

Année 2018

2018 TOU3 1703

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE SPECIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement
par

Agnès MAUREL RIBES

Le 29 mai 2018

**CARACTÉRISATION DU RÔLE DES ISOFORMES D'AKT DANS L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE
ET LES THROMBOPATHIES**

Directeur de thèse : Pr Bernard PAYRASTRE

JURY :

Monsieur le Professeur Eric DELABESSE

Président

Monsieur le Professeur Pierre SIÉ

Assesseur

Monsieur le Professeur Bernard PAYRASTRE

Assesseur

Monsieur le Professeur Atul PATHAK

Assesseur

Madame le Docteur Sophie VOISIN

Assesseur

TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2017

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. FORTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. CABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. CHAP Hugues
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel	Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques	Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard	Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques	Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
		Professeur Honoraire	M. CLANET Michel

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur MAZIERES Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur MURAT	Professeur SIMON Jacques
Professeur MANELFE Claude	Professeur FRAYSSE Bernard
Professeur LOUVET P.	Professeur ARBUS Louis
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CARATERO Claude	Professeur SALVAYRE Robert
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur COSTAGLIOLA Michel	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur ADER Jean-Louis	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur LAZORTHES Yves	Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur LARENG Louis	Professeur CHAP Hugues
Professeur JOFFRE Francis	Professeur LAURENT Guy
Professeur BONEU Bernard	Professeur MASSIP Patrice
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR Jacques	Thérapeutique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion
Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)
M. BONNEVIALLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT David	Neurologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale
M. LANGIN Dominique	Nutrition
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne
M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie
M. MALAUAUD Bernard	Urologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU Bruno (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. PARINAUD Jean (C.E)	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PAUL Carle	Dermatologie
M. PAYOUX Pierre	Biophysique
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie
M. RECHER Christian	Hématologie
M. RISCHMANN Pascal	Urologie
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie
M. SANS Nicolas	Radiologie
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON Norbert	Médecine Légale
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie

P.U. Médecine générale

M. OUSTRIC Stéphane Médecine Générale

P.U. - P.H.

2ème classe

Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. BONNEVIALLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. BUREAU Christophe	Hépto-Gastro-Entéro
M. CALVAS Patrick	Génétique
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. GAME Xavier	Urologie
M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. PERON Jean-Marie	Hépto-Gastro-Entérologie
M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme SAVAGNER Frédéricque	Biochimie et biologie moléculaire
M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie

P.U. Médecine générale

M. MESTHÉ Pierre Médecine Générale

P.A Médecine générale

POUTRAIN Jean-Christophe Médecine Générale

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépatogastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve Médecine Générale

M.C.U. - P.H.

M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétique
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAINAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry
Mme DUPOUY Julie

M.C.U. - P.H.

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. CMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel
Mme ESCOURROU Brigitte

Médecine Générale
Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves
Dr CHICOLAA Bruno
Dr IRI-DELAHAYE Motoko
Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre
Dr ANE Serge
Dr BIREBENT Jordan
Dr LATROUS Leila

Mes remerciements

À mon Président de Jury

Monsieur le Professeur Éric DELABESSE,

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier,

Éric, je suis honorée que vous puissiez présider ce jury et juger mon travail. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de mes remerciements, de mon respect et de mon engagement.

À mon Directeur de Thèse,

Monsieur le Professeur Bernard PAYRASTRE,

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier,

Bernard, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée et que tu sembles prêt à me renouveler : j'en suis véritablement très heureuse. Je te remercie de me faire découvrir ces plaquettes à travers ton regard. Ton énergie, tes connaissances, ton aisance à synthétiser, à argumenter, et saisir immédiatement The right thing... sont un exemple pour moi. Trouve dans ce travail le témoignage de ma reconnaissance et de mon engagement.

À mon jury de Thèse,

Monsieur le Professeur Pierre SIÉ,

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier,

Professeur Émérite,

Vous me faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury, ce travail est le vôtre, le fruit de votre esprit visionnaire et de votre expertise aiguisée. Vos qualités d'enseignant et votre sens critique sont un exemple pour moi, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon plus profond respect.

Monsieur le Professeur Atul PATHAK

Professeur des Universités

Cher Atul, je ne sais pas bien ce que l'histoire serait devenue sans ton conseil... Grâce à toi, je suis tombée dans la Médecine et j'ai découvert une discipline fabuleuse faite par des gens passionnés et engagés... Ta présence avec nous (parce que nous sommes en famille) a beaucoup de sens : elle est la marque de toute ma gratitude et de toute ma reconnaissance pour ce que, de loin, tu as déclenché. Tu nous fais l'amitié de juger ce travail, j'en suis d'autant plus honorée car je sais quel médecin et quel enseignant tu es. Trouve au travers de mon travail le signe de mon plus profond respect.

Madame le Docteur Sophie VOISIN,

Praticien Hospitalier,

Chère Sophie, nous étions déjà l'une en face de l'autre il y a 4 ans au moment des choix post-ECN et déjà, tu me conseillais !! Je te remercie pour tout le temps que tu passes à nous enseigner l'hémostase, avec toujours une bienveillance forte et sereine. Tu es toujours disponible, toujours égale, je me réjouis de travailler avec toi !! Tu me fais l'honneur de juger mon travail, trouve ici le témoignage de ma reconnaissance, de mon plus profond respect et de toute mon amitié.

À ceux qui ont participé à ma formation

Les Drs Jean-Pierre CAMBUS, Felipe GUERRERO et Vincent MEMIER, votre bon sens clinique et votre esprit critique sont des exemples pour moi, Felipe, ton souci du détail dans l'analyse de la variabilité analytique me marqueront à jamais, Vincent, tes explications physiopathologiques et ton sens pratique sont des exemples pour moi.

Les Drs Véronique DE MAS, Jill CORRE, Frédérique DUBOIS, François VERGEZ et JB RIEU, je serai assez peu passée en cytologie, mais heureusement qu'il y avait quelques petites gardes sympathiques au cours desquelles j'ai pu bénéficier chaque fois de compléments d'enseignement... François, je te remercie de me faire croire que, toi aussi, tu as parfois du mal à classer les cellules au microscope, je te remercie également pour ton soutien et tes conseils, j'apprécie nos discussions et suis très curieuse de voir ce qu'il va y avoir d'autre !!!

Cédric, Pierre & Jennifer, je crois que l'on va bien s'amuser !!! J'adore travailler avec vous, vous êtes toujours intéressés et curieux, vous cherchez toujours à comprendre, à argumenter. Cédric, tu es l'ADN de l'HCV, toujours prêt à t'intéresser à de nouvelles choses, à mettre au point de nouvelles analyses, tes connaissances et ton investissement sont un exemple, je me réjouis de savoir que nous allons encore un peu travailler ensemble !!! Pierre, ta curiosité et ta rigueur sont un exemple... tes blagues un peu moins (je rigole !!! elles sont horribles mais elles sont super drôles !!!), j'adore travailler avec toi aussi !! Jennifer, alias Vampirella, je ne sais pas ce que tu réussis le mieux : tes manip' ou la pâtisserie ?! Tu es une machine, tu gères tout, soucieuse également des gens avec lesquels tu travailles, ta volonté et ton courage sont des exemples.

Au personnel des sites de Ranguel, Purpan et IUC... Je peux dire que j'ai véritablement adoré travailler avec chacun d'entre vous. J'ai reconnu à chaque fois votre engagement, votre professionnalisme, votre connaissance aiguë de vos machines et de vos secteurs et votre réactivité. Mais, au-delà de vos compétences professionnelles, que les cyniques pourraient qualifier finalement de bien normales, je vous ai trouvé chouettes, drôles, de bonne humeur, amicaux, attentifs. Bref, j'ai reconnu votre sens de l'Equipe voire presque de la famille : je le salue, c'est une richesse pour votre travail et, soyez en assurés, pour votre vie !!

Je vais oublier des gens c'est sûr, c'est nul, je m'en excuse... mais je tente en cheminant depuis Ranguel où j'ai fait mes premiers pas... Kiki, Mimi, Christophe, Mélanie, Céline c'est avec vous que j'ai découvert les Stars Trek/Wars et...Adventure !!! The very beginnings !!! Linette, ma comparse de réglisses, Audrey, l'œil de sioux, ChloéOÉOÉ et Carine, vous avez toujours la pêche, Anne-Sophie mon hôtesse de l'air préférée, Marine, Virginie, Jean-Marc ton gâteau à la broche est une tuerie, Mathieu, Laurie, Pascal, la fine équipe ranguelloise !! Novella, Anne, Séverine à genou devant le

Sysmex pour qu'on ne revienne pas (elle n'a jamais infirmé), Jean-Marie, Claire, Alex-Monsieur-Plus pour les lames de collection et notre formation, Sandrine, Blandine, Cathy & Kathy, représentants de l'IUC !! Fabienne, Mélanie (ma « single lady » préférée, à quand la chorée avec toute l'équipe ?! j'en rêve !!), Florence, Emilie, Marine, Anaïs, Lorie, Lucie, Jennifer, Sandra, Sandrine, et les gars : Nico, Damien, Julien, Servan... que de gardes ensemble, j'ai adoré chacune d'entre elles avec vous !!! L'adresse est bonne en hémato vous l'avez compris, mais j'ai su vous apprécier en bioch également... Vous aussi, vous êtes chouettes et les gardes ne seraient pas les mêmes sans vous également !! Les piliers de Rangueil où j'ai commencé, Karim, Isa, Pauline, Delphine, Alex, les Juliens, Benjamin, Hervé... et de Purpan, Mike Olivier Fred Jean-Marc, il n'allait rien m'arriver !! Les filles vous êtes au top aussi : Agathe, Pascale, Noémie (grâce à toi, toutes les copines de Charlotte étaient jalouses de son gâteau et moi j'étais trop fière !!), Adeline (tu vas manquer, je suis heureuse pour toi, Groot sera notre lien, il est magnifique !!), Jeanne, Aurélie, Natacha, Elodie, Marie-Eve, et Chantal la plus cinéphile d'entre nous, je vous aime tous !! Je garde également un bon souvenir de certains d'entre vous de bactério/viro/immuno...
Ne changez pas grand-chose !! Merci pour ces quelques années !!

