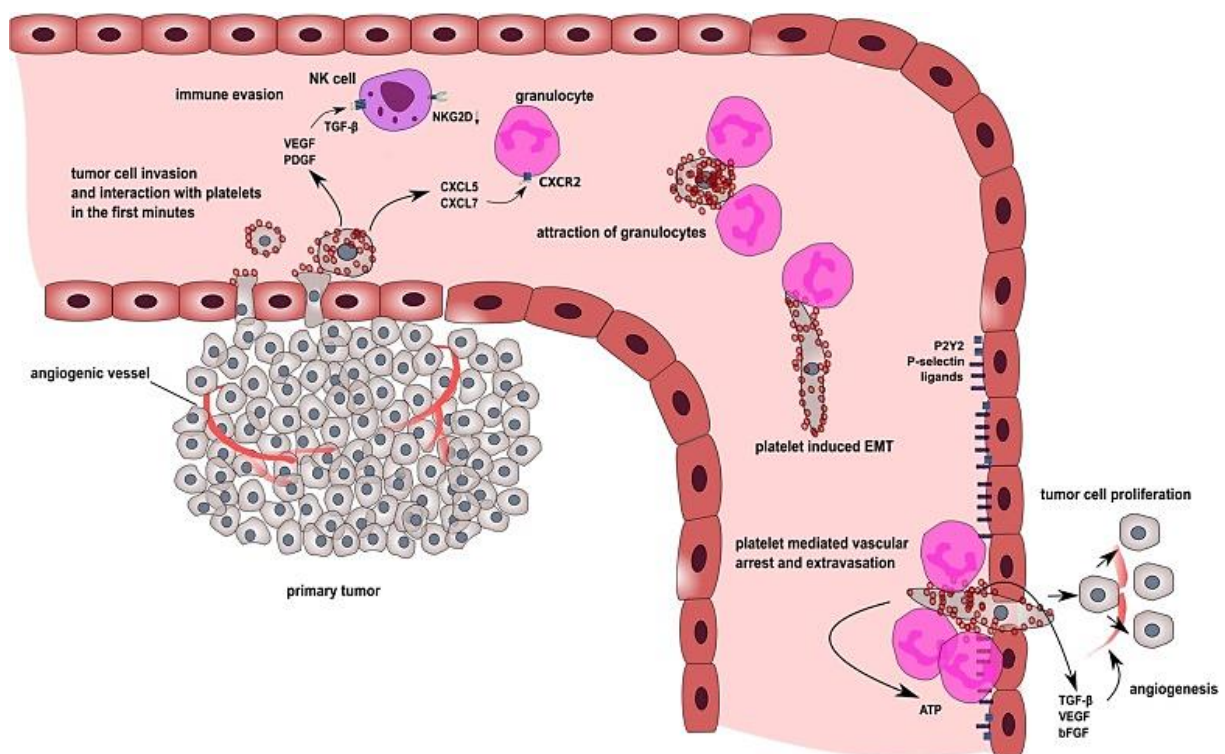
#### 4. Plaquettes et métastases

Le processus métastatique est le phénomène par lequel des cellules tumorales se détachent de la tumeur primitive, entrent dans la circulation sanguine et enfin colonisent un

nouveau tissu après extravasation. Les cellules tumorales de carcinomes (cancers épithéliaux) acquièrent cette capacité à se détacher suite à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Lors de cette transition, les cellules deviennent moins adhérentes, perdent leur polarisation et adoptent un phénotype mésenchymateux caractérisé par une mobilité accrue. Plusieurs études ont montré que les plaquettes intervenaient à différentes étapes du processus métastatique (**Figure 34**). Il a notamment été montré que les plaquettes activent de manière synergique, via la sécrétion de TGF $\beta$  mais également par contacts directs plaquettes-cellules tumorales, les voies TGF $\beta$ /Smad et NF- $\kappa$ B dans les cellules cancéreuses. L'activation de ces voies entraîne la transition du phénotype des cellules cancéreuses vers un phénotype invasif de type mésenchymateux associé à un risque métastatique accru *in vivo* [241]. La libération de TGF $\beta$  par les plaquettes serait notamment provoquée par leur interaction avec la PDPN exprimée par les cellules tumorales [242]. De plus, il a été montré que le niveau d'activation des plaquettes était corrélé au niveau d'expression des marqueurs de la TEM [243].

Lorsque des cellules adhérentes normales se détachent de la MEC, elles peuvent subir un type d'apoptose appelé anoïkis. Une étude a montré que les plaquettes réduiraient la susceptibilité à l'anoïkis des cellules tumorales et favoriseraient donc les métastases dans le cancer de l'ovaire chez la femme [226]. Dans la circulation, les cellules tumorales doivent surmonter diverses agressions, telles que les forces de cisaillements [217] et les attaques immunitaires. L'intégrine GPIIb-IIIa trouvée sur les plaquettes activées interagit avec l'intégrine  $\alpha$ v $\beta$ 3 exprimée par les cellules tumorales pour favoriser la cohésion et l'adhésion de ces cellules aux parois des vaisseaux sanguins et, ainsi, les protéger contre les forces de cisaillement du flux sanguin [244], [245]. L'importance du rôle potentiel joué par l'intégrine GPIIb-IIIa dans le processus métastatique est illustrée par les résultats d'une étude montrant que les souris avec un déficit plaquettaire en cette intégrine développent moins de métastases osseuses et pulmonaires [246][247].

Les plaquettes protègent également les cellules tumorales de la cytotoxicité du TNF $\alpha$  [248] et des cellules natural killer (NK) qui jouent un rôle important dans l'immunité anti-tumorale. Selon une étude, les plaquettes protègent non seulement les cellules tumorales de l'attaque des cellules NK mais les protègent également en régulant négativement l'activité des cellules NK [249]. En effet, le TGF- $\beta$  sécrété par les plaquettes activées inhiberait les cellules NK, empêchant ainsi la lyse des cellules tumorales et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  [250]. Enfin, les plaquettes sembleraient être impliquées dans la formation des niches pré-métastatiques permettant de préparer un terrain propice à la formation de métastases. Il a récemment été démontré que les plaquettes agrégées de tumeurs ont la capacité de guider la formation de niches métastatiques précoces dans le poumon murin en sécrétant des cytokines : CXCL-5 et CXCL-7, entraînant le recrutement de granulocytes favorisant la métastase [251]. Par conséquent, la théorie « graine et sol » de Paget pourrait être légèrement modifiée pour inclure « graine, sol et engrais », dans lequel les plaquettes joueraient le rôle crucial de « l'engrais » [252].



**Figure 34. Effets pro-métastatiques des plaquettes.** Suite à la transition épithélio-mésenchymateuse promue par les plaquettes, les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire et envahissent la circulation sanguine. Les cellules tumorales s'y recouvrent de plaquettes qui sécrètent différents facteurs de croissance et chimiokines (comme le VEGF, le PDGF ou le TGF- $\beta$ ) conduisant à une anergie des cellules NK. Les granulocytes sont attirés vers l'agglomérat de plaquettes et de cellules tumorales par les chimiokines CXCL5 et CXCL7. Enfin, les plaquettes médient l'arrêt des cellules tumorales au niveau de la paroi vasculaire d'un organe distant via la P-sélectine et ses ligands ainsi que par activation du récepteur endothélial P2Y2. Enfin, elles facilitent l'extravasation des cellules tumorales et contribuent à établir un foyer métastatique en sécrétant des facteurs de croissance s (ex : TGF- $\beta$ , VEGF ou bFGF) qui stimulent la prolifération des cellules tumorales et la formation de néovaisseaux. D'après [253].



La **Figure 35** présente un tableau résumant les récepteurs exprimés à la surface des plaquettes et signalés comme ayant un rôle dans la promotion des métastases cancéreuses.

Molécule	Effect on metastasis	References
<b>GPIIb/IIIa</b>	Reduced experimental metastasis of melanoma cells in GPIIb/IIIa <sup>-/-</sup> mice	(Jain et al., 2007)
<b>GPVI</b>	Reduced experimental metastasis of melanoma and Lewis lung carcinoma in GPVI <sup>-/-</sup> mice	(Jain et al., 2009)
<b>P-Selectin</b>	Reduced metastasis of B16 cells in P-selectin <sup>-/-</sup> mice	(Becker et al., 2017; Qi et al., 2014)
<b>NFE2L3</b>	Fewer lung metastases after intravenous injection of melanoma cells	(Camerer et al., 2004)
<b>Par4</b>	Fewer lung metastases after intravenous injection of melanoma cells	(Camerer et al., 2004)
<b>Gαq</b>	Reduced experimental metastasis of B16-BL6 melanoma and Lewis lung carcinoma cells following intravenous injection	(Palumbo et al., 2005)
<b>LPA</b>	Reduced bone metastasis of breast cancer after LPA deprivation or LPAR overexpression in tumor cells	(Boucharaba et al., 2004; Leblanc et al., 2014)
<b>β3 integrin</b>	Reduced bone metastasis of B16 melanoma cells after intracardiac injection	(Bakewell et al., 2003)
<b>α6β1 integrin</b>	Reduced metastasis of AT-3, B16F10, MC38 and E0771 cancer cells in α6β1 integrin <sup>-/-</sup> mice	(Mammadova-Bach et al., 2016)
<b>CLEC2</b>	Reduced metastasis of CHO cells by inhibition of Podoplanin-CLEC-2 binding	(Takagi et al., 2013)
<b>P2Y12</b>	Reduced metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells	(Wang et al., 2013)

**Figure 35. Récepteurs plaquettaires ayant des rôles connus dans les métastases [226].**

## OBJECTIFS DE LA THESE

Comme exposé dans l'introduction, bien que les plaquettes soient principalement connues et étudiées pour leur fonction dans l'hémostase primaire et la thrombose, elles sont aussi particulièrement impliquées dans la régulation des réactions inflammatoires. En plus de réguler la perméabilité endothéliale ainsi que l'infiltration et les fonctions effectrices des leucocytes, les plaquettes interviennent également en permanence pour réparer les dégâts vasculaires générés au cours des réactions inflammatoires. C'est l'étude de ce dernier aspect dont les mécanismes et les implications physiopathologiques et thérapeutiques restent encore à préciser qui a été au centre de mon projet de thèse. Plus précisément, les objectifs de mes travaux de thèse ont été :

- de déterminer les rôles respectifs joués par les récepteurs plaquettaire GPVI et CLEC-2 dans la prévention des saignements inflammatoires (Article 1, publié en tant que co-1<sup>ère</sup> auteure dans Haematologica en 2018)
- d'évaluer les risques de saignements inflammatoires liés à l'utilisation d'un médicament anti-plaquettaire ciblant la GPVI (Article 2, soumis en tant que 1<sup>ère</sup> auteure dans Haematologica en 2020)
- de déterminer si les récepteurs plaquettaire GPVI et CLEC-2 sont impliqués dans la stabilisation des vaisseaux tumoraux (Article 3, en préparation)

## RESULTATS EXPERIMENTAUX

## ARTICLE 1

# The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent

Soumaya Jadoui, Julie Rayes, Siân Lax, Angèle Gros, Surasak Wichaiyo, Véronique Ollivier, Cécile V Denis, Jerry Ware, Bernhard Nieswandt, Martine Jandrot-Perrus, Steve P Watson, Benoît Hottin-Noé.

Publié dans Haematologica, juin 2018

## Introduction

Plusieurs observations cliniques et études expérimentales ont montré que les réactions inflammatoires étaient une source de dégâts vasculaires pouvant conduire à des saignements en cas de thrombocytopenie. Les mécanismes par lesquels les plaquettes préviennent les saignements inflammatoires restent mal connus mais 2 études ont suggéré un possible rôle prépondérant des récepteurs plaquettaires GPVI et CLEC-2 dans cette fonction [139]. En effet, en 2013, Boulaftali *et al.* ont montré qu'alors que la transfusion de plaquettes WT ou ayant un défaut d'activation dépendante des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) permettait de prévenir les saignements inflammatoires chez des souris thrombopéniques soumises soit à une dermatite immuno-induite (réaction passive d'Arthus ; rpA) soit à une inflammation pulmonaire induite inhalation de LPS, la transfusion de plaquettes ayant un déficit en GPVI ou CLEC-2 échouait à corriger le phénotype hémorragique des souris thrombopéniques dans ces 2 modèles [139]. Le rôle de la GPVI dans la prévention des saignements inflammatoires cutanés a par la suite été confirmé et précisé par Gros *et al.* qui à l'aide de souris GPVI<sup>-/-</sup> ont pu montrer que la GPVI participait à la réparation des brèches vasculaires causées par les neutrophiles recrutés au cours de la rpA [141]. Suite à ces résultats, nous avons donc voulu déterminer si CLEC-2 jouait un rôle comparable à celui de la GPVI dans la prévention des saignements inflammatoires. Afin de répondre à cette question, nous avons comparé le phénotype hémorragique de souris ayant un déficit en GPVI (souris GPVI<sup>-/-</sup>) et/ou CLEC-2 plaquettaire (souris PF4-Cre CLEC1b<sup>fl/fl</sup>) à celui de souris rendues thrombopéniques au cours de la rpA cutanée ou d'une inflammation aiguë des poumons induite par inhalation de LPS.

### The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent

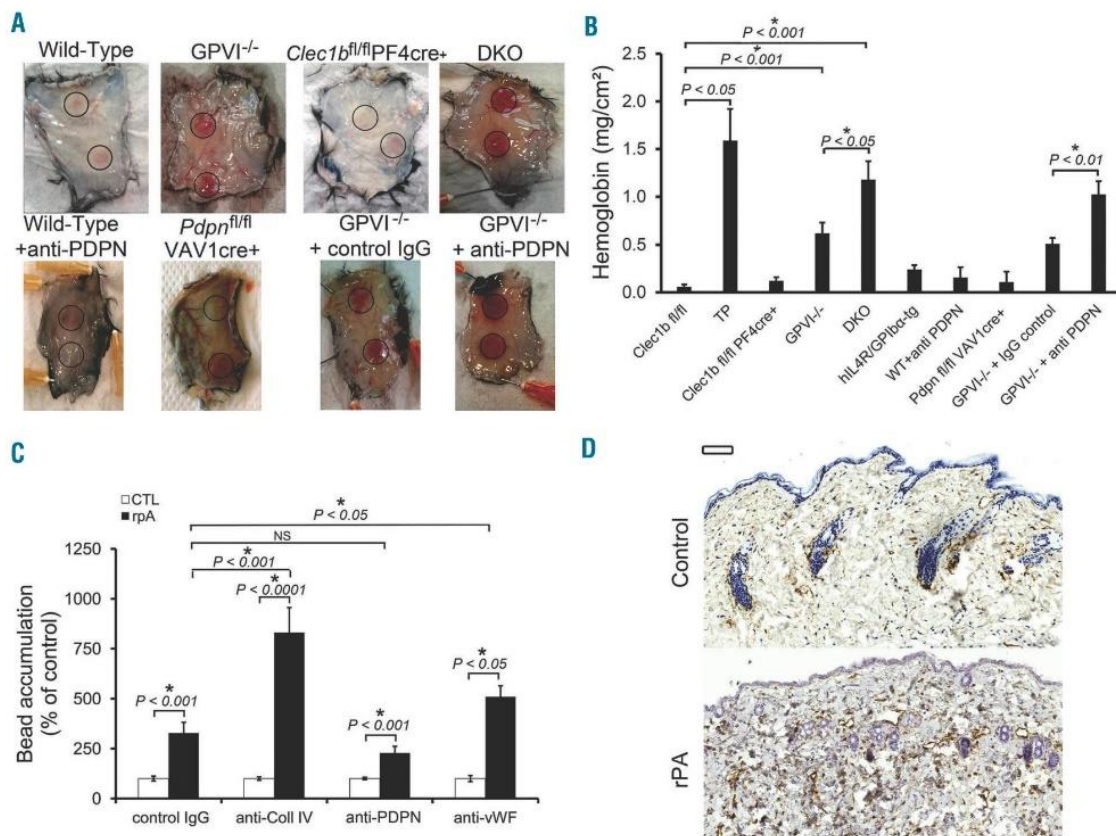
Platelets play a critical role in prevention of bleeding at sites of inflammation independent of “classical” hemostasis. For instance, in mouse models of immune complex-mediated skin inflammation and glomerulonephritis, early protective recruitment of platelets to the inflamed vasculature occurs without visual evidence of platelet aggregate formation as assessed by intravital microscopy or immunohistological analysis.<sup>1,2</sup> Furthermore, neither GPIb nor integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 are required for prevention of bleeding in the inflamed skin.<sup>1,3</sup>

A role for GPVI and CLEC-2 in prevention of bleeding following cutaneous reverse passive Arthus reaction (rpA) and LPS-induced lung inflammation has been reported following adoptive transfer of receptor-deficient platelets into hIL4R/GPIb $\alpha$  transgenic (hIL4R/GPIb $\alpha$ -tg) mice rendered thrombocytopenic with an antibody to hIL4R.<sup>4</sup> Using GPVI-deficient mice, the role of GPVI in limiting bleeding

in the cutaneous rpA model has been confirmed in mice with normal platelet count, and was shown to involve repairing of neutrophil-inflicted vascular injury.<sup>5</sup> The role of CLEC-2 in limiting bleeding in mice with a normal platelet count has not been investigated.

In order to address the contribution of platelet receptors to inflammation-mediated bleeding, we used cutaneous rpA and lung inflammation models. We compared the contribution of GPVI and targeted deletion of CLEC-2 and podoplanin to prevention of bleeding in the cutaneous rpA model. Mice with a deficiency in CLEC-2 on platelets or in its ligand podoplanin on all hematopoietic cells did not bleed (Figure 1A and B). This is in contrast to the petechial bleeding observed in GPVI-deficient mice (Figure 1A) which is mediated by repair of neutrophil-induced vascular injury.<sup>4,5</sup> Absence of bleeding in the CLEC-2-deficient mice was not due to altered neutrophil recruitment as this was comparable to that in GPVI-deficient mice (*Online Supplementary Figure S1*).

Mice lacking the extracellular domain of GPIb $\alpha$  did not bleed following cutaneous rpA (Figure 1B), confirming previous observations that prevention of bleeding in this



**Figure 1.** Platelet GPVI supports a first-line repair mechanism of inflammatory hemostasis in the inflamed skin with back up from the CLEC-2/podoplanin axis. Mice were subjected to cutaneous reverse passive Arthus reaction (rpA) and skin biopsies were collected after 4 hours of reaction. (A) Representative images of the rpA-challenged skin of wild-type (WT), GPVI deficient (GPVI<sup>-/-</sup>), CLEC-2 deficient (*Clec1b<sup>fl/fl</sup>/PF4cre+*) mice, and mice deficient in both receptors (DKO), WT mice treated with a blocking antibody to podoplanin (mAb 8.1.1 100  $\mu$ g/mouse, intravenous; anti-PDPN), mice with a deficiency of podoplanin in hematopoietic cells (*Pdpn<sup>fl/fl</sup>/VAV1cre+*), or GPVI<sup>-/-</sup> mice treated with a control or blocking antibody to podoplanin. (B) Hemoglobin content in inflamed and control skin biopsies. Platelet-depletion of WT mice served as a positive control. Induction of the rpA, led to significantly increased hemoglobin levels in GPVI<sup>-/-</sup> and DKO but not in platelet CLEC2-deficient mice. N=6. (C) Fluorescent microspheres (1  $\mu$ m-diameter) coated with control IgG or with antibodies to collagen (Coll IV), podoplanin (PDPN), or von Willebrand factor (vWF) were injected intravenously to mice 30 minutes after eliciting rpA. Accumulation at the site of rpA was quantified by flow cytometry analysis of digested skin biopsies. N=10 mice per group. Results are expressed as percentage of bead accumulation measured in unchallenged control skin biopsies. NS: not significant. (D) Representative images of unchallenged control and rpA-challenged skin biopsies from WT mice stained for podoplanin (brown) and hematoxylin (blue). Scale bar=100  $\mu$ m.

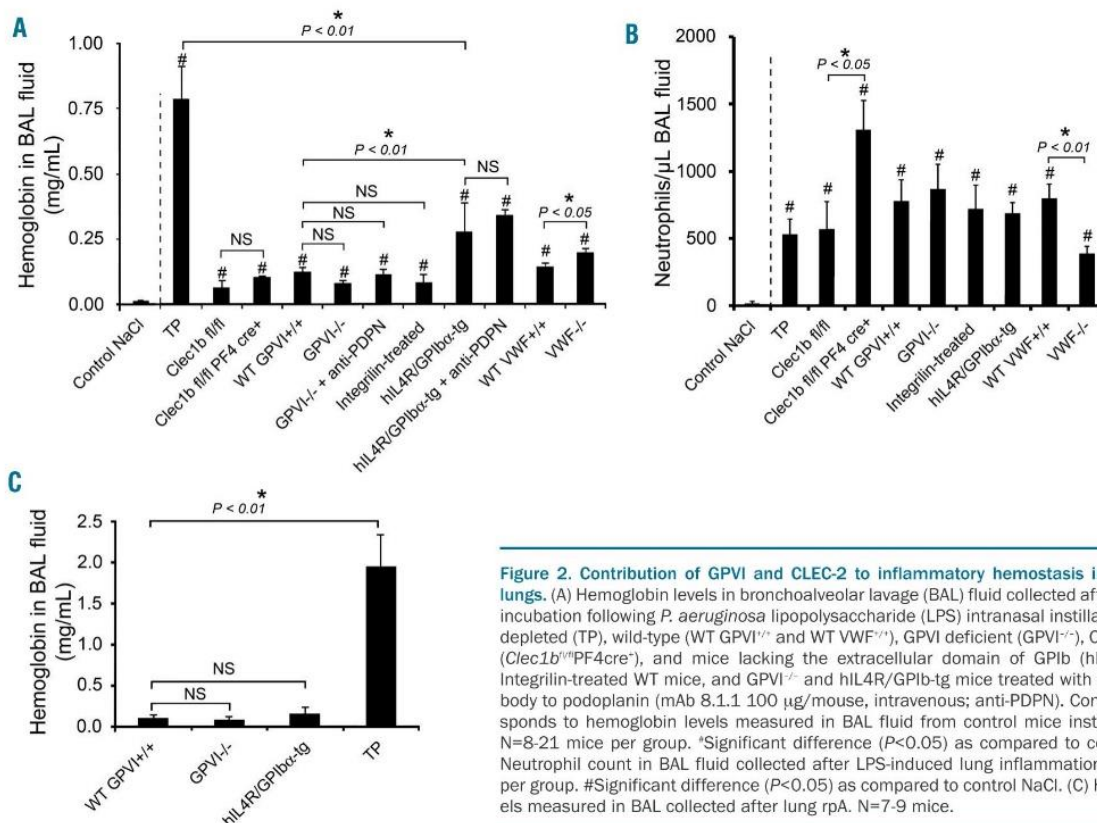
model is independent of the GPIIb/IIIa/von Willebrand factor (VWF) axis.<sup>6</sup> Nevertheless, bleeding in GPVI<sup>-/-</sup> mice was less severe than in thrombocytopenic mice, indicating involvement of one or more additional platelet receptors. Bleeding in mice deficient in GPVI and in platelet CLEC-2 (DKO) approached that of thrombocytopenic mice, and was similar to that in GPVI<sup>-/-</sup> mice treated with an anti-podoplanin blocking antibody (Figure 1A and B). These results show a potential role for CLEC-2/podoplanin axis in maintaining vascular integrity in the inflamed skin, only in the absence of GPVI.

The functional hierarchy between GPVI and CLEC-2 suggested possible differences in the exposure and/or localization of their respective ligands during cutaneous rpA. To investigate this, we compared the recruitment of microspheres (1 µm-diameter) coated with antibodies to podoplanin, collagen, VWF antibody or an irrelevant IgG to the reaction site (Figure 1C). Microspheres coated with antibodies to collagen or VWF but not to podoplanin accumulated significantly more than control microspheres. These results indicate that basement membrane components but not podoplanin become exposed and accessible to the circulation during cutaneous rpA. Concordantly, immunostaining shows that podoplanin is up-regulated in the extravascular space in the skin on macrophages and other stromal cells following rpA (Figure 1D and *Online Supplementary Figure S2A-C*). It appears that, in the absence of GPVI, engagement of platelet CLEC-2 by these podoplanin-positive cells limits bleeding in the inflamed skin. Supporting this hypothesis, platelets interacting with podoplanin-expressing cells were observed in the inflamed skin of GPVI<sup>-/-</sup> mice (*Online Supplementary Figure S2D*).

As previously shown,<sup>1</sup> immunodepletion of platelets

leads to pulmonary bleeding following LPS inhalation-induced lung inflammation (Figure 2A) and this is through neutrophil-mediated bleeding.<sup>7</sup> GPVI and platelet CLEC-2 have been shown to play a critical role in this model by adoptive transfer into the hIL4R/GPIIb-tg transgenic thrombocytopenic mouse model.<sup>4</sup> In contrast, however, bleeding was not observed following LPS challenge in mice deficient in GPVI or CLEC-2 (Figure 2A) even though neutrophil recruitment developed normally in GPVI<sup>-/-</sup> mice and was increased in platelet CLEC-2-deficient mice (Figure 2B), as previously shown.<sup>8</sup> Bleeding was also absent in mice treated with the blocking anti-podoplanin mAb 8.1.1 or the αIIbβ3 antagonist, integrilin (Figure 2A). These data show that GPVI, CLEC-2 and integrin αIIbβ3 are not required for prevention of bleeding in LPS-inflamed lungs.

The observation of moderate bleeding in hIL4R/GPIIb-tg mice in the absence of immunodepletion (Figure 2A) indicates a role for GPIIb-IX-V in maintenance of vascular integrity in the inflamed lung. Interestingly, bleeding in mice deficient in the GPIIb-IX-V ligand, VWF, was even milder than in hIL4R/GPIIb-tg mice (Figure 2A), thus suggesting that the protective function of GPIIb-IX-V in LPS-inflamed lungs does not solely depend on its interaction with VWF. A similar observation has been made for comparison of the roles of GPIIb-IX-V and VWF in models of arterial thrombosis.<sup>9</sup> In contrast to hIL4R/GPIIb-tg mice, however, VWF<sup>-/-</sup> mice were characterized by a reduction in neutrophil infiltration in LPS-inflamed lungs (Figure 2B) and this could account for the reduction in bleeding. Consistent with this, the role of VWF in mediating neutrophil recruitment in the cutaneous rpA model has been shown to be independent of GPIIb-IX-V.<sup>6</sup> Interestingly, the limited bleeding of hIL4R/GPIIb-tg mice following LPS inhalation com-



**Figure 2. Contribution of GPVI and CLEC-2 to inflammatory hemostasis in the inflamed lungs.** (A) Hemoglobin levels in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid collected after an overnight incubation following *P. aeruginosa* lipopolysaccharide (LPS) intranasal instillation in platelet-depleted (TP), wild-type (WT GPVI<sup>+/+</sup> and WT VWF<sup>+/+</sup>), GPVI deficient (GPVI<sup>-/-</sup>), CLEC-2 deficient (Clec1b<sup>fl/fl</sup>PF4<sup>cre+</sup>), and mice lacking the extracellular domain of GPIIb (hIL4R/GPIIb-tg), Integrilin-treated WT mice, and GPVI<sup>-/-</sup> and hIL4R/GPIIb-tg mice treated with a blocking antibody to podoplanin (mAb 8.1.1 100 µg/mouse, intravenous; anti-PDPN). Control NaCl corresponds to hemoglobin levels measured in BAL fluid from control mice instilled with NaCl. N=8-21 mice per group. \*Significant difference (P<0.05) as compared to control NaCl. (B) Neutrophil count in BAL fluid collected after LPS-induced lung inflammation. N=8-21 mice per group. #Significant difference (P<0.05) as compared to control NaCl. (C) Hemoglobin levels measured in BAL collected after lung rpA. N=7-9 mice.

pared to thrombocytopenic mice suggests the involvement of additional platelet receptors. Treatment of hIL4R/GPIb $\alpha$ -tg mice with an antibody to podoplanin, however, did not modify their bleeding phenotype, suggesting that the podoplanin-CLEC-2 axis does not provide a back-up mechanism.

The findings in this study show a difference in platelet receptor hierarchy in inflammatory hemostasis between the cutaneous rpA and LPS-induced lung inflammation models. To address whether this difference is model or organ dependent, we compared hIL4R/GPIb $\alpha$ -tg and GPVI $^{-/-}$  mice challenged with the rpA reaction in lung. Whereas pulmonary bleeding was observed following rpA in lung in thrombocytopenic mice, there was no bleeding in hIL4R/GPIb $\alpha$ -tg or GPVI $^{-/-}$  mice, in contrast to the results for rpA in skin (Figure 2C). This demonstrates that prevention of inflammatory bleeding in the rpA model is organ and stimulus dependent.

In conclusion, our results show that the role of GPVI, CLEC-2 and GPIb-IX-V in maintenance of inflammatory hemostasis is organ and stimulus dependent, demonstrating an unexpected complexity in the regulation of vascular integrity independent of classical hemostasis.

Julie Rayes,<sup>1</sup> Soumaya Jadoui,<sup>2</sup> Siân Lax,<sup>1</sup> Angèle Gros,<sup>2</sup> Surasak Wichaiyo,<sup>1</sup> Véronique Ollivier,<sup>2</sup> Cécile V. Denis,<sup>3</sup> Jerry Ware,<sup>4</sup> Bernhard Nieswandt,<sup>5</sup> Martine Jandrot-Perrus,<sup>2</sup> Steve P. Watson<sup>1,6\*</sup> and Benoît Ho-Tin-Noé<sup>2\*</sup>

\*JR and SJ and \*SPW and BH-T-N contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Institute of Cardiovascular Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, UK; <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR\_S1148, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Hôpital Bichat, France; <sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR\_S 1176, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>4</sup>Physiology and Biophysics, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA; <sup>5</sup>Chair of Experimental Biomedicine, University Hospital and University of Würzburg, Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, Germany and <sup>6</sup>Centre of Membrane Proteins and Receptors (COMPARE), Universities of

Birmingham and Nottingham, UK

Funding: this work was supported by grants from the British Heart Foundation (CH/03/003 and RG/13/18/30563), La Société Française d'Hématologie, Force Hémato, La Fondation Arc (PJA 20151203107), and L'INCA (RPT16002MMA).

Correspondence: s.p.watson@bham.ac.uk/  
benoit.ho-tin-noe@inserm.fr

doi:10.3324/haematol.2017.182162

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at [www.haematologica.org](http://www.haematologica.org).

## References

- Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood*. 2008;111(10):4958-4964.
- Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation*. 2009;120(13):1255-1265.
- Deppermann C, Kraft P, Volz J, et al. Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice. *Blood*. 2017;129(12):1702-1706.
- Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest*. 2013;123(2):908-916.
- Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, et al. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood*. 2015;126(8):1017-1026.
- Hillgruber C, Steingraber AK, Poppelmann B, et al. Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol*. 2014;134(1):77-86.
- Hillgruber C, Poppelmann B, Weishaupt C, et al. Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia. *J Exp Med*. 2015;212(8):1255-1266.
- Lax S, Rayes J, Wichaiyo S, et al. Platelet CLEC-2 protects against lung injury via effects of its ligand podoplanin on inflammatory alveolar macrophages in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(6):1016-1029.
- Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, et al. The role of platelet adhesion receptor GPIbalpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(45):16900-16905.



**The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent**

Julie Rayes,<sup>1\*</sup> Soumaya Jadoui,<sup>2\*</sup> Siân Lax,<sup>1</sup> Angèle Gros,<sup>2</sup> Surasak Wichaiyo,<sup>1</sup> Véronique Ollivier,<sup>2</sup> Cécile V. Denis,<sup>3</sup> Jerry Ware,<sup>4</sup> Bernhard Nieswandt,<sup>5</sup> Martine Jandrot-Perrus,<sup>2</sup> Steve P. Watson<sup>1,6#</sup> and Benoît Ho-Tin-Noé<sup>2#</sup>

\*JR and SJ and #SPW and BH-T-N contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Institute of Cardiovascular Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, UK; <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR\_S1148, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Hôpital Bichat, France; <sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR\_S 1176, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>4</sup>Physiology and Biophysics, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA; <sup>5</sup>Chair of Experimental Biomedicine, University Hospital and University of Würzburg, Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, Germany and <sup>6</sup>Centre of Membrane Proteins and Receptors (COMPARE), Universities of Birmingham and Nottingham, UK

Correspondence: [s.p.watson@bham.ac.uk/](mailto:s.p.watson@bham.ac.uk/)  
[benoit.ho-tin-noe@inserm.fr](mailto:benoit.ho-tin-noe@inserm.fr)  
doi:10.3324/haematol.2017.182162

## The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent

Julie Rayes, Soumaya Jadoui, Siân Lax, Angèle Gros, Surasak Wichaiyo, Véronique Ollivier, Cécile V. Denis, Jerry Ware, Bernhard Nieswandt, Martine Jandrot-Perrus, Steve P. Watson and Benoît Ho-Tin-Noé.

### Supplemental Information

#### Methods

##### Mice

GPVI<sup>-/-1, 2</sup>, *Clec1b*<sup>fl/fl</sup>PF4cre<sup>3</sup>, double KO (DKO), Pdpn<sup>fl/fl</sup>VAV1cre<sup>+4</sup>, hIL4R/GPIb $\alpha$ -tg<sup>5</sup>, VWF<sup>-/-6</sup> have been described previously. The lung inflammation model was approved by the Animal Care and Use Committee of the Claude Bernard Institute (Paris); the rpA model was undertaken under UK Home Office licence 70/8359 and the Animal Care and Use Committee of the Claude Bernard Institute.

##### Lung inflammation model

Sedated mice were inoculated intranasally with 20  $\mu$ g LPS from *Pseudomonas aeruginosa* prepared in 60  $\mu$ L of saline (30  $\mu$ L/nostril). Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed 24 hours later by cannulating the trachea with an 18-gauge angiocath and lavaging the lungs 2 times with 1 mL sterile PBS supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA) and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The BAL fluid was then centrifuged (8 min at 2000g) and pelleted cells were resuspended in 75  $\mu$ L PBS. A fraction of the resuspended cells was used for analysis in flow cytometry after combined fluorescent staining of CD45 and Ly6G for determination of neutrophil counts. The remaining fraction of cells was lysed by sonication to release haemoglobin from red blood cells, centrifuged (5 min at 10,000g), and haemoglobin concentration measured in supernatants as described<sup>7</sup>.

For induction of the rpA reaction in lungs, mice were inoculated intranasally with 60  $\mu$ g rabbit anti-BSA IgG prepared in 60  $\mu$ L of saline (30  $\mu$ L/nostril) immediately followed by IV injection of BSA (50  $\mu$ g/g mouse) in 50  $\mu$ L saline.

##### Cutaneous reverse passive Arthus reaction

The cutaneous rpA was induced in the back skin of mice as described previously<sup>7</sup>. Briefly, the reaction was elicited by intradermal injection of rabbit anti-BSA IgG (60  $\mu$ g in 20  $\mu$ L saline, 2 spots/mouse) immediately followed by intravenous injection of BSA (50  $\mu$ g/g mouse) in saline. Mice were

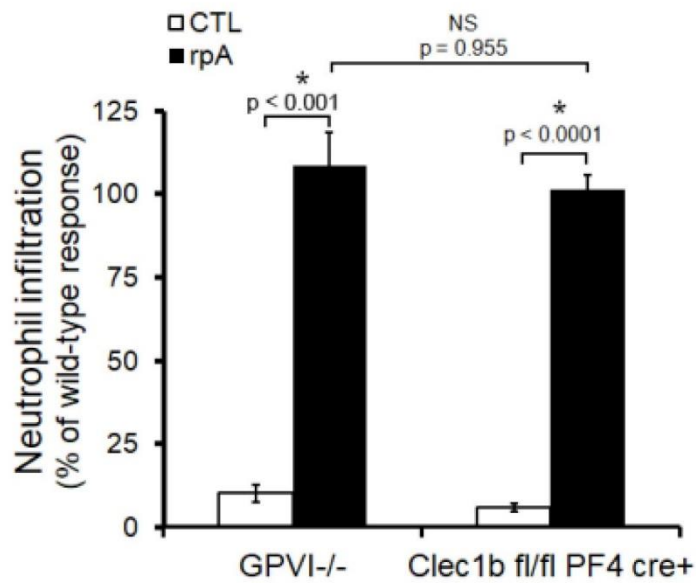
ethanized after 4 hours and skin biopsies at control and reaction sites harvested for haemoglobin determination and/or myeloperoxidase content<sup>7</sup>.