À mes Ribouldingues,

David Charlotte Alice, je suis si heureuse avec vous, si fière d'être la femme la mère, vous êtes véritablement toute ma raison d'être et de réaliser avec vous, pour vous, tout ça... David, il me manque tellement de mots... merci de me réaliser, de relativiser, souvent, et de me faire rire, toujours !! Les « Minus », vous êtes grandes maintenant, je m'incline devant la générosité inconditionnelle de vos jeunes années, je sais que ça a été un peu militaire, je sais que j'ai un peu manqué aussi, j'ai fait au mieux... Puissiez-vous voir dans ce parcours un exemple pour vous rassurer et vous permettre de vous dire que rien n'est finalement impossible, que l'on peut changer, se tromper, ou se planter complètement et repartir... Le seul véritable échec sera de ne pas parvenir à vous relever ; ce sera à vous de choisir si une nouvelle voie ne peut pas tout aussi bien vous convenir. Enfin, au-delà de ce qui arrivera ou n'arrivera pas, soyez passionnées, soyez généreuses, ayez des convictions et de... l'éthique !!

À mes amies-coexternes,

Daphné et Jennifer ; notre rencontre aura été une véritable bouffée d'air frais pendant ce marathon psychique et physique !!! Vous m'avez suivie tout au long de cette aventure et encouragée quand ça a été le plus difficile, je vous suis liée pour tout ça... j'aime cette amitié !! Daphné « comme dans Scoubidou », ces révisions au château resteront Les grands moments de notre externat. Je suis touchée de t'avoir vu vouloir réussir, de te savoir urgentiste, je sais que ça te donnera la possibilité de partir donner de ton temps, de ton énergie et de ton humour autour de toi, là où parfois c'est un peu plus sombre... Jennifer, ma globe-trotteuse-plongeuse-trekkeuse-bougeotteuse-et...euse encore !! J'adore ta curiosité pour la Médecine et pour toute autre chose non médicale, je m'incline devant ton esprit aventureux, devant ta capacité d'écoute et de compréhension, de toujours relativiser et de toujours te voir rebondir sur le meilleur de nous... Vous êtes des exemples pour mes filles, « Marraines-ma-bonne-fée » d'Alice, pour moi aussi...

À mes amies-mamans,

Adèle, sans toi, nos weekends ne seraient véritablement plus les mêmes, je félicite nos filles de nous avoir trouvées, quel bonheur de pouvoir se lâcher, dire des horreurs et vider nos sacs... rien ne sortira d'El Habanico !!

Milou, Chrystel, Manu, Vanessa, Agnes, Sandra, Sophie... de près ou de plus loin, vous avez toujours eu un mot, une attention, une aide, un encouragement. Je vous promets de ressortir faire quelques petites dînettes avec vous !!

À mes cointernes,

Et oui les gars !! On n'a pas eu le même internat, c'est sûr, mais j'ai bien aimé ces quelques années avec vous, et resterais bien travailler avec certains d'entre vous... J'aime votre implication dans votre formation et votre travail, votre rigueur, vos valeurs, mais aussi, votre humour, vos sarcasmes, et vous souhaite le meilleur pour votre vie professionnelle et personnelle.

J'ai été ravie par certaines rencontres, Thomas, Julien et Carole dès le début ça commençait bien, avec Arnaud, Marie et Angèle qui finissaient, puis Alice-Anne, Jules et Sherazade pour tenir en bioch, Camille, Clémence, Sarah, Manu, Catherine, Anthony, Greg et Cédric ...pour ce fabuleux stage de bactério, Louis-Thomas, Elodie, Barni, Laurie, Laure, Noémie, Etienne, Inès, Pierre-Yves, Romain, Thierry, Lucie pour tous les autres stages d'hémato, Morgane my Zotero best friend et tous les plus jeunes (en fait tout le monde !!!) Léa Vuthy Alizée Bastien Jean Hugo Aude Nicolas Antoine Caroline... and co' !!

Voilà, grâce à vous tous, je peux dire : je suis « gâtée pourrie » !!!

*To Starman,
Your brilliance inspired us all...*

Table des matières

Mes remerciements.....	5
Listes des abréviations.....	15
Index des illustrations.....	5
Physiologie de la mégacaryopoïèse.....	7
La moelle osseuse est le compartiment de la différenciation des progéniteurs.....	9
Le progéniteur commun érythroblastique-mégacaryocytaire (MEP).....	9
Les progéniteurs spécialisés.....	10
L'endomitose : une spécificité de la différenciation mégacaryocytaire.....	10
Bilan morphologique et fonctionnel.....	11
Les différents stades de maturation.....	12
Le promégacaryoblaste.....	13
Le mégacaryoblaste.....	13
Le mégacaryocyte basophile.....	13
Le mégacaryocyte granuleux.....	14
Le mégacaryocyte mature.....	14
Formation des proplaquettes/plaquettes.....	14
La régulation de la mégacaryopoïèse.....	15
Régulation transcriptionnelle de la mégacaryopoïèse.....	15
Régulation du microenvironnement de la mégacaryopoïèse.....	16
Anatomie plaquettaire.....	18
Les systèmes membranaires.....	19
La membrane plasmique.....	19
Les systèmes membranaires internes.....	22

<i>Le système canaliculaire ouvert (SCO)</i>	22
<i>Le système tubulaire dense (STD)</i>	22
Les organelles cytoplasmiques	22
Les granules δ ou granules denses.....	22
Les granules α	23
Les granules λ ou lysosomes.....	23
Les mitochondries et les grains de glycogène.....	23
Le cytosquelette plaquettaire	23
Sa composition.....	24
La dynamique du cytosquelette.....	24
Physiologie de l'activation plaquettaire	26
Les différentes séquences d'événements	26
Le temps vasculaire.....	27
Le temps plaquettaire.....	28
Les différents acteurs	30
Acteurs plasmatiques.....	30
Acteurs cellulaires.....	34
Les différents couples d'acteurs du temps plaquettaire	35
Mettant en jeu des protéines adhésives.....	37
Mettant en jeu des protéines solubles.....	43
Akt dans la fonction plaquettaire	45
Un peu d'histoire.....	45
Localisations tissulaire, cellulaire et subcellulaire des Akt.....	46
Les différentes formes d'Akt	47
Structure des isoformes d'Akt.....	48
Activation des isoformes d'Akt.....	50
Les voies de signalisation d'amont et d'aval	54
Les PI3Ks.....	54
Voie(s) d'amont PI3K-dépendante(s).....	56
Voie(s) d'aval.....	57
Caractéristiques du réseau de signalisation Akt	62
Mécanismes de rétrocontrôle négatif.....	62
Cross-talk entre voies de signalisation et redondance.....	62
Implications physiopathologiques	63
Enseignement des souris KO.....	63
Exemples d'implication d'Akt en physiopathologie chez l'Homme.....	64
Fonctions des isoformes d'Akt plaquettaires.....	65

Anomalies plaquettaires congénitales	68
Les thrombopénies constitutionnelles	69
Les thrombopénies causées par un défaut de la phase précoce de la mégacaryopoïèse	70
Les thrombopénies causées par une anomalie de la phase d'endomitose des mégacaryocytes.....	71
Les thrombopénies causées par un défaut de la plaquettogenèse.....	74
Thrombopathies constitutionnelles	77
Anomalies des protéines impliquées dans les propriétés adhésives des plaquettes et la stabilisation de leur agrégation	77
Pathologies liées à un défaut de l'initiation de l'activation plaquettaire	77
Pathologies liées à un défaut d'amplification de l'activation plaquettaire	80
Introduction du travail	82
Matériels & méthodes	86
Matériels	86
Méthodes.....	87
Analyses statistiques.....	91
Résultats expérimentaux	92
Caractérisation de la fonction plaquettaire de la patiente.....	92
Mise au point de l'utilisation des kits Cisbio de dosage de l'activation d'Akt1, 2 et 3 dans les plaquettes humaines.....	98
Mesure de l'activation basale d'Akt	101
Caractérisation de l'activation des isoformes d'Akt dans diverses conditions de stimulation des plaquettes humaines normales.....	102
Discussion et conclusions.....	105
Références bibliographiques	108

Listes des abréviations

A

AA	acide arachidonique
ABCC1/MRP1	ATP-binding cassette-drug transporter
ABCG5/8	ATP-binding cassette subfamily G member 5/8
ACLY	ATP-citrate lyase
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
ACTN1	actinin alpha 1
AGC group	PKA, PKG, PKC family
AgRP	agouti related-peptide
Akt	protéine kinase B
AMP	adénosine monophosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANGB	angioblast
ANKRD26	ankirin repeat domain 26
ANTH	AP180 N-terminal homolog
APP	amyloid precursor protein
APC	activated protein C
ARC-669931MX	cangrelor
ARC syndrome	arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis syndrome
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARP	acetylcholinesterase-related peptide
ASK1	apoptosis signal-regulated kinase 1
ATG12L	autophagy-related 12
ATG4B	autophagin-1

ATP	adénosine triphosphate
ATIII	antithrombine
AXL/TYRO3/MER	récepteurs tyrosine kinase

B

BAD	Bcl2 associated death promoter
BARRE	Bin amphiphysin Rvs
BEACH domain	Beige and Chediak-Higashi domain
BFU-E	Burst Forming Unit Erythrocyte
BIM	proapoptotic protein
BNIP3L	Bcl2-interacting protein 3 like
BSA	bovin serum albumin
BSS	Bernard-Soulier syndrome
Btk	Bruton tyrosine kinase

C

C2	PKC conserved 2
CalDAG-GEF1	calcium/diacylglycerol-guanine nucleotide exchange factor 1
CAMT	congenital amegakaryocytic thrombocytopenia syndrome
CAP23	cytoskeleton-associated protein
CBF	core binding factor
CCL64	mink cell line
CD39	ecto-ADPase
CD62P	cluster of differentiation 62P, P-sélectine
CD148	tyrosine phosphatase HPTP- η /DEP-1
CDK	cyclin-dependent kinase
C/EBP β	CCAAT/Enhancer-binding protein β
CFU-L	Colony Forming Unit-Lymphoid

CFU-GEMM	Colony Forming Unit - Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte, Megakaryocyte
CFU-GM	Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte colonies
CFU-E	Colony Forming Unit Erythrocyte
CFU-Mk	Colony Forming Unit Megakaryocyte
CFU-G	Colony Forming Unit Granulocyte
CFU-M	Colony Forming Unit Monocyte
CFU-Eo	Colony Forming Unit-Eosinophil
CFU-B	Colony Forming Unit-Basophile
CHK1	checkpoint kinase 1
CLASP1/2	cytoplasmic linker associated protein 1/2
CLEC2	C-type lectin like receptor 2
CLP	Common lymphoid progenitor
CMF	cytométrie de flux
CMP	Common myeloid progenitor
COX1	cyclooxygénase 1
GP	glycoprotein
CRMP2/4	collapsin response mediator protein 2/4
CSH	cellule souche hématopoïétique
CTPS1	cytidine triphosphate synthase 1
CXCL4/PF4	chemokine C-X-C motif ligand 4
CYCS	cytochrome C somatic

D

DAG	diacylglycerol
Del 22q	délétion d'un fragment du bras long du chromosome 22
DMS	demarcation membrane system

E

EDTA	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
EGF	endothelial growth factor
eIF2B	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta
eNOS	endothelial NO synthase
ENTH	epsin N-terminal homology
Ephrin/Eph	Eph receptors and ephrins
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ETS	avian erythroblastosis virus E26 homolog-1
ETV6	ETS variant 6

F

FAK	focal adhesion kinase
FASL	Fas ligand
Fb	fibronectine

FcRγ	récepteur du fragment cristallisable des IgG
FERM	band 1.4-ezrin-radixin-moesin
FERMT3	ferritin family homolog 3
Fg	fibrinogène
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLNA	filamin A
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
FPD/AML	Familial Platelet Disorder with predisposition to Acute Myelogenous Leukemia
FLI1	Friend leukemia integration 1 transcription factor
FOG1	friend of GATA1
FoxO	Forhead box O protein
FPD/AML	familial platelet disorder/ acute myeloid leukemia syndrome
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FvW	facteur von Willebrand
Fyn	tyrosine kinase de la famille Src
FYVE	domaine Fab1, YOTB, Vac1, EEA1

G

G _{q/i/s/12/13}	protéines G _q /G _i /G _s /G _{12/13}
G6PC	glucose-6-phosphatase catalytic subunit
GABARAPL1	GABA type A receptor associated protein like 1
GADD45a	growth arrest and DNA-damaged-inducible protein
Gads	Grb2 adaptator downstream of Shc
GAG	glycosaminoglycanes
GAP43	growth associated protein 43
GATA1	GATA-binding protein 1
sGC	soluble guanylate cyclase
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GF11B	growth factor independent 1B transcriptional repressor
GLUT3/4	glucose transporter 3/4
GNAS	guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating
GOLPH3	Golgi phosphoprotein 3
GPIBA/B	gène codant pour la GPIbα/β
GPIX	gène codant pour la GPIX
GPIb-IX-V	glycoprotéine Ib-IX-V
GPS	Gray platelet syndrome
GTPase	guanosine triphosphate hydrolase
GS	protéine G stimulator
GSK3	glycogen synthase kinase 3

H

HAB	Haemangioblast
HER2/3	human epidermal growth factor receptor 2/3
HIF1 α	hypoxia-inducible factor 1 α
HoxA1	homeobox A1
HSC	Haematopoietic stem cell
HSP27	heat shock protein 27
HTRF	Homogeneous Time-Resolved Fluorescence

I

I2MC	Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
IGF1	insulin growth factor 1
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
IKK α	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
IL	interleukine
IMS	invaginated membrane system
INPP4B	type II inositol polyphosphate 4 phosphatase
InsR	insulin receptor
IP3	inositol trisphosphate
IRS1/2	insulin receptor substrate 1/2
ISTH-BAT	International Society on Thrombosis and Haemostasis – Bleeding Assessment Tool
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITGA2B/ITGB3	integrin α IIb/ integrin β 3
IVIC	syndrome oculo-oto-radial

J

JAK	Janus Kinase ou just another kinase
JBS	Jacobsen syndrome

K

KA1	kinase-associated 1 domains
KD	kinase domain
KO	knock-out

L

LA	leucémie aiguë
LAD	leukocyte adhesion deficiency
LAT	linker for activation of T cells
LimK1/2	Lim domain kinase 1/2
LPL	lipoprotein lipase
LRP1	lipoprotein receptor related protein 1
LTC-IC	Long-Term culture Initiating Cells

Lyn tyrosine kinase de la famille Src

M

MB	marginal band
Maf	Musculoaponeurotic fibrosarcoma
MAP1B	microtubule associated protein 1B
MAP2C	microtubule associated protein 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
MARCKS	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MARK2/Par1	microtubule affinity regulating kinase 2
MCL1	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MDM2	muscle double minute 2 homolog
MEC	matrice extracellulaire
MEP	Megakaryocyte/Erythroid progenitor
MERIT40	mediator of Rap80 interactions and targeting 40
MFI	mean fluorescence intensity
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MKP	Megakaryocyte progenitor
MK	Immature megakaryocyte.
MLC	myosin light chain
MPL	thrombopoietin receptor
MRP1/ABCC1	multidrug resistance protein 1
MT	microtubules
MTCP1	mature T-cell proliferation 1
mTOR	mechanistic target of rapamycin
mTORC1/2	mechanistic target of rapamycin complex 1/2
MuRF1	muscle RING-finger protein 1
MVB	multivesicular bodies
MYB	myeloblastosis family of transcription factor
MYH9	myosin heavy chain 9
MYH10	myosin heavy chain 10

N

NBEAL2	neurobeachin-like 2
NES	nuclear export sequence
NFE2	nuclear factor erythroid 2
NGF	nerve growth factor
NO	monoxyde d'azote
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NPY	neuropeptide Y
NuRD	Nucleosome Remodeling and Deacetylase

P

P2X	récepteur à l'ATP
P2Y	récepteur à ADP
p21-CIP1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27-KIP1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p60c-src	cellular tyrosine kinase proto-oncogene src
p62c-yes	cellular tyrosine kinase proto-oncogene yes
p70-S6K	ribosomal protein S6 kinase beta1
p90-RSK	90kDa ribosomal protein S6 kinase
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAF	platelet activating factor
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAI1	plasminogen activator inhibitor 1
PAR	protease-activated receptor
PAR1, 4	récepteur de la thrombine
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PDE3A/B	phosphodiesterase 3A/B
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PDZ	post-synaptic density 95-disk large-zonula occludens
PE	phosphatidylethanolamine
PECAM1	platelet endothelial cell adhesion molecule
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PFA100	Platelet Function Analyser 100
PF4	platelet factor 4
PFKFB2	6 phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-biphosphatase 2
PGI2	prostacycline
PH	pleckstrin homology
PHLPP	PH domain leucin-rich repeat protein phosphatase
PHRC	programme hospitalier de recherche clinique
PI	phosphoinositide
PI3P	phosphatidylinositol 3 phosphate
PI4P	phosphatidylinositol 4 phosphate
PI(3,4,5)P3	phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate
PI(3,4)P2	phosphatidylinositol 3,4 biphosphate
PI(3,5)P2	phosphatidylinositol 3,5 biphosphate
PI(4,5)P2	phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIKfyve	FYVE-type Zinc finger containing phosphoinositide kinase
PKA	protein kinase A

PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PL	phospholipide
PLC	phospholipase C
PP2A	protein phosphatase 2A
PPP	plasma pauvre en plaquettes
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40kDa
PrC	protein C
PRKACG	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit γ
PROPPINs	propellers that bind phosphoinositides
PRP	plasma riche en plaquettes
PS	phosphatidylsérine
PSLG1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PSMD11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11
PTB	phosphotyrosin binding
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
PTS	Paris-Trousseau syndrome
PT-VWD	platelet-type von Willebrand disease
PU1	SPI1, facteur de transcription
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PX	Phox homology

R

R406	Syk inhibitor
Raf1	proto-oncogene serine/threonine kinase
RagA	Ras-related GTP-binding A protein
RagC	Ras-related GDP-binding C protein
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
Rap1	Ras-related protein 1
RASGRP2	Ras guanyl releasing protein 2
RGS2	regulator of G-protein signaling 2
rasGAP	Ras GTPase activating protein
RBC	Red blood cell
RBD	RNA-binding domain
RBL2	retinoblastoma-like protein 2
RBM8A	RNA-binding protein 8A
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RD	regulator domain
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RhoA	Ras homology gene family member A
RIAM	Rap1-GTP-interacting adaptor molecule
RTK	récepteur tyrosine kinase
RT-PCR	reverse transcription and polymerase chain reaction

RUNX1 runt-related transcription factor
 RUSAT radio-ulnar synostosis with
 amegakaryopoïesis and
 thrombocytopenia

S

S6K1 ribosomal protein S6 kinase 1
 Sall4 Sal-like transcription factor 4
 SCF stem cell factor
 SCH-79797 PAR1 selective antagonist
 SCO système canaliculaire ouvert
 SDS sodium dodecyl sulfate
 SREBP1c sterol regulatory element-binding
 protein 1c
 SDF1 stromal cell-derived growth factor 1
 SFK Src family kinase
 SH2 Src homology domain 2
 SH3 Src homology domain 3
 SHIP1 Src-homology 2 domain-containing
 inositol 5 phosphatase 1
 SIRT1 sirtuine 1
 SLP76 SH2 domain-containing leukocyte
 protein of 76 kDa
 SM sphingomyéline
 SMD syndrome myélodysplasique
 SNARE soluble N-ethylmaleimide-sensitive-
 factor attachment protein receptor
 SOD2 superoxide dismutase 2
 SPG syndrome des plaquettes grises
 SQ29458 TP receptor antagonist
 Src proto-oncogène tyrosine kinase
 STAT signal transducers and activators of
 transcription
 STD système tubulaire dense
 STIM1 stromal interaction molecule 1
 Syk Spleen tyrosine kinase