### **Preparation of functionalized fluorescent microspheres**

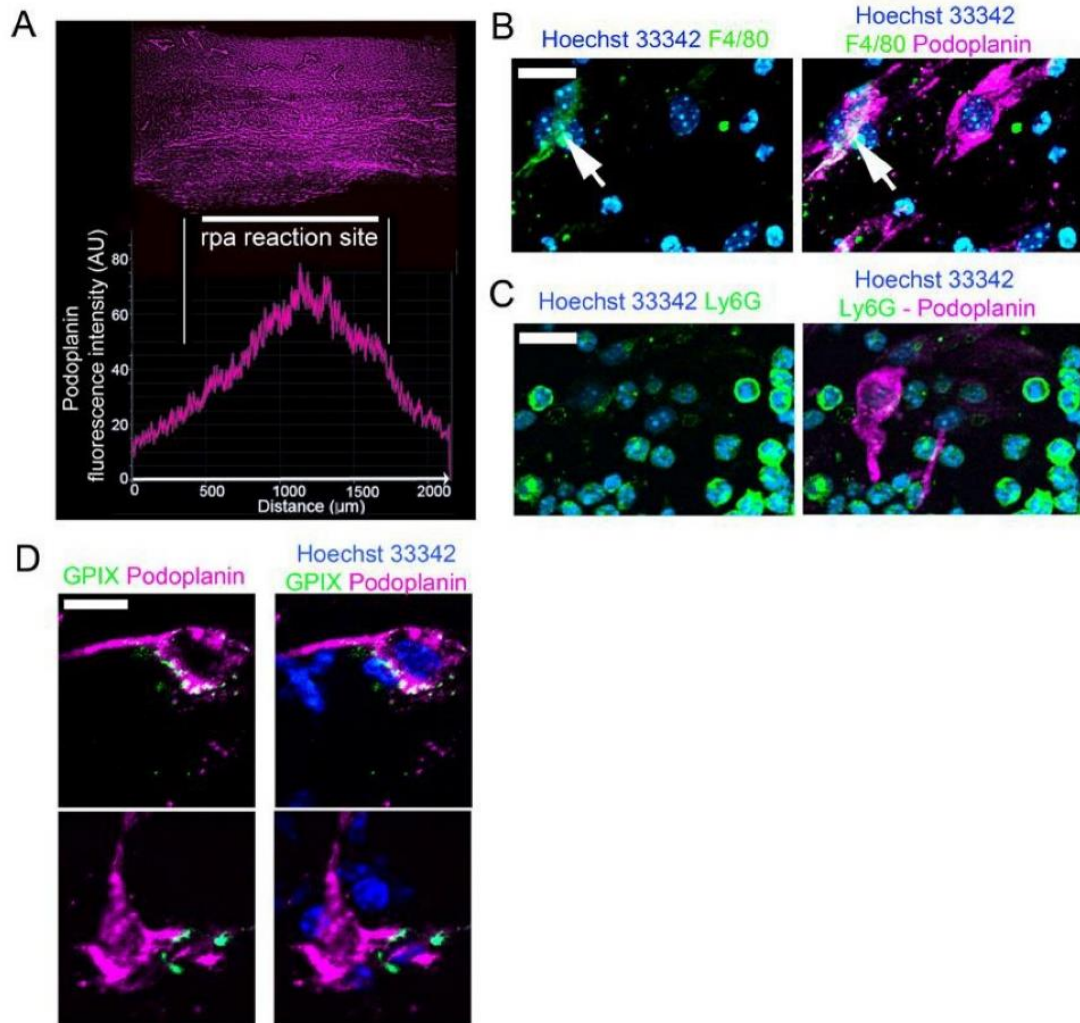
Yellow Green, Nile Red, Crimson, or Blue fluorescent microspheres (FluoSpheres Carboxylate-Modified Microspheres, 1  $\mu\text{m}$ -diameter, Molecular Probes, Life Technologies, Saint Aubin, France) were coated at 2  $\mu\text{g}$  of IgG/ $\text{cm}^2$  bead surface area following the manufacturer's instructions. The following antibodies were used for coating: rabbit anti- mouse collagen IV (PA1-26148, Thermo Fisher Scientific), hamster anti-mouse podoplanin (mAb 8.1.1), and sheep anti-mouse vWF (Abcam 11713). Microspheres were injected at  $200 \cdot 10^6$  beads/mouse in saline.

**Statistics** Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and were compared by the Mann-Whitney *U* test. *P* values  $<0.05$  were regarded as statistically significant.

## Supplemental Figures



**Supplemental Figure 1. Comparison of neutrophil recruitment to the skin during the cutaneous rpA between GPVI<sup>-/-</sup> and platelet CLEC2-deficient mice.** Quantification and comparison of neutrophil recruitment in control and rpA challenged skin biopsies as assessed by measurement of skin myeloperoxidase (MPO) content. Results are expressed as percent relative to the mean MPO content measured in rpA-challenged skin biopsies of control GPVI<sup>+/+</sup> wild-type mice. n = 5-9 mice per group.



**Supplemental Figure 2. Podoplanin expression in the skin during the cutaneous rpa reaction. A.** Representative image of a full thickness immunofluorescence staining for podoplanin (purple) in WT inflamed skin. The corresponding fluorescence intensity profile measured along a line-scan drawn parallel to the skin surface is shown below the image. **B.** Immunofluorescence staining for nuclei (blue, Hoechst 33342), macrophages (green, F4/80) and podoplanin (purple) in the inflamed skin of a WT mouse. White arrow shows a podoplanin-expressing macrophage. Bar = 20  $\mu\text{m}$ . **C.** Immunofluorescence staining for nuclei (blue, Hoechst 33342), neutrophils (green, Ly6G) and podoplanin (purple) in the inflamed skin of a WT mouse. Bar = 20  $\mu\text{m}$ . **D.** Immunofluorescence staining for nuclei (blue, Hoechst 33342), platelets (green, GPIX) and podoplanin (purple) in the inflamed skin of  $\text{GPVI}^{-/-}$  mice. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

## References

1. Kato K, Kanaji T, Russell S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*. 2003;102:1701-1707.
2. Bender M, Hagedorn I, Nieswandt B. Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl<sub>3</sub> -induced thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9:1423-1426.
3. Finney BA, Schweighoffer E, Navarro-Nunez L, et al. CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood*. 2012;119:1747-1756.
4. Hitchcock JR, Cook CN, Bobat S, et al. Inflammation drives thrombosis after Salmonella infection via CLEC-2 on platelets. *J Clin Invest*. 2015;125:4429-4446.
5. Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 2002;100:2102-2107.
6. Hillgruber C, Steingraber AK, Poppelmann B, et al. Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol*. 2014;134:77-86.
7. Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, et al. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood*. 2015;126:1017-1026.

## Résumé des résultats et conclusion

Alors que des études antérieures avaient suggéré que les récepteurs plaquettaires à motif ITAM et notamment le récepteur GPVI contribuaient à la prévention des saignements inflammatoires, le rôle de CLEC-2 devait être confirmé et les mécanismes précisés. L'induction d'une rpA chez des souris génétiquement modifiées et présentant un déficit en CLEC-2 uniquement sur la lignée mégacaryocytaire ( $Clec2^{fl/fl}$  PF4Cre+) a montré que ce récepteur n'était pas nécessaire à la prévention des saignements inflammatoires lors de la rpA cutanée ou en cas d'inhalation de LPS. De plus, nos résultats montrent qu'alors que la GPVI est requise pour la prévention des saignements lors de la rpA cutanée, elle n'est pas impliquée dans la prévention des saignements pulmonaires induits par inhalation de LPS ou même par formation de complexes immuns. Ainsi, en prenant l'exemple de la GPVI, nos résultats montrent que la contribution respective des récepteurs plaquettaires à la prévention des saignements inflammatoires est à la fois dépendante de l'organe touché et du stimulus inflammatoire.

Par ailleurs, bien que le récepteur CLEC-2 n'apparaisse pas indispensable à la prévention des saignements inflammatoires dans les modèles testés ici, nous avons observé que les saignements inflammatoires chez les souris ayant un déficit à la fois en GPVI et CLEC-2 présentaient des saignements inflammatoires plus importants que les souris GPVI<sup>-/-</sup> suggérant que CLEC-2 pourrait compenser partiellement l'absence de GPVI.

## ARTICLE 2

# Glenzocimab does not impact glycoprotein VI-dependent inflammatory hemostasis

Soumaya Jadoui, Ophélie Le Chapelain, Véronique Ollivier, Ali Mostefa-Kara, Lucas Di Meglio, Sébastien Dupont, Keltouma Maafa, Jean-Philippe Desilles, Mikaël Mazighi, Bernhard Nieswandt, Stéphane Loyau, Martine Jandrot-Perrus, Benoit Ho-Tin-Noé.

Article soumis à la revue Haematologica (révision mineure).



## Introduction

De nombreuses études *in vitro*, en chambres de perfusion, et *in vivo*, dans des modèles animaux de thrombose, indiquent qu'au contraire de son rôle mineur dans l'hémostase primaire, la GPVI jouerait un rôle central dans la thrombose artérielle. En effet, bien que les souris présentant une délétion génétique de GPVI aient un compte plaquettaire normal et ne présentent qu'une légère augmentation de leur temps de saignement, ces souris sont protégées de la thrombose dans différents modèles (thromboembolisme et blessure mécanique) [254]. L'absence de trouble majeur de l'hémostase en cas de déficit génétique en GPVI est par ailleurs confirmée par les données cliniques des quelques patients ayant un tel déficit et chez qui seule une diathèse hémorragique mineure a jusqu'ici été décrite (ecchymoses, pétéchies, épistaxis et saignements gingivaux) [255]. Ces données indiquant que le blocage de la GPVI n'aurait que peu d'incidence sur l'hémostase primaire tout en permettant une possible protection vis-à-vis de la thrombose ont stimulé la production de nouveaux antiplaquettaires ciblant la GPVI. Cependant, nos données récentes ayant révélé que la GPVI jouait un rôle essentiel dans la prévention des saignements inflammatoires cutanés, des questions sont apparues concernant la sécurité présumée liée à l'utilisation des anti-GPVI, en particulier en contexte inflammatoire. Pour ces raisons, nous avons étudié l'impact d'un anti-GPVI nouvellement développé, le Glencocimab (ACT017, Acticor Biotech), sur l'hémostase inflammatoire dépendante de la GPVI.

## **Glenzocimab does not impact glycoprotein VI-dependent inflammatory hemostasis.**

**Running head:** Glenzocimab and inflammatory hemostasis

Soumaya Jadoui<sup>1</sup>, Ophélie Le Chapelain<sup>1</sup>, Véronique Ollivier<sup>1</sup>, Ali Mostefa-Kara<sup>1</sup>, Lucas Di Meglio<sup>1</sup>, Sébastien Dupont<sup>1</sup>, Angèle Gros<sup>1</sup>, Jean-Philippe Desilles<sup>1,2</sup>, Mikaël Mazighi<sup>1,2</sup>, Bernhard Nieswandt<sup>3</sup>, Stéphane Loyau<sup>1</sup>, Martine Jandrot-Perrus<sup>1</sup>, Pierre H Mangin<sup>4</sup>, Benoit Ho-Tin-Noé<sup>1#</sup>.

<sup>1</sup>*Université de Paris, LVTS, Inserm U1148, F-75018 Paris, France.*

<sup>2</sup>*Rothschild Foundation Hospital, Paris, France. Department of Interventional Neuroradiology.*

<sup>3</sup>*University Hospital Würzburg, Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, Würzburg, Germany.*

<sup>4</sup>*Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France.*

#Correspondence:

Benoît Ho-Tin-Noé, PhD.

Laboratory of Vascular Translational Science, INSERM U1148, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard

75877 Paris Cedex 18 France.

Fax: + 33 (0) 1 40 25 86 02.

Tel: + 33 (0) 1 40 25 86 00.

[benoit.ho-tin-noe@inserm.fr](mailto:benoit.ho-tin-noe@inserm.fr)

## **Abstract**

**Background.** The blocking anti-glycoprotein VI (GPVI) Fab ACT017 (Glenzocimab) has emerged as a promising new drug because it inhibits platelet aggregation and arterial thrombosis without increasing bleeding time. However, recent studies have shown that GPVI contributes to repairing of neutrophil-induced injury in the inflamed skin. These results have suggested that GPVI inhibition could increase the risk of bleeding in inflamed organs. Here, we investigated the risk of inflammation-induced bleeding associated with GPVI deficiency and upon pharmacological inhibition of GPVI by ACT017.

**Methods.** The contribution of GPVI to prevention of inflammation-induced bleeding was assessed by subjecting GPVI<sup>+/+</sup>, GPVI<sup>-/-</sup>, and platelet-depleted mice to transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO), LPS-induced lung inflammation, and immune complex-mediated skin inflammation. The impact of ACT017 on GPVI-dependent inflammatory hemostasis was then evaluated using mice humanized for GPVI (hGPVI mice).

**Results.** In contrast to platelet depletion, GPVI deficiency did not increase the risk of bleeding following tMCAO or LPS-induced acute lung inflammation. However, GPVI<sup>-/-</sup> mice showed abnormal bleeding during immune complex-induced skin inflammation. Thus, while GPVI is dispensable for inflammatory hemostasis in the brain and lungs, it is primarily involved in this function in the skin. After confirming the ability of ACT017 to inhibit the adhesion and activation onto collagen of platelets from hGPVI mice under flow conditions, hGPVI mice subjected to immune complex-mediated skin inflammation or bearing skin tumors were treated with ACT017. Unlike acute depletion of platelets, ACT017 treatment did not cause bleeding in the inflamed skin or skin tumors of hGPVI mice.

**Conclusion.** Pharmacological blocking of GPVI by ACT017 does not impair GPVI-mediated inflammatory hemostasis. Our results thus indicate a favorable safety profile of ACT017 in inflammatory situations.

## Introduction

Over the past 10 years, results from several groups have highlighted the hemostatic function of platelets in various inflamed organs<sup>1</sup>. Yet, to date, the impact of antiplatelet drugs on inflammation-associated hemostasis remains largely uninvestigated at the preclinical stage. Preclinical evaluation of possible bleeding complications of antiplatelet and antithrombotic treatments is indeed restricted to time bleeding assays, like the tail bleeding time in mice<sup>2,3</sup> or the forearm bleeding time in non-human primates<sup>4,5</sup>. Whereas such assays can help evaluate the risk of bleeding associated with trauma or surgery, they may not predict the risk of bleeding associated with inflammation. In fact, there is evidence that the mechanisms of inflammation-associated hemostasis can differ substantially from those supporting “classical” hemostasis. For instance, there are several inflammatory situations where hemostasis does not require platelet granule secretion and GPIIbIIIa-mediated aggregation<sup>6</sup>, both of which processes are known to be fundamental for hemostasis following traumatic injury. Assessment of the risk of inflammation-induced bleeding thus appears as a blind spot of preclinical safety evaluation of antiplatelet drugs. Evaluation of this risk may however be necessary to achieve maximum safety, especially if one considers that inflammation-induced bleeding can affect many organs including vital organs like the brain and lungs<sup>7</sup>, and that there is an increasing interest in expanding the use of antiplatelet drugs beyond the field of thrombosis to those of inflammatory diseases<sup>8</sup> and cancers<sup>9</sup>.

Glycoprotein VI (GPVI), the main platelet receptor for collagen, has emerged as a new target for antithrombotic therapy because its blocking inhibits platelet aggregation and arterial thrombosis without increasing bleeding time<sup>2,10-12</sup>. Furthermore, so far, only a very mild bleeding diathesis has been reported in the few patients identified with a GPVI deficiency<sup>13</sup>. While these data have stimulated the development of new antiplatelet drugs targeting GPVI,

recent experimental evidence has indicated that, though dispensable for primary hemostasis, GPVI is essential for prevention of neutrophil-induced bleeding in various inflamed organs and tissues, primarily the skin<sup>14,15</sup>. Mice with a genetic deficiency in GPVI<sup>14,15</sup> or immunodepleted for GPVI<sup>16</sup> were indeed shown to present abnormal cutaneous bleeding in a model of immune complex-mediated dermatitis, the reverse passive Arthus reaction (rpA). Remarkably, the bleeding phenotype of GPVI-deficient mice subjected to the cutaneous rpA was in stark contrast with the absence of bleeding observed in mice with defects affecting other major pathways of platelet activation<sup>6,7,14,16</sup>. Later studies have indicated that the functional hierarchy between platelet receptors in inflammation-associated hemostasis varies with both the inflammatory stimulus and site of inflammation<sup>14</sup>. Thus, the predominant role of GPVI in mediating the hemostatic action of platelets in immune complex-mediated dermatitis cannot be generalized to all inflammatory situations. Nevertheless, that GPVI is in first-line to prevent bleeding in the inflamed skin has raised the possibility that pharmacological targeting of GPVI could increase the risk of bleeding in inflamed organs. Furthermore, there is evidence that the protective hemostatic role of GPVI during the cutaneous rpA also applies to other inflammatory contexts like in certain tumors<sup>17</sup> and possibly in inflamed lungs, though there is conflicting evidence on the importance of GPVI in preventing inflammatory bleeding in the latter organ<sup>14,16</sup>. In a context where new antiplatelet drugs targeting the collagen/GPVI axis have been recently developed, it thus appears important to assess and anticipate the yet uninvestigated risk of inflammation-induced bleeding under GPVI antagonists.

Among the newly developed drugs targeting GPVI, ACT017 (Glenzocimab, Acticor Biotech) is a humanized antibody fragment (Fab) that has already completed its phase I clinical trial in healthy volunteers<sup>18</sup> and just entered a phase II trial in stroke patients (Acute Ischemic Stroke Interventional Study “ACTIMIS”, NCT03803007). The antithrombotic potential of ACT017

and of its murine precursor, Fab 9O12, has been demonstrated *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*<sup>2,19,20</sup>. ACT017 and Fab 9O12 both bind to human GPVI and inhibit the procoagulant activity and aggregation of collagen-stimulated platelets, as well as platelet adhesion and thrombus formation onto collagen surfaces under arterial flow conditions<sup>2,19,20</sup>. Moreover, Fab 9O12 collagen-epinephrine-induced acute pulmonary thrombosis in transgenic mice expressing human GPVI (hGPVI mice)<sup>2</sup>. Notably, the inhibitory action of ACT017 occurs without causing thrombocytopenia or depletion of GPVI, and is not associated with spontaneous bleeding events or increased bleeding time<sup>20</sup>. Here, using the cutaneous rpA as a model situation where GPVI plays a major role in inflammatory hemostasis, we investigated whether ACT017 increases the risk of inflammation-induced bleeding.

## **Results and Discussion**

We first assessed the contribution of GPVI to the prevention of inflammation-induced bleeding by platelets in the brain and lungs. In agreement with previous results obtained with an antibody causing depletion of mouse GPVI<sup>21,22</sup>, there was no cerebral hemorrhage in any of the GPVI<sup>-/-</sup> mice subjected to transient (90 min) middle cerebral artery occlusion (Figure 1A). In contrast, cerebral hemorrhage occurred in all mice that had been rendered severely thrombocytopenic by the mean of a platelet-depleting antibody (Figure 1A). Genetic deficiency in GPVI was not associated with an increased bleeding risk in the model of acute lung injury induced by LPS inhalation either (Figure 1B). In the cutaneous rpA, as predicted by previous reports<sup>14-16</sup>, GPVI<sup>-/-</sup> mice developed skin bleeding at the inflammatory reaction site, a bleeding phenotype that was seen neither in GPVI<sup>+/+</sup> mice nor in GPVI<sup>+/-</sup> mice, which expressed half of normal GPVI surface levels (Figure 1C-D). Taken together, these results are consistent with evidence that GPVI is dispensable for hemostasis in the inflamed brain and lungs<sup>14,21-23</sup> but primarily involved in the

prevention of bleeding in the rpA-inflamed skin. Notably, they further indicate that 50% of normal GPVI surface levels are sufficient for hemostasis during the cutaneous rpA.

The ability of ACT017 to inhibit collagen/GPVI interactions and their functional consequences has been previously demonstrated in humans and in nonhuman primates<sup>20</sup>. However, it has not been tested in hGPVI mice. We thus verified the activity of ACT017 against GPVI from hGPVI mice. Like its murine precursor Fab 9O12<sup>2</sup>, ACT017 added to whole blood from hGPVI mice caused a drastic reduction in platelet adhesion and aggregation onto collagen fibers under arterial flow conditions (Figure 2A-B, Supplemental Movie). We next tested whether hGPVI mice treated with therapeutic (16 mg/kg) or higher doses of ACT017 (32 and 64 mg/kg) were sensitized to inflammation-induced bleeding during the cutaneous rpA. No bleeding occurred in ACT017-treated hGPVI mice, whatever the dose of ACT017 used (data not shown and Figure 2C-D). There was no bleeding either when ACT017 at the highest dose tested (64 mg/kg) was given through a continuous infusion over the 4 hours of rpA (data not shown). The absence of bleeding in hGPVI mice treated with ACT017 was in contrast to the petechial bleeding observed in GPVI<sup>-/-</sup> mice (Figure 1) and in platelet-depleted GPVI<sup>+/+</sup> and hGPVI mice (Figures 1C-D and 2C-D), which is known to be a consequence of neutrophil recruitment<sup>15</sup>. Absence of bleeding in rpA-challenged hGPVI mice treated with ACT017 was not due to altered neutrophil recruitment as this was comparable to that in hGPVI mice (Figure 2E). Interestingly, the latter result indicates that ACT017 does not impact neutrophil recruitment, at least in this model.

Solid tumors represent another inflammatory situation in which platelets were shown to continuously prevent leukocyte-induced bleeding and recent data have suggested that GPVI could be central to this function<sup>17</sup>. Like in the cutaneous rpA, acute treatment of hGPVI mice bearing skin tumors with ACT017 did not cause tumor bleeding. The absence of effect of

ACT017 on tumor vessel stability was in contrast to that of acute depletion of platelets, which caused tumor bleeding (Figure 2F).

In conclusion, in addition to confirming that GPVI is not required for inflammation-associated hemostasis in 2 vital organs, the brain and lungs, our results show that pharmacological blockade of GPVI by ACT017 does not impair GPVI-dependent inflammatory hemostasis. There are several non-exclusive reasons that could explain why pharmacological inhibition of GPVI by ACT017 does not reproduce the bleeding phenotype of GPVI<sup>-/-</sup> mice evidenced in the cutaneous rpA. First, it was shown previously that GPVI can cooperate with other platelet receptors like integrin alpha2beta1 to provide residual collagen-dependent platelet activation when its collagen binding site is blocked pharmacologically<sup>24</sup>. Furthermore, while ACT017 blocks the interactions between GPVI and collagen, it remains unknown whether ACT017 has similar blocking effects towards the other ligands of GPVI. Besides collagen, whose role in recruiting platelets to the inflamed skin vasculature remains to be demonstrated, fibrin(ogen) and a number of adhesive proteins of the vessel wall have been reported as GPVI ligands (e.g. laminin, fibronectin and vitronectin) and could thus provide redundant binding mechanisms. Moreover, were collagen to be the ligand supporting the adhesion of platelets to inflamed skin vessels, it is interesting to note that despite a drastic reduction in platelet adhesion and aggregation onto fibrillar collagen in the presence of ACT017 (Figure 2A-B, Supplemental Movie), residual platelet adhesion was observed. Considering that individual platelets and platelet monolayers were shown to ensure hemostasis at sites of mild inflammatory vascular injury<sup>1</sup>, such residual adhesion could be sufficient for inflammatory hemostasis. Previous studies have shown that platelets are particularly efficient in maintaining vascular integrity in inflamed organs, as platelet counts as low as 10% can support this function<sup>1</sup>. Consistent with this notion, GPVI<sup>+/-</sup> mice with half of normal GPVI surface levels showed normal hemostasis during the cutaneous rpA (Figure 1C-D). All in all, our results indicate that the highly favorable



safety profile of ACT017 suggested by previous results in bleeding time assays and by the absence of adverse bleeding events in the phase I clinical trial<sup>18</sup> also applies to inflammatory situations.

## **Material and methods**

### **Mice**

GPVI<sup>-/-</sup> mice and mice humanized for GPVI (hGPVI mice) on C57BL/6J background have been described previously<sup>2,15</sup>. Use of animals was approved by local and national review committees.

### **Transient middle cerebral artery occlusion**

Transient focal cerebral ischemia was induced in mice weighing 25±2g by occluding the right middle cerebral artery (MCA) with a 7.0 siliconized monofilament inserted through the common carotid artery (CCA). During the procedure, mice were anesthetized with an air/isoflurane mixture (5% for induction and 1% during surgery). Body temperature was maintained at 37°C (± 1.0°C) using a heating pad. The monofilament was carefully withdrawn and the CCA tied off after 90 min of occlusion.

### **Acute lung inflammation**

Acute lung inflammation was induced by inhalation of lipopolysaccharide (LPS) from *Pseudomonas aeruginosa* (20 µg in saline, 30 µL per nostril, Sigma-Aldrich, France) as described previously<sup>14</sup>.

### **Reverse passive Arthus reaction**

The cutaneous rpA and quantification of skin haemoglobin and myeloperoxidase content were performed as described previously<sup>14</sup>.

### **Tumor cell culture and implantation**

Murine B16F1 melanoma cells were cultured, implanted, and excised 10 days after implantation for measurement of intratumor haemoglobin content as described previously<sup>7</sup>.

## **Thrombocytopenia**

Severe thrombocytopenia was induced using the R300 antibody to mouse GPIIb/IIIa (Emfret, Analytics, 2 µg/g mouse). The antibody was injected intravenously immediately after LPS inhalation and rpA initiation, 3 hours after induction of cerebral ischemia, or 14 days after tumor cell injection.

## **Treatment with ACT017**

ACT017 was a gift from Acticor Biotech. For the cutaneous rpA, three different doses of ACT017 were tested: 16 mg/kg, 32 mg/kg, and 64 mg/kg mouse. Each dose was given in two equal fractions separated by 2 hours, and half of each dose fraction was injected intravenously and the other half intraperitoneally.

In a subset of experiments, 4 mice were anesthetized with an air/isoflurane mixture (5% for induction and 1%), and ACT017 was administered as a bolus (6.4 mg/kg) followed by continuous infusion of the remainder over 4 hours through a catheter inserted in the tail vein and for a total dose of 64 mg/kg.

In tumor bearing mice, ACT017 was injected at 64 mg/kg on day 14 after tumor cell implantation. ACT017 was given in two equal fractions separated by 4 hours, and the mice were euthanized 8 hours after the first injection.

## **Flow chamber experiments**

Citrated whole blood from hGPVI mice was labeled with DIOC6 (5 µM, Sigma-Aldrich, France), incubated with ACT017 (80 µg/mL) or vehicle (20 mM sodium citrate, 130 mM sodium chloride, pH 5.0) for 10 min, and then perfused at a wall shear rate of 1500 s<sup>-1</sup> over Vena8Fluor+Biochip microchannels (Cellix, Dublin, Ireland) pre-coated with fibrillar collagen

(50 µg/mL, Horm, Nycomed, Munich, Germany). Platelet adhesion was recorded for 3 min using an Orca R2 camera (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ, USA) mounted on a Zeiss Axiovert microscope. At the end of the flow, the channels were rinsed with PBS, and still images were acquired for quantification of platelet-coated surface areas using the Histolab software.

### **Statistics**

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and pairwise comparisons were made using the non-parametric Wilcoxon or Mann-Whitney U test as appropriate. *P* values <0.05 were regarded as statistically significant.

## **Disclosures**

M. Jandrot-Perrus is the founder of Acticor Biotech. The other authors report no conflicts.

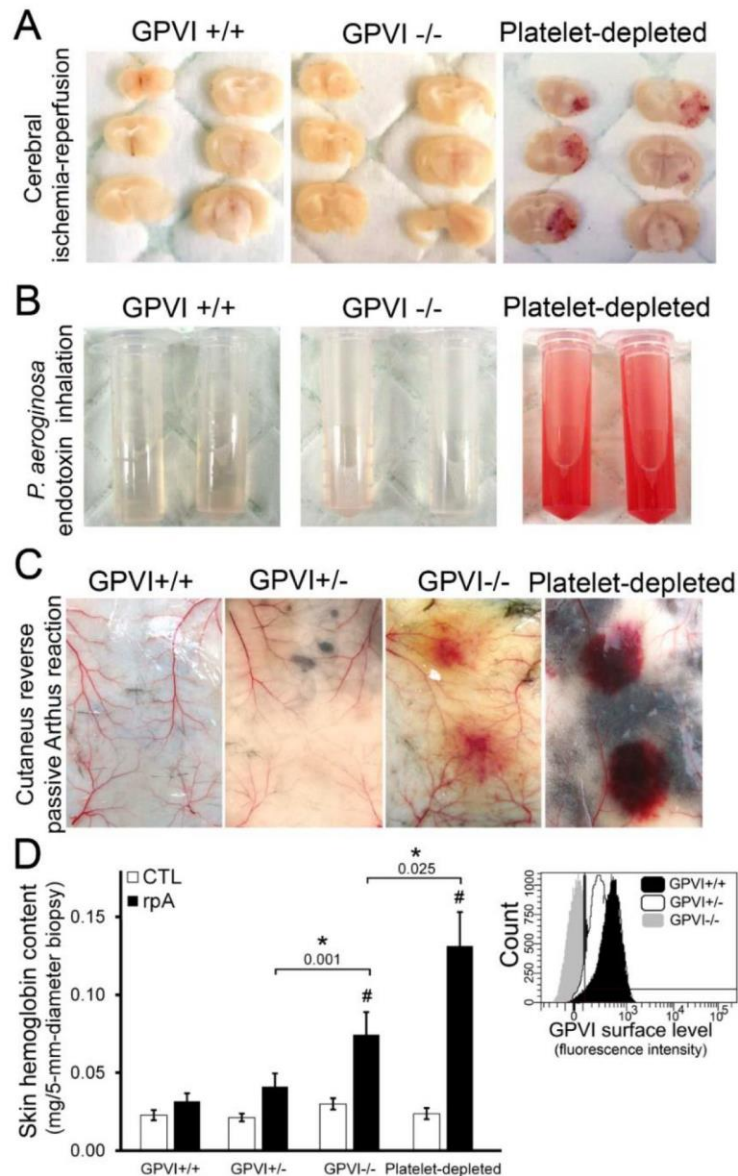
## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from INCA (2016-09/435/NI-KA), La Fondation Arc (PJA 20151203107), La Fondation pour la Recherche Médicale (grant #DPC20171138959), and by public grants overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the Investments for the Future program (PIA) under grant agreement No. ANR-18-RHUS-0001 (RHU Booster) and BPI (CMI2 project TherAVC2.0). Soumaya Jadoui was awarded a grant from la Société Française d'Hématologie.

## References

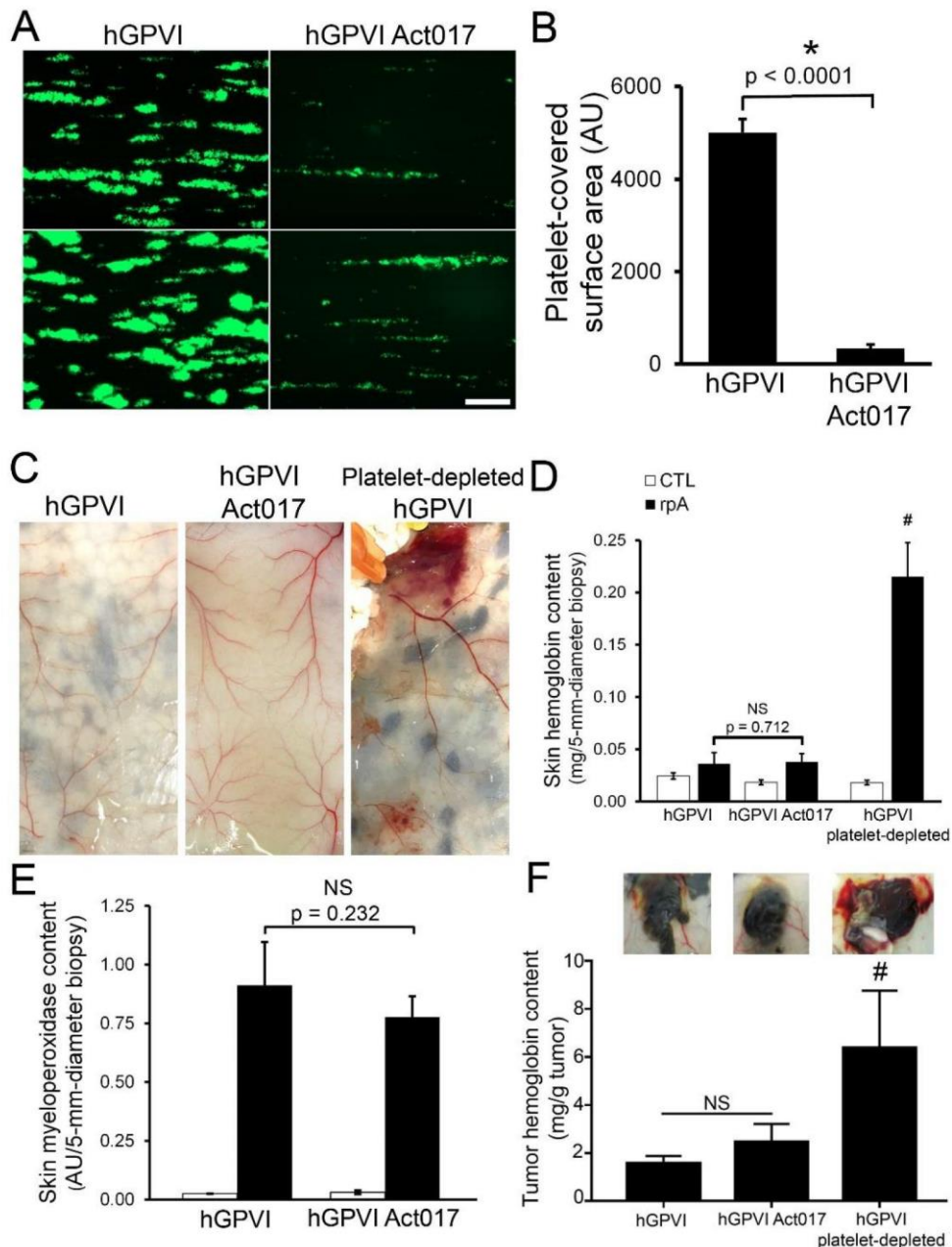
1. Ho-Tin-Noé B, Boulaftali Y, Camerer E. Platelets and vascular integrity: How platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood* 2018;131(3):277–288.
2. Mangin PH, Tang CJ, Bourdon C, et al. A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;341(1):156–163.
3. Ungerer M, Li Z, Baumgartner C, et al. The GPVI - Fc Fusion Protein Revacept Reduces Thrombus Formation and Improves Vascular Dysfunction in Atherosclerosis without Any Impact on Bleeding Times. *PLoS One*;8(8):.
4. Lebozec K, Jandrot-Perrus M, Avenard G, Favre-Bulle O, Billiald P. Quality and cost assessment of a recombinant antibody fragment produced from mammalian, yeast and prokaryotic host cells: A case study prior to pharmaceutical development. *N Biotechnol* 2018;4431–40.
5. Suleymanov OD, Szalony JA, Salyers AK, et al. Pharmacological interruption of acute thrombus formation with minimal hemorrhagic complications by a small molecule tissue factor/factor VIIa inhibitor: Comparison to factor Xa and thrombin inhibition in a nonhuman primate thrombosis model. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(3):1115–1121.
6. Deppermann C, Kraft P, Volz J, et al. Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice. *Blood* 2017;129(12):1702–1706.
7. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 2008;111(10):4958–4964.
8. Middleton EA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in pulmonary immune responses and inflammatory lung diseases. *Physiol Rev* 2016;96(4):1211–1259.
9. Demers M, Wagner DD. Targeting platelet function to improve drug delivery. *OncImmunology* 2012;1(1):100–102.
10. Dütting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: A target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci* 2012;33(11):583–590.
11. Jiang P, Jandrot-Perrus M. New advances in treating thrombotic diseases: GPVI as a platelet drug target. *Drug Discovery Today* 2014;19(9):1471–1475.
12. Stegner D, Haining EJ, Nieswandt B. Targeting glycoprotein vi and the immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(8):1615–1620.
13. Rayes J, Watson SP, Nieswandt B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J Clin Invest* 2019;129(1):12–23.
14. Rayes J, Jadoui S, Lax S, et al. The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* 2018;103(6):e256–e258.
15. Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, et al. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* 2015;126(8):1017–1026.
16. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest* 2013;123(2):908–916.
17. Volz J, Mammadova-Bach E, Gil-Pulido J, et al. Inhibition of platelet GPVI induces intratumor hemorrhage and increases efficacy of chemotherapy in mice. *Blood* 2019;133(25):2696–2706.
18. Voors-Pette C, Lebozec K, Dogterom P, et al. Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab: First-in-Human Healthy Volunteer Trial. *Arterioscler Thromb*

- Vasc Biol 2019;39(5):956–964.
19. Lecut C, Feeney LA, Kingsbury G, et al. Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived fab fragments. *J Thromb Haemost* 2003;1(12):2653–2662.
  20. Lebozec K, Jandrot-Perrus M, Avenard G, Favre-Bulle O, Billiald P. Design, development and characterization of ACT017, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks. *MAbs* 2017;9(6):945–958.
  21. Kraft P, Schuhmann MK, Fluri F, et al. Efficacy and safety of platelet glycoprotein receptor blockade in aged and comorbid mice with acute experimental stroke. *Stroke* 2015;46(12):3502–3506.
  22. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: Impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation* 2007;115(17):2323–2330.
  23. Claushuis TAM, de Vos AF, Nieswandt B, et al. Platelet glycoprotein VI aids in local immunity during pneumonia-derived sepsis caused by gram-negative bacteria. *Blood* 2018;131(8):864–876.
  24. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, et al. Glycoprotein VI but not  $\alpha 2\beta 1$  integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001;20(9):2120–2130.