T

TAR syndrome syndrome thrombopénie aplasia
 radiale
 TBC17 TBC1 family member 17
 TBC1D4 TBC1 domain family member 4
 TBS Tris-buffered saline
 TCL1 T-cell leukemia 1
 TCPT Paris-Trousseau thrombocytopenia
 Tec protéine tyrosine kinase
 TF facteur tissulaire
 TFPI tissue factor pathway inhibitor
 TGFβ transforming growth factor beta
 TLR4 Toll like receptor 4
 TM thrombomoduline

TMEM16F transmembrane protein 16F,
 anoctamine 6
 TNF tumor necrosis factor
 TOP temps d'occlusion plaquettaire
 tPA tissue plasminogen activator
 TP thromboxane receptor
 TPO thrombopoïétine
 TRAIL TNF-related apoptosis inducing ligand
 TRAP thrombin receptor-activating peptide
 TSC1/2 tuberous sclerosis complex 1/2
 TSP thrombospondine
 TSSC6 tumor-suppressing subchromosomal
 transferable fragment cDNA 6
 TUBB1 tubulin beta 1
 TxA2 thromboxane A2

U

U46619 TxA2 receptor agonist
 uPA urokinase
 UTR untranslated transcribed region

V

VASP vasodilator-stimulated
 phosphoprotein
 VAV1/3 proto-oncogène associant les activités
 tyrosine kinase et GTPase
 VCFS syndrome vélo-cardio-facial
 VEGF vascular endothelial growth factor
 VMP volume moyen plaquettaire
 VPAC1 vasoactive intestinal polypeptide
 receptor 1
 vWF facteur von Willebrand

W

WAS Wiskott-Aldrich syndrome
 WASp Wiskott-Aldrich syndrom protein
 WNK1 lysine deficient protein kinase 1

X

XLT X-linked thrombocytopenia syndrome
 XLTDA X-linked thrombocytopenia with or
 without dyserythropoietic anemia
 XLTT X-linked thrombocytopenia with
 Thalassemia

Index des illustrations

Figure 1 : L'hématopoïèse.

Figure 2 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement des mégacaryocytes.

Figure 3 : Schéma adapté de la revue de Stegner et collaborateurs.

Figure 4 : Stades de maturation des mégacaryocytes (illustrations du site HématoCell Angers).

Figure 5 : Microenvironnement participant à la régulation du développement des mégacaryocytes et leur migration, d'après la revue de Deutsch et Homer.

Figure 6 : Structure schématique des plaquettes (illustrations du site slidevideo).

Figure 7 : Protéines de transport des phospholipides de la membrane plaquettaire.

Figure 8 : Le rôle des protéines motrices du cytosquelette au cours de l'activation des plaquettes.

Figure 9 : Interaction plaquettes/cellules endothéliales et activité anticoagulante de l'endothélium quiescent.

Figure 10 : Résumé des différentes étapes de la formation du clou plaquettaire lors d'une brèche vasculaire.

Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation structurale du FvW.

Figure 12 : Aperçu des récepteurs plaquettaires impliqués dans l'activation des plaquettes.

Table 1 : Principaux couples ligands # récepteurs mettant en jeu des protéines adhésives ou des protéines solubles, ainsi que les voies de signalisation principales.

Figure 13 : Parties extracellulaires du complexe GPIb-IX-V. La GPIb α interagit avec son ligand préférentiel, le FvW, mais également avec d'autres ligands tels que la thrombospondine, des facteurs de la coagulation (FXI, FXII), la thrombine, le kininogène de haut poids moléculaire ou la P-sélectine.

Figure 14 : Signalisation plaquettaire induite par le complexe GPIb-IX-V et conduisant à l'activation de l'intégrine α IIb β 3.

Figure 15 : Voies de signalisation dépendantes de la GPVI.

Figure 16 : Structure de l'intégrine α IIb β 3 et changement conformationnel suite à son activation (Academic OneFile Document).

Figure 17 : Activation « inside-out » de l'intégrine α IIb β 3.

Figure 18 : Récepteurs P2Y plaquettaires à l'ADP.

Figure 19 : Expression des différentes isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines.

Figure 20 : Structure des différentes isoformes d'Akt.

Figure 21 : Schéma de la régulation d'Akt adapté d'après Ebner et collaborateurs.

Figure 22 : Activation des PI3Ks dans les plaquettes.

Figure 23 : Les 3 classes de PI3Ks chez les Mammifères : structure schématique des sous-unités catalytiques et régulatrices et des substrats biologiques.

Figure 24 : La stimulation des RTK ou RCPG conduit à l'activation de PI3K et la production de PI(3,4,5)P3 (PIP3) au niveau de la membrane plasmique.

Figure 25 : Substrats et fonctions des protéines impliquées dans le réseau Akt.

Figure 26 : Régulation de GSK3 et phosphorylation de son substrat.

Figure 27 : Régulation des cibles transcriptionnelles des membres de la famille FoxO.

Figure 28 : Régulation de mTORC1 via le complexe TSC.

Figure 29 : Rôle d'Akt dans l'agrégation plaquettaire chez la souris.

Figure 30 : Mécanismes supposés de l'activation d'Akt par la thrombine, l'ADP et le TxA2 dans les plaquettes humaines.

Tableau II : Algorithme diagnostique d'une thrombopénie constitutionnelle associant la présence d'anomalies extra-hématologiques et la taille des plaquettes.

Figure 31 : Gènes impliqués dans les thrombopénies en fonction des différentes étapes de la mégacaryopoïèse.

Figure 32 : Représentation schématique des marqueurs moléculaires validés en CMF en aval des principaux récepteurs plaquettaires (PHCR 1206808).

Figure 33 : Principe général du FRET.

Figure 34 : Caractérisation de la fonction plaquettaire de la patiente par la technique d'agrégométrie.

Figure 35 : Caractérisation du niveau d'activation de certaines protéines de la signalisation « inside-out » plaquettaire chez la patiente.

Figure 36 : Caractérisation des différentes phosphorylations activatrices d'Akt chez la patiente, suite à la stimulation des plaquettes par les différents agonistes.

Figure 37 : Caractérisation de l'activation d'Akt et de ses voies de signalisation d'aval induites par les différents agonistes testés chez la patiente.

Figure 38 : Diminution d'expression de l'isoforme Akt2 plaquettaire chez la patiente.

Figure 39 : Estimation de la phosphorylation activatrice d'Akt après stimulation par la thrombine ou le collagène, aux temps indiqués, et pour les différentes quantités de plaquettes lavées.

Figure 40 : Phosphorylation activatrice basale des différentes isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines de sujets sains.

Figure 41 : Phosphorylation activatrice des différentes isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines de sujets sains, après stimulation par différents agonistes.

En dépit d'un handicap certain, en termes de taille et d'absence de noyau, les plaquettes jouent un rôle fondamental dans les processus physiopathologiques de l'hémostase et de la formation du thrombus. Toutefois, de nouvelles fonctions plaquettaires ont été mises en évidence ces dernières années, notamment dans l'inflammation, l'immunité, l'angiogenèse, la formation de métastases ou encore dans le développement et la régénération de certains organes.

Effectivement, les plaquettes disposent d'une machinerie sécrétoire remarquable et, outre les granules de stockage, sont dotées de mitochondries, d'ARNm, de ribosomes, de voies de signalisation et de multiples récepteurs, etc... qui n'ont rien à envier aux cellules nucléées. Certains auteurs comparent les plaquettes à de véritables drones qui auraient encore des secrets à livrer concernant leurs fonctions. De plus, leur nombre leur confère une autre caractéristique d'intérêt : dans le sang périphérique, les plaquettes sont entre 150 et 450 G/L, correspondant au type cellulaire circulant le plus abondant après les érythrocytes.

L'ensemble des fonctions plaquettaires est régulé par des voies de signalisation intracellulaires complexes mettant en jeu de nombreuses enzymes telles que des protéines kinases, des lipides kinases, des phosphatases, des phospholipases ou des GTPases. L'objectif de ma thèse est de caractériser une voie de signalisation impliquant les lipides kinases de la famille des PI3-kinases et, en aval, les protéines kinases de la famille Akt, notamment chez une patiente présentant une dérégulation de cette voie.

Ainsi, à travers l'étude de la fonction des plaquettes dans l'hémostase, nous allons tenter de caractériser plus avant la mise en jeu des trois isoformes d'Akt dans l'activation plaquettaire et son implication suspectée dans un cas de thrombopathie constitutionnelle.

Physiologie de la mégacaryopoïèse

Les plaquettes, également appelées thrombocytes, présentent des caractéristiques structurales originales puisqu'elles sont les plus petites cellules sanguines (1,5 à 4 μm de diamètre et 0,5 à 2 μm d'épaisseur) dépourvues de noyau. Malgré ce qui pourrait apparaître comme un handicap, elles participent à de multiples fonctions essentielles, notamment l'hémostase, mais également l'inflammation, la réponse antimicrobienne ou la dissémination de cellules tumorales [1].

Ces cellules anucléées sont issues de la lignée mégacaryocytaire médullaire à partir d'une cellule souche hématopoïétique commune, selon un processus de différenciation complexe à 2 étapes : la mégacaryopoïèse puis la thrombopoïèse.

- La mégacaryopoïèse correspond aux événements i) d'engagement de la cellule souche hématopoïétique, ii) de prolifération, puis iii) de différenciation/maturation du progéniteur mégacaryocytaire. Cette dernière phase est caractérisée par une succession d'endomitoses, ou endoréplifications du noyau, aboutissant à la formation d'une cellule géante : le mégacaryocyte.
- La thrombopoïèse constitue l'étape ultime de la production des plaquettes à partir de la fragmentation du cytoplasme du mégacaryocyte mature. Cette production est estimée à environ 2 à 5000 plaquettes/mégacaryocyte.

Les plaquettes persistent environ 7 à 10 jours dans le sang et, grâce à des mécanismes de régulation spécifiques, faisant notamment intervenir la thrombopoïétine (TPO), leur numération reste relativement stable pour un même individu, soit environ 150 à 450 G/L.