**Figure 1. Contribution of GPVI to inflammation-associated hemostasis.** The contribution of GPVI to inflammation-associated hemostasis was determined in 3 different models of acute inflammation. **A.** Representative images of brain sections taken 24 hours after GPVI<sup>+/+</sup>, GPVI<sup>-/-</sup>, GPVI<sup>-/-</sup>, and platelet-depleted mice were subjected to 90 min transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). Note that tMCAO caused bleeding only in platelet-depleted mice. The images are representative of n = 6 mice per group. **B.** Representative images of the bronchoalveolar lavage fluid from GPVI<sup>+/+</sup>, GPVI<sup>-/-</sup>, and platelet-depleted mice collected 24 hours after LPS inhalation. The images are representative of n = 8 mice per group. **C-D.** Effect of partial or complete glycoprotein VI deficiency on inflammatory bleeding during the cutaneous reverse passive Arthus reaction (rpA). **C.** Representative images of the skin of GPVI<sup>+/+</sup>, GPVI<sup>+/-</sup>, GPVI<sup>-/-</sup>, and platelet-depleted mice after 4 hours of rpA. The images are representative of n = 7-10 mice per group. **D.** Skin hemoglobin content after 4 hours of rpA. # indicates a significant difference (p<0.05) from the rpA GPVI<sup>+/+</sup> group, n=14-20 skin biopsies per group. Inset : Representative histogram of flow cytometry analysis of GPVI surface levels in GPVI<sup>+/+</sup>, GPVI<sup>+/-</sup>, GPVI<sup>-/-</sup> mice.





**Figure 2. Impact of ACT017 on GPVI-dependent hemostasis.** A-B. Citrated whole blood from hGPVI mice was incubated or not with ACT017 (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 10 min and perfused at a wall shear rate of  $1500\text{ s}^{-1}$  for 3 min over a collagen-coated surface. A. Representative images of platelet coverage at the end of the perfusion. B. Mean surface areas covered by platelets calculated from 15 (hGPVI) and 20 (hGPVI ACT017) different fields taken with a 20 x objective along channels from 3 (hGPVI) and 4 (hGPVI ACT017) different runs. C. Representative images of the skin of hGPVI mice treated or not with ACT017 (64 mg/kg) after 4 hours of rpA. The images are representative of  $n = 4-9$  mice per group. D. Skin hemoglobin content after 4 hours of rpA. # indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) from the rpA hGPVI group,  $n = 6-18$  skin biopsies per group. E. Skin myeloperoxidase content after 4 hours of rpA.  $n = 6-18$  skin biopsies per group. F. Hemoglobin content and macroscopic aspect of B16F1 tumors from hGPVI mice treated or not with ACT017 (64 mg/kg) or a platelet-depleting antibody. Tumors were excised 8 hours after injection of the treatments. # indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) from the hGPVI group,  $n = 8-10$  tumors per group.

## Résumé des résultats et conclusions

Dans cette étude, nous avons évalué l'impact d'un nouveau médicament anti-GPVI, le Glenzocimab (ACT017), sur l'hémostase inflammatoire en utilisant deux modèles dans lesquels la GPVI a été montrée précédemment comme jouant un rôle primordial : la rpA cutanée et un modèle de tumeur cutanée B16F1. Après avoir confirmé que la GPVI ne participait pas à la prévention des saignements inflammatoires dans le cerveau ou les poumons mais qu'elle était bien essentielle à cette fonction lors de la rpA cutanée, nous avons ensuite évalué le risque hémorragique associé à un traitement par du Glenzocimab dans ce modèle. Nos résultats montrent que bien que capable d'inhiber fortement (mais pas complètement) l'adhésion et l'agrégation plaquettaires sur collagène et en conditions de flux chez des souris transgéniques exprimant la GPVI humaine (souris hGPVI), le Glenzocimab n'entraîne pas de surrisque hémorragique ni dans le modèle de rpA cutanée, ni dans un modèle de tumeur cutanée B16F1. Ces résultats soulignent donc une différence importante entre les effets d'une inhibition pharmacologique de la GPVI par le Glenzocimab et ceux d'un déficit génétique total en GPVI. D'un point de vue thérapeutique, ils indiquent que le profil de sûreté favorable de ce médicament constaté dans des tests de temps saignement est également valable en conditions inflammatoires.

## ARTICLE 3

# Contribution of the platelet (hemi)ITAM receptors GPVI and CLEC-2 to the regulation of the tumor vascular and inflammatory microenvironment

Soumaya Jadoui<sup>1</sup>, Ophélie Le Chapelain<sup>1</sup>, Véronique Ollivier<sup>1</sup>, Keltouma Maafa<sup>1</sup>, Angèle Gros<sup>1</sup>,  
Samir Barbaria<sup>1</sup>, Marie-Anne Mahwin<sup>1</sup>, Bernhard Nieswandt<sup>2</sup>, Scott I. Abrams<sup>3</sup>, Pierre H. Mangin<sup>4</sup>,  
Martine Jandrot-Perrus<sup>1</sup>, Steve P. Watson<sup>5</sup>, Benoit Ho-Tin-Noé<sup>1</sup>.

En préparation

## Introduction

Dès 1865, Armand Trousseau diagnostique chez certains patients, et notamment lui-même, une coagulation sanguine excessive causée par une tumeur [214]. Il est maintenant connu qu'une thrombocytose est un marqueur prédictif du cancer et est associée à une faible survie chez les patients atteints d'un cancer. De plus, le rôle des plaquettes dans le cancer ne se limite pas au phénomène de thrombose associé au cancer, elles contribuent également à la croissance, au maintien et à la propagation du cancer. Les plaquettes se sont également révélées essentielles à la formation et au maintien des vaisseaux sanguins [256] et lymphatiques [233], notamment par la libération de microparticules [257] et l'expression de facteur pro-angiogénique (VEGF, IL-1 $\beta$ , MMP2) [258]. Toutes ces données font des plaquettes des régulatrices importantes du microenvironnement tumoral. Nous avons montré au laboratoire que les plaquettes régulent l'intégrité vasculaire dans différents modèles d'inflammation et de tumeurs solides [76], [80] et notamment via leur récepteurs à ITAM (GPVI et CLEC-2). Une récente étude de Volz a montré que l'inhibition de la GPVI par un anticorps anti-GPVI déstabilise les vaisseaux tumoraux et permet un meilleur effet d'un traitement anti-tumoral. Néanmoins, le rôle du récepteur plaquettaire CLEC-2 dans le maintien de la vasculature tumorale n'a pas été exploré. Nous nous sommes donc intéressé dans cette étude au rôle de GPVI et CLEC-2 dans deux modèles de tumeurs : cancer du sein (PyMT, lignée cellulaire AT3) et mélanome sous-cutané (lignée cellulaire B16F1). Le but de cette étude est de déterminer l'impact des plaquettes et la contribution de leurs récepteurs GPVI et CLEC2 au maintien de la vasculature tumorale et à la régulation du microenvironnement tumoral.

## **Contribution of the platelet (hemi)ITAM receptors GPVI and CLEC-2 to the regulation of the tumor vascular and inflammatory microenvironment**

Soumaya Jadoui<sup>1</sup>, Ophélie Le Chapelain<sup>1</sup>, Véronique Ollivier<sup>1</sup>, Keltouma Maafa<sup>1</sup>, Angèle Gros<sup>1</sup>, Samir Barbaria<sup>1</sup>, Marie-Anne Mahwin<sup>1</sup>, Bernhard Nieswandt<sup>2</sup>, Scott I. Abrams<sup>3</sup>, Pierre H. Mangin<sup>4</sup>, Martine Jandrot-Perrus<sup>1</sup>, Steve P. Watson<sup>5</sup>, Benoit Ho-Tin-Noé<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Université de Paris, Laboratory of Vascular Translational Science, U1148 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), F-75006, Paris, France.*

<sup>2</sup>*University Hospital Würzburg, Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, Würzburg, Germany.*

<sup>3</sup>*Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York, USA.*

<sup>4</sup>*Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France.*

<sup>5</sup>*Institute of Cardiovascular Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham. B15 2TT.*

#Correspondence:

Benoît Ho-Tin-Noé, PhD.

Laboratory of Vascular Translational Science, INSERM U1148, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard

75877 Paris Cedex 18 France.

Fax: + 33 (0) 1 40 25 86 02.

Tel: + 33 (0) 1 40 25 86 00.

[benoit.ho-tin-noe@inserm.fr](mailto:benoit.ho-tin-noe@inserm.fr)

## Introduction

There is now a wide body of clinical and experimental evidence that the contribution of platelets to the pathophysiology of cancers far exceeds the thrombotic manifestations of cancers. Experimental studies using cultured human cells and mouse models of tumors have indeed shown that platelets can promote the metastatic process in multiple ways, from stimulating the epithelial-mesenchymal transition (EMT)<sup>1</sup> to protecting tumor cells from immune cell recognition<sup>2</sup> and facilitating tumor cell extravasation at distant sites<sup>3-6</sup>. The hypothesis that platelets favour metastatic dissemination is further supported by histopathological analyses showing the presence of intratumoral platelet clusters in a variety of solid human cancers<sup>7-11</sup>, notably at the invasive front in association with signs of EMT<sup>8</sup>. Moreover, high platelet-to-lymphocyte ratio was recently identified as an independent predictive factor of metastasis and poor prognosis in breast and colorectal cancer patients<sup>12-15</sup>. The fact that antiplatelet drugs like aspirin<sup>16,17</sup> and P2Y12 inhibitors<sup>18-20</sup> inhibit metastasis in cancer patients and in several mouse models of cancers also points to a significant participation of platelets in this process.

In addition to their role in the development of metastases, platelets are also suspected to influence tumor growth. In fact, although several studies have reported direct or indirect tumoricidal effects of platelets<sup>11,21,22</sup>, other studies have shown that platelets and their secreted factors stimulate the proliferation and survival of cancer cells *in vitro*<sup>1,23,24</sup>. Moreover, Have shown that targeting platelets or their receptors can impact tumor cell proliferation or tumor growth in various types of tumors and that genetic ablation or pharmacological inhibition of certain platelet receptors could reduce primary tumor growth in mice<sup>3,9,18,2525-28</sup>.

Promotion of angiogenesis and stabilization of tumor vessels are among the possible mechanisms by which platelets support tumor growth. In fact, platelets have been shown to support angiogenesis in *in vivo* angiogenesis assays<sup>29</sup>, and platelets from cancer patients are characterized by an increased

content in angiogenic factors<sup>30-32</sup>. However, it is worth noting that, despite these data, the actual contribution of platelets to angiogenesis in human cancers as well as in animal models of cancers remains yet to be ascertained. Aside from their potential involvement in promoting tumor angiogenesis, experimental studies have indicated that platelets are essential for stabilization of tumor vessels. Acute immunodepletion of platelets was indeed shown to invariably and immediately result in intratumor cytotoxic hemorrhage in a variety of mouse models of solid cancers<sup>25,27,33</sup>. The prevention of tumor haemorrhage by platelets was shown to rely on continuous repairing of vascular injuries induced by tumor-infiltrating leukocytes<sup>25,33</sup>, a mechanism very similar to that underlying the prevention of bleeding in inflamed organs<sup>34</sup>. Remarkably, it has been proposed and then shown experimentally that targeting this tumor-supporting function of platelets might improve the delivery of anticancer drugs by increasing tumor vascular permeability<sup>28</sup>. A first proof of this concept was given by Demers *et al.* who showed that acute immunodepletion of platelets in tumor-bearing mice selectively induced leakiness of tumor vessels, thus favoring the delivery and tumoricidal effects of paclitaxel to breast tumor sites<sup>28</sup>. More recently, Volz *et al* reported comparable results using a blocking Fab to GPVI<sup>25</sup>. These results have indicated that GPVI could be essential for maintenance of tumor vessel integrity and would thus represent a potential target for improved antitumor therapy. In line with these studies, we investigated whether GPVI and the platelet (hemi)ITAM receptor CLEC-2, which was shown previously to cooperate with GPVI for maintenance of vascular integrity in the inflamed skin<sup>35,36</sup>, contribute to the regulation of the tumor vascular microenvironment using two different mouse models of solid tumors.

## **Material and methods**

### **Animals.**

GPVI<sup>-/-37</sup> and Clec1b<sup>fl/fl</sup>PF4cre<sup>38</sup> mice and their control littermates on a C57BL/6 background were bred and housed in our animal facility. All experimental procedures were approved by the local animal ethics committee (APAFIS#7648-2016112114487415v3).

### **Tumor cell culture and implantation.**

Murine B16F1 melanoma cells were purchased from ATCC. AT-3 breast cancer cells derived from a mammary carcinoma of MMTV-PyMT transgenic mice on a C57BL/6 background have been described previously<sup>39</sup>. B16F1 and AT-3 cells were cultured in DMEM (4.5 g/L glucose for B16F1 cells, 1 g/L glucose for AT-3 cells) supplemented with 10% FBS, 1% glutamine, and 1% penicillin-streptomycin.

For cutaneous melanoma,  $1 \times 10^6$  B16F1 cells were injected subcutaneously into the dorsal skin of age- (10- to 15-week-old) and gender-matched mice of the various genotypes, which were sacrificed on day 14 post-implantation. For orthotopic breast cancer models,  $2 \times 10^5$  AT-3 cells were injected bilaterally into the inguinal mammary fat pads of age-matched (10- to 15-week-old) female virgin mice, which were sacrificed on day 21 post-implantation.

### **Blood cell count evolution**

Blood was collected from the retro-orbital venous plexus under 5% isoflurane anesthesia in EDTA tubes (STARSDT, 41.1504.005) and analyzed using an automated counter (ABC Vet, Scil).



### **Preparation of tumor extracts and tumor supernatants**

Tumors were excised, weighed, homogenized in PBS supplemented with protease inhibitors (Sigma, P8340) and EDTA (1 mM) at a volume-to-weight ratio of 5  $\mu$ L/mg tumor, subjected to 3 freeze/thaw cycles and sonication, centrifuged at 5000 g for 5 min, and the resulting tumor extracts were collected. For measurement of free tumor LDH activity, tumor homogenates were prepared at a volume-to-weight ratio of 10  $\mu$ L/mg tumor, centrifuged directly at 5000 g for 5 min without cell lysis steps, and the supernatants containing extracellular tumor contents were collected.

### **Tumor vascular perfusion**

For determination of tumor vascular perfusion, mice were injected intravenously through the retro-orbital venous sinus with 100  $\mu$ L of 40 mg/mL FITC-dextran (150 kDa, Sigma-Aldrich) 5 min before euthanasia. Tumor FITC-dextran content was quantified by measuring the fluorescence at  $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em} = 488/521$  nm in tumor extracts with a fluorescence microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan).

### **Immunohistology**

Tumors were collected after intracardiac perfusion with zinc fixative (100 mmol/L Tris-HCl containing 37 mmol/L zinc chloride, 23 mmol/L zinc acetate, and 3.2 mmol/L calcium acetate), fixed in the same buffer for 48 hours, embedded in paraffin, and sectioned at 5  $\mu$ m. Immunostainings were performed as described previously<sup>33</sup> using the following primary antibodies: anti-collagen IV (PA1-26148, ThermoS), anti-CD31 (5H10-1; BD Pharmingen), anti-PF4 (500-P05, Peprotech), anti-GPIX (M051-0, Emfret), and anti-VWF (A0082, DAKO). The

slides were mounted in aqueous Fluorescent Mounting Medium (Dako) and images were acquired using a Leica DMI8 fluorescence microscope.

### **Intravital microscopy**

B16F1 or PyMT AT-3 cells ( $1 \times 10^6$ ) were injected subcutaneously in the dorsal skin and allowed to grow for 5 to 7 days before surgical implantation of a dorsal skinfold chamber<sup>27</sup> (APJ Trading Co) for intravital imaging. For visualization of platelets and neutrophils, mice were injected intravenously with an Alexa Fluor 647-conjugated anti-GPIX antibody (Emfret Analytics) and an Alexa Fluor 555-conjugated anti-Ly6G antibody (BioxCell)<sup>40</sup>, respectively. During intravital observation, anaesthesia was maintained by mask inhalation of isoflurane at 1.5%, and images were acquired using a fluorescence macroscope (MacroFluo, Leica) equipped with a thermostated heating plate, a 5 X objective, and a sCMOS camera (Orca-Flash-4.0, Hamamatsu Photonics), and controlled with Metamorph software (Molecular Devices).

### **Determination of intratumor platelet factor 4 and hemoglobin content.**

Platelet factor 4 (PF4) levels in tumor extracts were measured using a commercial ELISA following the manufacturer's instructions. Hemoglobin content was estimated by measurement of heme concentration in tumor extracts by addition of formic acid as described previously<sup>36</sup>.

### **Lactate dehydrogenase activity**

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in plasma and in tumor supernatants using the LDH Assay Kit (Abcam, Cambridge, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Paired and unpaired data were compared using the Wilcoxon signed-rank or Mann-Whitney U tests, respectively. Values of  $P < 0.05$  were regarded as statistically significant.

## Results

### **Platelet GPVI and CLEC-2 receptors do not contribute to platelet recruitment to the tumor**

We first assessed whether tumor growth, which can be associated with thrombocytosis, led to modifications of platelet counts in mice implanted with B16F1 melanoma or AT-3 breast cancer cells. There was no significant impact on circulating platelet count of either B16F1 melanoma or AT-3 breast tumors over the course of the allowed growth period (14 and 21 days, respectively) and in any of the mouse genotypes (Figure 1). Nevertheless, it is worth noting that, in agreement with previous reports<sup>41</sup>, platelet CLEC-2-deficient mice displayed a reduced platelet count as compared to their control littermates, irrespectively of tumor cell implantation (Figure 1).

We next investigated the interactions between platelets and the vasculature of both AT-3 and B16F1 tumors. Immunohistological examination showed the presence of non-aggregated platelets adherent to the vessel wall or in the direct vicinity of blood vessels in both types of tumors (Figure 2A). Notably, whereas the presence of large platelet aggregates obstructing tumor blood vessels was a frequent feature of B16F1 melanoma tumors, such aggregates were scarce in AT-3 breast tumors (not shown). In order to exclude the possibility that the presence of intravascular platelets was the result of perfusion artefacts, we further analyzed platelet-tumor interactions *in vivo* by intravital microscopy. Intravital observation confirmed that physical interactions between platelets and tumor vessels of AT-3 and B16F1 tumors occurred continually. These interactions included brief tethering, firm adhesion of single platelets or sheets of platelets in association or not with neutrophils, and small platelet aggregates. Remarkably, platelets were seen in perfused vessels as well as in dead-end angiogenic sprouts (not shown). Direct contacts between platelets and the ligands of GPVI and CLEC-2, respectively collagen and podoplanin, were detected in both types of tumors (not shown). Type IV collagen was mainly expressed in the subendothelium of tumor vessels, while podoplanin was expressed by lymphatics, fibroblast-like cells, and to a lesser extent, tumor cells (not shown).

The contribution of GPVI and CLEC-2 to intratumoral platelet recruitment and accumulation was evaluated by measurement of platelet factor 4 (PF4) levels in tumor extracts. There was no difference in intratumor PF4 levels neither between GPVI<sup>-/-</sup> and GPVI<sup>+/+</sup> mice nor between platelet CLEC-2-deficient mice and their littermate controls (Figure 2B). These results thus indicate both GPVI and CLEC-2 are dispensable for platelet accumulation in B16F1 melanoma and AT-3 mammary tumors.

### **Platelet ITAM receptors deficiency tumor vessel function have a minor contribution to tumor vessel development and function**

After assessing if GPVI and CLEC-2 were required for platelet recruitment to primary tumor sites, we next examined their role in tumor vessel growth and function. Immunostaining for collagen IV revealed no overt quantitative defect in tumor angiogenesis in GPVI<sup>-/-</sup> and platelet CLEC-2-deficient mice (Figure 3). Notably, however, and although difficult to objectify, tumor vessels of platelet CLEC-2-deficient mice appeared dysmorphic as compared to tumor vessels of other groups of mice, which presented a more regular shape and a relatively continuous wall (Figure 3A and B). Furthermore, blood-filled skin lymphatics surrounding B16F1 melanoma tumors were occasionally observed during tumor collection exclusively in platelet CLEC-2-deficient mice (Figure 3C), a phenotype consistent with the essential role of CLEC-2-driven platelet activation in keeping the blood and lymphatic systems separated throughout vessel formation programs<sup>38</sup>.

To determine the overall impact of GPVI and CLEC-2 deficiency on tumor vessel function, tumor vascular perfusion was quantified between the various groups of mice by measuring intratumor levels of FITC-dextran injected intravenously just before removal of the tumors. There was no significant difference in intravascular tumor FITC-dextran content between GPVI<sup>-/-</sup> mice, platelet CLEC-2-deficient mice, and their respective control littermates (Figure 3D-E).

Intratumor haemoglobin content, used as a mixed marker of both tumor vascular perfusion and bleeding, was significantly increased in AT-3 mammary tumors and B16F1 melanoma of platelet CLEC-2-deficient mice as compared to their control littermates (Figure 4A). A similar trend, however non-significant, was seen in GPVI<sup>-/-</sup> mice (Figure 4A and B).

### **Platelet ITAM receptors deficiency tumor vessel function have a minor contribution to tumor vessel development and function**

Intratumor bleeding has been shown previously to be cytotoxic to the tumor and to result in reduced tumor cell proliferation<sup>25,27,28</sup>. We thus determined whether the increased tumor bleeding of platelet CLEC-2-deficient mice had an impact on tumor growth and viability.

While there was no statistically significant difference in tumor weight between any of the mouse groups implanted with B16F1 tumors, the weight of AT-3 tumors from platelet CLEC-2-deficient mice was reduced as compared to that of AT-3 tumors from their control littermates (Figure 5A). There was however no significant difference in free LDH activity between AT-3 tumors from platelet CLEC-2-deficient mice and their control littermates (Figure 5B), thus suggesting that the reduced weight of AT-3 tumors from platelet CLEC-2-deficient mice may not result from increased tumor necrosis (Figure 5B).

Finally, we verified whether the increased permeability of tumor vessels associated with platelet CLEC-2 deficiency could be taken advantage of for improving the delivery of antitumor drugs. To that end, platelet CLEC-2-deficient mice, GPVI<sup>-/-</sup> mice, and their control littermates bearing B16F1 tumors received an antitumoral immunotherapeutic treatment that was administered on day 6, and then again on day 10 following tumor cell implantation. The efficacy of the intratumoral delivery of this treatment consisting in the combined injection of hamster anti-mouse CTLA4 and rat anti-mouse PD1 monoclonal antibodies was determined by measurement of rat IgG levels in tumor

extracts. As expected, rat IgG were detected only in tumors from mice that received the antitumoral immunotherapeutic treatment (Figure 6). Surprisingly however, the intratumor level of rat IgG was lower in tumors from platelet CLEC-2-deficient and GPVI<sup>-/-</sup> mice than in tumors from their control littermates (Figure 6).

## Discussion

Here, we aimed to investigate the contribution of the platelet receptors GPVI and CLEC-2 to physical and functional interactions between platelets and the tumor vasculature mouse models of skin and breast cancer. At this stage of our study, our results indicate that, in contrast to what was observed in a model of acute skin inflammation<sup>35,36,40</sup>, neither GPVI nor CLEC-2 alone seems to be primarily involved in either platelet recruitment to tumor vessels, or prevention of tumor bleeding in the 2 models of solid tumors studied. Although a slight statistically significant increase in bleeding was observed in tumors from platelet CLEC-2-deficient mice, it is worth noting that this increase was comparable to the non-significant one obtained in GPVI<sup>-/-</sup> mice. Thus, this questions the biological significance of this limited increase in tumor bleeding, especially if one also considers the fact that platelet CLEC-2-deficient mice did not show any modification of tumor growth or necrosis compared to their control littermates. Remarkably, our results are consistent with those of previous studies in models of experimental lung metastasis, in which no bleeding phenotype of pulmonary metastatic nodules in GPVI<sup>-/-4,6</sup> or CLEC-2-depleted mice<sup>42</sup> was reported. Yet, the absence of bleeding phenotype in mice with an isolated genetic deficit in GPVI or CLEC-2 does not completely rule out the possibility of a role for these receptors in tumor vessel stabilization. In fact, these 2 receptors have been shown previously to be able to partially or even fully compensate for each other's loss to ensure primary hemostasis<sup>43</sup>, promote thrombosis<sup>43</sup>, or prevent inflammatory bleeding in the inflamed skin<sup>36</sup>. Whether such functional redundancy is at work for maintenance of tumor vessel integrity thus remains to be determined. This could be achieved by targeting simultaneously both receptors, either by using double knockout mice lacking GPVI and CLEC-2, or by pharmacologically blocking GPVI or CLEC-2 in mice with an isolated deficit in the respective other receptor.

In contrast to our results, a recent study showed that targeting of GPVI by the mean of a blocking Fab induced severe bleeding in various tumor models<sup>25</sup>, including the AT-3 mammary tumor model



we used here. As a result of this increased tumor bleeding, GPVI inhibition potentiated the intratumoral delivery and anti-tumoral activity of the chemotherapeutic drugs like Doxil and paclitaxel when co-administered with the anti-GPVI Fab<sup>25</sup>. The reasons of this important discrepancy with our results remain unclear and require further investigations. One possible explanation might be the fact that the GPVI blocking Fab used in the study by Volz *et al.* does not only inhibit GPVI/collagen interactions but also induces temporary thrombocytopenia<sup>44</sup>, a side effect likely to favour tumor bleeding.

Finally, despite the uncertainty regarding the contribution of GPVI and CLEC-2 to the prevention of tumor bleeding, several of our results suggest that these receptors may still participate in the regulation of tumor vessel formation and/or function. First, the vascular mixing phenotype observed in B16F1 melanoma tumors of platelet CLEC-2-deficient mice indicates that CLEC-2 intervenes in the formation of tumor blood and lymphatic vessels. In addition, the unexpected reduction in intratumoral accumulation of anti-immune checkpoints antibodies in GPVI<sup>-/-</sup> and platelet CLEC-2 deficient mice suggests that these two receptors may contribute to the regulation of tumor vessel endothelial permeability and/or of lymphatic drainage function. Those possibilities will have to be evaluated in future studies.

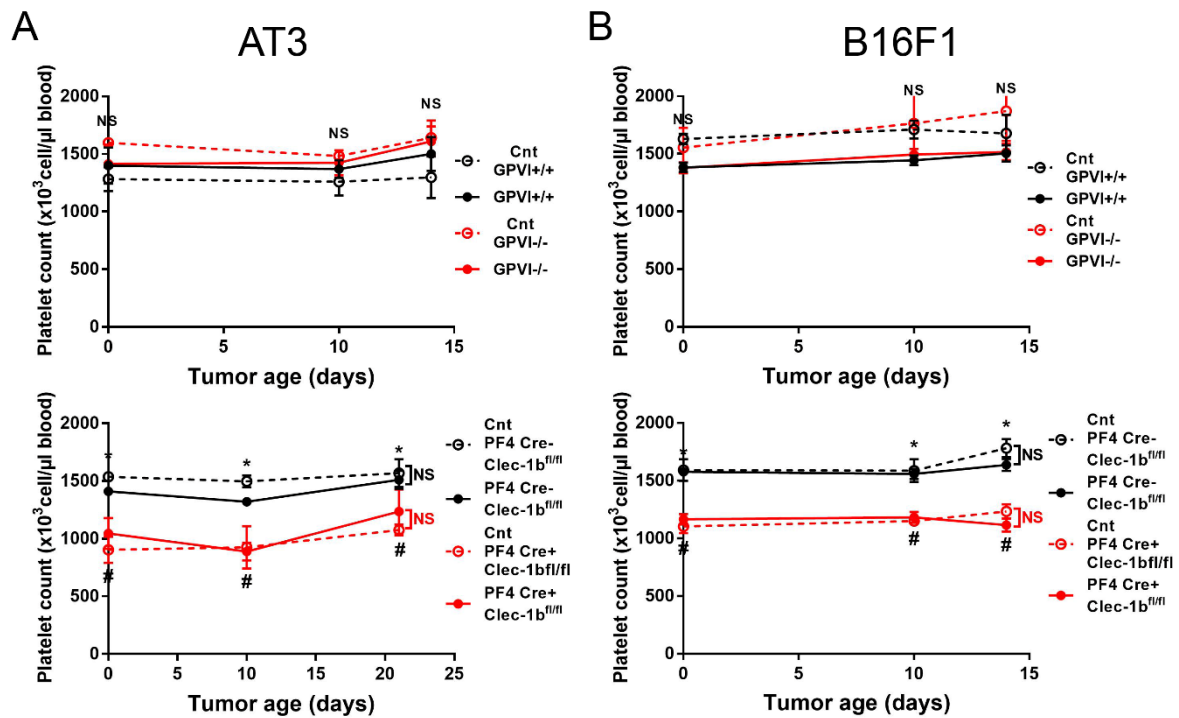
## References

1. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* 2011;20(5):576–590.
2. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999;59(6):1295–1300.
3. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(16):9325–9330.
4. Jain S, Russell S, Ware J. Platelet glycoprotein VI facilitates experimental lung metastasis in syngenic mouse models. *J Thromb Haemost* 2009;7(10):1713–1717.
5. Jain S, Zuka M, Liu J, et al. Platelet glycoprotein Iba supports experimental lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(21):9024–9028.
6. Mammadova-Bach E, Gil-Pulido J, Sarukhanyan E, et al. Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived Galectin-3. *Blood* [Epub ahead of print].
7. Ishikawa S, Miyashita T, Inokuchi M, et al. Platelets surrounding primary tumor cells are related to chemoresistance. *Oncol Rep* 2016;36(2):787–794.
8. Miyashita T, Tajima H, Makino I, et al. Metastasis-promoting role of extravasated platelet activation in tumor. *J Surg Res* 2015;193(1):289–294.
9. Qi C, Li B, Guo S, et al. P-selectin-mediated adhesion between platelets and tumor cells promotes intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice. *Int J Biol Sci* 2015;11(6):679–687.
10. Qi C, Wei B, Zhou W, et al. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth. *Oncotarget* 2015;6(9):6584–6596.
11. Plantureux L, Mege D, Crescence L, et al. The interaction of platelets with colorectal cancer cells inhibits tumor growth but promotes metastasis. *Cancer Res* 2020;80(2):291–303.
12. Zhu Y, Si W, Sun Q, Qin B, Zhao W, Yang J. Platelet-lymphocyte ratio acts as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncotarget* 2017;8(1):1023–1030.
13. Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, et al. Prediction of sentinel lymph node metastasis using the platelet-to-lymphocyte ratio in T1 breast cancer. *Anticancer Res* 2020;40(4):2343–2349.
14. Huang XZ, Chen WJ, Zhang X, et al. An Elevated Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predicts Poor Prognosis and Clinicopathological Characteristics in Patients with Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Disease Markers*;2017.
15. Lin MS, Huang JX, Zhu JY, Shen HZ. Elevation of platelet count in patients with colorectal cancer predicts tendency to metastases and poor prognosis. *Hepatogastroenterology* 2012;59(118):1687–1690.
16. Johnson KE, Ceglowski JR, Roweth HG, et al. Aspirin inhibits platelets from reprogramming breast tumor cells and promoting metastasis. *Blood Adv* 2019;3(2):198–211.
17. Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JFF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: A study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* 2012;379(9826):1591–1601.
18. Mezouar S, Darbousset R, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. *Int J Cancer* 2015;136(2):462–475.
19. Gebremeskel S, Levatte T, Liwski RS, Johnston B, Bezuhly M. The reversible P2Y12 inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer. *Int J Cancer* 2015;136(1):234–240.
20. Gareau AJ, Brien C, Gebremeskel S, Liwski RS, Johnston B, Bezuhly M. Ticagrelor inhibits platelet-tumor cell interactions and metastasis in human and murine breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2018;35(1–2):25–35.

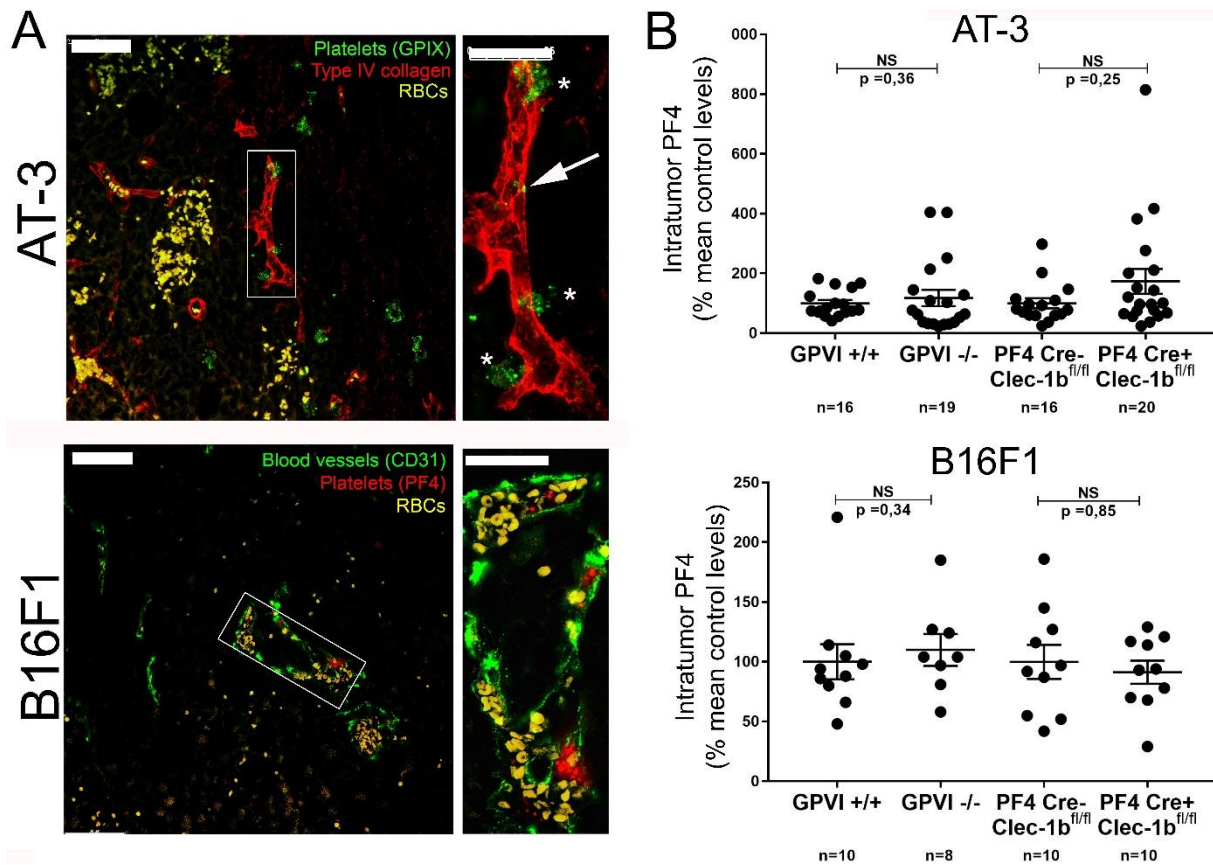
21. Michael J V., Wurtzel JGT, Mao GF, et al. Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. *Blood* 2017;130(5):567–580.
22. Ibele GM, Kay NE, Johnson GJ, Jacob HS. Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood* 1985;65(5):1252–1255.
23. Egan K, Crowley D, Smyth P, et al. Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells. *PLoS One*;6(10):.
24. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, et al. Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem* 2010;285(32):24494–24507.
25. Volz J, Mammadova-Bach E, Gil-Pulido J, et al. Inhibition of platelet GPVI induces intratumor hemorrhage and increases efficacy of chemotherapy in mice. *Blood* 2019;133(25):2696–2706.
26. Stone RL, Nick AM, McNeish IA, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012;366(7):610–618.
27. Ho-Tin-Noé B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res* 2008;68(16):6851–6858.
28. Demers M, Ho-Tin-Noé B, Schatzberg D, Yang JJ, Wagner DD. Increased efficacy of breast cancer chemotherapy in thrombocytopenic mice. *Cancer Res* 2011;71(5):1540–1549.
29. Kisucka J, Butterfield CE, Duda DG, et al. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(4):855–860.
30. Wynendaele W, Derua R, Hoylaerts MF, et al. Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: A key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann Oncol* 1999;10(8):965–971.
31. Han H, Cao FL, Wang BZ, Mu XR, Li GY, Wang XW. Expression of angiogenesis regulatory proteins and epithelial-mesenchymal transition factors in platelets of the breast cancer patients. *Sci World J*;2014.
32. Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE, et al. VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis* 2012;15(2):265–273.
33. Ho-Tin-Noé B, Carbo C, Demers M, Cifuni SM, Goerge T, Wagner DD. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol* 2009;175(4):1699–1708.
34. Ho-Tin-Noé B, Boulaftali Y, Camerer E. Platelets and vascular integrity: How platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood* 2018;131(3):277–288.
35. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest* [Epub ahead of print].
36. Rayes J, Jadoui S, Lax S, et al. The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* 2018;103(6):e256–e258.
37. Kato K, Kanaji T, Russell S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* [Epub ahead of print].
38. Finney BA, Schweighoffer E, Navarro-Núñez L, et al. CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood* 2012;119(7):1747–1756.
39. Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *PLoS One*;6(11):.

40. Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, et al. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* 2015;126(8):1017–1026.
41. Lax S, Rayes J, Wichaiyo S, et al. Platelet CLEC-2 protects against lung injury via effects of its ligand podoplanin on inflammatory alveolar macrophages in the mouse. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2017;313(6):L1016–L1029.
42. Shirai T, Inoue O, Tamura S, et al. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost* 2017;15(3):513–525.
43. Bender M, May F, Lorenz V, et al. Combined in vivo depletion of glycoprotein VI and C-type lectin-like receptor 2 severely compromises hemostasis and abrogates arterial thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(5):926–934.
44. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, et al. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 2001;193(4):459–469.
45. Kizer NT, Hatem H, Nugent EK, et al. Chemotherapy response rates among patients with endometrial cancer who have elevated serum platelets. *Int J Gynecol Cancer* 2015;25(6):1015–1022.
46. Bottsford-Miller J, Choi HJ, Dalton HJ, et al. Differential platelet levels affect response to taxane-based therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21(3):602–610.

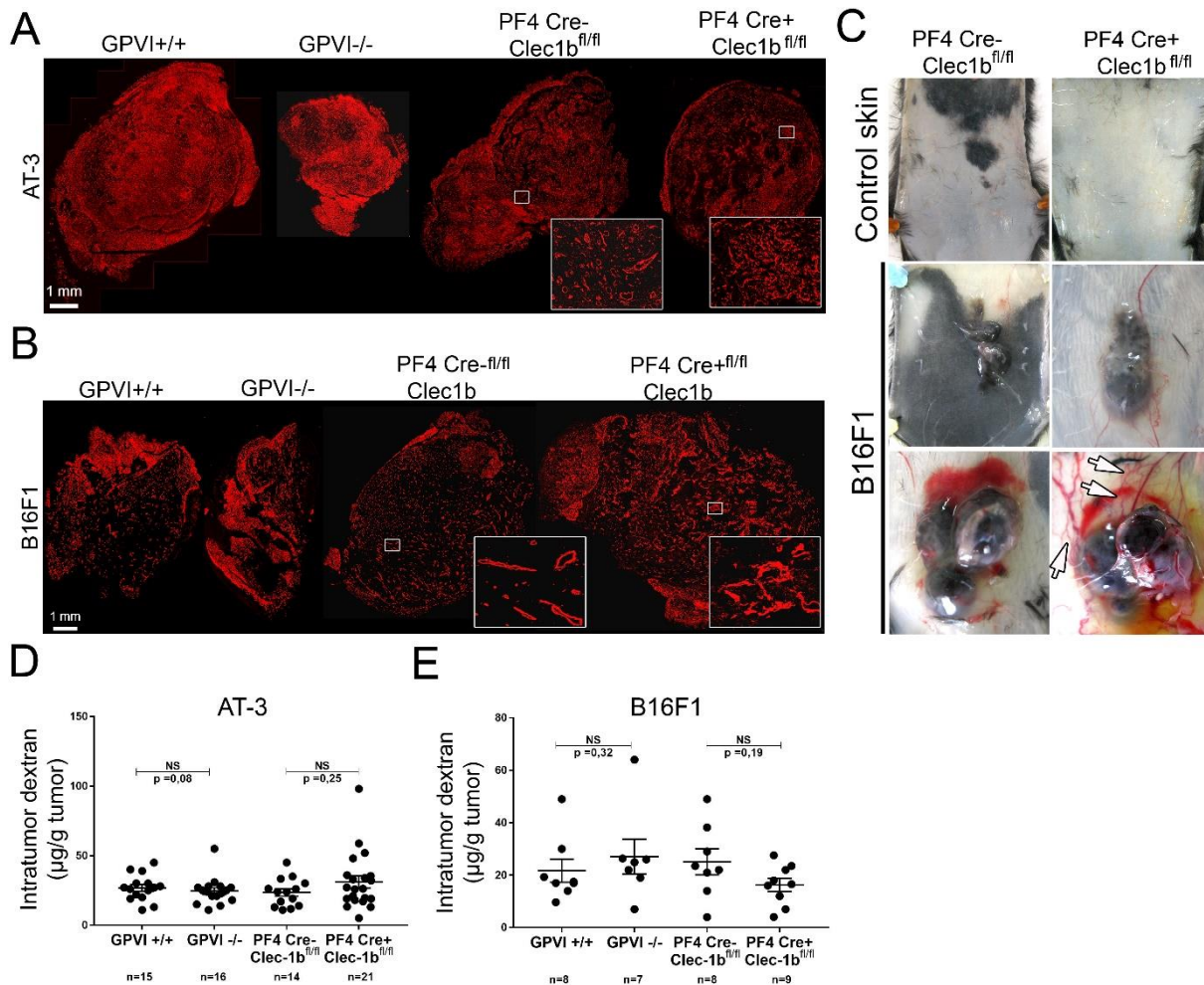
## Figures



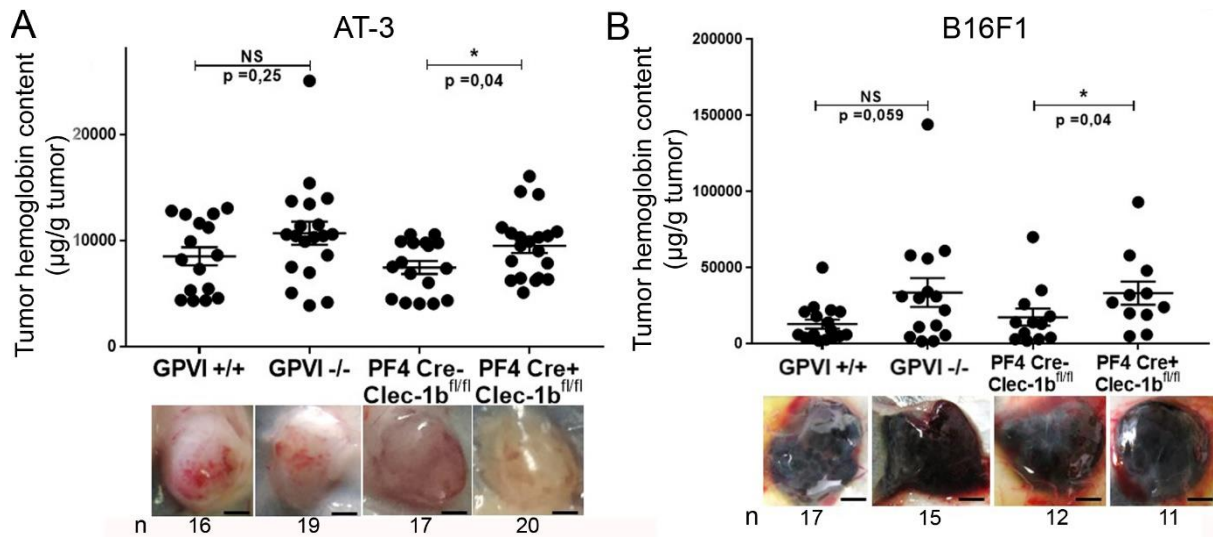
**Figure 1. Comparison of platelet count evolution in tumor-bearing mice.** Platelet count evolution in control mice and in AT-3 (A) or B16F1 (B) tumor-bearing mice. \* indicates a statistically significant difference between non-tumor bearing control PF4 Cre- Clec1b<sup>fl/fl</sup> and platelet CLEC-2-deficient mice (PF4 Cre+ Clec1b<sup>fl/fl</sup> mice). # indicates a statistically significant difference between tumor bearing PF4 Cre- Clec1b<sup>fl/fl</sup> and platelet CLEC-2-deficient mice (PF4 Cre+ Clec1b<sup>fl/fl</sup> mice). n=2-15.



**Figure 2. Contribution of GPVI and CLEC-2 to platelet recruitment to primary tumor sites.** **A.** Immunohistological analysis and intravital microscopy showed that wild-type platelets interact continually with vessels of both AT-3 and B16F1 tumors. The arrow indicates a single platelet lining the basement membrane. The asterisks indicate perivascular cluster of platelets. Scale bars = 50  $\mu$ m (left panels) and 25  $\mu$ m (right panels). **B.** The role of GPVI and CLEC-2 in intratumoral platelet recruitment was determined by comparing platelet intratumor content (as assessed by measurement of platelet factor 4 in tumor extracts) between GPVI<sup>-/-</sup> mice, platelet CLEC-2-deficient mice (PF4Cre<sup>+</sup> Clec1b<sup>fl/fl</sup>), and their control littermates.

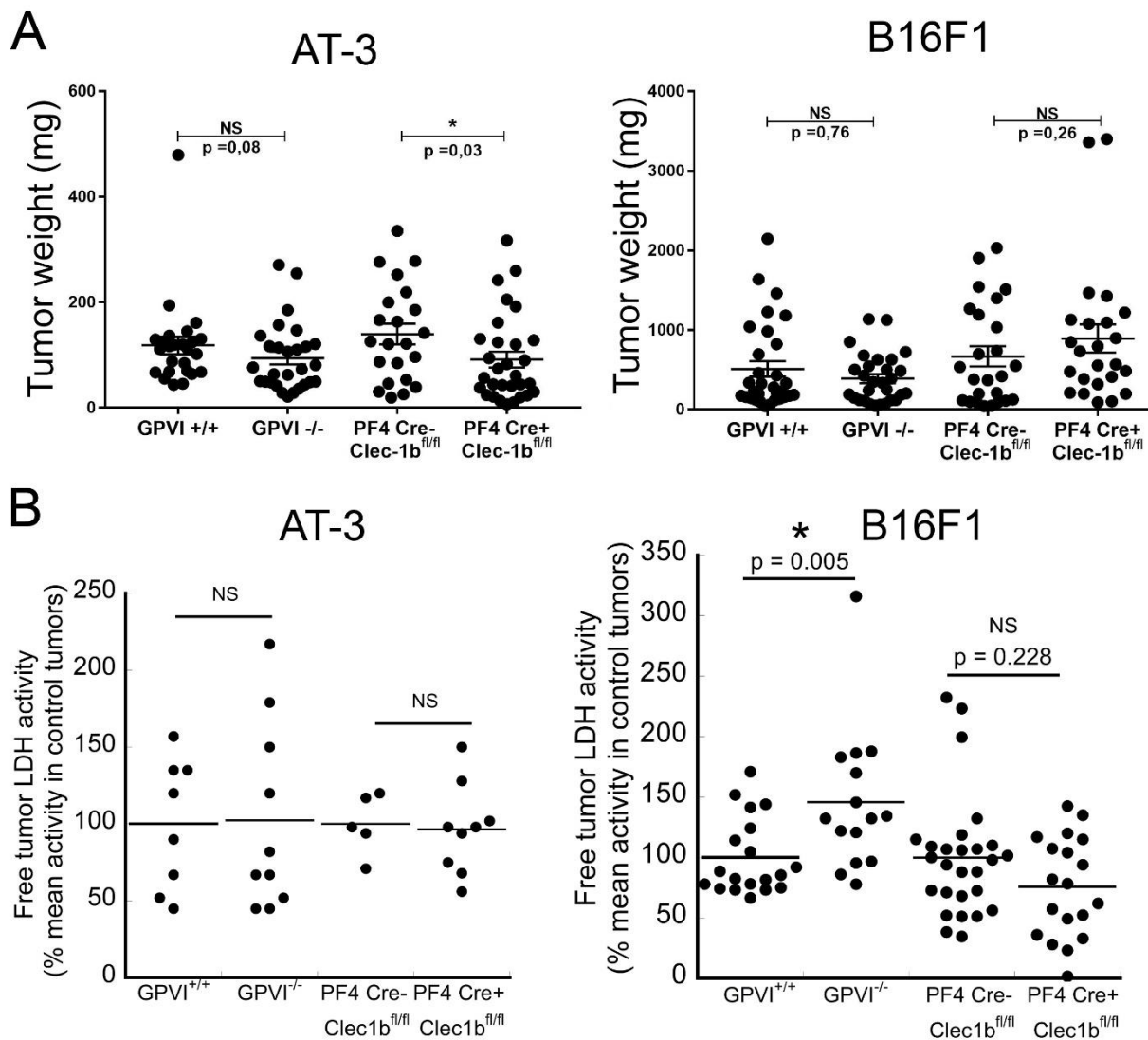


**Figure 3. Contribution of GPVI and CLEC-2 to tumor vessel growth and function. A-B.** Immunostaining for type IV collagen for detection of blood vessels in AT-3 mammary (A) and B16F1 melanoma (B) tumors of GPVI<sup>-/-</sup> mice, platelet CLEC-2-deficient mice (PF4Cre+ Clec1b<sup>fl/fl</sup>), and their control littermates. Higher magnifications are shown in the insets. Note that tumor vessels from platelet CLEC-2-deficient mice appear dysmorphic, that platelets interact continually with tumor vessels. **C.** Representative images showing the macroscopic aspect of B16F1 melanoma from platelet CLEC-2-deficient mice and their control littermates. The arrows indicate blood-filled lymphatics surrounding a B16F1 melanoma tumor as was occasionally and exclusively observed in platelet CLEC-2-deficient mice. **D-E.** Comparison of tumor vascular perfusion between the various groups of mice in both tumor models as assessed by quantification of intravenously-injected fluorescent dextran tumor content.

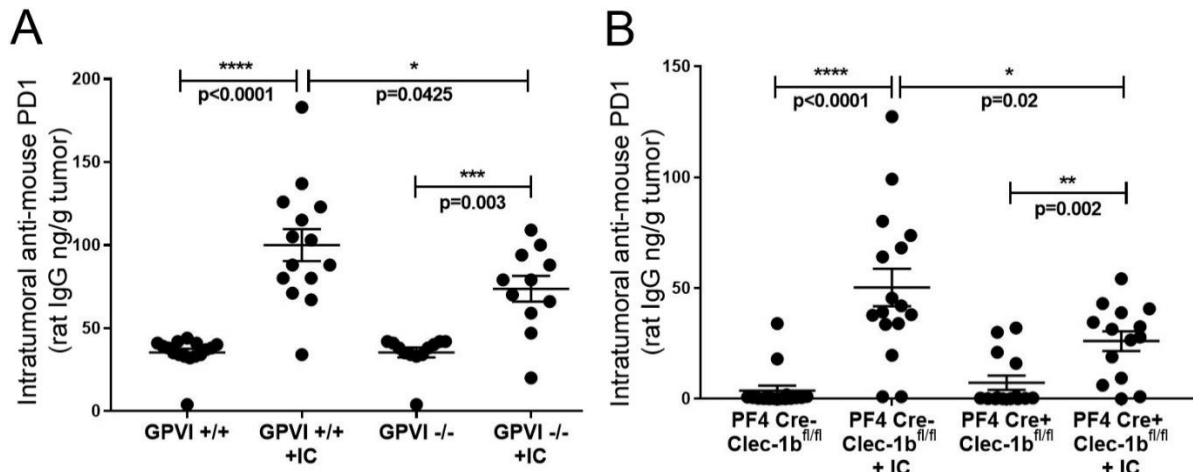


**Figure 4. Contribution of GPVI and CLEC-2 to the prevention of tumor bleeding by platelets. A-B.** Macroscopic aspect and hemoglobin content of AT-3 mammary (A) and B16F1 melanoma (B) tumors from GPVI<sup>-/-</sup> mice, platelet CLEC-2-deficient mice (PF4Cre<sup>+</sup> Clec1b<sup>fl/fl</sup>), and their control littermates.





**Figure 5. Impact of GPVI and platelet CLEC-2 deficiency on tumor growth and necrosis. A.** Comparison of AT-3 mammary (left panel) and B16F1 melanoma (right panel) tumor weights between GPVI<sup>-/-</sup> mice, platelet CLEC-2-deficient mice (PF4Cre<sup>+</sup> Clec1b<sup>fl/fl</sup>), and their respective control littermates, as indicated. **B.** Comparison of free LDH activity used as a marker of tumor necrosis in AT-3 mammary (left panel) and B16F1 melanoma (right panel) tumors between GPVI<sup>-/-</sup> mice, platelet CLEC-2-deficient mice (PF4Cre<sup>+</sup> Clec1b<sup>fl/fl</sup>), and their respective control littermates, as indicated. Results are expressed as percentages relative to the mean free tumor LDH activity measured in control tumors from GPVI<sup>+/+</sup> or PF4Cre<sup>-</sup> Clec1b<sup>fl/fl</sup> mice.



**Figure 6. Impact of GPVI and platelet CLEC-2 deficiency on the delivery of anti-immune checkpoint antibodies to B16F1 tumors.** A. Comparison of the intratumoral content in rat IgG between GPVI<sup>-/-</sup> mice (A) or platelet CLEC-2-deficient (B)mice (PF4Cre<sup>+</sup> Clec1b<sup>fl/fl</sup>) and their respective control littermate, treated or not with a rat monoclonal blocking antibody directed against the PD-1 immune checkpoint (IC).

## REVUE 1

### Spontaneous bleeding in thrombocytopenia: Is it really spontaneous?

Benoît Ho-Tin-Noé, Soumaya Jadoui

Publié dans Transfusion clinique et biologique, Septembre 2018





ELSEVIER



Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com

TRANSFUSION  
CLINIQUE ET BIOLOGIQUE

Transfusion Clinique et Biologique 25 (2018) 210–216

Platelets and Platelet transfusions: Challenges for today and tomorrow

## Spontaneous bleeding in thrombocytopenia: Is it really spontaneous?

B. Ho-Tin-Noé\*, S. Jadoui

Laboratory of Vascular Translational Science, université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, U1148 institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Paris, France

Available online 17 July 2018

### Abstract

Spontaneous bleeding is a clinical hallmark of thrombocytopenia and can take multiple forms including petechiae, epistaxis, gum bleeding, or, in worst cases, intracranial hemorrhage. Those bleeding events are called “spontaneous” because they occur in the absence of overt trauma. Spontaneous bleeding manifestations have long been considered to be a direct consequence of low platelet counts. Nevertheless, although low platelet counts may lead to ultrastructural endothelial alterations, those alterations and the associated state of vascular fragility are unlikely sufficient to cause spontaneous rupture of the microvessel wall. Indeed, in addition to endothelial injury, factors capable of damaging the basement membrane are required to allow escape of red blood cells in the extravascular space. Therefore, despite their misleading name, spontaneous bleeding events in thrombocytopenia are most likely provoked and involve subclinical biological processes in which platelets normally intervene to ensure hemostasis. In this review, we discuss past and more recent studies on the possible triggers of spontaneous bleeding events in thrombocytopenia, with a particular focus on the role of inflammatory reactions.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Thrombocytopenia; Vascular integrity; Spontaneous bleeding; Platelets; Inflammation; Petechial bleeding; Angiogenesis

### 1. Introduction

Thrombocytopenia defined as a platelet count below the lower limit of 150,000 platelets/ $\mu$ L blood can be caused by a variety of reasons, one of the foremost being immune thrombocytopenia, formerly known as idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) [1]. Thrombocytopenia can be an isolated disorder or develop secondary to or in association with drug treatments [1–5] or conditions such as viral or bacterial infections [1,6–8]. Whatever the etiology of thrombocytopenia, thrombocytopenic patients have an increased risk of bleeding, which can be fatal in rare cases [1,9,10]. Nevertheless, not all thrombocytopenic patients share the same bleeding risk. Thrombocytopenia is considered mild if the platelet count remains above 70,000/ $\mu$ L and, generally, patients with counts greater than 50,000 platelets/ $\mu$ L are asymptomatic and may not need treatment [1,11–13]. Severe thrombocytopenia occurs when the platelet count falls below

20,000–30,000/ $\mu$ L. Patients with a count lower than 30,000/ $\mu$ L have an increased susceptibility to trauma-induced bleeding, and those with counts below 10,000/ $\mu$ L are regarded as the most at risk of so-called spontaneous bleeding, which represents a hematologic emergency. Those bleeding events are clinical hallmarks of thrombocytopenia and are called “spontaneous” because they occur in the absence of overt trauma. They can take the form of seemingly benign manifestations like petechiae, epistaxis, or gum bleeding, but also of more alarming signs like genitourinary, gastrointestinal, or, in worst cases, intracranial hemorrhage.

Causes of spontaneous bleeding in thrombocytopenic patients are often not investigated or at least rarely mentioned in published reports. This is perhaps partly because manifestations such as petechial purpura or epistaxis are not regarded as severe enough to warrant further examination. Another explanation for this lack of clinical investigation is that, as illustrated by the clinical term “thrombocytopenic purpura”, thrombocytopenia in itself is largely considered as a sufficient explanation. While purpura is the collective term for bleeding into the skin and mucous membranes, “thrombocytopenic” purpura implicitly designates a particular form of purpura associated with, or caused by decreased platelet numbers. Nonetheless, from a mechanistic

\* Corresponding author. Laboratory of Vascular Translational Science, U1148 Inserm, 46, rue Henri-Huchard 75018 Paris, France.

E-mail address: benoit.ho-tin-noe@inserm.fr (B. Ho-Tin-Noé).

perspective, this raises the question of why would low platelet counts lead to the escape of red blood cells (RBCs) into tissues through a presumably uninjured vessel wall? Over the years, several non-exclusive explanations have been advanced to account for this intriguing aspect of thrombocytopenia. In this short review, we discuss past and more recent studies on the mechanisms underlying spontaneous bleeding events in thrombocytopenia.

## 2. Endothelial abnormalities and spontaneous bleeding in thrombocytopenia: Myth or reality?

A commonly given and widely accepted explanation is that thrombocytopenia compromises vascular resistance and causes vascular fragility related to the loss of the endothelial supporting functions of platelets. The concept of vascular fragility in thrombocytopenia arose very early [14] and was principally strengthened by electron microscopy analyses of the microvascular changes occurring in thrombocytopenic animals and patients. In 1970, Gore et al. described widespread alterations of the endothelium of small blood vessels in thrombocytopenic guinea pigs [15]. In line with those observations, in 1975, Kitchens and Weiss reported that extensive ultrastructural changes of the endothelium occurred within hours of thrombocytopenia induction in rabbits [16]. Changes in the endothelium affected capillaries and post-capillary venules, and included marked endothelial thinning as well as the formation of numerous fenestrations [16]. Kitchens and Pendergast later made comparable observations of ultrastructural endothelial alterations in skin and muscle biopsies of patients with severe thrombocytopenia [17]. Endothelial alterations were quite frequent as thin spots and fenestrations were observed in 43% and 6%, respectively, of the capillaries analyzed [17]. Remarkably, in both humans and rabbits, glucorticoid treatment corrected endothelial abnormalities together with the bleeding phenotype associated with severe thrombocytopenia [17,18]. From these observations, a model was proposed in which extravasation of RBCs partly occurs through endothelial gaps forming when platelet counts fall below a critical threshold of approximately 10,000–20,000 platelets/ $\mu\text{L}$  (Fig. 1). Despite some controversies, this model still resonates nowadays [19,20]. A matter of debate relates to whether or not endothelial gaps in thrombocytopenia form through disassembly of interendothelial junctions. Whereas Gore [15] and others [19,21] suggested that extravasation of RBCs took place between loosened interendothelial junctions, Kitchens emphasized that interendothelial junctions in thrombocytopenic rabbits and humans were normal [16–18]. Instead, he proposed that RBCs extravasate from sites of profound endothelial thinning and transcellular fenestrations, by a yet-to-be-defined mechanism that might involve increased vesicular transport and/or because of decreased mechanical strength of the endothelium in those spots [16–18]. A maybe more contentious aspect is the fact that several notable contemporaries of Kitchens, like David Shepro [22] and John V. Hurley [21,23], did not detect any consistent differences in the structure of endothelial cells between control and thrombocytopenic animals. All controversies left aside, there is evidence

that low platelet counts and even gaps in the endothelial lining might not be sufficient to cause bleeding. First, there is variability in the bleeding risk and severity of thrombocytopenic patients with severe thrombocytopenia. In fact, patients with equally low platelet counts do not all bleed and bleeding severity also varies among patients [24–26]. Moreover, even in a given thrombocytopenic patient, bleeding is not widespread to the entire body but limited to certain areas. Clinical bleeding in thrombocytopenia is therefore likely affected by additional factors besides the platelet count. Variability of the bleeding phenotype in thrombocytopenia was also observed in a recent experimental study, in which only 2 out of 5 severely thrombocytopenic dogs (<3% of baseline platelet counts) developed cutaneous bleeding [19]. The authors observed that endothelial junctions in thrombocytopenic dogs who did not develop cutaneous hemorrhage appeared normal, while large interendothelial gaps and widened endothelial junctions were found in the skin of those who did bleed. From these observations it was suggested that variability in the degree of endothelial damage may account for differences in the bleeding phenotype in thrombocytopenia. Nonetheless, although opening of endothelial junctions and gaps surely permit plasma leakage, they are unlikely sufficient to allow the escape of RBCs beyond the inner endothelial layer of blood vessels, unless they are concomitant with alterations of the underlying basement membrane. However, with the exception of the initial study by Gore et al., in which disruptions of basement membrane portions adjacent to endothelial gaps in myocardial venules of thrombocytopenic guinea pigs were noted [27] (but later interpreted as possible tissue preparation artefacts [21]), none of the other electron microscopy studies on the origins of bleeding in thrombocytopenia found defects in the basement membrane of microvessels from thrombocytopenic animals or patients [16–19,21–23]. In the absence of such defects, one should expect to find RBCs escaping through endothelial junction being eventually retained by the basement membrane underneath the endothelium. Remarkably, electron microscopy micrographs of RBCs lying between the endothelium and the basement membrane of microvessels in the constricted cremaster of thrombocytopenic rats are shown in the 1976 study by Dale and Hurley [21]. Finally, in support of the idea that loosening of endothelial junctions is not the cause of bleeding in thrombocytopenia, recent studies have shown that injection of the pro-permeability factors histamine or VEGF did not induce skin bleeding in severely thrombocytopenic mice [28,29]. Taken together, these data strongly suggest that, although endothelial alterations might favor RBC extravasation and sensitize microvessels to injuries by weakening the first vascular barrier, second “hits” capable of inducing damage to the basement membrane are required for spontaneous bleeding during thrombocytopenia. If in addition to low platelet counts and possible associated endothelial alterations, second hits are needed to trigger “spontaneous” bleeding in thrombocytopenia, why did thrombocytopenic animals bleed in ultrastructural studies where, in most cases, induction of thrombocytopenia was supposedly the only challenge [6,16,18,21,27,31]? Could there be surreptitious causes? Mild trauma represents an obvious possible cause of basement membrane injury, but as presented

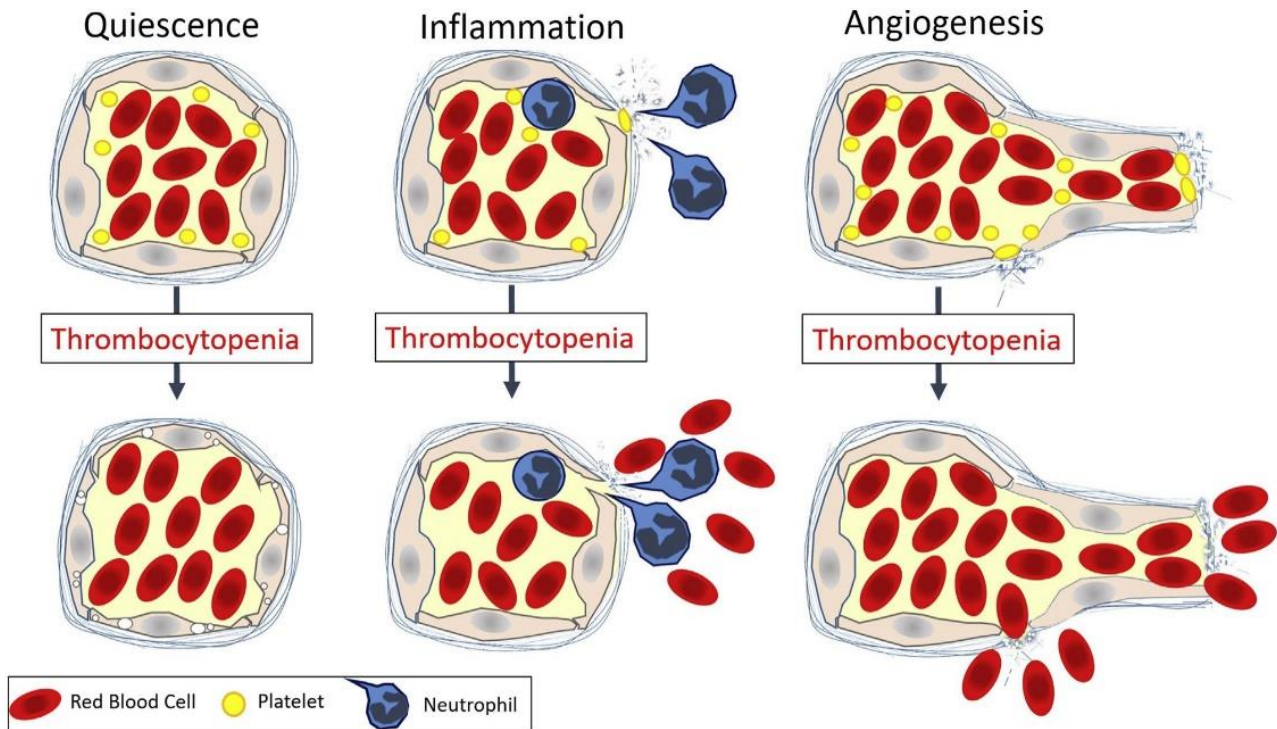


Fig. 1. Non-traumatic causes of bleeding in thrombocytopenia. Several non-traumatic causes have been proposed to explain spontaneous bleeding events in thrombocytopenia. Low platelet counts have long been assumed to be associated with endothelial alterations, including endothelial thinning and gap formation. Although such alterations might lead to vascular fragility, they are unlikely sufficient to cause escape of red blood cells through the unruptured basement membrane underlying the endothelial layer. Recent studies have shown that leukocyte infiltration is a cause of microvascular lesions in inflamed organs that can trigger bleeding in thrombocytopenia. Angiogenesis, whose steps include degradation of the basement membrane, has also been shown to induce bleeding in experimental models of thrombocytopenia.

below, other unsuspected causes have been recently identified as potential triggers of bleeding in thrombocytopenia.

### 3. Inflammation causes bleeding in thrombocytopenia

Mucous membranes and skin, the main surface barriers in animals, are the most common sites of spontaneous bleeding in thrombocytopenia [1,32–35]. They are the body's first line of defence, and as such they are continuously exposed to a variety of inflammatory stimuli including tissue damage, infections, foreign bodies, irritants and toxic compounds, allergens, and radiations. Leukocyte infiltration associated with inflammatory reactions and immune responses has long been identified as a non-traumatic cause of basement membrane damage [36,37]. It is thus tempting to hypothesize that local inflammatory processes could trigger bleeding events interpreted as spontaneous in thrombocytopenia (Fig. 1). In support of this model, 10 years ago, it was shown that subjecting thrombocytopenic mice to models of dermatitis, cerebral ischemia-reperfusion, or lung inflammation, invariably resulted in bleeding at the inflammatory reaction site, while the same challenges did not cause bleeding in mice with normal platelet counts [38]. Remarkably, induction of thrombocytopenia alone did not cause bleeding either, a result that was in line with those of a previous study showing that low platelet counts by themselves did not explain bleeding in mice immunodepleted of platelets [39]. Over the past years, the ability of inflammation to induce bleeding in

thrombocytopenia has been confirmed by different groups in a variety of models covering a wide array of inflammatory stimuli [40,41]. Those stimuli include viral [42,43] and bacterial [44,45] infections, immunization [46], immune complexes [38,47–49], irritants [28,38], ischemia-reperfusion [38,50], and even irradiation [28]. Taken together, these studies have revealed an important role for platelets in preventing bleeding from the very onset of inflammation and throughout the inflammatory process. They show that a defect in this function due to low platelet counts can lead to bleeding in situations that are otherwise clinically silent from a hemostasis perspective. Could subclinical inflammation then have contributed to spark “spontaneous” bleeding events observed in early experimental studies in thrombocytopenic animals? Although answers to this question can only be speculative, it is worth noting that these studies were done long before the widespread introduction of surveillance and monitoring of animal health and welfare conditions. We all know too well that pathogens including parasites, bacteria, viruses, and fungi are common guests of conventional animal facilities. Another potential source of inflammation comes from the methods of induction of thrombocytopenia. Irradiation, which was used in several historic studies, is an established cause of both vascular injury and inflammation [51–54]. Platelet immunodepletion by the mean of a platelet antiserum or of a purified antibody to a given platelet antigen was also used in past studies and remains a very common way for inducing profound thrombocytopenia in animals [55]. It has been shown, however, that depending on the

platelet antigen targeted, platelet depleting antibodies might not only cause thrombocytopenia, but also adverse systemic inflammatory reactions that can be associated with bleeding in the skin and mucous membranes [55]. Thus, even in the absence of provoked inflammation, it is conceivable that inflammation due to pathogens endemic to conventional laboratory animal facilities, or secondary to the induction of thrombocytopenia might have contributed to bleeding in thrombocytopenic animals.

The demonstration that inflammatory reactions induce bleeding in experimental thrombocytopenia sheds a new light on clinical findings and observations in thrombocytopenic patients. First, it provides an alternative or complementary explanation to the reversal of endothelial abnormalities for the ability of glucocorticoids to prevent bleeding in thrombocytopenia irrespectively of platelet count correction [14,18]. Furthermore, it questions the mechanisms underlying bleeding in the tourniquet test, which, in the past, was part of the clinical tests for the diagnosis of thrombocytopenia and hemostasis defects [30,56]. It was used to assess the above-discussed assumed capillary fragility accompanying thrombocytopenia in both humans and animals [21,30,57]. Briefly, the tourniquet test consists in inflating a cuff around the upper arm at a specific pressure for a fixed period of time in order to increase pressure in capillaries downstream of the cuff. The formation of petechiae consecutive to this manipulation is interpreted as capillary fragility indicative of a defect in platelet count and/or function. Nonetheless, although intended as such, the tourniquet test is not simply a model of increased blood pressure. From an inflammation standpoint, it is a model of ischemia-reperfusion injury that has been shown to involve leukocyte-mediated vascular injury [58–62]. One could argue that the duration of ischemia in the tourniquet test is limited to only a few minutes. However, recent studies have shown that leukocyte recruitment occurs within minutes of ischemia [63–65], thus indicating that short periods of ischemia might be sufficient to cause vascular injury. Nowadays, the tourniquet test is no longer in use for the diagnosis of thrombocytopenia but it is still part of the WHO-recommended tests for the diagnosis of dengue infection [66]. It is worth noting that hemorrhagic fevers like dengue are often associated with thrombocytopenia and provide a clinical illustration of how the combination of infection and thrombocytopenia can cause bleeding in humans.