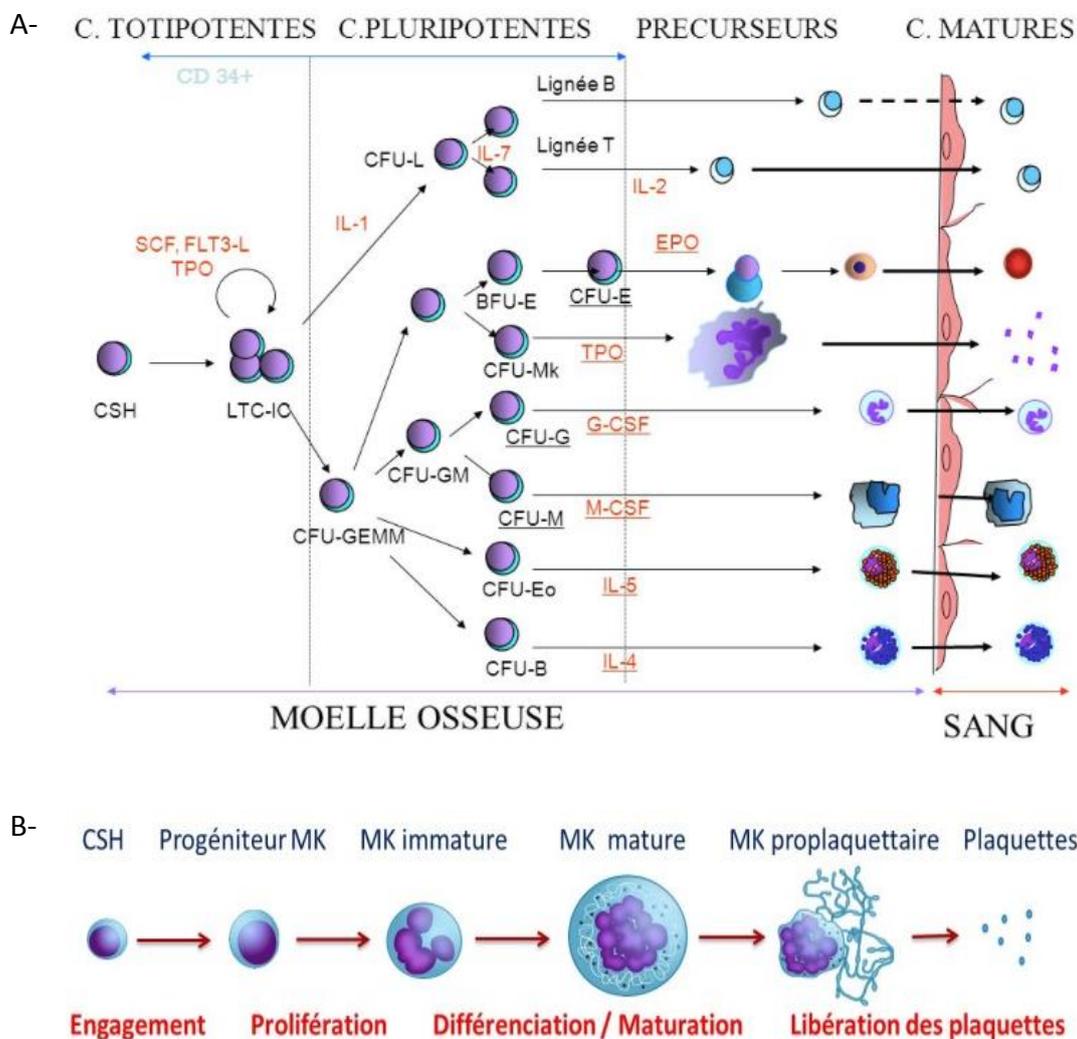


Figure 1 : L'hématopoïèse. A. Schéma adapté d'une présentation du Dr Ngo Sack. B. Une fois engagé vers la voie de différenciation mégacaryocytaire, le mégacaryoblaste -noyau unilobé et cytoplasme basophile- se différencie en mégacaryocyte basophile -noyau irrégulier polylobé avec cytoplasme spumeux- puis en mégacaryocyte granuleux -noyau plurilobé et cytoplasme acidophile. Le mégacaryocyte plaquettogène, qui correspond à un stade fugace, génère les plaquettes (INSERM U949, Dr N. Brouard).

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique. LTC-IC : Long-Term culture Initiating Cells. CFU-L : Colony Forming Unit-Lymphoïd. CFU-GEMM : Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte, Megakaryocyte. CFU-GM : Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte colonies. BFU-E : Burst Forming Unit Erythrocyte. CFU-E : Colony Forming Unit Erythrocyte. CFU-Mk : Colony Forming Unit Megakaryocyte. CFU-G : Colony Forming Unit Granulocyte. CFU-M : Colony Forming Unit Monocyte. CFU-Eo : Colony Forming Unit-Eosinophil. CFU-B : Colony Forming Unit-Basophile.

La moelle osseuse est le compartiment de la différenciation des progéniteurs

Alors que la mégacaryopoïèse s'effectue dans la moelle osseuse, l'étape ultime de libération des plaquettes, la thrombopoïèse, est sanguine.

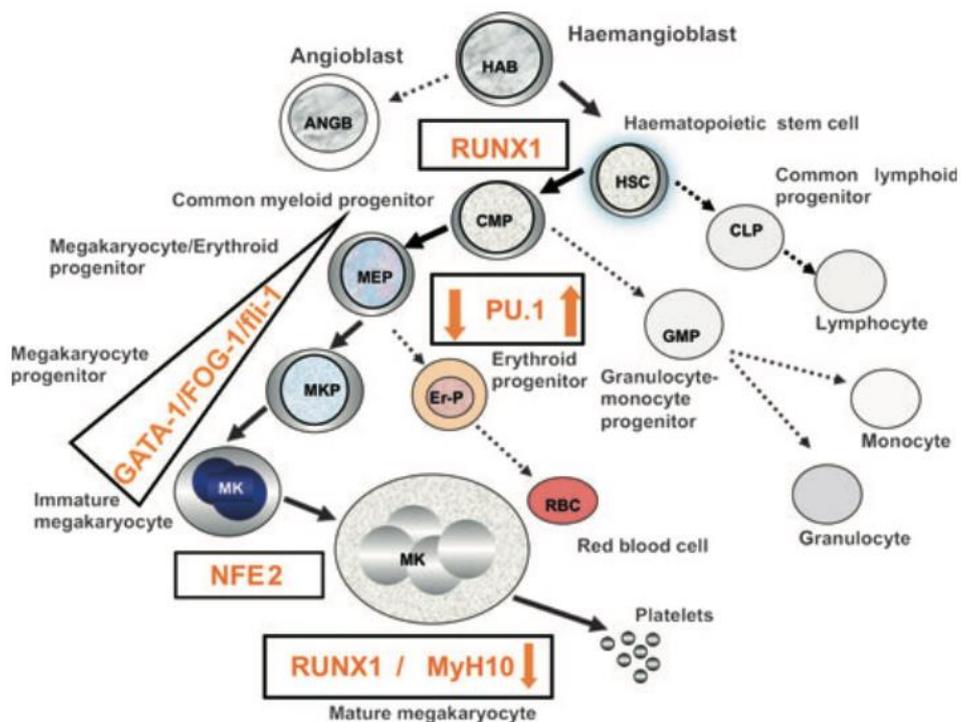


Figure 2 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement des mégacaryocytes [1].

HAB : haemangioblast. ANGB : Angioblast. HSC : Haematopoïetic stem cell. CMP : Common myeloid progenitor. MEP : Megakaryocyte/Erythroid progenitor. MKP : Megakaryocyte progenitor. MK : Immature megakaryocyte. CLP : Common lymphoid progenitor. GMP : Granulocyte-monocyte progenitor. Er-P : Erythroid progenitor. RBC : Red blood cell.

Le progéniteur commun érythroblastique-mégacaryocytaire (MEP)

Dans des niches spécialisées de la moelle osseuse, la cellule souche hématopoïétique se différencie d'une part en progéniteur lymphoïde, et d'autre part en CFU-GEMM, également appelé CFU-Mix,

pour Mixed Progenitor Colony, ou CMP, pour Common Myeloid Progenitor. Le CFU-GEMM se différencie ensuite en CFU-GM et MEP, pour Megakaryocyte-Erythroid Precursor.

La différenciation du CFU-GEMM est orchestrée par de nombreux mécanismes moléculaires régulés par certains facteurs de transcription dont les principaux sont GATA1 et PU.1 (également appelé SPI1) ; ils conduisent le développement des MEP et des CFU-GM, respectivement [2]. Des cytokines et des facteurs de croissance participent également à cette différenciation ; c'est le cas de la TPO et des effecteurs des voies de signalisation engagées à partir de son récepteur spécifique c-Mpl, ainsi que des interleukines 3, 6 et 11 (IL3, IL6, IL11) et le Stem Cell Factor (SCF).

Les progéniteurs spécialisés

En réponse à certains facteurs environnementaux, le MEP se différencie d'une part en progéniteur érythroblastique précoce BFU-E, et d'autre part, en mégacaryocyte précoce ou BFU-Mk, dont la capacité proliférative est très forte.

D'un point de vue moléculaire, l'up-régulation de GATA1 et l'extinction de PU.1 [3] est impliquée dans la restriction de cette différenciation. FOG1 (Friends Of GATA1), cofacteur de GATA1, est requis pour la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire car il intervient dans la régulation de l'accès de GATA1 aux séquences nucléotidiques d'intérêt [3]. De plus, MYB, connu comme un inhibiteur de la mégacaryopoïèse, interagit avec GATA1 qui l'inhibe et oriente la différenciation mégacaryocytaire.

Le BFU-Mk, à fort pouvoir prolifératif, se différencie ensuite en un progéniteur mégacaryocytaire tardif plus mature CFU-Mk, sous le contrôle de cytokines telles que GM-CSF, IL3, IL6, IL11, TPO, SCF.