The ability of inflammation to trigger bleeding in thrombocytopenic patients was directly addressed and demonstrated under controlled experimental conditions in a recent study. In this study, Hillgruber et al. showed that skin inflammation induced by UVB irradiation caused cutaneous petechiae in thrombocytopenic patients but not in control subjects with normal platelet counts [28]. Those results not only confirmed experimental data obtained in thrombocytopenic mice [28] but also reproduced an incidental observation made in a patient with ITP who developed petechial bleeding after getting a sunburn [67]. The risk of inflammation-induced bleeding in thrombocytopenia has clinical implications for management of thrombocytopenic patients. In fact, it suggests that investigating and treating inflammation might help prevent bleeding events in those patients. In support of this view is the case of another ITP patient who

had stopped brushing her teeth to avoid oral bleeding from brushing-associated trauma but who ended up bleeding because of a periodontitis that had developed secondary to poor oral hygiene habits. Treatment of the periodontitis and adoption of good oral health habits helped to stop gum bleeding in this patient [68].

The mechanisms by which platelets prevent bleeding in inflamed organs are described extensively elsewhere [40,41,69–71] and will not be developed here. It is noteworthy, however, to mention that hemostasis in inflamed organs does not necessarily require platelet aggregation and relies on both organ- and stimulus-dependent pathways [40,49,50,70]. By taking into consideration results from both early and recent studies, a model arises where platelets continuously seal breaches in inflamed vessels caused in part by infiltrating leukocytes. Depending on the degree of injury, this repair function can be ensured by single platelets or sheets of platelets covering small holes in the vasculature, or by more strongly activated and aggregated platelets in case of more severe injury. This model of graduated and fine-tuned platelet responses might give a rationale for or at least is consistent with the existence of multiple and numerous platelet activation pathways.

#### 4. Conclusions

Although low platelet counts may lead to ultrastructural endothelial alterations, those alterations and the associated state of vascular fragility are unlikely sufficient to cause spontaneous rupture of the entire microvessel wall. In addition to endothelial degeneration, factors capable of damaging the basement membrane are required to allow escape of RBCs in the extravascular space. Therefore, despite a misleading name, spontaneous bleeding events in thrombocytopenia are provoked. Besides increased blood pressure, inflammatory reactions represent a potentially important source of microvascular lesions. Spontaneous bleeding events in thrombocytopenia might be then viewed as indicators of subclinical inflammation, which could be worth taking into account for management of thrombocytopenic patients. Finally, inflammation is likely not the only surreptitious cause of bleeding in thrombocytopenia (Fig. 1). In fact, platelets ensure hemostasis in other non-traumatic situations. In particular, platelets have been shown to prevent bleeding during angiogenesis, whose steps involve degradation of the basement membrane [72–74]. Like in acute models of inflammation, induction of thrombocytopenia leads to bleeding in various experimental models of angiogenesis, including models of solid tumors [75–77]. How exactly platelets prevent bleeding from angiogenic vessels remains to be determined but there is evidence that it could involve mechanisms comparable to those of inflammation-associated hemostasis [71,77]. Remarkably, recent work by the group of Heyu Ni has revealed the contribution of impaired angiogenesis to intracranial hemorrhage, a life-threatening complication of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia [78–80].



## Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

## Acknowledgments

This work was supported by Inserm and funded by grants from La Fondation pour la Recherche Médicale (#DPC20171138959), la Fondation Arc (#PJA20151203107), INCa (#2016-164), and la Fondation de France to B. Ho-Tin-Noé.

## References

- [1] Gauer RL, Braun MM. Thrombocytopenia. *Am Fam Physician* 2012;85:613–22.
- [2] Kam T, Alexander M. Drug-induced immune thrombocytopenia. *J Pharm Pract* 2014;27:430–9, <http://dx.doi.org/10.1177/0897190014546099>.
- [3] Bennett CM. Drug-induced Thrombocytopenia. *Transfus Med Hemost* 2009;487–90, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374432-6.00089-0>.
- [4] Solomon CG, Greinacher A. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2015;373:252–61, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMcp1411910>.
- [5] Dior M, Coriat R, Mir O, Brezault C, Perkins G, Dhooge M, et al. A rare hematological adverse event induced by bevacizumab: Severe thrombocytopenia. *Am J Med* 2012;125:828–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.04.026>.
- [6] Wilson JJ, Neame PB, Kelton JG. Infection-induced thrombocytopenia. *Semin Thromb Hemost* 1982;8:217–33, <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-1005053>.
- [7] Georgiev G, Milanov S, Todorova V, Kozarov L, Milanov M. Sepsis-induced thrombocytopenia: Early prediction and modifiable mortality. *Crit Care* 2011;15:S156, <http://dx.doi.org/10.1186/cc9862>.
- [8] K.I. S. Schexneider KI, Reedy EA. Thrombocytopenia in dengue fever. *Curr Hematol Rep* 2005;4:145–8.
- [9] Cohen YC, Djulbegovic B, Shamai-Lubovitz O, Mozes B. The Bleeding Risk and Natural History of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Patients With Persistent Low Platelet Counts. *Arch Intern Med* 2000;160:1630, <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.160.11.1630>.
- [10] George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:3–40, <http://dx.doi.org/10.3109/07853899808999383>.
- [11] Stasi R. How to approach thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012:191–7, <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation191-20121>.
- [12] Izak M, Bussel J. Management of thrombocytopenia. *F1000Prime Rep* 2014;6, <http://dx.doi.org/10.12703/P6-45>.
- [13] Arnold DM. Bleeding complications in immune thrombocytopenia. *Hematology* 2015:237–42, <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation237-20151>.
- [14] Faloon WW, Greene RW, Lozner EL. The hemostatic defect in thrombocytopenia as studied by the use of ACTH and cortisone. *Am J Med* 1952;13:12–20, [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(52\)90076-4](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(52)90076-4).
- [15] Gore I, Takada M, Austin J. Ultrastructural basis of experimental thrombocytopenic purpura. *Arch Pathol* 1970;90:197–205.
- [16] Kitchens CS, Weiss L. Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood* 1975;46:567–78.
- [17] Kitchens CS, Pendergast JF. Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endothelium that are ameliorated by glucocorticosteroid administration. *Blood* 1986;67:203–6.
- [18] Kitchens CS. Amelioration of endothelial abnormalities by prednisone in experimental thrombocytopenia in the rabbit. *J Clin Invest* 1977;60:1129–34, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI108864>.
- [19] Levine DN, Cianciolo RE, Linder KE, Bizikova P, Adam J, Brooks MB, et al. Endothelial alterations in a canine model of immune thrombocytopenia. *Platelets* 2017;00:1–10, <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2017.1378807>.
- [20] Nachman RL, Rafii S, Platelets. Petechiae, and Preservation of the Vascular Wall. *N Engl J Med* 2008;359:1261–70, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0800887>.
- [21] Dale C, Hurlley JV. An electron-microscope study of the mechanism of bleeding in experimental thrombocytopenia. *J Pathol* 1977;121:193–213, <http://dx.doi.org/10.1177/1077546311404269>.
- [22] Shepro D, Sweetman HE, Hechtman HB. Experimental thrombocytopenia and capillary ultrastructure. *Blood* 1980;56:937–40.
- [23] Miles RG, Hurlley JV. The effect of thrombocytopenia on the ultrastructure and reaction to injury of vascular endothelium. *Microvasc Res* 1983;26:273–90, [http://dx.doi.org/10.1016/0026-2862\(83\)90077-8](http://dx.doi.org/10.1016/0026-2862(83)90077-8).
- [24] Aledort LM, Hayward CPM, Chen MG, Nichol JL, Bussel J. Prospective screening of 205 patients with ITP, including diagnosis, serological markers, and the relationship between platelet counts, endogenous thrombopoietin, and circulating antithrombopoietin antibodies. *Am J Hematol* 2004;76:205–13, <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.20104>.
- [25] Neunert C, Noroozi N, Norman G, Buchanan GR, Goy J, Nazi I, et al. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *J Thromb Haemost* 2015;13:457–64, <http://dx.doi.org/10.1111/jth.12813>.
- [26] Mead AJ, Newland AC, Provan D. Adult Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Hematology* 2003;8:345–57, <http://dx.doi.org/10.1080/1024533032000158850>.
- [27] Gore I, Wada M, Goodman ML. Capillary hemorrhage in ascorbic-acid-deficient guinea pigs. Ultrastructural basis. *Arch Pathol* 1968;85:493–502.
- [28] Hillgruber C, Poppelmann B, Weishaupt C, Steingraber AK, Wessel F, Berdel WE, et al. Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia. *J Exp Med* 2015;212:1255–66, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20142076> [pii:jem.20142076].
- [29] Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Demers M, Cifuni SM, Goerge T, Wagner DD. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol* 2009;175:1699–708, <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2009.090460> [pii:S0002-9440(10)60680-3].
- [30] Humble JG. The mechanism of petechial hemorrhage formation. *Blood* 1949;4:69–75.
- [31] Johnson SA, Balboa RS, Dessel BH, Monto RW, Siegesmund KA, Greenwalt TJ. The mechanism of the endothelial supporting function of intact platelets. *Exp Mol Pathol* 1964;3:115–27, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4800\(64\)90045-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4800(64)90045-0).
- [32] Provan D, Newland A. Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Adults. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25, <http://dx.doi.org/10.1097/00043426-200312001-00008>.
- [33] Bolton-Maggs P. Severe bleeding in idiopathic thrombocytopenic purpura TL - 25. sev bleeding idiopathic thrombocytopenic purpura; 2003 [25 VN-r].
- [34] Neunert C, Buchanan GR, Imbach PA, Bolton-Maggs PHB, Bennett CM, Neufeld EJ, et al. Bleeding manifestations and management of children with persistent and chronic immune thrombocytopenia (ITP): Data from the intercontinental cooperative ITP. *Blood* 2009;114:4457–63, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-12-466375>.
- [35] Brannan DP, Guthrie THJ. Idiopathic thrombocytopenic purpura in adults. *South Med J* 1988;81:75–80.
- [36] Cochrane CG, Aikin BS. Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions. The destruction of vascular basement membrane in vivo and in vitro. *J Exp Med* 1966;124:733–52.
- [37] Janoff A, Scherer J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1968;128:1137–55.
- [38] Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 2008;111:4958–64, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-11-123620> [pii:blood-2007-11-123620].
- [39] Dominguez V, Govezensky T, Gevorkian G, Larralde C. Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice. *Haematologica* 2003;88:679–87.

- [40] Ho-Tin-Noe B, Boulaftali Y, Camerer E. Platelets and Vascular Integrity: How platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood* 2017 [In press].
- [41] Deppermann C. Platelets vascular integrity. *Platelets* 2018;1–7, <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2018.1428739>.
- [42] Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, Whitmire JK, Marchese P, Chisari FV, et al. Platelets prevent IFN-alpha/beta-induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:629–34, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711200105> [pii: 0711200105].
- [43] Loria GD, Romagnoli PA, Moseley NB, Rucavado A, Altman JD. Platelets support a protective immune response to LCMV by preventing splenic necrosis. *Blood* 2013;121:940–50, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-376822> [pii: blood-2011-08-376822].
- [44] de Stoppelaar SF, van t Veer C, Claushuis TA, Albersen BJ, Roelofs JJ, van der Poll T. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice. *Blood* 2014;124:3781–90, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-05-573915> [pii: blood-2014-05-573915].
- [45] Claushuis TAM, de Vos AF, Nieswandt B, Boon L, Roelofs JJTH, de Boer OJ, et al. Platelet glycoprotein VI aids in local immunity during gram-negative pneumonia derived sepsis. *Blood* 2018;131:864–76.
- [46] Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, Hess PR, Sen A, McDaniel JM, et al. Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* 2013;502:105–9, <http://dx.doi.org/10.1038/nature12501> [pii:nature12501].
- [47] Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 2009;120:1255–65, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.873695> [pii: Circulationaha.109.873695].
- [48] Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, Ollivier V, Loyau S, Goerge T, et al. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* 2015;126:1017–26, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-12-617159> [pii:blood-2014-12-617159].
- [49] Rayes J, Jadoui S, Lax S, Gros A, Wichaiyo S, Ollivier V, et al. The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* 2018;103.
- [50] Deppermann C, Kraft P, Volz J, Schuhmann MK, Beck S, Wolf K, et al. Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice. *Blood* 2017;129:1702–6, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-12-750711> [pii:blood-2016-12-750711].
- [51] Quarmby S, Kumar P, Kumar S. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. *Int J Cancer* 1999;82:385–95 [Doi 10.1002/(SICI)1097-0215(19990730)82:3<385::AID-IJC12>3.0.CO;2-5].
- [52] Narayan K, Cliff WJ. Morphology of irradiated microvasculature: a combined in vivo and electron-microscopic study. *Am J Pathol* 1982;106:47–62.
- [53] Yang V, Stearner S, Dimitrievich G, Griem M. Study in the rabbit radiation ear chamber damage to the microvasculature. *Radiat Res* 1977;70:107–17.
- [54] Hallahan D, Kuchibhotla J, Wyble C. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res* 1996;56:5150–5.
- [55] Nieswandt B, Bergmeier W, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood* 2000;96:2520–7.
- [56] Quick AJ. The bleeding time as a test of hemostatic function. *Am J Clin Pathol* 1975;64:87–94.
- [57] Shepro D, Welles SL, Hechtman HB. Vasoactive agonists prevent erythrocyte extravasation in thrombocytopenic hamsters. *Thromb Res* 1984;35:421–30, [http://dx.doi.org/10.1016/0049-3848\(84\)90234-2](http://dx.doi.org/10.1016/0049-3848(84)90234-2).
- [58] Hughes SF, Hendricks BD, Edwards DR, Middleton JF. Tourniquet-applied upper limb orthopaedic surgery results in increased inflammation and changes to leukocyte, coagulation and endothelial markers. *PLoS One* 2010;5, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011846>.
- [59] Hughes SF, Cotter MJ, Evans SA, Jones KP, Adams RA. Role of leukocytes in damage to the vascular endothelium during ischaemia-reperfusion injury. *Br J Biomed Sci* 2006;63:166–70, <http://dx.doi.org/10.1080/09674845.2006.11732743>.
- [60] Hughes SF, Hendricks BD, Edwards DR, Bastawrous SS, Roberts GE, Middleton JF. Mild episodes of tourniquet-induced forearm ischaemia-reperfusion injury results in leukocyte activation and changes in inflammatory and coagulation markers. *J Inflamm* 2007;4, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-9255-4-12>.
- [61] Estebe JP, Davies JM, Richebe P. The pneumatic tourniquet: Mechanical, ischaemia-reperfusion and systemic effects. *Eur J Anaesthesiol* 2011;28:404–11, <http://dx.doi.org/10.1097/EJA.0b013e328346d5a9>.
- [62] Tran TP, Tu H, Pipinos II, Muelleman RL, Albadawi H, Li YL. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *Eur J Pharmacol* 2011;650:328–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.037>.
- [63] Desilles JP, Syvannarath V, Ollivier V, Journe C, Delbosc S, Ducroux C, et al. Exacerbation of Thromboinflammation by Hyperglycemia Precipitates Cerebral Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation. *Stroke* 2017, <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017080> [pii: STROKEAHA.117.017080].
- [64] Desilles JP, Loyau S, Syvannarath V, Gonzalez-Valcarcel J, Cantier M, Louedec L, et al. Alteplase Reduces Downstream Microvascular Thrombosis and Improves the Benefit of Large Artery Recanalization in Stroke. *Stroke* 2015;46:3241–8, <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.010721> [pii:STROKEAHA.115.010721].
- [65] Desilles JP, Syvannarath V, Meglio L, Di, Ducroux C, Boisseau W, et al. Downstream microvascular thrombosis in cortical venules is an early response to Proximal Cerebral Arterial occlusion. *J Am Heart Assoc* 2018;7, <http://dx.doi.org/10.1161/JAHA.117.007804>.
- [66] Dengue haemorrhagic fever Diagnosis WHO. treatment, prevention and control. *Dengue Haemorrhagic Fever Diagnosis. Treat Prev Control* 1997:1–92, <http://dx.doi.org/10.1002/9781444340051>.
- [67] Carbo C, del Conde I, Duerschmied D. Petechial bleeding after sunburn in a patient with mild thrombocytopenia. *Am J Hematol* 2009;84:523, <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21321>.
- [68] Sangwan A, Tewari S, Narula SC, Sharma RK, Sangwan P. Significance of periodontal health in primary immune thrombocytopenia- a case report and review of literature. *J Dent (Tehran)* 2013;10:197–202.
- [69] Boulaftali Y, Hess PR, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ Res* 2014;114:1174–84, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301611> [pii: CIRCRESAHA.114.301611].
- [70] Boulaftali Y, Mawhin M, Jandrot-Perrus M, Ho-Tin-Noé B. Glycoprotein VI in securing vascular integrity in inflamed vessels. *Res Pract Thromb Haemost* 2018;2:228–39.
- [71] Ho-Tin-Noe B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2011;9(Suppl 1):56–65, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x>.
- [72] Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:1–19, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a005090>.
- [73] Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol* 2008;18:560–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.08.007>.
- [74] Chang SH, Kanasaki K, Gocheva V, Blum G, Harper J, Moses MA, et al. VEGF-A induces angiogenesis by perturbing the cathepsin-cysteine protease inhibitor balance in venules, causing basement membrane degradation and mother vessel formation. *Cancer Res* 2009;69:4537–44, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4539>.
- [75] Kisucka J, Butterfield CE, Duda DG, Eichenberger SC, Saffaripour S, Ware J, et al. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:855–60, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510412103>.
- [76] Ho-Tin-Noe B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res* 2008;68:6851–8, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0718> [pii:68/16/6851].

- [77] Ho-Tin-Noe B, Goerge T, Wagner DD. Platelets: guardians of tumor vasculature. *Cancer Res* 2009;69:5623–6, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1370> [pii: 0008-5472.CAN-09-1370].
- [78] Yougbaré I, Lang S, Yang H, Chen P, Zhao X, Tai WS, et al. Maternal anti-platelet  $\beta 3$  integrins impair angiogenesis and cause intracranial hemorrhage. *J Clin Invest* 2015;125:1545–56, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI77820>.
- [79] Xu XR, Gallant RC, Ni H. Platelets, immune-mediated thrombocytopenias, and fetal hemorrhage. *Thromb Res* 2016;141:S76–9, [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(16\)30372-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30372-3).
- [80] Yougbaré I, Zdravic D, Ni H. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Novel mechanisms of miscarriage learned from placental pathology in animal models. *J Pediatr Pediatr Med* 2018;2:28–33.



## REVUE 2

# The reversed passive Arthus reaction as a model for investigating the mechanisms of inflammation-associated hemostasis

Soumaya Jadoui, Ophélie Le Chapelain, Yacine Boulaftali, Benoit Ho-Tin-Noé

Publié dans Platelets, Mai 2020



# The reversed passive Arthus reaction as a model for investigating the mechanisms of inflammation-associated hemostasis

Ophélie Le Chapelain<sup>a\*</sup>, Soumaya Jadoui<sup>a\*</sup>, Yacine Boulaftali<sup>a</sup>, & Benoit Ho-Tin-Noé<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Université de Paris, LVTS, Inserm U1148, F-75018 Paris, France

## Abstract

In recent years, accumulating evidence has indicated that platelets continuously repair vascular damage at sites of inflammation and/or infection. Studies in mouse models of inflammation have highlighted the fact that the mechanisms underlying bleeding prevention by platelets in inflamed organs can substantially differ from those supporting primary hemostasis following tail tip transection or thrombus formation in models of thrombosis. As a consequence, exploration of the hemostatic function of platelets in inflammation, as well as assessment of the risk of inflammation-induced bleeding associated with a platelet deficit and/or the use of anti-thrombotic drugs, require the use of dedicated experimental models. In the present review, we present the pros and cons of the cutaneous reversed passive Arthus reaction, a model of inflammation which has been instrumental in studying how inflammation causes vascular injury and how platelets continuously intervene to repair it. The limitations and common issues encountered when working with mouse models of inflammation for investigating platelet functions in inflammation are also discussed.

## Keywords

Inflammation, platelets, reversed passive Arthus reaction, vascular integrity

## History

Received 9 December 2019

Revised 20 January 2020

Accepted 14 February 2020

Published online 28 February 2020

## Introduction

Over the last years, accumulating evidence from several groups has highlighted the hemostatic function of platelets in inflamed organs[1]. Importantly, studies on the mechanisms underlying inflammation-associated hemostasis have underscored the fact that they can substantially differ from those supporting primary hemostasis following traumatic injury or thrombosis. As a consequence, the contribution of platelet activation receptors and adhesion molecules to the prevention of bleeding in inflamed organs cannot be predicted from their role in models of thrombosis or in the tail bleeding time assay. There are indeed many examples of discrepancies regarding the involvement of a given platelet receptor in thrombosis, hemostasis after injury, and bleeding prevention in inflamed organs (Table I). For instance, glycoprotein (GP) Ib complex deficiency or blockade in mice protects from ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>)-induced thrombosis and increases tail bleeding time [2,5,13,36], whereas it does not sensitize to inflammation-induced bleeding in the skin, brain, or in solid tumors (Table I) [8,10,13,9]. In contrast, GPVI, whose implication in thrombosis varies with the model considered [16,17,37], is not essential for bleeding arrest after tail tip transection[17], but is primarily involved in the prevention of neutrophil-induced bleeding in the inflamed skin and in various types of solid tumors (Table I) [9,18–20]. These examples show that assessment of the risk of inflammation-induced bleeding associated with a platelet deficit and/or the use of anti-thrombotic drugs requires the use of dedicated experimental models.

In the present review, we present and discuss the pros and cons of the cutaneous reversed passive Arthus reaction, a model of inflammation which has been instrumental in studying how inflammation causes vascular injury and how platelets continuously intervene to repair it.

## The Reversed Passive Arthus Reaction

The Arthus reaction is a classic *in vivo* model of immune complex-mediated acute inflammatory tissue injury. It is named after the French physiologist Nicolas Maurice Arthus who reported the effect of repeated injections of aseptic horse serum in rabbits. In his 1903 report, Arthus noted that, while a single injection of horse serum in the skin, peritoneum, or blood of rabbits had no acute or delayed effect, repeated injections of the very same serum, even at low doses, resulted in local or systemic adverse reactions, depending on the injection route. In the skin, these adverse reactions ranged from simple edema to necrosis[38]. From a mechanistic perspective, the cutaneous Arthus reaction is a hypersensitivity reaction triggered by the formation of antigen/antibody complexes consecutively to the intradermal injection of an antigen following several courses of immunization. The experimental protocol consists in, first, immunizing an animal with a soluble antigen, and then, once antibodies to this antigen are present in the circulation, injecting the antigen intradermally. Besides this classical « active » Arthus reaction, several « passive » variations of the Arthus reaction have been developed. In these « passive » variations, the immune phase of sensitization and endogenous antibody production is bypassed by transferring an active precipitating antibody to unimmunized recipient animals. Skipping the sensitization phase offers several experimental and practical advantages if one's objective is to study the events following immune complex formation. It is time- and cost-

\*These authors contributed equally to this work

Correspondence: Benoit Ho-Tin-Noé, Université de Paris, LVTS, Inserm U1148, F-75018 Paris, France. E-mail: [benoit.ho-tin-noe@inserm.fr](mailto:benoit.ho-tin-noe@inserm.fr)

Table I. Distinct implication of platelet adhesion and activation receptors in mouse models of primary hemostasis, thrombosis, and inflammation-associated hemostasis. Comparison of the impact of pharmacological or genetic inactivation of various platelet adhesion and/or activation receptors in the tail bleeding time and ferric chloride thrombosis assays, and in various models of inflammation.

	Tail bleeding time	FeCl <sub>3</sub> -induced thrombosis	Inflammation-induced bleeding			
			Reversed passive Arthus reaction	LPS-induced lung inflammation	Transient cerebral ischemia	Tumors
GPIIb-IX-V	Prolonged [2–4]	Completely inhibited [5–7]	No bleeding[8,9]	Minor bleeding [9]	No bleeding [10–12]	Lewis lung carcinoma: No bleeding[13] B16 melanoma: No bleeding[14]
GPVI	No effect [15]	No effect [15–17]	Bleeding [9,18,19]	Bleeding [19] No bleeding[9]	No bleeding [10]	TrampC1 prostate cancer and AT-3 breast cancer: Bleeding[20] Lewis lung carcinoma: No bleeding[21]
PAR4	Prolonged [15,22]	Partially inhibited [15,22]	No bleeding [19]	No bleeding [19]	No bleeding [23]	Not Determined
P2Y <sub>12</sub>	Prolonged [24,25]	Completely inhibited [24,25]	No bleeding [19]	No bleeding [19]	No bleeding [26]	B16F1 melanoma and Lewis lung carcinoma: No bleeding[27]
CLEC-2	Slightly prolonged [28,29]	Partially inhibited [28,29]	Bleeding [19] No bleeding [9]	Bleeding [19] No bleeding [9]	Not Determined	B16 melanoma and 3LL lung carcinoma: No bleeding[30]
αIIbβ <sub>3</sub>	Prolonged [31]	Completely inhibited [32]	No bleeding [8,9,33]	No bleeding [9]	Hemorrhagic transformation [10]	B16 melanoma: No bleeding[34] 4T1 breast carcinoma: No bleeding[35]

saving, and allows a more rapid and better-controlled reaction induction. The possibility to inject the same dose of precipitating antibody to all animals favors the reproducibility of the experiments. In addition, the antibody dose can be adjusted to control the reaction kinetics and severity.

Passive versions of the Arthus reaction include:

- the direct passive Arthus reaction, in which the precipitating antibody is first injected intravenously in recipient animals, and then, immediately after, the antigen is injected in the skin
- the reversed passive Arthus reaction (RPA), in which the antigen is injected intravenously and the corresponding precipitating antibody in the skin
- the local passive Arthus reaction (LPA), in which a first injection with the antibody is made directly in the skin, followed by a superimposed injection of the antigen

A 4<sup>th</sup> variation, almost similar to the LPA, consists in injecting pre-formed antigen-antibody complexes in the skin. The latter two variations of the Arthus reaction were actually initially used in early studies aimed at determining the intrinsic ability of antigen/antibody complexes to directly trigger inflammation and tissue injury [39,40].

The Arthus reaction and its passive versions have been compared to one another, notably by Cochrane and Weigle. Their comparison showed that all of these reactions share the same sequence of events and result in local skin edema, leukocyte infiltration, hemorrhage, and necrosis. However, at equal dosage of antibody, these features develop more rapidly and are more pronounced in models where either the antigen or the antibody is injected intravenously than in models where both the antigen and the antibody are injected locally [40,41]. The increased severity of the reaction when one of the reactants is present intravenously has been shown to be associated with preferential localization of the immune complexes in vessel walls, leading to greater intravascular leukocyte accumulation and related vascular injury [40,41].

The RPA has been the main model used in mice for investigating the mechanisms of inflammation-associated hemostasis in the skin [8,9,18,19,33,42–46]. Studies using various transgenic mice have shown that multiple redundant components support the cutaneous RPA. Its initiation by IgG immune complexes is mediated by Fc gamma receptors (FcγRs)[47], particularly on mast cells[48], and, to a lesser degree, by the complement C5a receptor (C5aR) [49–51]. FcγR-dependent activation of mast cells by IgG immune complexes is essential to edema formation and to the recruitment of neutrophils [48,52], which have been identified as the main mediators of vascular injury causing bleeding in the cutaneous RPA [18,53,54]. The recruitment of mast cells and neutrophils to the skin during the RPA involves various adhesion receptors and ligands, including ICAM1 [55], L-selectin[55], P-selectin[42], β<sub>2</sub> integrins[54], and von Willebrand factor [44–46]. With respect to platelets, their functions in the cutaneous RPA have been shown to include promotion of edema formation and leukocyte recruitment, and repair of neutrophil-mediated vascular injury [18,42,54]. Remarkably, the mouse cutaneous RPA may only provide a partial insight into the functions of platelets in IC-induced inflammation, as, in contrast to human platelets, mouse platelets do not express any FcγR[56].

Although the present review focuses on the cutaneous RPA, it is important to note that the relative participation of mast cells, FcγRs, and of the various complement components in the initiation of the RPA vary in a tissue site-specific manner [49,57]. For instance, complement component C3 participates in RPA development in the lungs but not in the skin[57]. More generally, as compared to its role in the cutaneous RPA, the complement system plays a more prominent role when the RPA is elicited in the lungs [49,57]. Interestingly, there is evidence that the mechanisms by which platelets secure inflamed vessels during the RPA also follow a tissue site-specific pattern. In fact, while the platelet collagen receptor GPVI plays a key role in bleeding prevention during the cutaneous RPA, it is dispensable in the lung RPA[9].

## Methodological Aspects of the Cutaneous Reversed Passive Arthus Reaction

A common antigen/antibody combination used to trigger the RPA in mice is serum bovine albumin (BSA) and anti-BSA rabbit IgG [8,9,18,19,33,43–46]. Other antigen/antibody pairs like chicken egg albumin and anti-chicken egg albumin rabbit IgG have also been used with comparable efficacy [42,47,49,52,55,58]. As the use of heterologous rabbit IgG in mice might look surprising, it is worth noting that rabbit IgG immune complexes have Fc pieces recognized by mouse Fc $\gamma$  receptors (Fc $\gamma$ R) [59–62]. In the vast majority of the studies, the precipitating rabbit IgG is injected intradermally in the mouse dorsal skin at a dose 60  $\mu$ g/spot in a volume ranging from 20 to 30  $\mu$ L. Irrelevant rabbit IgG or saline are usually injected as negative controls. The dorsal skin offers several injection sites, thus allowing to have negative controls and/or multiple RPA spots in each mouse. Depending on the study, the dose of antigen injected iv varies between 20 and 150  $\mu$ g/g body weight [8,9,18,19,33,43]. The reasons for these variations in the dose of antigen used are not clear but one can assume that it is due to the fact that the antigen dose is the easiest (and least expensive) parameter one can adjust to modulate RPA severity and kinetics.

## Investigating platelet functions in inflammation with the cutaneous reversed passive Arthus reaction

As mentioned above, the cutaneous RPA is characterized by local edema, neutrophil infiltration, and tissue injury, including hemorrhage and even necrosis at later time points. This model can thus be used to investigate how platelets regulate these various parameters, which can all be analyzed quantitatively, in addition to classical qualitative histological examination.

Plasma protein extravasation and edema can be quantitatively assessed by measuring skin accumulation of intravenously injected Evan's blue dye and/or the increase in skin biopsy wet weight in RPA compared to control spots [42,46,49,54].

Myeloperoxidase (MPO) being abundantly stored in neutrophil azurophilic granules, it accounts for >5% of the neutrophil dry mass [63], neutrophil infiltration is usually estimated by determination of skin MPO content [8,9,44–46,49,54]. A classical method for quantification of MPO in the skin is the measurement of its peroxidase activity by the mean of a peroxidase substrate, generally 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) [8,9,44–46,49,54]. One should, however, keep in mind that, though convenient and relatively inexpensive, general peroxidase substrates like TMB are not specific for MPO [64,65]. In addition to tissue

inhibitors of MPO, other peroxidases present in the tissue may interfere with the quantification. This issue becomes particularly relevant when working in mice with compromised platelet function, and therefore potentially prone to bleeding, as the peroxidase activity of hemoglobin may lead to overestimation of MPO content. Immunohistological quantification of infiltrating neutrophils or measurement of MPO antigen using immunoassays like ELISA are alternative methods that can help circumvent these difficulties in hemorrhagic samples.

As neutrophils trigger bleeding in the cutaneous RPA [18,54], neutrophil recruitment is an important parameter to assess when studying inflammation-associated hemostasis. In fact, if blocking of a pathway happens to compromise neutrophil recruitment, it may then also compromise the overall evaluation of inflammation-induced bleeding. Before the development of GPVI<sup>-/-</sup> mice, mice lacking the Fc $\gamma$  chain (Fc $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mice), which is required for GPVI expression and function in platelets [66–68], were used as a model for GPVI deficiency. It has been shown that Fc $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mice do not bleed abnormally when subjected to the cutaneous RPA [8,48,52]. The absence of bleeding phenotype of Fc $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mice in the cutaneous RPA is in stark contrast with that of GPVI<sup>-/-</sup> mice, which have since been shown to develop exacerbated skin bleeding in this model [9,18,19]. Considering that Fc $\gamma$ Rs on mast cells amplify neutrophil infiltration during the cutaneous RPA [48,52], reduced neutrophil-dependent injury in Fc $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mice may have masked the need for GPVI to stop bleeding in the inflamed skin. In a similar manner, given that platelets promote neutrophil infiltration in the cutaneous RPA [42], it is possible that blocking certain platelet activation pathways also affects neutrophil recruitment, thus compromising evaluation of inflammation-induced bleeding. This issue related to the duality of platelets in inflammation most likely applies to other models of inflammation, such as solid tumors and LPS-induced lung inflammation [20,35,54], in which platelets also repair neutrophil-inflicted vascular injury.

Occurrence of bleeding during the cutaneous RPA can be assessed macroscopically by examining the skin. Bleeding severity can be quantified by various methods, including counting of bleeding spots [54], measurement of the bleeding surface area [42,48,58], counting of erythrocytes in tissue sections [52], or measurement of skin hemoglobin content using biochemical assays [9,18,19,43,45]. Here again, an important issue to consider, particularly in mice with defective primary hemostasis, is the risk of bleeding from injection-related trauma, which can cause false-positive results. Careful examination of the bleeding pattern can help distinguish between inflammation- and trauma-induced bleeding. Inflammation-induced bleeding manifests as petechiae with multiple clearly distinguishable bleeding spots,



Figure 1. Distinguishing neutrophil-induced bleeding from trauma-induced bleeding in the cutaneous reversed passive Arthus reaction. Thrombocytopenia or compromised platelet function can lead to false-positive bleeding from injection-related trauma in the cutaneous RPA. Examination of the bleeding pattern makes it possible to distinguish between neutrophil-induced and trauma-induced bleeding. Whereas neutrophil-induced bleeding occurs under the form of multiple petechiae, trauma-induced bleeding takes the form of a single diffuse blood stain. The images show the typical aspect of neutrophil-induced and injection trauma-induced skin bleeding in thrombocytopenic mice subjected to the cutaneous RPA. The control corresponds to the skin a thrombocytopenic mouse left unchallenged.



indicative of microvessel rupture caused by leukocyte infiltration (Figure 1). In contrast, trauma-related bleeding takes the form of a single diffuse blood stain (Figure 1). Distinguishing between RPA- and trauma-induced bleeding may, however, become more difficult as RPA bleeding spot density and size increases with reaction progression and/or severity (Figure 1). Therefore, for optimal assessment of inflammation-induced bleeding, skin examination should be carried out before the distinct petechiae merge together into a larger stain. As compared to edema formation and leukocyte recruitment, bleeding in mice with normal platelet function is actually a late event that is usually evaluated at 8 hours after RPA initiation, when tissue injury is severe and readily apparent [42,52]. Intravital microscopy analysis of the cutaneous RPA using the dorsal skinfold chamber model has shown that, in contrast, RPA-induced bleeding in thrombocytopenic mice can be detected as early as 20 min after reaction initiation [8]. These results have thus revealed that platelets surreptitiously intervene to ensure hemostasis from the very onset of inflammation. From a methodological point of view, this means that defects in this platelet function can be detected and analyzed early after reaction elicitation. In agreement with this notion, skin bleeding in mice with a deficiency in GPVI or GPVI signaling is obvious after 4 hours of cutaneous RPA [9,18,19], a timing at which no macroscopic bleeding is visible in mice with normal platelet count and function [8,9,18,19,33].

Platelet recruitment to the inflamed vasculature is another parameter that can be investigated in the cutaneous RPA. In a comparable manner to neutrophil recruitment that can be evaluated by skin MPO content, platelet accumulation at the RPA site can be quantified by measuring a protein abundantly stored in platelet granules (e.g. platelet factor 4) in skin biopsies [18]. Furthermore, the possibility of combining the cutaneous RPA with intravital microscopy in the dorsal skinfold chamber allows real-time analysis of platelet interactions with leukocytes and the vessel wall at the reaction site. Such analysis has shown that neutrophils and single platelets are recruited to inflamed capillaries and post-capillary venules within minutes of reaction induction [18]. Although it has not been taken advantage of yet, the cutaneous RPA is also compatible with other *in vivo* imaging methods which have proven their usefulness for the study of inflammation, such as noninvasive fluorescence imaging for detection and quantification of vascular permeability, cell trafficking, or proteolytic activity by the mean of enzyme-activatable fluorescent probes [69,70].

Finally, inflammation-induced changes in gene and protein expression can also be investigated in the cutaneous RPA using transcriptome and proteome analysis techniques. Analysis by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction of RNA isolated from skin samples has notably shown that platelet depletion by busulfan leads to a reduction in the production of major pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$ , during the RPA [42].

## Conclusions

The mouse cutaneous RPA has been essential to the demonstration of the continuous hemostatic action of platelets in inflamed organs. Recent studies have suggested that this model could be of particular interest for investigating the aggregation-independent functions of individual platelets in inflammation [18]. More generally, it provides a well-characterized and accessible model for studying how platelets promote edema formation and neutrophil recruitment, and how they repair neutrophil-induced vascular injury during inflammation. The mechanisms underlying hemostasis in the cutaneous RPA have however been shown to be different from those involved in other inflammatory settings like

LPS-induced lung inflammation or cerebral ischemia/reperfusion (Table I) [1,9]. The pathways of inflammatory responses (e.g. FcR-dependent or driven by pattern recognition receptors) vary greatly with the stimulus nature, and so do the vascular bed characteristics (e.g. endothelial cell phenotype, basement membrane and perivascular extracellular matrix composition) and types of resident immune cells with the organ considered. Platelets have the capacity to differentially sense a variety of environmental cues, including extracellular matrix components and inflammatory stimuli, through distinct types of activating and inhibitory receptors. It might not be surprising, then, that, as was shown previously [1,9,33], the respective contribution of platelet receptors to inflammation regulation is both organ and stimulus-dependent. Therefore, in a comparable manner to the study of thrombosis, which requires the use of various models [16,24], the functions of platelets in inflammation cannot be fully apprehended without the use of multiple models of inflammation.

## Acknowledgements

This work was supported by La Fondation pour la Recherche Médicale (grant #DPC20171138959), and the Agence Nationale de la Recherche ANR-16-RHUS-0004 (RHU TRT\_cSVD), and L'INCA (RPT16002MMA). Soumaya Jadoui is the recipient of a grant from La Société Française d'Hématologie.

## Author Contributions

OLC, SJ, YB drafted the Table and contributed intellectual content. BH conceived and wrote the manuscript.

## Declaration of Interest

The authors report no conflicts of interest.

## References

1. Ho-Tin-Noé B, Boulaftali Y, Camerer E. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood* 2018; 1313:277–288. doi:10.1182/blood-2017-06-742676.
2. Ware J, Russell S, Ruggeri ZM. Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the bernard-soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 976:2803–2808. doi:10.1073/pnas.050582097.
3. Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2002; 1006:2102–2107. doi:10.1182/blood-2002-03-0997.
4. Kanaji S, Orje JN, Kanaji T, Kamikubo Y, Morodomi Y, Chen Y, Zarpellon A, Eberhardt J, Forli S, Fahs SA et al. Humanized GPIIb-IIIa-von willebrand factor interaction in the mouse. *Blood Adv* 2018; 2:192522–2532. doi:10.1182/bloodadvances.2018023507.
5. Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, Cifuni SM, Ruggeri ZM, Ware J, Wagner DD. The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 10345:16900–16905. doi:10.1073/pnas.0608207103.
6. Sermon AM, Smith JM, Maclean R, Kitchen S. INR in liver disease: an ISI derived from liver disease patients improves agreement between INRs with different reagents. *J Thromb Haemost* 2009; 7S2:353–354. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03473-2.x.
7. Kanaji S, Orje JN, Kanaji T, Kamikubo Y, Morodomi Y, Chen Y, Zarpellon A, Eberhardt J, Forli S, Fahs SA et al. Humanized GPIIb-IIIa-von Willebrand factor interaction in the mouse. *Blood Adv* 2018. doi:10.1182/bloodadvances.2018023507.
8. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ, Cifuni SM, Wagner DD. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 2008; 11110:4958–4964. doi:10.1182/blood-2007-11-123620.
9. Rayes J, Jadoui S, Lax S, Gros A, Wichaiyo S, Ollivier V, Denis CV, Ware J, Nieswandt B, Jandrot-Perrus M et al. The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* 2018; 1036e256–8. doi:10.3324/haematol.2017.182162.

10. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation* 2007; 115:2323–2330. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.691279.
11. Chen C, Li T, Zhao Y, Qian Y, Li X, Dai X, Huang D, Pan T, Zhou L. Platelet glycoprotein receptor Ib blockade ameliorates experimental cerebral ischemia–reperfusion injury by strengthening the blood–brain barrier function and anti-thrombo-inflammatory property. *Brain Behav Immun* 2018; 69:255–263. doi:10.1016/j.bbi.2017.11.019.
12. Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. The role of glycoprotein Ibalpha and von Willebrand factor interaction in stroke development. *Hamostaseologie* 2010; 30:136–138. doi:10.1055/s-0037-1619047.
13. Ho-Tin-Noé B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res* 2008; 68:6851–6858. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0718.
14. Jain S, Zuka M, Liu J, Russell S, Dent J, Guerrero JA, Forsyth J, Maruszak B, Gartner TK, Felding-Habermann B et al. Platelet glycoprotein Ib $\alpha$  supports experimental lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:219024–9028. doi:10.1073/pnas.0700625104.
15. Bynagari-Settipalli YS, Cornelissen I, Palmer D, Duong D, Concengco C, Ware J, Coughlin SR. Redundancy and interaction of thrombin- and collagen-mediated platelet activation in tail bleeding and carotid thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34:2563–2569. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304244.
16. Mangin PH, Tang CJ, Bourdon C, Loyau S, Freund M, Hechler B, Gachet C, Jandrot-Perrus M. A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 341:156–163. doi:10.1124/jpet.111.189050.
17. Mangin P, Yap CL, Nonne C, Sturgeon SA, Goncalves I, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Wright CE, Lanza F, Jackson SP. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcR $\gamma$  deficiency. *Blood* 2006; 107:4346–4353. doi:10.1182/blood-2005-10-4244.
18. Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, Ollivier V, Loyau S, Goerge T, Nieswandt B, Jandrot-Perrus M, Ho-Tin-Noé B. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* 2015; 126:1017–1026. doi:10.1182/blood-2014-12-617159.
19. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, Cholka A, Stolla M, Mackman N, Owens AP, Ware J, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest* 2013; 123:908–916. doi:10.1172/JCI65154.
20. Volz J, Mammadova-Bach E, Gil-Pulido J, Nandigama R, Remer K, Sorokin L, Zerneck A, Abrams SI, Ergün S, Henke E et al. Inhibition of platelet GPVI induces intratumor hemorrhage and increases efficacy of chemotherapy in mice. *Blood* 2019; 133:252696–2706. doi:10.1182/blood.2018877043.
21. Jain S, Russell S, Ware J. Platelet glycoprotein VI facilitates experimental lung metastasis in syngenic mouse models. *J Thromb Haemost* 2009; 7:1713–1717. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03559.x.
22. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001; 413:6851:74–78. doi:10.1038/35092573.
23. Mao Y, Zhang M, Tuma RF, Kunapuli SP. Deficiency of PAR4 attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30:1044–1052. doi:10.1038/jcbfm.2009.283.
24. André P, DeGuzman F, Haberstock-Debic H, Mills S, Pak Y, Inagaki M, Pandey A, Hollenbach S, Phillips DR, Conley PB. Thienopyridines, but not elinogrel, result in off-target effects at the vessel wall that contribute to bleeding. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 338:1:22–30. doi:10.1124/jpet.110.178574.
25. André P, Phillips DR, Conley PB, André P, Delaney SM, Larocca T, Vincent D, Deguzman F, Jurek M, Koller B et al. P2Y<sub>12</sub> regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003; 113:398–406. doi:10.1172/JCI200317864.Introduction.
26. Yamauchi K, Imai T, Shimazawa M, Iwama T, Hara H. Effects of ticagrelor in a mouse model of ischemic stroke. *Sci Rep* 2017; 7(1). doi:10.1038/s41598-017-12205-w.
27. Wang Y, Sun Y, Li D, Zhang L, Wang K, Zuo Y, Gartner TK, Liu J. Platelet P2Y<sub>12</sub> is involved in murine pulmonary metastasis. *PLoS One* 2013; 8:11. doi:10.1371/journal.pone.0080780.
28. May F, Hagedorn I, Pleines I, Bender M, Vögtle T, Eble J, Elvers M, Nieswandt B. CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood* 2009; 114:3464–3472. doi:10.1182/blood-2009-05-222273.
29. Bender M, May F, Lorenz V, Thielmann I, Hagedorn I, Finney BA, Vögtle T, Remer K, Braun A, Bösl M et al. Combined in vivo depletion of glycoprotein VI and C-type lectin-like receptor 2 severely compromises hemostasis and abrogates arterial thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:926–934. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300672.
30. Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H et al. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost* 2017; 15:513–525. doi:10.1111/jth.13604.
31. Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Culleré M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S, Hynes RO. B3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* 1999; 103:229–238. doi:10.1172/JCI5487.
32. Smyth SS, Reis ED, Väänänen H, Zhang W, Collier BS. Variable protection of  $\beta$ 3-integrin-deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood* 2001; 98:1055–1062. doi:10.1182/blood.V98.4.1055.
33. Deppermann C, Kraft P, Volz J, Schuhmann MK, Beck S, Wolf K, Stegner D, Stoll G, Nieswandt B. Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice. *Blood* 2017; 129:1702–1706. doi:10.1182/blood-2016-12-750711.
34. Ehtler K, Konrad I, Lorenz M, Schneider S, Hofmaier S, Plenagl F, Stark K, Czermak T, Tirniceriu A, Eichhorn M et al. Platelet GPIIb supports initial pulmonary retention but inhibits subsequent proliferation of melanoma cells during hematogenic metastasis. *PLoS One* 2017; 12:3. doi:10.1371/journal.pone.0172788.
35. Ho-Tin-Noé B, Carbo C, Demers M, Cifuni SM, Goerge T, Wagner DD. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol* 2009; 174:1699–1708. doi:10.2353/ajpath.2009.090460.
36. Maurer E, Tang C, Schaff M, Bourdon C, Receveur N, Ravanat C, Eckly A, Hechler B, Gachet C, Lanza F et al. Targeting platelet GPIIb $\beta$  reduces platelet adhesion, gpIb signaling and thrombin generation and prevents arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:1221–1229. doi:10.1161/ATVBAHA.112.301013.
37. Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* 2006; 107:3902–3906. doi:10.1182/blood-2005-09-3687.
38. Arthus M. Injections repetées de serum de cheval chez le lapin. *Cie ME editor. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales. Paris:Libraires de l'Académie de Médecine; 1903. p. 817–820.*
39. Ishizaka K, Ishizaka T, Campbell DH. The biological activity of soluble antigen-antibody complexes. II. Physical properties of soluble complexes having skin-irritating activity. *J Exp Med* 1959; 109:127–143. doi:10.1084/jem.109.2.127.
40. Cochrane CG, Weigle WO. The cutaneous reaction to soluble antigen-antibody complexes; a comparison with the Arthus phenomenon. *J Exp Med* 1958; 108:591–604. doi:10.1084/jem.108.5.591.
41. Cochrane CG. The Arthus and related reactions. Williams CA, Chase MW editors. *Antigen-Antibody Reactions In Vivo: methods in Immunology and Immunochemistry*. New York San Francisco London:Academic Press; 1976. p. 159–175.
42. Hara T, Shimizu K, Ogawa F, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, Takenaka M, Komura K, Hasegawa M, Fujimoto M et al. Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthus reaction. *Am J Pathol* 2010; 176:259–269. doi:10.2353/ajpath.2010.081117.
43. Lee RH, Piatt R, Conley PB, Bergmeier W. Effects of ibuprofen treatment on murine platelet function during inflammation and in primary hemostasis. *Haematologica* 2017; 102:e89–92. doi:10.3324/haematol.2016.155978.

44. Adam F, Casari C, Prévost N, Kauskot A, Loubière C, Legendre P, Repérant C, Baruch D, Rosa JP, Bryckaert M et al. A genetically-engineered von Willebrand disease type 2B mouse model displays defects in hemostasis and inflammation. *Sci Rep* 2016; 6. doi:10.1038/srep26306.
45. Aymé G, Adam F, Legendre P, Bazaa A, Proulle V, Denis CV, Christophe OD, Lenting PJ. A novel single-domain antibody against von willebrand factor a1 domain resolves leukocyte recruitment and vascular leakage during inflammation - brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 379:1736–1740. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309319.
46. Hillgruber C, Steingraber AK, Pöppelmann B, Denis CV, Ware J, Vestweber D, Nieswandt B, Schneider SW, Goerge T. Blocking von willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2014; 134:77–86. doi:10.1038/jid.2013.292.
47. Sylvestre DL, Ravetch JV. Fc receptors initiate the arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* 1994; 265:1175–1179. doi:10.1126/science.8066448.
48. Sylvestre DL, Ravetch JV. A dominant role for mast cell Fc receptors in the arthus reaction. *Immunity* 1996; 54:387–390. doi:10.1016/S1074-7613(00)80264-2.
49. Höpken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C. Impaired inflammatory responses in the reverse arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor. *J Exp Med* 1997; 186:749–756. doi:10.1084/jem.186.5.749.
50. Köhl J, Gessner JE. On the role of complement and Fc  $\gamma$ -receptors in the arthus reaction. *Mol Immunol* 1999; 36(13–14):893–903. doi:10.1016/S0161-5890(99)00111-X.
51. Baumann U, Köhl J, Tschernig T, Schwerter-Strumpf K, Verbeek JS, Schmidt RE, Gessner JE. A codominant role of Fc $\gamma$ RI/III and C5aR in the reverse arthus reaction. *J Immunol* 2000; 164:1065–1070. doi:10.4049/jimmunol.164.2.1065.
52. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Augmentation of reverse Arthus reaction by mast cells in mice. *J Clin Invest* 1991; 88:841–846. doi:10.1172/JCI115385.
53. Cochrane CG, Aikin BS. Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions. The destruction of vascular basement membrane in vivo and in vitro. *J Exp Med* 1966; 124:733–752. doi:10.1084/jem.124.4.733.
54. Hillgruber C, Pöppelmann B, Weishaupt C, Steingraber AKA, Wessel F, WE B, JE G, Ho-Tin-Noé B, Vestweber D, Goerge T. Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia. *J Exp Med* 2015; 212:1255–1266. doi:10.1084/jem.20142076.
55. Kaburagi Y, Hasegawa M, Nagaoka T, Shimada Y, Hamaguchi Y, Komura K, Saito E, Yanaba K, Takehara K, Kadono T et al. The cutaneous reverse arthus reaction requires intercellular adhesion molecule 1 and L-selectin expression. *J Immunol* 2002; 168:2970–2978. doi:10.4049/jimmunol.168.6.2970.
56. Daëron M. Fc RECEPTOR BIOLOGY. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:203–234. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.203.
57. Baumann U, Chouchakova N, Gewecke B, Köhl J, Carroll MC, Schmidt RE, Gessner JE. Distinct tissue site-specific requirements of mast cells and complement components C3/C5a receptor in IgG immune complex-induced injury of skin and lung. *J Immunol* 2001; 167:1022–1027. doi:10.4049/jimmunol.167.2.1022.
58. Orito H, Fujimoto M, Ishiura N, Yanaba K, Matsushita T, Hasegawa M, Ogawa F, Takehara K, Sato S. Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 cooperatively contribute to the cutaneous Arthus reaction. *J Leukoc Biol* 2007; 81:1197–1204. doi:10.1189/jlb.1006623.
59. Unkeless JC, Kaplan G, Plutner H, Cohn ZA. Fc-receptor variants of a mouse macrophage cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:1400–1404. doi:10.1073/pnas.76.3.1400.
60. Unkeless JC. The presence of two Fc receptors on mouse macrophages: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity\*. *J Exp Med* 1977; 145:931–947. doi:10.1084/jem.145.4.931.
61. Steinman RM, Cohn ZA. The interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages in vitro. *J Cell Biol* 1972; 55:186–204. doi:10.1083/jcb.55.1.186.
62. Finbloom DS, Magilavy DB, Harford JB, Rifai A, Plotz PH. Influence of antigen on immune complex behavior in mice. *J Clin Invest* 1981; 68:214–224. doi:10.1172/JCI110238.
63. Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys* 1962; 96:465–467. doi:10.1016/0003-9861(62)90321-1.
64. Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KLC, Wojtkiewicz G, Linnoila JJ, Chen JW. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One* 2013. doi:10.1371/journal.pone.0067976.
65. Xia Y, Zweier JL. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. *Anal Biochem* 1997; 245:93–96. doi:10.1006/abio.1996.9940.
66. Poole A, Gibbins JM, Turner M, Van Vugt MJ, Van De Winkel JGJ, Saito T, Tybulewicz VLJ, Watson SP. The Fc receptor  $\gamma$ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *Embo J* 1997; 16:2333–2341. doi:10.1093/emboj/16.9.2333.
67. Berlanga O, Tulasne D, Bori T, Snell DC, Miura Y, Jung S, Moroi M, Frampton J, Watson SP. The Fc receptor  $\gamma$ -chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur J Biochem* 2002; 269:2951–2960. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02969.x.
68. Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcR $\gamma$  chain. *J Biol Chem* 2000; 275:23998–24002. doi:10.1074/jbc.M003803200.
69. Cho H, Bhatti F-U-R, Yoon TW, Hasty KA, Stuart JM, Yi A-K. Non-invasive dual fluorescence in vivo imaging for detection of macrophage infiltration and matrix metalloproteinase (MMP) activity in inflammatory arthritic joints. *Biomed Opt Express* 2016; 7:1842–1852. doi:10.1364/boe.7.001842.
70. Cloutier N, Paré A, Farndale RW, Schumacher HR, Nigrovic PA, Lacroix S, Boilard E. Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* 2012; 120:1334–1343. doi:10.1182/blood-2012-02-413047.



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

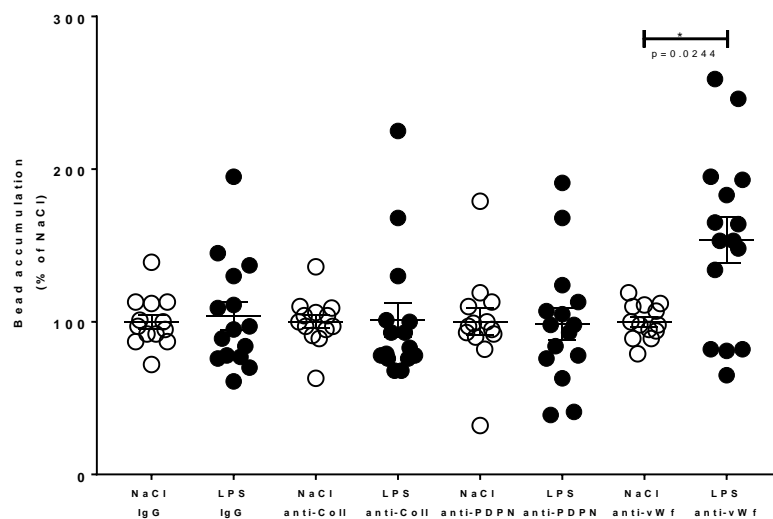
Dans la partie introductive de ce travail, nous avons pu voir qu'en dehors de l'hémostase, les plaquettes ont un rôle essentiel dans les réactions inflammatoires. Les plaquettes sont importantes dans la protection des saignements au cours des réactions inflammatoires et ce dans différents organes. Les récepteurs plaquettaire GPVI et CLEC-2 ont été identifiés comme étant potentiellement les principaux récepteurs responsables de cette fonction protectrice des plaquettes. L'objectif principal de ce travail de thèse a été d'étudier le rôle des plaquettes et de leurs récepteurs dans différents modèles inflammatoires.

Dans un premier temps nous avons cherché à déterminer si et comment GPVI et CLEC-2 coopéraient pour assurer la fonction hémostatique des plaquettes dans différents modèles inflammatoires. Dans mon 1<sup>er</sup> article, nous avons montré qu'au cours des réactions inflammatoires, les mécanismes par lesquels les plaquettes préviennent les saignements varient en fonction du stimulus inflammatoire ainsi que de l'organe stimulé. En effet, dans un modèle d'inflammation cutanée chez la souris (la rpA cutanée), nous avons montré que GPVI jouait un rôle majeur dans le contrôle des saignements inflammatoires cutanés alors que CLEC-2 ne jouait qu'un rôle mineur, visible uniquement en absence de GPVI. Dans un modèle d'inflammation pulmonaire induit par inhalation d'endotoxine, nous avons montré que ni GPVI ni CLEC-2 n'était impliqué dans la protection des saignements inflammatoires. Ainsi, contrairement à l'hypothèse selon laquelle ces deux récepteurs plaquettaire joueraient un rôle central dans la prévention des saignements inflammatoires [139], nos résultats ont démontré que la prépondérance fonctionnelle de ces récepteurs observée dans le cas d'une inflammation cutanée ne pouvait pas être généralisée à toutes les situations inflammatoires. En effet, nous avons montré que la hiérarchie fonctionnelle entre récepteurs plaquettaire dans la prévention des saignements inflammatoires variait à la fois avec le stimulus et le site inflammatoires. Ces variations mécanistiques en fonction du contexte inflammatoire rendent difficile la prédiction du rôle respectif des différents récepteurs plaquettaire dans la prévention des saignements inflammatoires. Une meilleure compréhension des facteurs déterminant le rôle respectif des différents récepteurs plaquettaire dans cette fonction pourrait cependant permettre d'anticiper le risque hémorragique associé à la prise d'antiplaquettaire administrés en conditions inflammatoires et d'orienter au mieux les prises de décisions thérapeutiques. Par exemple, en raison du rôle délétère joué par les plaquettes au cours des accidents vasculaires cérébraux ischémiques (AVCs) en tant que constituant cellulaire principal des thrombi artériels, mais

également en tant que cellules pro-inflammatoires favorisant l'infiltration des leucocytes dans le parenchyme cérébral à la phase aiguë des AVCs, il a été proposé que l'utilisation d'antiplaquettaires pourrait limiter les lésions d'ischémie-reperfusion cérébrale [259]. Néanmoins, des études dans des modèles d'AVC chez la souris ont montré que parallèlement à ces effets délétères, les plaquettes exerçaient une fonction bénéfique cruciale en prévenant les saignements induits par l'inflammation associée à l'ischémie-reperfusion cérébrale [125], [140]. Cette situation illustre l'ambivalence des plaquettes au cours des réactions inflammatoires et l'intérêt potentiel de bloquer sélectivement leurs fonctions inflammatoires délétères tout en préservant leur fonction hémostatique. L'existence de nombreuses voies d'activation plaquettaire et d'un large choix de médicaments antiplaquettaires déjà disponibles (ex : aspirine, thienopyridines, ticagrelor) ou en cours de développement (ex : anticorps anti-GPVI tel que le Glencimab [260], GPVI dimérique soluble (Revacept) [261], anticorps anti-GPIIb tel que l'Anfibatide [262]) offre une telle perspective.

Il est probable que plusieurs facteurs, non-exclusifs, déterminent ensemble les voies d'activation plaquettaire engagées dans une situation inflammatoire donnée. Outre les stimuli inflammatoires dont certains sont capables d'activer directement les plaquettes via des récepteurs spécifiques (ex : PAMPs et PRRs, complexes immuns et récepteurs FcγRIIA), nos résultats suggèrent un rôle du lit vasculaire dont dépend la composition de la lame basale et de la matrice extracellulaire périvasculaire et donc la nature des ligands et des protéines adhésives potentiellement exposés aux plaquettes circulantes. Nos résultats montrent en effet qu'au contraire de la podoplanine, le collagène de type IV est exposé au sang circulant au cours de la rpA cutanée, une situation propice et en accord avec l'engagement et le rôle de la GPVI au cours de cette réaction. Le rôle prépondérant de la GPVI dans la prévention des saignements cutanés au cours de la rpA pourrait également s'expliquer par le fait que les collagènes de type I ou III sont particulièrement abondants dans la peau [264]. De façon intéressante, dans nos résultats non publiés mais présentés ci-après, nous avons de la même manière comparé l'exposition au sang circulant de la podoplanine, du collagène de type IV et du vWF au cours de l'inflammation pulmonaire aiguë induite par inhalation d'endotoxine. Ces résultats mettent en évidence une exposition et/ou accumulation préférentielle du vWF au cours de cette réaction (**Figure 36**). Ce résultat est compatible avec un engagement de la GPIIb dans ce modèle inflammatoire et semble

donc cohérent avec l'implication de la GPIb dans la prévention des saignements pulmonaires que nous avons rapportée [263].



**Figure 36. Comparaison de l'exposition au sang circulant de ligands de différents récepteurs plaquettaires au cours d'une inflammation pulmonaire aiguë induite par inhalation d'endotoxine.** Comparaison de l'accumulation intrapulmonaire de microsphères fluorescentes recouvertes d'anticorps non-relevants contrôles ou ciblant le collagène (ligand de GPVI), la podoplanine (ligand de CLEC-2) ou le facteur de von Willebrand (ligand de GPIb-V-IX). Ces microsphères ont été injectées dans la circulation par voie intraveineuse chez des souris ayant subi une inflammation pulmonaire par inhalation d'endotoxine puis leur recrutement a été quantifié par mesure de la fluorescence des différents types de billes par cytométrie en flux après digestion des poumons. Coll : collagène. PDPN : podoplanine. vWf : von Willebrand factor.

En plus de variations dans la composition du sous-endothélium et de la matrice périvasculaire, il existe une hétérogénéité phénotypique considérable de l'endothélium entre les différents organes et même selon la taille du vaisseau. Par exemple, l'endothélium peut être hautement perméable, comme dans le rein ou le foie, ou particulièrement imperméable, comme au niveau de la barrière hémato-encéphalique [264]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que comme dans les cellules du système immunitaire, l'activation des récepteurs à motif ITAM des plaquettes peut être contrebalancée par l'activation de récepteurs à motif ITIM [265]. Suite à l'activation de ces récepteurs, des protéines tyrosine-phosphatases comme SHP-1 et SHP-2 sont recrutées et peuvent inactiver certains effecteurs des voies de signalisation ITAM (Syk, PLC $\gamma$ , SLP-76 ou LAT) [266]. Les plaquettes expriment plusieurs récepteurs à motif ITIM comme PECAM-1 (ou CD31), CEACAM-1 (Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule-1 ou CD66a), G6b-B, ou encore LILRB (Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B) qui inhibent l'activation des plaquettes induite par le collagène et des agonistes de GPVI [267]–[270]. Ainsi, l'engagement de



ces récepteurs par leurs ligands respectifs peut inhiber certaines voies d'activation plaquettaire. L'expression des ligands des ITIMs plaquettaires, comme par exemple le perlecan pour G6b-B [271], au sein du sous-endothélium et la variation de cette expression en fonction des différents organes reste à ce jour peu explorée. On peut toutefois envisager qu'une expression différentielle de ces ligands inhibiteurs de certaines voies d'activation plaquettaire pourrait également influencer les voies d'activation plaquettaire disponibles et engagées en fonction du lit vasculaire inflammatoire. L'existence de souris transgéniques déficientes pour ces récepteurs plaquettaires ITIMs pourrait permettre de déterminer l'influence de ces récepteurs sur les mécanismes de prévention des saignements inflammatoires [272].

Bien que nos résultats aient mis en évidence et confirmé l'importance de la GPVI dans la prévention des saignements inflammatoires dans le modèle de rpA cutanée et, dans une moindre mesure, montré celle de la GPIb dans la prévention des saignements inflammatoires pulmonaires induits par le LPS, ils soulignent également l'importante redondance fonctionnelle existant entre les nombreux récepteurs plaquettaires pour assurer l'hémostase dans les organes inflammés. En plus de la capacité de CLEC-2 à compenser partiellement l'absence de GPVI au cours de la rpA cutanée, il apparaît que le blocage ou la délétion génétique d'un seul récepteur ou d'une seule voie d'activation a un impact sur l'hémostase inflammatoire bien inférieur à celui d'une déplétion plaquettaire. De même, il a été montré précédemment que l'hémostase inflammatoire est totalement préservée chez la souris dès que le compte plaquettaire excède 5 à 10 % du compte normal [125]. Cette importante conservation de la fonction peut apparaître rassurante d'un point de vue thérapeutique et pourrait expliquer le fait que la plupart des antiplaquettaires ont peu de complications hémorragiques graves, notamment en conditions inflammatoires. L'absence d'étude rapportant l'incidence d'évènements hémorragiques liés à la prise d'antiplaquettaires en situation inflammatoire suggère qu'il pourrait s'agir d'évènements particulièrement rares. Néanmoins, de nombreuses études cliniques ont rapporté des saignements tumoraux chez des patients atteints de cancers et prenant des antiplaquettaires [273]–[275].

Si l'on considère les similitudes entre prévention des saignements tumoraux et celle des saignements inflammatoires qui reposent toutes les deux sur la réparation par les plaquettes de dégâts infligés par les leucocytes [80], les saignements tumoraux consécutifs à la prise d'antiplaquettaires soulèvent donc tout de même la possibilité d'un risque hémorragique comparable dans les organes inflammés, même si à ce jour ce risque reste peu ou pas exploré. C'est dans ce contexte que nous avons étudié dans mon 2<sup>ème</sup> article le risque de saignement inflammatoire associé à un traitement par du Glenzocimab, un nouvel antiplaquettaire ciblant la GPVI, actuellement en phase 2 d'évaluation clinique pour le traitement des AVCs. Pour cette étude où j'ai eu recours à la rpA comme situation modèle dans laquelle la GPVI intervient dans l'hémostase inflammatoire, mes résultats montrent qu'au contraire du déficit génétique total en GPVI qui conduit à des saignements lors de la rpA cutanée, l'inhibition pharmacologique de la GPVI par le Glenzocimab utilisé même à des doses suprathérapeutiques, ne s'accompagne pas d'un tel effet. Ces résultats, combinés à l'absence de rôle démontré de la GPVI dans la prévention de la transformation hémorragique des AVCs, indiquent donc que l'utilisation de ce nouvel antiplaquettaire chez les patients victimes d'AVCs n'entraînerait pas de surrisque hémorragique. Ce résultat expérimental est cohérent avec le succès récent de la phase d'escalade de dose de Glenzocimab réalisée chez 60 patients d'AVCs ayant reçu ce médicament en complément de la thrombolyse et/ou de la thrombectomie mécanique et chez qui aucune augmentation du risque d'hémorragie intracérébrale ou d'autres événements hémorragiques n'a été observée. Le fait que le Glenzocimab bloque efficacement l'activation et l'agrégation plaquettaires induites par le collagène sans interférer avec l'hémostase inflammatoire dépendante de la GPVI amène des questions quant au mode d'action de la GPVI pour cette fonction. Il a été montré que le Glenzocimab bloquait l'interaction entre le collagène et la GPVI mais l'épitope bloqué par le Glenzocimab n'est à ce jour pas connu. De plus, l'effet du Glenzocimab sur les interactions de la GPVI avec ses ligands autres que le collagène (fibrin(ogène), laminine) reste à déterminer. Bien que le collagène soit exposé au cours de la rpA, il se pourrait donc que d'autres ligands de la GPVI insensibles au Glenzocimab soient impliqués dans le recrutement et l'activation des plaquettes dans ce modèle. Par ailleurs, il est important de noter que nos expériences en chambre de perfusion ont montré que malgré l'inhibition marquée de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires aux fibres de collagènes par le Glenzocimab en conditions de flux, une adhésion résiduelle persistait. L'hémostase inflammatoire ne nécessitant qu'une quantité limitée de

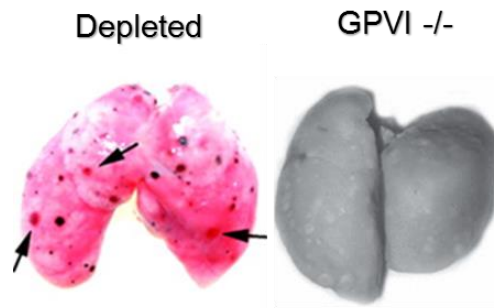
plaquettes ( $\geq 10\%$  du compte normal) et pouvant être assurée indépendamment de l'agrégation plaquettaire dans différents modèles d'inflammation, dont la rpA [276], cette adhésion résiduelle au collagène pourrait être suffisante au maintien de l'intégrité vasculaire dans la peau inflammée. En tout état de cause, nos résultats sont en faveur d'une grande sécurité d'utilisation du Glenzocimab d'un point de vue hémostatique.

Enfin, dans une dernière étude toujours en cours et s'inscrivant dans la continuité de mes travaux sur l'hémostase inflammatoire, je me suis intéressée au rôle des récepteurs GPVI et CLEC-2 dans la stabilisation des vaisseaux tumoraux. Des analogies mécanistiques notables avaient jusqu'ici été rapportées entre prévention des saignements tumoraux et hémostase inflammatoire. Comme rappelé plus-haut, ces deux processus reposent en effet sur la réparation par les plaquettes de dégâts infligés par les leucocytes, réparation pouvant être assurée par une faible quantité de plaquettes et pour laquelle plusieurs des intégrines ou récepteurs d'adhésion plaquettaire essentiels à l'hémostase primaire (GPIb, intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ) ne sont pas indispensables [131]. En raison de ces analogies, notre hypothèse initiale était que, comme suggéré pour l'hémostase inflammatoire [139], GPVI et CLEC-2 pourraient jouer un rôle primordial dans cette fonction au sein des tumeurs solides. De plus, il avait été montré que la déplétion plaquettaire concomitamment à l'administration de médicaments anticancéreux permettait d'augmenter l'accumulation intratumorale et donc l'efficacité de ces médicaments via les saignements tumoraux ainsi provoqués [133]. Nous avons donc pour objectif secondaire de déterminer si GPVI et CLEC-2 représentaient des cibles thérapeutiques potentielles dans le but de reproduire cet effet, la déplétion plaquettaire n'étant pas une approche envisageable d'un point de vue clinique en raison de l'important risque hémorragique. Ayant mis en évidence au cours de mes 1<sup>ers</sup> travaux de thèse les différences mécanistiques importantes concernant l'hémostase inflammation selon le site et le type de réaction inflammatoire, j'ai eu recours pour cette étude à deux modèles de tumeurs solides affectant des organes différents : un modèle de cancer du sein triple négatif (lignée AT3) et un modèle de mélanome (lignée B16F1). Nos résultats montrent que, dans ces deux modèles, des plaquettes individuelles non agrégées interagissent en permanence avec les vaisseaux tumoraux. Cependant, nos données suggèrent que ni GPVI ni CLEC-2 ne joue un rôle majeur dans le recrutement et l'accumulation des plaquettes dans ces tumeurs. Ce résultat

marque une 1<sup>ère</sup> différence notable quant au rôle de la GPVI dans ces modèles de tumeurs solides et dans le modèle de rpA cutanée, réaction au cours de laquelle la GPVI participe au recrutement des plaquettes dans la peau inflammée [141]. Concernant les saignements tumoraux, nous n'avons pas observé d'impact de GPVI sur l'incidence ou la sévérité des saignements tumoraux dans les tumeurs AT-3 ou B16F1. Nos résultats indiquent une légère augmentation statistiquement significative du saignement des tumeurs de souris ayant un déficit en CLEC-2 plaquettaire. Cette augmentation est cependant très modérée, son importance et sa signification biologique restent à établir puisqu'elle ne s'accompagne pas d'une modification de la croissance tumorale. Nos résultats indiquent donc que contrairement à notre hypothèse, GPVI et CLEC-2 ne joueraient pas de rôle majeur dans la prévention des saignements tumoraux cytotoxiques par les plaquettes. De plus, nos résultats préliminaires indiquent que ni le déficit en GPVI, ni le déficit en CLEC-2 au niveau des plaquettes, ne permettrait d'augmenter l'accumulation intratumorale d'anticorps anti-points de contrôle immunitaire PD1/CTLA-4.