L'endomitose : une spécificité de la différenciation mégacaryocytaire

Le CFU-Mk se différencie en promégacaryoblaste qui possède la particularité, après la phase S, d'entrer en phase M sans aller au-delà de l'étape de cytokinèse de l'anaphase. En d'autres termes, il perd la capacité de se diviser mais pas celle de se répliquer (endoréplication) et maturer son cytoplasme. La séparation des cellules filles ne s'effectue pas ; le noyau est alors pourvu de 2 fois plus de chromosomes. La ploïdie augmente à nouveau avec l'entrée dans le cycle mitotique suivant,

passant progressivement de 4N jusqu'à 128N, avec un mode moyen à 16N pour la majeure partie des mégacaryocytes chez un sujet sain.

D'un point de vue moléculaire, le passage de la mitose à l'endomitose est assuré par l'expression de RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) responsable de l'extinction de MYH10, une myosine faisant partie intégrante de l'anneau contractile responsable du clivage en cellules filles [4]. La perte de l'expression de cette myosine rajoutée à une dysfonction de l'activité RhoA, une GTPase participant à l'assemblage de cet anneau contractile, est responsable de l'échec de la cytokinèse.

En plus de la particularité du cytosquelette dans le mécanisme de l'endomitose et compte tenu des propriétés connues de certaines CDK/Cyclines vis-à-vis du contrôle du cycle cellulaire, certains inhibiteurs de ces points de contrôle ont été impliqués dans le mécanisme de sortie du cycle cellulaire, c'est le cas de p19INK4D et de p21Cip1/Waf1 [5] [6].

Parallèlement aux phénomènes nucléaires, se produisent des processus de maturation cytoplasmiques responsables de la formation et du chargement des granules de sécrétion des futures plaquettes matures ainsi que d'un réseau membranaire, appelé système de démarcation membranaire (DMS), des futures extensions cytoplasmiques qui traverseront les sinusoides vasculaires.

Concernant les granules, elles sont produites à partir du bourgeonnement du trans-Golgi et des endosomes précoces, puis mûrent en corps multivésiculaires (MVB) à l'intérieur desquels le tri et le chargement du contenu spécifique des granules s'opèrent. Elles sont ensuite mobilisées sur un réseau de microtubules vers les extrémités des proplaquettes grâce à des protéines qualifiées de « motrices » ; certaines d'entre elles sont d'ailleurs clairement corrélées à des thrombopathies, certaines seront détaillées dans le chapitre 5 relatifs aux anomalies plaquettaires constitutionnelles.

Bilan morphologique et fonctionnel

Les différents stades de maturation des mégacaryocytes sont situés dans une niche hématopoïétique médullaire combinant la proximité de CSH, de sinusoides vasculaires et d'ostéoblastes à une matrice extracellulaire favorable. La théorie généralement admise selon laquelle les mégacaryocytes issus des cellules souches hématopoïétiques migrent depuis une niche périostique lointaine vers les sinusoides vasculaires médullaires à mesure de leur maturation n'est pas aussi tranchée actuellement. Des arguments pour un modèle modifié émergent : les mégacaryocytes auraient une migration plus lente et modérée, l'espace intervasculaire de maturation serait plus restreint, et les

mégacaryocytes seraient générés à proximité des sinusoides vasculaires de la moelle [7]. Certains auteurs émettent également l'hypothèse de la coexistence de 2 pools de mégacaryocytes : i) un rapidement mobilisable et proche des sinusoides vasculaires de la moelle pour la génération de plaquettes, et ii) un autre plus quiescent en périphérie de ces sinusoides. Des études complémentaires sont évidemment nécessaires pour étayer cette hypothèse.

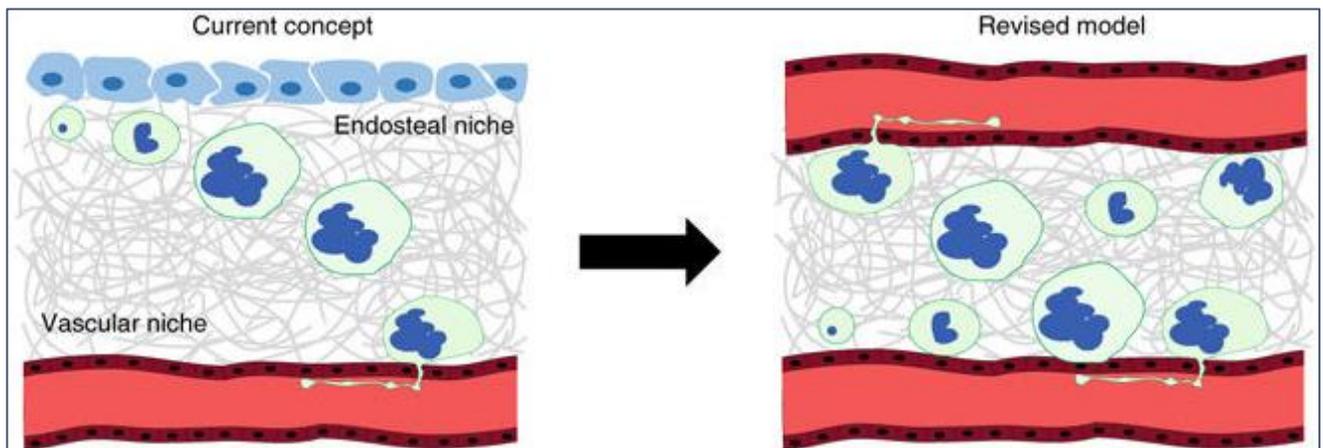


Figure 3 : Schéma adapté de la revue de Stegner et collaborateurs [7].

Les mégacaryocytes matures se plaquent à la paroi externe des sinusoides vasculaires médullaires et émettent des prolongements cytoplasmiques dans la lumière de ces vaisseaux : les proplaquettes sont émises et se fragmentent ensuite en plaquettes, emportées dans le torrent circulatoire.

Les différents stades de maturation

Parallèlement aux endomitoses, la morphologie du mégacaryocyte évolue du fait de la synthèse active qui s'opère dans le cytoplasme. Ainsi, le noyau certes augmente de volume mais le cytoplasme, où sont synthétisées et s'accumulent de nombreuses molécules, grandit également pour aboutir à des cellules géantes.

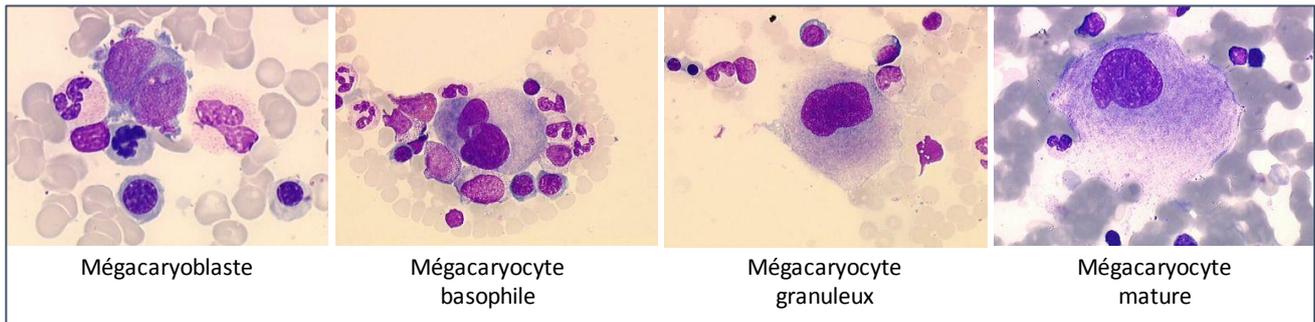


Figure 4 : Stades de maturation des mégacaryocytes (illustrations du site HématoCell Angers).

Le promégacaryoblaste

Il correspond aux cellules issues du CFU-MK et représente environ 10% de l'ensemble des mégacaryocytes médullaires. Sur le frottis médullaire, sa morphologie s'apparente à celle d'un lymphocyte, mais reste exceptionnellement visible sur une moelle normale. Son noyau présente une ploïdie faible, de 2N à 4N, son cytoplasme exprime la peroxydase plaquettaire, marqueur précoce de la lignée mégacaryocytaire qui le rend identifiable notamment en microscopie électronique.

Le mégacaryoblaste

La ploïdie augmente à 4N-8N et un début de maturation cytoplasmique s'opère. La taille est estimée entre 25 et 30 μm . L'observation morphologique en microscopie optique montre une élévation du rapport nucléocytoplasmique, un noyau souvent bilobé, une chromatine fine et un cytoplasme très basophile sans granulations. La microscopie électronique permet de déceler le développement d'un système de membranes intracytoplasmiques et la synthèse grandes quantités de molécules spécialisées débutent.

Le mégacaryocyte basophile

La ploïdie, à son maximum, est majoritairement estimée à 16N ; la synthèse d'ADN cesse. Le mégacaryocyte basophile mesure entre 30 et 40 μm et représente environ 25% de la lignée mégacaryocytaire. D'un point de vue morphologique, les cellules sont de grande taille, le noyau commence à se lobuler, la quantité de cytoplasme augmente, réduisant le rapport

nucléocytoplasmique. L'apparition de quelques granules alpha et denses est détectée en microscopie électronique.

Le mégacaryocyte granuleux

Les granulations plaquettaires augmentent, les membranes de démarcation permettent d'organiser des territoires plaquettaires. Il mesure environ 40 à 60 μm et compte pour environ 55% de la lignée mégacaryocytaire. Morphologiquement, la taille du cytoplasme augmente encore, réduisant d'autant le rapport nucléocytoplasmique, le noyau est multilobé, la chromatine plus dense, le cytoplasme perd sa basophilie et devient plus acidophile (rosé), et s'enrichit en granulations.

Le mégacaryocyte mature

C'est le mégacaryocyte plaquetto-gène. Sa taille est comparable au mégacaryocyte granuleux. Les granulations se regroupent en amas dans le cytoplasme, et constitue les ébauches des futures plaquettes. Morphologiquement, le noyau est multilobé, dense, pycnotique et le cytoplasme évoque celui d'une plaquette. Il est relativement peu abondant dans la moelle puisqu'il correspond à environ 5% de la lignée mégacaryocytaire.