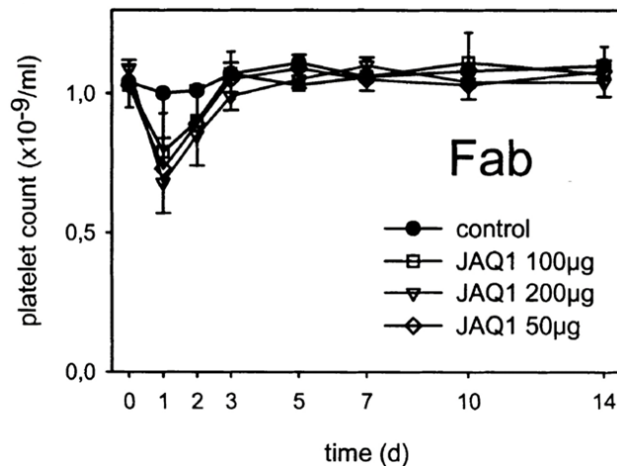
L'absence de phénotype hémorragique des tumeurs de souris GPVI<sup>-/-</sup> et ayant un déficit en CLEC-2 plaquettaire est en accord avec plusieurs études réalisées dans des modèles de métastases pulmonaires expérimentales. Comme au niveau de tumeurs solides implantées à leur site de développement primaire (peau, glande mammaire), les plaquettes préviennent également les saignements au niveau de métastases pulmonaires établies [131]. Plusieurs études chez la souris ont étudié l'impact d'un déficit ou d'une inhibition de GPVI ou CLEC-2 sur le développement de métastases pulmonaires expérimentales. Il est intéressant de noter qu'aucune de ces études n'a

rapporté de saignements pulmonaires chez les souris porteuses de métastases pulmonaires et ayant un déficit en GPVI ou CLEC-2 (**Figure 37**) [206], [277], [278].



**Figure 37. La thrombopénie induit des saignements dans les métastases pulmonaire mais pas la déficience en GPVI.**  
Photographies de poumons montrant l'aspect de métastases pulmonaires chez des souris ayant été traitées par un IgG déplétant les plaquettes (à gauche) ou chez des souris déficientes en GPVI (à droite). Adapté de [131], [279].

Par contre, nos données sont en contradiction avec les résultats d'une étude récente de Volz *et al.* [134] décrivant un phénotype hémorragique de différents types de tumeurs solides implantées chez des souris GPVI<sup>-/-</sup> ou chez des souris traitées par un Fab induisant à une immunodéplétion de la GPVI (JAQ1) [134]. Les raisons de cette différence entre nos résultats et ceux de cette étude restent à élucider. Comme pour les modèles d'inflammation aiguë [263], il existe probablement des différences mécanistiques dans la prévention des saignements tumoraux par les plaquettes liées au type de tumeur. Néanmoins, parmi les modèles de tumeurs utilisés dans l'étude de Volz *et al.* figure le modèle de tumeur mammaire AT-3 que nous avons également utilisé. Concernant la capacité du Fab anti-GPVI JAQ1 à provoquer des saignements tumoraux, là encore ces résultats indiquant que le blocage fonctionnel de la GPVI permettrait d'augmenter la perméabilité vasculaire au sein des tumeurs sont en opposition avec nos résultats. Nous avons en effet montré que le blocage de la GPVI par du Glenzocimab n'avait pas d'incidence sur la survenue d'hémorragies tumorales. Cette différence peut s'expliquer par le mode d'action du Fab JAQ1 qui en plus d'entraîner un blocage et une immunodéplétion de la GPVI à la surface des plaquettes, provoque une thrombopénie transitoire (**Figure 38**) [280]. Ainsi, les saignements observés chez les souris traitées par JAQ1 pourraient peut-être dus à l'effet combiné d'une inhibition de la GPVI et d'une baisse du compte plaquettaire.



**Figure 38. Impact du Fab anti-GPVI JAQ1 sur le compte plaquettaire.** Comparaison de l'effet de doses croissantes du Fab JAQ1 injecté à des souris sur le compte plaquettaire. Issu de [280].

Parmi les aspects qu'il nous reste à explorer, il pourrait être intéressant de vérifier si, comme dans la rpA cutanée, les deux récepteurs GPVI et CLEC-2 coopèrent pour prévenir les saignements tumoraux. L'utilisation de souris doublement invalidées à la fois pour GPVI et CLEC-2 pourrait permettre de répondre à cette question.

En conclusion, mes résultats ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes plaquettaires impliqués dans la prévention des saignements dans les organes inflammés et dans les tumeurs. En montrant la grande variabilité de ces mécanismes en fonction des réactions et du site inflammatoire et des modèles de tumeurs, nos résultats soulèvent la difficulté de prédire le risque hémorragique inflammatoire associé à la prise d'antiplaquettaires et d'identifier une cible pharmacologique plaquettaire unique pour le développement de traitements adjuvants des thérapies anticancéreuses médicamenteuses.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] H. Z. Movat, « Tissue injury and inflammation induced by immune complexes: the critical role of the neutrophil leukocyte », *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 31, n° 1, p. 201-210, août 1979, doi: 10.1016/0014-4800(79)90021-2.
- [2] U. Baumann *et al.*, « Distinct tissue site-specific requirements of mast cells and complement components C3/C5a receptor in IgG immune complex-induced injury of skin and lung », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 167, n° 2, p. 1022-1027, juill. 2001, doi: 10.4049/jimmunol.167.2.1022.
- [3] J. Köhl et J. E. Gessner, « On the role of complement and Fc  $\gamma$ -receptors in the Arthus reaction », *Mol. Immunol.*, vol. 36, n° 13, p. 893-903, sept. 1999, doi: 10.1016/S0161-5890(99)00111-X.
- [4] Y. Lai et R. L. Gallo, « Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases », *Infect. Disord. Drug Targets*, vol. 8, n° 3, p. 144-155, sept. 2008, doi: 10.2174/1871526510808030144.
- [5] M. C. Lebre *et al.*, « Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9 », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, n° 2, p. 331-341, févr. 2007, doi: 10.1038/sj.jid.5700530.
- [6] A. Abtin, L. Eckhart, M. Mildner, F. Gruber, J.-M. Schröder, et E. Tschachler, « Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to *Escherichia coli* », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 22, n° 7, p. 2168-2176, juill. 2008, doi: 10.1096/fj.07-104117.
- [7] « Acute inflammation - Creative Diagnostics ». <https://www.creative-diagnostics.com/acute-inflammation.htm> (consulté le juin 24, 2020).
- [8] M. Zahid *et al.*, « The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 10, n° 12, p. 2418-2427, déc. 2012, doi: 10.1111/jth.12009.
- [9] J.-F. Tanguay *et al.*, « Prevention of in-stent restenosis via reduction of thrombo-inflammatory reactions with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 », *Thromb. Haemost.*, vol. 91, n° 6, p. 1186-1193, juin 2004, doi: 10.1160/TH03-11-0701.
- [10] B. Engelmann et S. Massberg, « Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, n° 1, p. 34-45, janv. 2013, doi: 10.1038/nri3345.
- [11] X. Delabranche, J. Helms, et F. Meziani, « Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis », *Ann. Intensive Care*, vol. 7, n° 1, p. 117, déc. 2017, doi: 10.1186/s13613-017-0339-5.
- [12] J. R. Hitchcock *et al.*, « Inflammation drives thrombosis after *Salmonella* infection via CLEC-2 on platelets », *J. Clin. Invest.*, vol. 125, n° 12, p. 4429-4446, déc. 2015, doi: 10.1172/JCI79070.
- [13] S. Massberg *et al.*, « Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases », *Nat. Med.*, vol. 16, n° 8, p. 887-896, août 2010, doi: 10.1038/nm.2184.

- [14] G. M. Thomas, L. Panicot-Dubois, R. Lacroix, F. Dignat-George, D. Lombardo, et C. Dubois, « Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo », *J. Exp. Med.*, vol. 206, n° 9, p. 1913-1927, août 2009, doi: 10.1084/jem.20082297.
- [15] P.-S. Sung et S.-L. Hsieh, « CLEC2 and CLEC5A: Pathogenic Host Factors in Acute Viral Infections », *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 2867, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02867.
- [16] T. Iba et J. H. Levy, « Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 16, n° 2, p. 231-241, 2018, doi: 10.1111/jth.13911.
- [17] B. Nieswandt, I. Pleines, et M. Bender, « Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 9 Suppl 1, p. 92-104, juill. 2011, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x.
- [18] S. Mezouar *et al.*, « Involvement of Platelet-Derived Microparticles in Tumor Progression and Thrombosis », *Semin. Oncol.*, vol. 41, n° 3, p. 346-358, juin 2014, doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.04.010.
- [19] S. R. Clark *et al.*, « Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood », *Nat. Med.*, vol. 13, n° 4, p. 463-469, avr. 2007, doi: 10.1038/nm1565.
- [20] B. McDonald, R. Urrutia, B. G. Yipp, C. N. Jenne, et P. Kubes, « Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis », *Cell Host Microbe*, vol. 12, n° 3, p. 324-333, sept. 2012, doi: 10.1016/j.chom.2012.06.011.
- [21] A. Carestia, R. P. Davis, H. Grosjean, M. W. Lau, et C. N. Jenne, « Acetylsalicylic acid inhibits intravascular coagulation during Staphylococcus aureus-induced sepsis in mice », *Blood*, vol. 135, n° 15, p. 1281-1286, avr. 2020, doi: 10.1182/blood.2019002783.
- [22] J. Rayes, J. H. Bourne, A. Brill, et S. P. Watson, « The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation », *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, vol. 4, n° 1, p. 23-35, oct. 2019, doi: 10.1002/rth2.12266.
- [23] M. Mezger *et al.*, « Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation », *Front. Immunol.*, vol. 10, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01731.
- [24] W. H. Brown, « THE HISTOGENESIS OF BLOOD PLATELETS », *J. Exp. Med.*, vol. 18, n° 3, p. 278-286, sept. 1913, doi: 10.1084/jem.18.3.278.
- [25] S. H. Song, « Studies on splenic megakaryocytes. I. Recovery of megakaryocytes from the splenic venous outflow », *Vox Sang.*, vol. 35, n° 3, p. 117-125, sept. 1978, doi: 10.1111/j.1423-0410.1978.tb02909.x.
- [26] E. Lefrançais *et al.*, « The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors », *Nature*, vol. 544, n° 7648, p. 105-109, 06 2017, doi: 10.1038/nature21706.
- [27] W. H. Howell et D. D. Donahue, « THE PRODUCTION OF BLOOD PLATELETS IN THE LUNGS », *J. Exp. Med.*, vol. 65, n° 2, p. 177-203, janv. 1937, doi: 10.1084/jem.65.2.177.
- [28] M. Jirouskova, A. S. Shet, et G. J. Johnson, « A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, avr. 01, 2007.



<https://onlinelibrary-wiley-com.gate2.inist.fr/doi/abs/10.1111/j.1538-7836.2007.02407.x>  
(consulté le juin 28, 2019).

- [29] L. Guo et M. T. Rondina, « The Era of Thromboinflammation: Platelets Are Dynamic Sensors and Effector Cells During Infectious Diseases », *Front. Immunol.*, vol. 10, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02204.
- [30] J. N. Thon et J. E. Italiano, « Platelets: production, morphology and ultrastructure », *Handb. Exp. Pharmacol.*, n° 210, p. 3-22, 2012, doi: 10.1007/978-3-642-29423-5\_1.
- [31] J.-P. Cazenave, P. Ohlmann, D. Cassel, A. Eckly, B. Hechler, et C. Gachet, « Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 272, p. 13-28, 2004, doi: 10.1385/1-59259-782-3:013.
- [32] P. Jiravanichpaisal, B. L. Lee, et K. Söderhäll, « Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization », *Immunobiology*, vol. 211, n° 4, p. 213-236, 2006, doi: 10.1016/j.imbio.2005.10.015.
- [33] S. Iwanaga et B. L. Lee, « Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals », *J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 38, n° 2, p. 128-150, mars 2005, doi: 10.5483/bmbrep.2005.38.2.128.
- [34] A. S. Weyrich, S. Lindemann, et G. A. Zimmerman, « The evolving role of platelets in inflammation », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 1, n° 9, p. 1897-1905, sept. 2003, doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00304.x.
- [35] G. Brown, P. J. Hughes, R. H. Michell, A. G. Rolink, et R. Ceredig, « The sequential determination model of hematopoiesis », *Trends Immunol.*, vol. 28, n° 10, p. 442-448, oct. 2007, doi: 10.1016/j.it.2007.07.007.
- [36] W. Bergmeier et L. Stefanini, « Platelet ITAM signaling », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 20, n° 5, p. 445-450, sept. 2013, doi: 10.1097/MOH.0b013e3283642267.
- [37] J. Qiao, M. Al-Tamimi, R. I. Baker, R. K. Andrews, et E. E. Gardiner, « The platelet Fc receptor, FcγRIIIa », *Immunol. Rev.*, vol. 268, n° 1, p. 241-252, nov. 2015, doi: 10.1111/imr.12370.
- [38] S. P. Watson *et al.*, « The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen », *Thromb. Haemost.*, vol. 86, n° 1, p. 276-288, juill. 2001.
- [39] S. P. Watson, J. M. J. Herbert, et A. Y. Pollitt, « GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 8, n° 7, p. 1456-1467, juill. 2010, doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03875.x.
- [40] K. Suzuki-Inoue, N. Tsukiji, T. Shirai, M. Osada, O. Inoue, et Y. Ozaki, « Platelet CLEC-2: Roles Beyond Hemostasis », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 44, n° 2, p. 126-134, mars 2018, doi: 10.1055/s-0037-1604090.
- [41] V. Rathore *et al.*, « PECAM-1 negatively regulates GPIb/V/IX signaling in murine platelets », *Blood*, vol. 102, n° 10, p. 3658-3664, nov. 2003, doi: 10.1182/blood-2003-06-1888.
- [42] F. Cognasse *et al.*, « The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors », *Front. Immunol.*, vol. 6, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00083.
- [43] K. A. Nguyen *et al.*, « Role of Siglec-7 in apoptosis in human platelets », *PloS One*, vol. 9, n° 9, p. e106239, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0106239.

- [44] M. T. Rondina et O. Garraud, « Emerging evidence for platelets as immune and inflammatory effector cells », *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 653, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00653.
- [45] D. Nunez, C. Charriaut-Marlangue, M. Barel, J. Benveniste, et R. Frade, « Activation of human platelets through gp140, the C3d/EBV receptor (CR2) », *Eur. J. Immunol.*, vol. 17, n° 4, p. 515-520, avr. 1987, doi: 10.1002/eji.1830170413.
- [46] A. T. Nurden, « Platelets, inflammation and tissue regeneration », *Thromb. Haemost.*, vol. 105, n° 5, p. S13-S33, 2011, doi: 10.1160/THS10-11-0720.
- [47] O. Garraud, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, J.-M. Cavaillon, et F. Cognasse, « Bench-to bedside review: Platelets and active immune functions - new clues for immunopathology? », *Crit. Care*, vol. 17, n° 4, Art. n° 4, août 2013, doi: 10.1186/cc12716.
- [48] C. Schulz *et al.*, « EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 9, n° 5, p. 1007-1019, mai 2011, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04235.x.
- [49] J. Rayes, S. P. Watson, et B. Nieswandt, « Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2 », *J. Clin. Invest.*, vol. 129, n° 1, p. 12-23, janv. 2019, doi: 10.1172/JCI122955.
- [50] E. Brandt, F. Petersen, A. Ludwig, J. E. Ehlert, L. Bock, et H. D. Flad, « The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 67, n° 4, p. 471-478, avr. 2000, doi: 10.1002/jlb.67.4.471.
- [51] P. von Hundelshausen *et al.*, « RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium », *Circulation*, vol. 103, n° 13, p. 1772-1777, avr. 2001, doi: 10.1161/01.cir.103.13.1772.
- [52] D. K. Jin *et al.*, « Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes », *Nat. Med.*, vol. 12, n° 5, p. 557-567, mai 2006, doi: 10.1038/nm1400.
- [53] A. R. L. Gear et D. Camerini, « Platelet Chemokines and Chemokine Receptors: Linking Hemostasis, Inflammation, and Host Defense », *Microcirculation*, vol. 10, n° 3-4, p. 335-350, 2003, doi: 10.1038/sj.mn.7800198.
- [54] T. J. Stocker, H. Ishikawa-Ankerhold, S. Massberg, et C. Schulz, « Small but mighty: Platelets as central effectors of host defense », *Thromb. Haemost.*, vol. 117, n° 4, p. 651-661, 03 2017, doi: 10.1160/TH16-12-0921.
- [55] F. Eisinger, J. Patzelt, et H. F. Langer, « The Platelet Response to Tissue Injury », *Front. Med.*, vol. 5, 2018, doi: 10.3389/fmed.2018.00317.
- [56] P. André, L. Nannizzi-Alaimo, S. K. Prasad, et D. R. Phillips, « Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease », *Circulation*, vol. 106, n° 8, p. 896-899, août 2002, doi: 10.1161/01.cir.0000028962.04520.01.
- [57] E. Karshovska, C. Weber, et P. von Hundelshausen, « Platelet chemokines in health and disease », *Thromb. Haemost.*, vol. 110, n° 5, p. 894-902, nov. 2013, doi: 10.1160/TH13-04-0341.

- [58] D. M. Maynard, H. F. G. Heijnen, M. K. Horne, J. G. White, et W. A. Gahl, « Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 5, n° 9, p. 1945-1955, sept. 2007, doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02690.x.
- [59] H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, A. Chabert, B. Pozzetto, F. Cognasse, et O. Garraud, « Platelets and infections - complex interactions with bacteria », *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 82, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00082.
- [60] G. Thurston *et al.*, « Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage », *Nat. Med.*, vol. 6, n° 4, p. 460-463, avr. 2000, doi: 10.1038/74725.
- [61] J. J. Li, Y. Q. Huang, R. Basch, et S. Karpatkin, « Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets », *Thromb. Haemost.*, vol. 85, n° 2, p. 204-206, févr. 2001.
- [62] P. Seizer et A. E. May, « Platelets and matrix metalloproteinases », *Thromb. Haemost.*, vol. 110, n° 5, p. 903-909, nov. 2013, doi: 10.1160/TH13-02-0113.
- [63] D. Shepro, S. L. Welles, et H. B. Hechtman, « Vasoactive agonists prevent erythrocyte extravasation in thrombocytopenic hamsters », *Thromb. Res.*, vol. 35, n° 4, p. 421-430, août 1984, doi: 10.1016/0049-3848(84)90234-2.
- [64] E. Masini, M. G. Di Bello, S. Raspanti, T. B. Sacchi, E. Maggi, et P. F. Mannaioni, « Platelet aggregation and histamine release by immunological stimuli », *Immunopharmacology*, vol. 28, n° 1, p. 19-29, août 1994, doi: 10.1016/0162-3109(94)90035-3.
- [65] C. N. Morrell, A. A. Aggrey, L. M. Chapman, et K. L. Modjeski, « Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells », *Blood*, vol. 123, n° 18, p. 2759-2767, mai 2014, doi: 10.1182/blood-2013-11-462432.
- [66] S. Kulkarni, K. J. Woollard, S. Thomas, D. Oxley, et S. P. Jackson, « Conversion of platelets from a proaggregatory to a proinflammatory adhesive phenotype: role of PAF in spatially regulating neutrophil adhesion and spreading », *Blood*, vol. 110, n° 6, p. 1879-1886, sept. 2007, doi: 10.1182/blood-2006-08-040980.
- [67] Y. Igarashi et Y. Yatomi, « Sphingosine 1-phosphate is a blood constituent released from activated platelets, possibly playing a variety of physiological and pathophysiological roles », *Acta Biochim. Pol.*, vol. 45, n° 2, p. 299-309, 1998.
- [68] S. L. Gazit *et al.*, « Platelet and Erythrocyte Sources of S1P Are Redundant for Vascular Development and Homeostasis, but Both Rendered Essential After Plasma S1P Depletion in Anaphylactic Shock », *Circ. Res.*, vol. 119, n° 8, p. e110-126, sept. 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308929.
- [69] R. Kapur, A. Zufferey, E. Boilard, et J. W. Semple, « Nouvelle Cuisine: Platelets Served with Inflammation », *J. Immunol.*, vol. 194, n° 12, p. 5579-5587, juin 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1500259.
- [70] T. Gremmel, A. L. F. Iii, et A. D. Michelson, « Platelet Physiology », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 42, n° 03, p. 191-204, avr. 2016, doi: 10.1055/s-0035-1564835.
- [71] C. H. Y. Wong, C. N. Jenne, B. Petri, N. L. Chrobok, et P. Kubes, « Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance », *Nat. Immunol.*, vol. 14, n° 8, p. 785-792, août 2013, doi: 10.1038/ni.2631.

- [72] J. L. Li, A. Zarbock, et A. Hidalgo, « Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance », *J. Exp. Med.*, vol. 214, n° 8, p. 2193-2204, août 2017, doi: 10.1084/jem.20170879.
- [73] E. Boilard *et al.*, « Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production », *Science*, vol. 327, n° 5965, p. 580-583, janv. 2010, doi: 10.1126/science.1181928.
- [74] N. Tessandier *et al.*, « Platelets Disseminate Extracellular Vesicles in Lymph in Rheumatoid Arthritis », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 40, n° 4, p. 929-942, 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313698.
- [75] M. Iannacone *et al.*, « Platelets prevent IFN- $\alpha/\beta$ -induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 2, p. 629-634, janv. 2008, doi: 10.1073/pnas.0711200105.
- [76] B. Ho-Tin-Noé, M. Demers, et D. D. Wagner, « How platelets safeguard vascular integrity », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° s1, p. 56-65, 2011, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x.
- [77] N. Cloutier *et al.*, « Platelets can enhance vascular permeability », *Blood*, vol. 120, n° 6, p. 1334-1343, août 2012, doi: 10.1182/blood-2012-02-413047.
- [78] J. F. Danielli, « Capillary permeability and oedema in the perfused frog », *J. Physiol.*, vol. 98, n° 1, p. 109-129, mars 1940, doi: 10.1113/jphysiol.1940.sp003837.
- [79] B. Ho-Tin-Noé, M. Demers, et D. D. Wagner, « How platelets safeguard vascular integrity », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 9 Suppl 1, p. 56-65, juill. 2011, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x.
- [80] B. Ho-Tin-Noé, Y. Boulaftali, et E. Camerer, « Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation », *Blood*, vol. 131, n° 3, p. 277-288, janv. 2018, doi: 10.1182/blood-2017-06-742676.
- [81] M. A. Gimbrone, R. H. Aster, R. S. Cotran, J. Corkery, J. H. Jandl, et J. Folkman, « Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium », *Nature*, vol. 222, n° 5188, p. 33-36, avr. 1969, doi: 10.1038/222033a0.
- [82] C. Kleinschnitz *et al.*, « Blocking of platelets or intrinsic coagulation pathway-driven thrombosis does not prevent cerebral infarctions induced by photothrombosis », *Stroke*, vol. 39, n° 4, p. 1262-1268, avr. 2008, doi: 10.1161/STROKEAHA.107.496448.
- [83] O. Martín-Solé, J. Rodó, L. García-Aparicio, J. Blanch, V. Cusí, et A. Albert, « Effects of Platelet-Rich Plasma (PRP) on a Model of Renal Ischemia-Reperfusion in Rats », *PLoS One*, vol. 11, n° 8, p. e0160703, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0160703.
- [84] A. Petrenko *et al.*, « Organ Preservation into the 2020s: The Era of Dynamic Intervention », *Transfus. Med. Hemotherapy Off. Organ Dtsch. Ges. Transfusionsmedizin Immunhamatologie*, vol. 46, n° 3, p. 151-172, juin 2019, doi: 10.1159/000499610.
- [85] S. K. Lo, K. E. Burhop, J. E. Kaplan, et A. B. Malik, « Role of platelets in maintenance of pulmonary vascular permeability to protein », *Am. J. Physiol.*, vol. 254, n° 4 Pt 2, p. H763-771, avr. 1988, doi: 10.1152/ajpheart.1988.254.4.H763.
- [86] C. S. Kitchens et L. Weiss, « Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia », *Blood*, vol. 46, n° 4, p. 567-578, oct. 1975.

- [87] C. S. Kitchens et J. F. Pendergast, « Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endothelium that are ameliorated by glucocorticosteroid administration », *Blood*, vol. 67, n° 1, p. 203-206, janv. 1986.
- [88] C. Dale et J. V. Hurley, « An electron-microscope study of the mechanism of bleeding in experimental thrombocytopenia », *J. Pathol.*, vol. 121, n° 4, p. 193-204, avr. 1977, doi: 10.1002/path.1711210402.
- [89] J. S. Alexander, W. F. Patton, B. W. Christman, L. L. Cuiper, et F. R. Haselton, « Platelet-derived lysophosphatidic acid decreases endothelial permeability in vitro », *Am. J. Physiol.*, vol. 274, n° 1, p. H115-122, 1998, doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.1.H115.
- [90] J. R. Gamble *et al.*, « Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions », *Circ. Res.*, vol. 87, n° 7, p. 603-607, sept. 2000, doi: 10.1161/01.res.87.7.603.
- [91] R. Mineau-Hanschke, M. E. Wiles, N. Morel, H. B. Hechtman, et D. Shepro, « Modulation of cultured pulmonary microvessel and arterial endothelial cell barrier structure and function by serotonin », *Microvasc. Res.*, vol. 39, n° 2, p. 140-155, mars 1990, doi: 10.1016/0026-2862(90)90066-z.
- [92] F. R. Haselton et J. S. Alexander, « Platelets and a platelet-released factor enhance endothelial barrier », *Am. J. Physiol.*, vol. 263, n° 6 Pt 1, p. L670-678, déc. 1992, doi: 10.1152/ajplung.1992.263.6.L670.
- [93] S. F. Rodrigues et D. N. Granger, « Blood cells and endothelial barrier function », *Tissue Barriers*, vol. 3, n° 1-2, p. e978720, 2015, doi: 10.4161/21688370.2014.978720.
- [94] S. A. Johnson, R. S. Balboa, B. H. Dessel, R. W. Monto, K. A. Siegesmund, et T. J. Greenwalt, « THE MECHANISM OF THE ENDOTHELIAL SUPPORTING FUNCTION OF INTACT PLATELETS », *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 3, p. 115-127, avr. 1964, doi: 10.1016/0014-4800(64)90045-0.
- [95] R. L. Nachman et S. Rafii, « Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall », *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, n° 12, p. 1261-1270, sept. 2008, doi: 10.1056/NEJMra0800887.
- [96] B. Petri *et al.*, « von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation », *Blood*, vol. 116, n° 22, p. 4712-4719, nov. 2010, doi: 10.1182/blood-2010-03-276311.
- [97] T. Hara *et al.*, « Platelets Control Leukocyte Recruitment in a Murine Model of Cutaneous Arthus Reaction », *Am. J. Pathol.*, vol. 176, n° 1, p. 259-269, janv. 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.081117.
- [98] C. Hillgruber *et al.*, « Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia », *J. Exp. Med.*, vol. 212, n° 8, p. 1255-1266, juill. 2015, doi: 10.1084/jem.20142076.
- [99] A. Gros, V. Ollivier, et B. Ho-Tin-Noé, « Platelets in Inflammation: Regulation of Leukocyte Activities and Vascular Repair », *Front. Immunol.*, vol. 5, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2014.00678.
- [100] C. Hillgruber *et al.*, « Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, n° 1, p. 77-86, janv. 2014, doi: 10.1038/jid.2013.292.

- [101] M. H. Fukami, H. Holmsen, et K. Ugurbil, « Histamine uptake in pig platelets and isolated dense granules », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 33, n° 23, p. 3869-3874, déc. 1984, doi: 10.1016/0006-2952(84)90053-4.
- [102] F. De Clerck, L. Van Gorp, J. Beetens, et R. S. Reneman, « Platelet-mediated vascular permeability in the rat: a predominant role for 5-hydroxytryptamine », *Thromb. Res.*, vol. 38, n° 4, p. 321-339, mai 1985, doi: 10.1016/0049-3848(85)90132-x.
- [103] R. Mineau-Hanschke, H. B. Hechtman, et D. Shepro, « Endothelial cell junctional integrity modulation by serotonin: an ultrastructural analysis », *Tissue Cell*, vol. 21, n° 2, p. 161-170, 1989, doi: 10.1016/0040-8166(89)90060-8.
- [104] D. Bottaro, D. Shepro, S. Peterson, et H. B. Hechtman, « Serotonin, norepinephrine, and histamine mediation of endothelial cell barrier function in vitro », *J. Cell. Physiol.*, vol. 128, n° 2, p. 189-194, août 1986, doi: 10.1002/jcp.1041280208.
- [105] J. S. Pober et W. C. Sessa, « Evolving functions of endothelial cells in inflammation », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, n° 10, p. 803-815, oct. 2007, doi: 10.1038/nri2171.
- [106] R. Pendu *et al.*, « P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor », *Blood*, vol. 108, n° 12, p. 3746-3752, déc. 2006, doi: 10.1182/blood-2006-03-010322.
- [107] M.-D. Filippi, « Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives », *Blood*, vol. 133, n° 20, p. 2149-2158, mai 2019, doi: 10.1182/blood-2018-12-844605.
- [108] S. Nourshargh et R. Alon, « Leukocyte Migration into Inflamed Tissues », *Immunity*, vol. 41, n° 5, p. 694-707, nov. 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.008.
- [109] K. Stark *et al.*, « Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and “instruct” them with pattern-recognition and motility programs », *Nat. Immunol.*, vol. 14, n° 1, p. 41-51, janv. 2013, doi: 10.1038/ni.2477.
- [110] K. Ley et J. Reutershan, « Leucocyte-endothelial interactions in health and disease », *Handb. Exp. Pharmacol.*, n° 176 Pt 2, p. 97-133, 2006, doi: 10.1007/3-540-36028-x\_4.
- [111] P. He, « Leucocyte/endothelium interactions and microvessel permeability: coupled or uncoupled? », *Cardiovasc. Res.*, vol. 87, n° 2, p. 281-290, juill. 2010, doi: 10.1093/cvr/cvq140.
- [112] P. Baluk, P. Bolton, A. Hirata, G. Thurston, et D. M. McDonald, « Endothelial gaps and adherent leukocytes in allergen-induced early- and late-phase plasma leakage in rat airways », *Am. J. Pathol.*, vol. 152, n° 6, p. 1463-1476, juin 1998.
- [113] J. V. Hurley, « An electron microscopic study of leucocytic emigration and vascular permeability in rat skin », *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, vol. 41, p. 171-186, avr. 1963, doi: 10.1038/icb.1963.17.
- [114] J. V. Hurley, « ACUTE INFLAMMATION: THE EFFECT OF CONCURRENT LEUCOCYTIC EMIGRATION AND INCREASED PERMEABILITY ON PARTICLE RETENTION BY THE VASCULAR WALL », *Br. J. Exp. Pathol.*, vol. 45, p. 627-633, déc. 1964.
- [115] H. Gilchrest et A. S. Watnick, « Edema formation and neutrophil mobilization in the neutropenic rat », *Agents Actions*, vol. 7, n° 5-6, p. 529-532, déc. 1977, doi: 10.1007/BF02111125.

- [116] F. Wessel *et al.*, « Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin », *Nat. Immunol.*, vol. 15, n° 3, p. 223-230, mars 2014, doi: 10.1038/ni.2824.
- [117] D. Vestweber, F. Wessel, et A. F. Nottebaum, « Similarities and differences in the regulation of leukocyte extravasation and vascular permeability », *Semin. Immunopathol.*, vol. 36, n° 2, p. 177-192, mars 2014, doi: 10.1007/s00281-014-0419-7.
- [118] V. S. Dole, W. Bergmeier, H. A. Mitchell, S. C. Eichenberger, et D. D. Wagner, « Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin », *Blood*, vol. 106, n° 7, p. 2334-2339, oct. 2005, doi: 10.1182/blood-2005-04-1530.
- [119] V. S. Dole, W. Bergmeier, I. S. Patten, J. Hirahashi, T. N. Mayadas, et D. D. Wagner, « PSGL-1 regulates platelet P-selectin-mediated endothelial activation and shedding of P-selectin from activated platelets », *Thromb. Haemost.*, vol. 98, n° 4, p. 806-812, oct. 2007.
- [120] J. M. Fox *et al.*, « CXCL4/Platelet Factor 4 is an agonist of CCR1 and drives human monocyte migration », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 9466, 21 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27710-9.
- [121] T. H. Wirtz *et al.*, « Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties », *Atherosclerosis*, vol. 239, n° 1, p. 1-10, mars 2015, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.039.
- [122] J.-E. Alard *et al.*, « Recruitment of classical monocytes can be inhibited by disturbing heteromers of neutrophil HNP1 and platelet CCL5 », *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, n° 317, p. 317ra196, déc. 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aad5330.
- [123] C. Yu, S. Zhang, Y. Wang, S. Zhang, L. Luo, et H. Thorlacius, « Platelet-Derived CCL5 Regulates CXC Chemokine Formation and Neutrophil Recruitment in Acute Experimental Colitis », *J. Cell. Physiol.*, vol. 231, n° 2, p. 370-376, févr. 2016, doi: 10.1002/jcp.25081.
- [124] J. A. Giles *et al.*, « Neutrophil infiltration to the brain is platelet-dependent, and is reversed by blockade of platelet GPIIb/IIIa », *Immunology*, vol. 154, n° 2, p. 322-328, 2018, doi: 10.1111/imm.12892.
- [125] T. Goerge *et al.*, « Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia », *Blood*, vol. 111, n° 10, p. 4958-4964, mai 2008, doi: 10.1182/blood-2007-11-123620.
- [126] J. Hirahashi *et al.*, « Mac-1 (CD11b/CD18) Links Inflammation and Thrombosis After Glomerular Injury », *Circulation*, vol. 120, n° 13, p. 1255-1265, sept. 2009, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.873695.
- [127] G. D. Loria, P. A. Romagnoli, N. B. Moseley, A. Rucavado, et J. D. Altman, « Platelets support a protective immune response to LCMV by preventing splenic necrosis », *Blood*, vol. 121, n° 6, p. 940-950, févr. 2013, doi: 10.1182/blood-2011-08-376822.
- [128] S. F. de Stoppelaar, C. van 't Veer, T. A. M. Claushuis, B. J. A. Albersen, J. J. T. H. Roelofs, et T. van der Poll, « Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice », *Blood*, vol. 124, n° 25, p. 3781-3790, déc. 2014, doi: 10.1182/blood-2014-05-573915.
- [129] A. P. N. A. de Porto *et al.*, « Platelet Btk is Required for Maintaining Lung Vascular Integrity during Murine Pneumococcal Pneumosepsis », *Thromb. Haemost.*, vol. 119, n° 6, p. 930-940, juin 2019, doi: 10.1055/s-0039-1681046.