Formation des proplaquettes/plaquettes

Après une maturation médullaire estimée à 8 jours environ, les mégacaryocytes matures émettent de longues et fines extensions cytoplasmiques « vermiformes », appelées proplaquettes à travers les sinusoides vasculaires, qui se fragmentent en plaquettes dans la lumière vasculaire, emportées par le flux sanguin.

Récemment, une voie alternative a été décrite chez la souris [8]; les auteurs ont démontré que de nombreux mégacaryocytes sont présents dans la microcirculation pulmonaire et libèrent activement des plaquettes. Ce travail atteste que les poumons sont un site extramédullaire de production d'environ 50 % de la totalité des plaquettes chez la souris ; plusieurs stades de différenciations des mégacaryocytes ont été identifiés dans les espaces périvasculaires pulmonaires. De plus, les auteurs montrent que dans des conditions de thrombopénie et de déficit relatif en cellules souche

médullaires, certains de ces progéniteurs présents dans les poumons migrent vers la moelle osseuse pour la recoloniser et redonner des cellules hématopoïétiques. Ce travail montre chez la souris un rôle inattendu pour les poumons en tant que de niche hématopoïétique.

La régulation de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est régulée tout au long de ses différentes étapes, permettant de fait de contrôler la prolifération, l'engagement, la différenciation en mégacaryocytes matures et la libération des plaquettes. Ceci est rendu possible par l'action concertée de cytokines et facteurs de transcription. D'ailleurs, un certain nombre de ces protéines sont le siège de mutations responsables de thrombopénies, une des plus connue étant la thrombopénie liée à l'X pour laquelle GATA1 est retrouvé muté.

Régulation transcriptionnelle de la mégacaryopoïèse

Les premières données concernant les facteurs de transcription impliqués dans la mégacaryopoïèse knock-out et, plus récemment, des progrès de techniques de séquençage et d'analyses du génome.

GATA1 occupe une place centrale dans la régulation de la différenciation et de la maturation des mégacaryocytes : il module indirectement l'expression de gènes cible *via* le recrutement de différents corégulateurs. FOG1, une protéine à doigts de Zinc, est un de ces corégulateurs responsable du rétrocontrôle de l'activité GATA1 ; sa liaison à NuRD inactive la transcription de GATA1. De même, Fli1, un facteur de transcription membre de la famille ETS, reconnaît une séquence consensus riche en bases purines et se comporte comme un régulateur majeur notamment des derniers stades de la différenciation mégacaryocytaire en interagissant avec GATA1 pour l'activation de l'expression des gènes intervenant dans les étapes terminales. Enfin, Pu1, également membre de la famille ETS et interagissant avec GATA1 selon un mode d'inhibition réciproque, tient un rôle essentiel dans le choix d'orientation entre lignées érythroïde et mégacaryocytaire. NFE2, un facteur de transcription hétérodimérique formé de p45 et d'une protéine de la famille Maf, est un autre complexe transcriptionnel indispensable à la différenciation correcte des mégacaryocytes, à leur maturation et à la génération de proplaquettes et libération de plaquettes. Enfin, RUNX1 joue également un rôle majeur dans la mégacaryopoïèse ; en coopérant

avec d'autres facteurs de transcription dont GATA1 et Fli1, il inhiberait la différenciation terminale des mégacaryocytes et favoriserait la prolifération des progéniteurs [9] [10].

En clinique, des mutations de RUNX1 sont retrouvées dans des cas de thrombopénies constitutionnelles telles que FPD/AML (Familial Platelet Disorder with predisposition to Acute Myeloid Leukemia), certains de ces cas seront brièvement rapportés dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

Régulation du microenvironnement de la mégacaryopoïèse

L'environnement médullaire favorable à la mégacaryopoïèse est un milieu complexe et hautement spécialisé qui combine des gradients de chimiokines, de facteurs de croissance, de calcium, d'oxygène, de protéines d'adhésion, chargées de la migration des niches ostéoblastiques vers les niches vasculaires.

La thrombopoïétine (TPO) est la principale et la plus puissante cytokine physiologique régulatrice de l'ensemble des stades de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse. Elle est le produit d'un seul gène présent sur le chromosome 3 et correspond à une protéine de 332 acides aminés fortement glycosylée et acide. Produite par le foie, le niveau de TPO circulant est inversement proportionnel à la numération plaquettaire et son activité est régie par sa liaison à un récepteur spécifique MPL, responsable de l'activation de cascades de signalisation dont les voies JAK/STAT-MAPK et PI3K-Akt. Du fait de son rôle dans la survie et la prolifération des CSH et, de sa capacité à stimuler la prolifération et la maturation des progéniteurs mégacaryocytaires, en contrôlant leur ploïdie et l'augmentation de leur taille, la TPO constitue une cible pharmacologique de choix dans le traitement de certaines thrombopénies. Effectivement, des agonistes du récepteur MPL, Romiplostim (Nplate[®]) et Eltrombopag (Revolade[®]), sont utilisés chez l'Homme [9] [11].

D'autres cytokines présentent également un intérêt, il est intéressant de souligner qu'il existe probablement une balance entre des facteurs stimulant la mégacaryopoïèse tels que TPO, IL6 ou IL11, et d'autres l'inhibant tels que TGF β , le PF4, et que celle-ci génère des microenvironnements différents à l'origine de changement de taille des mégacaryocytes au cours de leur développement notamment.

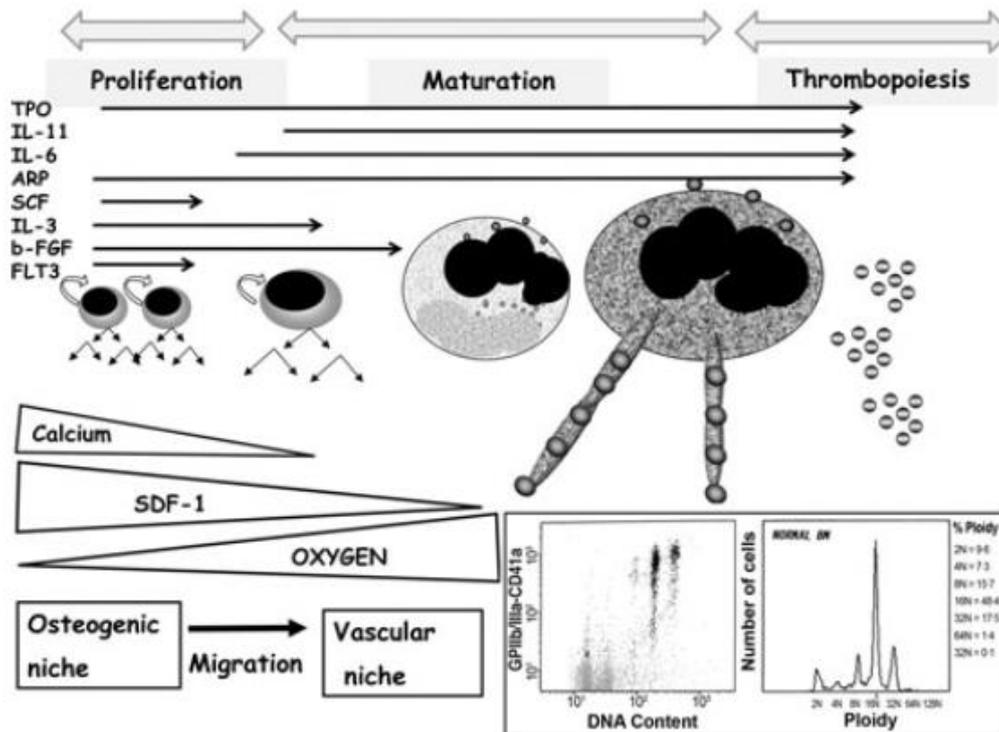


Figure 5 : Microenvironnement participant à la régulation du développement des mégacaryocytes et leur migration, d'après la revue de Deutsch et Homer [11].

TPO : Thrombopoïétine. ARP : peptide inductible dérivant d'une acétylcholinestérase. SCF : Stem Cell Factor. FLT3 : Fms-Like Tyrosine Kinase 3. SDF1 : Stromal cell-Derived Factor 1 α .

Anatomie plaquettaire

Une fois émises dans la circulation sanguine selon des mécanismes complexes et originaux décrits précédemment, les plaquettes vont participer au maintien de l'intégrité vasculaire ainsi qu'à un certain nombre d'autres fonctions [12] [13].

La question est de savoir comment les plaquettes, qui sont les plus petites cellules sanguines, anucléées de surcroît, font pour être aussi biologiquement actives ? Quels sont leurs atouts physiques pour participer aux fonctions qui leur sont attribuées ?

Au microscope optique, elles se distinguent par un centre relativement dense contenant des granulations, ou chromomère, et par une zone périphérique non colorée, le hyalomère. La microscopie électronique a permis d'aller au-delà de cette description en définissant 4 zones principales : i) une zone périphérique, ii) des systèmes membranaires internes, iii) des organelles intracellulaires, et iv) le cytosquelette.

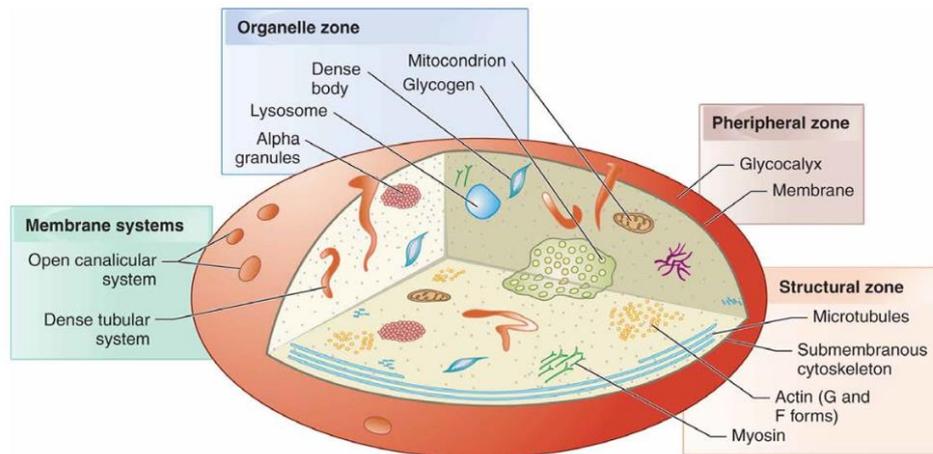


Figure 6 : Structure schématisique des plaquettes (illustration du site Slidevideo).