- [130] B. H. Herzog *et al.*, « Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2 », *Nature*, vol. 502, n° 7469, p. 105-109, oct. 2013, doi: 10.1038/nature12501.
- [131] B. Ho-Tin-Noé, T. Goerge, S. M. Cifuni, D. Duerschmied, et D. D. Wagner, « Platelet Granule Secretion Continuously Prevents Intratumor Hemorrhage », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 16, p. 6851-6858, août 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0718.
- [132] B. Ho-Tin-Noé, C. Carbo, M. Demers, S. M. Cifuni, T. Goerge, et D. D. Wagner, « Innate Immune Cells Induce Hemorrhage in Tumors during Thrombocytopenia », *Am. J. Pathol.*, vol. 175, n° 4, p. 1699-1708, oct. 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.090460.
- [133] M. Demers, B. Ho-Tin-Noé, D. Schatzberg, J. J. Yang, et D. D. Wagner, « Increased efficacy of breast cancer chemotherapy in thrombocytopenic mice », *Cancer Res.*, vol. 71, n° 5, p. 1540-1549, mars 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2038.
- [134] J. Volz *et al.*, « Inhibition of platelet GPVI induces intratumor hemorrhage and increases efficacy of chemotherapy in mice », *Blood*, vol. 133, n° 25, p. 2696-2706, juin 2019, doi: 10.1182/blood.2018877043.
- [135] G. Majno et G. E. Palade, « Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study », *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 11, p. 571-605, déc. 1961, doi: 10.1083/jcb.11.3.571.
- [136] R. S. Cotran, « THE DELAYED AND PROLONGED VASCULAR LEAKAGE IN INFLAMMATION. II. AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE VASCULAR RESPONSE AFTER THERMAL INJURY », *Am. J. Pathol.*, vol. 46, p. 589-620, avr. 1965.
- [137] V. T. Marchesi, « SOME ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON INTERACTIONS BETWEEN LEUKOCYTES, PLATELETS, AND ENDOTHELIAL CELLS IN ACUTE INFLAMMATION », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 116, p. 774-788, août 1964, doi: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb52545.x.
- [138] C. Deppermann *et al.*, « Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice », *Blood*, vol. 129, n° 12, p. 1702-1706, mars 2017, doi: 10.1182/blood-2016-12-750711.
- [139] Y. Boulaftali *et al.*, « Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation », *J. Clin. Invest.*, vol. 123, n° 2, p. 908-916, févr. 2013, doi: 10.1172/JCI65154.
- [140] Kleinschnitz Christoph, Pozgajova Miroslava, Pham Mirko, Bendszus Martin, Nieswandt Bernhard, et Stoll Guido, « Targeting Platelets in Acute Experimental Stroke », *Circulation*, vol. 115, n° 17, p. 2323-2330, mai 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.691279.
- [141] A. Gros *et al.*, « Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice », *Blood*, vol. 126, n° 8, p. 1017-1026, août 2015, doi: 10.1182/blood-2014-12-617159.
- [142] J. Rayes et S. P. Watson, « Platelet GPVI repairs its own damage », *Blood*, vol. 126, n° 8, p. 933-934, août 2015, doi: 10.1182/blood-2015-06-650838.
- [143] O. Inoue *et al.*, « Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI », *Blood*, vol. 107, n° 4, p. 1405-1412, févr. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-06-2406.



- [144] M. Schaff *et al.*, « Integrin  $\alpha 6\beta 1$  is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis », *Circulation*, vol. 128, n° 5, p. 541-552, juill. 2013, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000799.
- [145] J. Pircher *et al.*, « Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation », *Nat. Commun.*, vol. 9, n° 1, p. 1523, 18 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03925-2.
- [146] M. Frohm *et al.*, « The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 24, p. 15258-15263, juin 1997, doi: 10.1074/jbc.272.24.15258.
- [147] F. Gaertner *et al.*, « Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria », *Cell*, vol. 171, n° 6, p. 1368-1382.e23, nov. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.11.001.
- [148] S. Loyau *et al.*, « Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, n° 3, p. 778-785, mars 2012, doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241067.
- [149] I. Induruwa, S. M. Jung, et E. A. Warburton, « Beyond antiplatelets: The role of glycoprotein VI in ischemic stroke », *Int. J. Stroke*, vol. 11, n° 6, p. 618-625, août 2016, doi: 10.1177/1747493016654532.
- [150] S. M. Jung *et al.*, « Constitutive Dimerization of Glycoprotein VI (GPVI) in Resting Platelets Is Essential for Binding to Collagen and Activation in Flowing Blood », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 35, p. 30000-30013, août 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.359125.
- [151] S. M. Jung, K. Tsuji, et M. Moroi, « Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 7, n° 8, p. 1347-1355, août 2009, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03496.x.
- [152] K. L. Lowe *et al.*, « The expression of mouse CLEC-2 on leucocyte subsets varies according to their anatomical location and inflammatory state », *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, n° 9, p. 2484-2493, sept. 2015, doi: 10.1002/eji.201445314.
- [153] A. Wetterwald *et al.*, « Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes », *Bone*, vol. 18, n° 2, p. 125-132, févr. 1996, doi: 10.1016/8756-3282(95)00457-2.
- [154] N. G. Ordóñez, « D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma », *Hum. Pathol.*, vol. 36, n° 4, p. 372-380, avr. 2005, doi: 10.1016/j.humpath.2005.01.019.
- [155] K. Mishima, Y. Kato, M. K. Kaneko, R. Nishikawa, T. Hirose, et M. Matsutani, « Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression », *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 111, n° 5, p. 483-488, mai 2006, doi: 10.1007/s00401-006-0063-y.
- [156] T. Kato *et al.*, « Cancer-Associated Fibroblasts Affect Intratumoral CD8+ and FoxP3+ T Cells Via IL6 in the Tumor Microenvironment », *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, n° 19, p. 4820-4833, oct. 2018, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0205.

- [157] T. Z. Hou *et al.*, « A distinct subset of podoplanin (gp38) expressing F4/80+ macrophages mediate phagocytosis and are induced following zymosan peritonitis », *FEBS Lett.*, vol. 584, n° 18, p. 3955-3961, sept. 2010, doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.053.
- [158] Y. Miyamoto *et al.*, « Podoplanin is an inflammatory protein upregulated in Th17 cells in SKG arthritic joints », *Mol. Immunol.*, vol. 54, n° 2, p. 199-207, juin 2013, doi: 10.1016/j.molimm.2012.11.013.
- [159] K. Suzuki-Inoue *et al.*, « Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 32, p. 24494-24507, août 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.130575.
- [160] P. Uhrin *et al.*, « Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation », *Blood*, vol. 115, n° 19, p. 3997-4005, mai 2010, doi: 10.1182/blood-2009-04-216069.
- [161] N. Tsukiji *et al.*, « Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction », *Blood*, vol. 132, n° 11, p. 1167-1179, sept. 2018, doi: 10.1182/blood-2017-12-823369.
- [162] S. Tamura *et al.*, « Podoplanin-positive periarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2 », *Blood*, vol. 127, n° 13, p. 1701-1710, mars 2016, doi: 10.1182/blood-2015-08-663708.
- [163] Bender Markus *et al.*, « Combined In Vivo Depletion of Glycoprotein VI and C-Type Lectin-Like Receptor 2 Severely Compromises Hemostasis and Abrogates Arterial Thrombosis in Mice », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, n° 5, p. 926-934, mai 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300672.
- [164] H. Payne, T. Ponomaryov, S. P. Watson, et A. Brill, « Mice with a deficiency in CLEC-2 are protected against deep vein thrombosis », *Blood*, vol. 129, n° 14, p. 2013-2020, 06 2017, doi: 10.1182/blood-2016-09-742999.
- [165] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The Hallmarks of Cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [166] E. Fuchs, « Das Sarcom des Uvealtractus. », *Graefe's Archiv für Ophthalmologie*, Vienne, p. 233, 1882.
- [167] S. Paget, « The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889 », *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 8, n° 2, p. 98-101, août 1989.
- [168] M. R. Junttila et F. J. de Sauvage, « Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response », *Nature*, vol. 501, n° 7467, p. 346-354, sept. 2013, doi: 10.1038/nature12626.
- [169] I. P. Witz et O. Levy-Nissenbaum, « The tumor microenvironment in the post-PAGET era », *Cancer Lett.*, vol. 242, n° 1, p. 1-10, oct. 2006, doi: 10.1016/j.canlet.2005.12.005.
- [170] M. Wang *et al.*, « Role of tumor microenvironment in tumorigenesis », *J. Cancer*, vol. 8, n° 5, p. 761-773, févr. 2017, doi: 10.7150/jca.17648.

- [171] C. D. Heinen, C. Schmutte, et R. Fishel, « DNA repair and tumorigenesis: lessons from hereditary cancer syndromes », *Cancer Biol. Ther.*, vol. 1, n° 5, p. 477-485, oct. 2002, doi: 10.4161/cbt.1.5.160.
- [172] A. P. Feinberg et B. Tycko, « The history of cancer epigenetics », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, n° 2, p. 143-153, févr. 2004, doi: 10.1038/nrc1279.
- [173] T. Chen, Y. You, H. Jiang, et Z. Z. Wang, « Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis », *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, n° 12, p. 3261-3272, déc. 2017, doi: 10.1002/jcp.25797.
- [174] O. Warburg, F. Wind, et E. Negelein, « THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY », *J. Gen. Physiol.*, vol. 8, n° 6, p. 519-530, mars 1927.
- [175] G. F. Weber, « Time and Circumstances: Cancer Cell Metabolism at Various Stages of Disease Progression », *Front. Oncol.*, vol. 6, 2016, doi: 10.3389/fonc.2016.00257.
- [176] N. Y. Spencer et R. C. Stanton, « The Warburg Effect, Lactate, and Nearly a Century of Trying to Cure Cancer », *Semin. Nephrol.*, vol. 39, n° 4, p. 380-393, juill. 2019, doi: 10.1016/j.semnephrol.2019.04.007.
- [177] P. Saharinen, L. Eklund, K. Pulkki, P. Bono, et K. Alitalo, « VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis », *Trends Mol. Med.*, vol. 17, n° 7, p. 347-362, juill. 2011, doi: 10.1016/j.molmed.2011.01.015.
- [178] D. Hanahan et J. Folkman, « Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis », *Cell*, vol. 86, n° 3, p. 353-364, août 1996, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80108-7.
- [179] L. M. Coussens et Z. Werb, « Inflammation and cancer », *Nature*, vol. 420, n° 6917, p. 860-867, déc. 2002, doi: 10.1038/nature01322.
- [180] F. Cavallo, C. De Giovanni, P. Nanni, G. Forni, et P.-L. Lollini, « 2011: the immune hallmarks of cancer », *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 60, n° 3, p. 319-326, mars 2011, doi: 10.1007/s00262-010-0968-0.
- [181] S. A. Stacker, S. P. Williams, T. Karnezis, R. Shayan, S. B. Fox, et M. G. Achen, « Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, n° 3, p. 159-172, mars 2014, doi: 10.1038/nrc3677.
- [182] R. L. Stone *et al.*, « Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, n° 7, p. 610-618, févr. 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1110352.
- [183] R. Kalluri, « The biology and function of fibroblasts in cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, n° 9, p. 582-598, sept. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.73.
- [184] A. Kawase *et al.*, « Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma », *Int. J. Cancer*, vol. 123, n° 5, p. 1053-1059, sept. 2008, doi: 10.1002/ijc.23611.
- [185] J. G. Goetz *et al.*, « Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis », *Cell*, vol. 146, n° 1, p. 148-163, juill. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.05.040.

- [186] H. Yamaguchi *et al.*, « Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells », *PLoS One*, vol. 9, n° 1, p. e85485, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0085485.
- [187] A. Orimo *et al.*, « Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion », *Cell*, vol. 121, n° 3, p. 335-348, mai 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.
- [188] M. Ugorski, P. Dziegiel, et J. Suchanski, « Podoplanin - a small glycoprotein with many faces », *Am. J. Cancer Res.*, vol. 6, n° 2, p. 370-386, janv. 2016.
- [189] D. Öhlund, E. Elyada, et D. Tuveson, « Fibroblast heterogeneity in the cancer wound », *J. Exp. Med.*, vol. 211, n° 8, p. 1503-1523, juill. 2014, doi: 10.1084/jem.20140692.
- [190] M. Karin, « Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression », *Nature*, vol. 441, n° 7092, p. 431-436, mai 2006, doi: 10.1038/nature04870.
- [191] K. E. de Visser, A. Eichten, et L. M. Coussens, « Paradoxical roles of the immune system during cancer development », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, n° 1, p. 24-37, janv. 2006, doi: 10.1038/nrc1782.
- [192] C. Murdoch, M. Muthana, S. B. Coffelt, et C. E. Lewis, « The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, n° 8, p. 618-631, août 2008, doi: 10.1038/nrc2444.
- [193] J. Condeelis et J. W. Pollard, « Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis », *Cell*, vol. 124, n° 2, p. 263-266, janv. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.01.007.
- [194] J. Kim et J.-S. Bae, « Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment », *Mediators Inflamm.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/6058147.
- [195] J. B. Swann et M. J. Smyth, « Immune surveillance of tumors », *J. Clin. Invest.*, vol. 117, n° 5, p. 1137-1146, mai 2007, doi: 10.1172/JCI31405.
- [196] S. J. Roberts *et al.*, « Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n° 16, p. 6770-6775, avr. 2007, doi: 10.1073/pnas.0604982104.
- [197] T. Kobayashi, Y. Hamaguchi, M. Hasegawa, M. Fujimoto, K. Takehara, et T. Matsushita, « B Cells Promote Tumor Immunity against B16F10 Melanoma », *Am. J. Pathol.*, vol. 184, n° 11, p. 3120-3129, nov. 2014, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.003.
- [198] I. Mishalian, R. Bayuh, L. Levy, L. Zolotarov, J. Michaeli, et Z. G. Fridlender, « Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression », *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 62, n° 11, p. 1745-1756, nov. 2013, doi: 10.1007/s00262-013-1476-9.
- [199] H. Kolarova *et al.*, « Myeloperoxidase induces the priming of platelets », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 61, p. 357-369, août 2013, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.014.
- [200] W. Lee, S. Y. Ko, M. S. Mohamed, H. A. Kenny, E. Lengyel, et H. Naora, « Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum », *J. Exp. Med.*, vol. 216, n° 1, p. 176-194, 07 2019, doi: 10.1084/jem.20181170.

- [201] S. K. Wculek et I. Malanchi, « Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells », *Nature*, vol. 528, n° 7582, p. 413-417, déc. 2015, doi: 10.1038/nature16140.
- [202] A. Yadav, B. Kumar, J.-G. Yu, M. Old, T. N. Teknos, et P. Kumar, « Tumor-Associated Endothelial Cells Promote Tumor Metastasis by Chaperoning Circulating Tumor Cells and Protecting Them from Anoikis », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 10, p. e0141602, oct. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0141602.
- [203] I. Cima *et al.*, « Tumor-derived circulating endothelial cell clusters in colorectal cancer », *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, n° 345, p. 345ra89-345ra89, juin 2016, doi: 10.1126/scitranslmed.aad7369.
- [204] S. C. Bhakdi *et al.*, « Accuracy of Tumour-Associated Circulating Endothelial Cells as a Screening Biomarker for Clinically Significant Prostate Cancer », *Cancers*, vol. 11, n° 8, juill. 2019, doi: 10.3390/cancers11081064.
- [205] S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh, A. Haskell, R. K. Jain, et D. M. McDonald, « Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors », *Am. J. Pathol.*, vol. 160, n° 3, p. 985-1000, mars 2002, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64920-6.
- [206] R. K. Jain, J. D. Martin, et T. Stylianopoulos, « The role of mechanical forces in tumor growth and therapy », *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 16, p. 321-346, juill. 2014, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-105259.
- [207] D. Ferland-McCollough, S. Slater, J. Richard, C. Reni, et G. Mangialardi, « Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology », *Pharmacol. Ther.*, vol. 171, p. 30-42, mars 2017, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.008.
- [208] R. Li *et al.*, « Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis », *BMC Cancer*, vol. 14, n° 1, p. 167, mars 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-167.
- [209] K. Lapis et J. Tímár, « Role of elastin–matrix interactions in tumor progression », *Semin. Cancer Biol.*, vol. 12, n° 3, p. 209-217, juin 2002, doi: 10.1016/S1044-579X(02)00024-X.
- [210] W. Hornebeck, A. Robinet, L. Duca, F. Antonicelli, J. Wallach, et G. Bellon, « The Elastin Connection and Melanoma Progression », *Anticancer Res.*, vol. 25, n° 4, p. 2617-2625, janv. 2005.
- [211] V. Givant-Horwitz, B. Davidson, et R. Reich, « Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor », *Cancer Res.*, vol. 64, n° 10, p. 3572-3579, mai 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3424.
- [212] C. López-Otín et L. M. Matrisian, « Emerging roles of proteases in tumour suppression », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, n° 10, p. 800-808, oct. 2007, doi: 10.1038/nrc2228.
- [213] M. C. Brahimi-Horn, J. Chiche, et J. Pouyssegur, « Hypoxia and cancer », *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, vol. 85, n° 12, p. 1301-1307, déc. 2007, doi: 10.1007/s00109-007-0281-3.
- [214] A. Trousseau, *Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris*. Baillière, 1865.
- [215] R. J. Lin, V. Afshar-Kharghan, et A. I. Schafer, « Paraneoplastic thrombocytosis: the secrets of tumor self-promotion », *Blood*, vol. 124, n° 2, p. 184-187, juill. 2014, doi: 10.1182/blood-2014-03-562538.

- [216] A. A. Khorana, C. W. Francis, E. Culakova, et G. H. Lyman, « Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study », *Cancer*, vol. 104, n° 12, p. 2822-2829, 2005, doi: 10.1002/cncr.21496.
- [217] N. M. Cooke *et al.*, « Increased platelet reactivity in patients with late-stage metastatic cancer », *Cancer Med.*, vol. 2, n° 4, p. 564-570, août 2013, doi: 10.1002/cam4.86.
- [218] S. Ishikawa *et al.*, « Platelets surrounding primary tumor cells are related to chemoresistance », *Oncol. Rep.*, vol. 36, n° 2, p. 787-794, août 2016, doi: 10.3892/or.2016.4898.
- [219] C. Qi *et al.*, « P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth », *Oncotarget*, vol. 6, n° 9, p. 6584-6596, févr. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3164.
- [220] T. Miyashita *et al.*, « Impact of Extravasated Platelet Activation and Podoplanin-positive Cancer-associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer Stroma », *Anticancer Res.*, vol. 39, n° 10, p. 5565-5572, oct. 2019, doi: 10.21873/anticancer.13750.
- [221] S.-R. Zhang *et al.*, « Tumor-Infiltrating Platelets Predict Postsurgical Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 25, n° 13, p. 3984-3993, déc. 2018, doi: 10.1245/s10434-018-6727-8.
- [222] N. Nishida, H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, et M. Kojiro, « Angiogenesis in Cancer », *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 2, n° 3, p. 213-219, sept. 2006.
- [223] J. Folkman, « Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, n° 4, Art. n° 4, avr. 2007, doi: 10.1038/nrd2115.
- [224] C. Kut, F. Mac Gabhann, et A. S. Popel, « Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 97, n° 7, p. 978-985, oct. 2007, doi: 10.1038/sj.bjc.6603923.
- [225] J. Kisucka *et al.*, « Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, n° 4, p. 855-860, janv. 2006, doi: 10.1073/pnas.0510412103.
- [226] M. Haemmerle, R. L. Stone, D. G. Menter, V. Afshar-Kharghan, et A. K. Sood, « THE PLATELET LIFELINE TO CANCER: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES », *Cancer Cell*, vol. 33, n° 6, p. 965-983, juin 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.002.
- [227] P. Jurasz, D. Alonso-Escolano, et M. W. Radomski, « Platelet–cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 143, n° 7, p. 819-826, 2004, doi: 10.1038/sj.bjp.0706013.
- [228] G. J. Caine, G. Y. Lip, et A. D. Blann, « Platelet-derived VEGF, Flt-1, angiopoietin-1 and P-selectin in breast and prostate cancer: further evidence for a role of platelets in tumour angiogenesis », *Ann. Med.*, vol. 36, n° 4, p. 273-277, 2004, doi: 10.1080/07853890410026098.
- [229] P. T. Huong, L. T. Nguyen, X.-B. Nguyen, S. K. Lee, et D.-H. Bach, « The Role of Platelets in the Tumor-Microenvironment and the Drug Resistance of Cancer Cells », *Cancers*, vol. 11, n° 2, févr. 2019, doi: 10.3390/cancers11020240.

- [230] J. E. Tengood, R. Ridenour, R. Brodsky, A. J. Russell, et S. R. Little, « Sequential delivery of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor for angiogenesis », *Tissue Eng. Part A*, vol. 17, n° 9-10, p. 1181-1189, mai 2011, doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0551.
- [231] R. H. Lee et W. Bergmeier, « Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and hemITAM signaling and vascular integrity in inflammation and development », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 14, n° 4, p. 645-654, 2016, doi: 10.1111/jth.13250.
- [232] R. C. Becker, T. Sexton, et S. Smyth, « Translational Implications of Platelets as Vascular First Responders », *Circ. Res.*, vol. 122, n° 3, p. 506-522, févr. 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310939.
- [233] R. Cao *et al.*, « PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis », *Cancer Cell*, vol. 6, n° 4, p. 333-345, oct. 2004, doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.034.
- [234] B. Westermarck et C.-H. Heldin, « Platelet-Derived Growth Factor Structure, function and implications in normal and malignant cell growth », *Acta Oncol.*, vol. 32, n° 2, p. 101-105, janv. 1993, doi: 10.3109/02841869309083897.
- [235] S. F. Schoppmann, L. Alidzanovic, A. Schultheis, T. Perkmann, C. Brostjan, et P. Birner, « Thrombocytes Correlate with Lymphangiogenesis in Human Esophageal Cancer and Mediate Growth of Lymphatic Endothelial Cells In Vitro », *PLoS One*, vol. 8, n° 6, p. e66941, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066941.
- [236] M. Krzystek-Korpacka, D. Diakowska, A. Gamian, et M. Matusiewicz, « Increase in serum platelet-derived growth factor (PDGF)-BB reflects lymph node involvement in esophageal cancer patients independently from platelet count », *Exp. Oncol.*, vol. 33, n° 3, p. 140-144, sept. 2011.
- [237] C. C. Bertozzi, P. R. Hess, et M. L. Kahn, « Platelets: Covert Regulators of Lymphatic Development », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, n° 12, p. 2368-2371, déc. 2010, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.217281.
- [238] B. Ho-Tin-Noé, T. Goerge, et D. D. Wagner, « Platelets: Guardians of Tumor Vasculature », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 14, p. 5623-5626, juill. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1370.
- [239] N. P. J. Brindle, P. Saharinen, et K. Alitalo, « Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection », *Circ. Res.*, vol. 98, n° 8, p. 1014-1023, avr. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000218275.54089.12.
- [240] S. Karpatkin, E. Pearlstein, C. Ambrogio, et B. S. Coller, « Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. », *J. Clin. Invest.*, vol. 81, n° 4, p. 1012-1019, avr. 1988, doi: 10.1172/JCI113411.
- [241] M. Labelle, S. Begum, et R. O. Hynes, « Direct Signaling Between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis », *Cancer Cell*, vol. 20, n° 5, p. 576-590, nov. 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.009.
- [242] A. Takemoto *et al.*, « A critical role of platelet TGF- $\beta$  release in podoplanin-mediated tumour invasion and metastasis », *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 42186, 08 2017, doi: 10.1038/srep42186.
- [243] T. Miyashita *et al.*, « The metastasis-promoting roles of extravasated platelet aggregation in pancreatic cancer and stroma », *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 219, n° 4, p. e171, oct. 2014, doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2014.07.848.

- [244] B. Felding-Habermann, R. Habermann, E. Saldívar, et Z. M. Ruggeri, « Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 10, p. 5892-5900, mars 1996, doi: 10.1074/jbc.271.10.5892.
- [245] A. Amirkhosravi *et al.*, « Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454 », *Thromb. Haemost.*, vol. 90, n° 3, p. 549-554, sept. 2003, doi: 10.1160/TH03-02-0102.
- [246] S. J. Bakewell *et al.*, « Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 24, p. 14205-14210, nov. 2003, doi: 10.1073/pnas.2234372100.
- [247] E. Camerer, A. A. Qazi, D. N. Duong, I. Cornelissen, R. Advincula, et S. R. Coughlin, « Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis », *Blood*, vol. 104, n° 2, p. 397-401, juill. 2004, doi: 10.1182/blood-2004-02-0434.
- [248] C. Philippe, B. Philippe, B. Fouqueray, J. Perez, M. Leuret, et L. Baud, « Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by platelets », *Am. J. Pathol.*, vol. 143, n° 6, p. 1713-1723, déc. 1993.
- [249] B. Nieswandt, M. Hafner, B. Echtenacher, et D. N. Männel, « Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets », *Cancer Res.*, vol. 59, n° 6, p. 1295-1300, mars 1999.
- [250] H.-G. Kopp, T. Placke, et H. R. Salih, « Platelet-Derived Transforming Growth Factor- $\beta$  Down-Regulates NKG2D Thereby Inhibiting Natural Killer Cell Antitumor Reactivity », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 19, p. 7775-7783, oct. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2123.
- [251] M. Labelle, S. Begum, et R. O. Hynes, « Platelets guide the formation of early metastatic niches », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n° 30, p. E3053-E3061, juill. 2014, doi: 10.1073/pnas.1411082111.
- [252] M. Yan et P. Jurasz, « The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1863, n° 3, p. 392-400, mars 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.07.008.
- [253] M. Schlesinger, « Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis », *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 11, n° 1, p. 125, oct. 2018, doi: 10.1186/s13045-018-0669-2.
- [254] « New advances in treating thrombotic diseases: GPVI as a platelet drug target », *Drug Discov. Today*, vol. 19, n° 9, p. 1471-1475, sept. 2014, doi: 10.1016/j.drudis.2014.06.005.
- [255] J. F. Arthur, S. Dunkley, et R. K. Andrews, « Platelet glycoprotein VI-related clinical defects », *Br. J. Haematol.*, vol. 139, n° 3, p. 363-372, nov. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06799.x.
- [256] E. Sierko et M. Z. Wojtukiewicz, « Platelets and Angiogenesis in Malignancy », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 30, n° 1, p. 95-108, févr. 2004, doi: 10.1055/s-2004-822974.
- [257] A. Janowska-Wieczorek *et al.*, « Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer », *Int. J. Cancer*, vol. 113, n° 5, p. 752-760, févr. 2005, doi: 10.1002/ijc.20657.
- [258] S. S. Smyth *et al.*, « Platelet functions beyond hemostasis », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 7, n° 11, p. 1759-1766, nov. 2009, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03586.x.



- [259] S. Maiocchi, I. Alwis, M. C. L. Wu, Y. Yuan, et S. P. Jackson, « Thromboinflammatory Functions of Platelets in Ischemia-Reperfusion Injury and Its Dysregulation in Diabetes », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 44, n° 2, p. 102-113, mars 2018, doi: 10.1055/s-0037-1613694.
- [260] Voors-Pette Christine *et al.*, « Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 39, n° 5, p. 956-964, mai 2019, doi: 10.1161/ATVBAHA.118.312314.
- [261] M. Ungerer *et al.*, « Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans », *Circulation*, vol. 123, n° 17, p. 1891-1899, mai 2011, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.980623.
- [262] X. Lei *et al.*, « Anfibatide, a novel GPIIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis », *Thromb. Haemost.*, vol. 111, n° 2, p. 279-289, févr. 2014, doi: 10.1160/TH13-06-0490.
- [263] J. Rayes *et al.*, « The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent », *Haematologica*, vol. 103, n° 6, p. e256-e258, juin 2018, doi: 10.3324/haematol.2017.182162.
- [264] L. A. Dyer et C. Patterson, « Development of the Endothelium: An Emphasis on Heterogeneity », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 36, n° 3, p. 227-235, avr. 2010, doi: 10.1055/s-0030-1253446.
- [265] M. Daëron, S. Jaeger, L. Du Pasquier, et E. Vivier, « Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future », *Immunol. Rev.*, vol. 224, p. 11-43, août 2008, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00666.x.
- [266] A. D. Barrow et J. Trowsdale, « You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling », *Eur. J. Immunol.*, vol. 36, n° 7, p. 1646-1653, 2006, doi: 10.1002/eji.200636195.
- [267] S. Patil, D. K. Newman, et P. J. Newman, « Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen », *Blood*, vol. 97, n° 6, p. 1727-1732, mars 2001, doi: 10.1182/blood.v97.6.1727.
- [268] X. Fan *et al.*, « Paired immunoglobulin-like receptor B regulates platelet activation », *Blood*, vol. 124, n° 15, p. 2421-2430, oct. 2014, doi: 10.1182/blood-2014-03-557645.
- [269] C. Wong *et al.*, « CEACAM1 negatively regulates platelet-collagen interactions and thrombus growth in vitro and in vivo », *Blood*, vol. 113, n° 8, p. 1818-1828, févr. 2009, doi: 10.1182/blood-2008-06-165043.
- [270] J. Mori *et al.*, « G6b-B inhibits constitutive and agonist-induced signaling by glycoprotein VI and CLEC-2 », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 51, p. 35419-35427, déc. 2008, doi: 10.1074/jbc.M806895200.
- [271] T. Vögtle *et al.*, « Heparan sulfates are critical regulators of the inhibitory megakaryocyte-platelet receptor G6b-B », *eLife*, vol. 8, 22 2019, doi: 10.7554/eLife.46840.

- [272] C. H. Coxon, M. J. Geer, et Y. A. Senis, « ITIM receptors: more than just inhibitors of platelet activation », *Blood*, vol. 129, n° 26, p. 3407-3418, juin 2017, doi: 10.1182/blood-2016-12-720185.
- [273] R.-R. S *et al.*, « Usefulness of Bleeding After Acute Coronary Syndromes for Unmasking Silent Cancer. », *Am. J. Cardiol.*, vol. 125, n° 12, p. 1801-1808, avr. 2020, doi: 10.1016/j.amjcard.2020.03.023.
- [274] K. Gupta, A. Khan, M. Kumar, K. Sawalha, M. Abozenah, et R. Singhania, « Readmissions Rates After Myocardial Infarction for Gastrointestinal Bleeding: A National Perspective », *Dig. Dis. Sci.*, mai 2020, doi: 10.1007/s10620-020-06315-1.
- [275] N. Ishizaka, A. Sakamoto, M. Fujishiro, R. Nagai, et K. Koike, « Gastrointestinal malignancies and cardiovascular diseases—Non-negligible comorbidity in an era of multi-antithrombotic drug use », *J. Cardiol.*, vol. 58, n° 3, p. 199-207, nov. 2011, doi: 10.1016/j.jjcc.2011.08.004.
- [276] B. Ho-Tin-Noé, Y. Boulaftali, et E. Camerer, « Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation », *Blood*, vol. 131, n° 3, p. 277-288, janv. 2018, doi: 10.1182/blood-2017-06-742676.
- [277] T. Shirai *et al.*, « C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 15, n° 3, p. 513-525, 2017, doi: 10.1111/jth.13604.
- [278] E. Mammadova-Bach *et al.*, « Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived galectin-3 », *Blood*, vol. 135, n° 14, p. 1146-1160, avr. 2020, doi: 10.1182/blood.2019002649.
- [279] S. Jain, S. Russell, et J. Ware, « Platelet glycoprotein VI facilitates experimental lung metastasis in syngenic mouse models », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, n° 10, p. 1713-1717, 2009, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03559.x.
- [280] B. Nieswandt *et al.*, « Long-Term Antithrombotic Protection by in Vivo Depletion of Platelet Glycoprotein VI in Mice », *J. Exp. Med.*, vol. 193, n° 4, p. 459-470, févr. 2001, doi: 10.1084/jem.193.4.459.

## Résumé

En plus d'assurer l'hémostase suite aux blessures, les plaquettes préviennent également les saignements au cours des réactions inflammatoires et dans les tumeurs solides en réparant les lésions vasculaires générées par les leucocytes. Les récepteurs plaquettaire GPVI (principal récepteur plaquettaire au collagène) et CLEC-2 (récepteur de la podoplanine) ont été identifiés comme étant potentiellement essentiels à la prévention des saignements inflammatoires et tumoraux.

Notre objectif a été dans un premier temps de déterminer si et comment les récepteurs GPVI et CLEC-2 coopèrent pour assurer la fonction hémostatique des plaquettes dans les organes inflammés. A l'aide de différents modèles d'inflammation aiguë chez la souris, nous montrons que le récepteur CLEC-2 intervient dans l'hémostase inflammatoire uniquement en cas de déficit en GPVI, assurant ainsi une redondance fonctionnelle partielle permettant de limiter les saignements inflammatoires. Par ailleurs, nos résultats montrent qu'alors que GPVI et CLEC-2 assurent ensemble l'hémostase inflammatoire dans la peau inflammée, ils n'interviennent pas dans cette même fonction en cas d'inflammation pulmonaire ou cérébrale. Ainsi, nos résultats montrent que la contribution respective des différents récepteurs d'adhésion et d'activation plaquettaires, dont GPVI et CLEC-2, à l'hémostase inflammatoire varie en fonction du stimulus inflammatoire ainsi que de l'organe affecté. Suite à ces résultats montrant l'importance du récepteur GPVI dans la prévention des saignements inflammatoires cutanés, nous avons évalué le risque de saignement inflammatoire associé à la prise de glenzocimab, un nouveau médicament antiplaquettaire ciblant la GPVI et actuellement en phase 2 d'évaluation clinique pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux. Nos résultats montrent que contrairement à un déficit génétique en GPVI, l'inhibition pharmacologique de la GPVI par le glenzocimab n'augmente pas le risque de saignements inflammatoires cutanés. Ces résultats indiquent donc que le traitement par du glenzocimab n'interfère pas avec la fonction de la GPVI dans l'hémostase inflammatoire et présenterait donc un excellent profil de sûreté même en conditions inflammatoires.

Enfin, en vue des analogies mécanistiques existant entre hémostase inflammatoire et tumorale, nous avons cherché à déterminer la contribution des récepteurs plaquettaires GPVI et CLEC2 au maintien de la vasculature tumorale dans deux modèles de tumeurs : cancer du sein (PyMT, lignée cellulaire AT3) et mélanome sous-cutané (lignée cellulaire B16F1). Dans ces deux modèles, nous montrons que des interactions physiques ont lieu en permanence entre plaquettes et vaisseaux tumoraux. Cependant, le déficit en GPVI ou en CLEC-2 n'a aucun impact sur ces interactions ni même sur la survenue de saignements tumoraux. Nos résultats indiquent que les plaquettes sont des composants importants du microenvironnement vasculaire tumoral mais les récepteurs plaquettaires impliqués dans les interactions plaquettes/tumeurs et dans la stabilisation des vaisseaux tumoraux restent encore à identifier.

Dans leur ensemble, nos résultats contribuent à une meilleure compréhension des fonctions des plaquettes et de leurs récepteurs GPVI et CLEC-deux dans les réactions inflammatoires et dans l'hémostase tumorale, une première étape nécessaire au développement de nouvelles applications thérapeutiques des médicaments antiplaquettaires.

Plaquettes ; ITAM plaquettaires ; GPVI ; CLEC-2 ; intégrité vasculaire ; hémostase inflammatoire ; hémostase tumorale ; anti-GPVI ; mélanome ; tumeur du sein

## Summary

Besides their crucial role in primary hemostasis, platelets are now also recognized for their role in preventing inflammatory and tumor bleeding by repairing vascular lesions generated by leukocytes. The platelet receptors GPVI (main platelet collagen receptor) and CLEC-2 (podoplanin receptor) have been identified as potentially essential in the prevention of inflammatory and tumor bleeding.

Our objective was first to determine if and how GPVI and CLEC-2 cooperate to ensure the hemostatic function of platelets in inflamed organs. Using different mice models of acute inflammation, we show that CLEC-2 is involved in inflammatory hemostasis only in GPVI deficient mice, thus ensuring partial functional redundancy to limit inflammatory bleeding. Furthermore, our results show that while GPVI and CLEC-2 together provide inflammatory hemostasis in the inflamed skin, they are not involved in the same function in the inflamed lungs or brain. Thus, our results show that the respective contribution of the various platelet adhesion and activation receptors, including GPVI and CLEC-2, to inflammatory hemostasis varies according to the inflammatory stimulus and the affected organ. Considering these results showing the importance of the GPVI receptor in the prevention of inflammatory skin bleeding, we next evaluated the risk of inflammatory bleeding associated with glenzocimab treatment, a new antiplatelet drug targeting GPVI and currently in phase II clinical trial in stroke patients. Our results show that unlike genetic deficiency in GPVI, pharmacological inhibition of GPVI by glenzocimab does not increase the risk of inflammatory skin bleeding. These results indicate that treatment with glenzocimab does not interfere with the function of GPVI in inflammatory hemostasis and thus displays an excellent safety profile in inflammatory conditions.

Finally, because of the mechanistic analogies existing between inflammatory and tumor hemostasis, we sought to determine the contribution of platelet GPVI and CLEC2 receptors to the maintenance of tumor vasculature in two tumor models: breast cancer (PyMT, AT3 cell line) and subcutaneous melanoma (B16F1 cell line). In these two models, we show that physical interactions take place permanently between platelets and tumor vessels. However, GPVI or CLEC-2 deficiency has no impact on these interactions or on tumor bleeding. Our results indicate that platelets are important components of the tumor vascular microenvironment but the platelet receptors involved in platelet/tumor interactions and in the stabilization of tumor vessels have yet to be identified.

Taken together, our results contribute to a better understanding of the functions of platelets and their GPVI and CLEC-2 receptors in inflammatory reactions and in tumor hemostasis, a necessary first step in the development of new therapeutic applications of antiplatelet drugs.

Platelets; Platelet ITAMs; GPVI; CLEC-2; vascular integrity; inflammatory hemostasis; tumor hemostasis; anti-GPVI; melanoma; breast tumor