Les systèmes membranaires

La membrane plasmique

Comme n'importe quelle membrane cellulaire eucaryote, la membrane plasmique plaquettaire se présente sous forme d'une bicouche lipidique dont les feuilletts, interne et externe, ont une composition spécifique à l'origine d'une asymétrie membranaire. Parmi les principaux constituants lipidiques de la bicouche se trouvent i) des glycérophospholipides tels que la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidyléthanolamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI), ii) des sphingolipides dont la sphingomyéline (SM) ainsi que iii) des lipides neutres comme le cholestérol. Les composants protéiques de la membrane plasmique, principalement des glycoprotéines, peuvent soit être ancrés dans un des feuilletts lipidiques, soit traverser la bicouche lipidique de part en part du fait de domaines hydrophobes. Plusieurs de ces protéines sont des récepteurs spécifiques de différents ligands qui seront abordés en détails dans le chapitre suivant.

L'asymétrie membranaire se manifeste de différentes façons : sur les phospholipides eux-mêmes et également au niveau de leur répartition membranaire. Pour chaque classe de ces lipides, il existe un grand nombre d'espèces moléculaires selon le branchement et/ou le degré d'insaturation des chaînes carbonées. Ainsi, l'ensemble de la membrane plasmique est recouvert par un manteau amorphe : le glycocalyx périplaquettaire. Il est constitué de glycosaminoglycanes (GAG) et constitue une zone de « protection » et probablement un premier niveau de régulation des fonctions plaquettaires et de leur relation avec leur environnement. En effet, par opposition de charges

négatives, les GAG endothéliaux repoussent les plaquettes de la face endoluminale de la paroi vasculaire.

Concernant la répartition membranaire, les phospholipides sont distribués de façon asymétrique entre les 2 couches lipidiques : alors que les SM prédominent sur le feuillet externe, les PE, PI et PS sont davantage représentés dans le feuillet interne, les PC étant répartis de façon équitable entre les 2 feuillets. La création et le maintien de cette asymétrie membranaire est sous le contrôle de protéines spécialisées dans le transfert de lipides d'un feuillet à un l'autre, ou « flip-flop » membranaire [14]. Ainsi, la flippase P4 ATPase assure le passage de PS vers le feuillet interne [15] et la floppase ABCC1/MRP1 se charge quant à elle du passage de certains phospholipides vers le feuillet externe [16] [17]. Enfin, alors qu'un système agit pour créer une asymétrie membranaire, un autre cherche à le réverser sous l'action d'une scramblase TMEM16F [18].

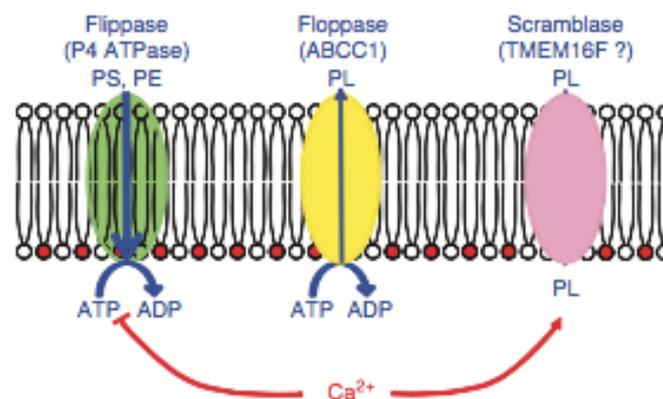


Figure 7 : Protéines de transport des phospholipides de la membrane plaquettaire [19]. En présence d'un signal calcique secondaire à l'action de la thrombine ou du collagène, la scramblase catalyse le transfert bidirectionnel des phospholipides et l'inhibition de la flippase contribue à l'exposition de phosphatidylsérine.

PS : phosphatidylsérine, PE : phosphatidyléthanolamine.

Parmi les phospholipides d'intérêt côté intracellulaire, les phosphoinositides (PIs) ont une place particulière : alors qu'ils sont les phospholipides les moins abondants (environ 10% des phospholipides totaux), ils sont métaboliquement très actifs, et participent à de nombreuses voies de signalisation cellulaire. En effet, leur localisation et leur capacité à se lier spécifiquement à des protéines leur permet d'organiser de façon spatiotemporelle des complexes protéiques responsables de signaux de survie, de trafic intracellulaire ou de réarrangement du cytosquelette [20]. Cette présence est régulée doublement i) par des protéines de liaison type Pipmodulines (GAP43, MARCKS

ou CAP23) qui masquent les PIs et gênent leur rôle de second messenger puis ii) par le jeu de phosphorylation/déphosphorylation par des protéines kinases et phosphatases spécifiques activées par divers agonistes plaquettaires et recrutées grâce à des domaines spécifiques [21]. Ces modules protéiques capables d'interagir avec les PIs tels que les domaines Pleckstrin Homology (PH), FYVE, ou Phox (PX) seront revus dans le chapitre 4 de cette introduction bibliographique, lorsque nous aborderons les protéines Akt.

La PS est un autre phospholipide important pour les fonctions plaquettaires. Son exposition active sur le feuillet externe de la membrane plasmique lors d'une forte activation des plaquettes permet de focaliser la formation de thrombine et donc la génération de fibrine [19]. En effet, sous l'action combinée d'agents pro-coagulants forts (thrombine plus collagène) à la surface des plaquettes, une augmentation intra-plaquettaire significative de calcium induit un remodelage membranaire, via notamment la scramblase TMEM16F, responsable d'une redistribution aminophospholipidique sur le feuillet externe, la libération de microvésicules et l'évagination de la membrane plasmique. L'accès des PS à la surface des plaquettes activées est à l'origine de l'activité pro-coagulante des plaquettes ; en fournissant une surface anionique, les PS servent de point d'ancrage au facteur Va du complexe prothrombinase et donc à l'amplification de la génération de thrombine. L'exemple physiopathologique du syndrome de Scott illustre ce propos : la symptomatologie hémorragique est expliquée par le défaut d'exposition des PS pro-coagulantes au feuillet externe des plaquettes. Défaut qui s'explique par une mutation perte de fonction du gène *tmem16f* codant pour une scramblase dont le rôle dans la régulation de l'asymétrie membranaire a été évoqué ci-dessus [22].

Concernant le cholestérol, plusieurs études *in vitro* consistant à modifier la teneur membranaire en cholestérol ont démontré que ce lipide jouait un rôle significatif dans l'activation précoce des plaquettes et mimait l'hyperréactivité des plaquettes provenant d'individus atteints d'hypercholestérolémie de type IIa [21]. Plus largement, le cholestérol, en régulant la fluidité et l'organisation membranaire, participerait à la formation et à la stabilisation de « rafts » lipidiques, qui sont des micro-domaines membranaires qui concentrent un certain nombre d'acteurs de la signalisation plaquettaire.

Une idée en cours est qu'un certain niveau de compartimentation de la membrane plasmique, maintenue de façon dynamique, en interaction avec son cytosquelette, permet une activation efficace des plaquettes via des récepteurs et des corécepteurs particuliers qui seront détaillés dans le chapitre suivant.

Les systèmes membranaires internes

Le système canaliculaire ouvert (SCO)

Connecté à la surface des plaquettes, il correspond à des invaginations profondes de la membrane plasmique à travers le cytoplasme et assure une surface de contact importante avec le milieu plasmatique extracellulaire [23]. Ce réservoir de membranes facilite l'étalement et l'émission de filopodes/lamellipodes lors de l'activation plaquettaire. De même, il renferme un plus grand nombre de glycoprotéines membranaires accessibles lors de l'activation plaquettaire. Enfin, il joue un rôle dans les mécanismes d'endocytose de molécules plasmatiques et/ou d'exocytose des granules plaquettaires.

Le système tubulaire dense (STD)

Non connecté à la surface des plaquettes, il correspond à du *reticulum endoplasmique* lisse, reliquat du mégacaryocyte, et porte des enzymes du métabolisme lipidique, telles que des peroxydases, ainsi que des enzymes régulant les flux calciques intracellulaires, telles que des ATPases. Il est le lieu de synthèse notamment des prostaglandines, du Thromboxane A2 (TxA2), et de stockage du calcium, indispensable au fonctionnement plaquettaire.

Les organelles cytoplasmiques

Le cytoplasme regorge d'éléments : mitochondries, grains de glycogène, lysosomes ou granules ayant chacun des rôles bien spécifiques au cours de l'activation plaquettaire.

Les granules δ ou granules denses

Ils mesurent 150 nm de diamètre et sont peu abondants puisqu'il en existe environ 1 à 10 par plaquette. Ils contiennent des quantités importantes de calcium, de pyrophosphate, de sérotonine et de certains nucléotides [24]. Ces derniers, adénosine 5'-diphosphate ADP et adénosine 5'-triphosphate ATP participent à l'amplification de la réponse plaquettaire et sont à différencier des nucléotides présents dans le cytoplasme des plaquettes, qui ne sont pas sécrétés mais une source énergétique plaquettaire.

Les granules α

Comparées aux granules denses, ils sont 5 à 10 fois plus nombreux et représentent environ 10% du volume plaquettaire. Ils mesurent 300 à 500 nm de diamètre et sont environ 20 à 200 par plaquette. Ils contiennent des éléments protéiques variés, spécifiques ou non des plaquettes [25]. Parmi eux, se trouvent i) des protéines plasmatiques adhésives, telles que le fibrinogène, le facteur von Willebrand (FvW), la fibronectine, la thrombospondine, la vitronectine, la P-sélectine (CD62), ii) des protéines plasmatiques de la coagulation telles que le fibrinogène, les facteurs V VIII IX XIII, la prothrombine, iii) des protéines de la fibrinolyse, telles que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 PAI1, α 2-antiplasmine, iv) des facteurs de croissance, tels que les PDGF, VEGF, EGF, IGF, v) des cytokines/chimiokines, telles que IL1 β , RANTES, CXCL4, etc. et vi) des protéines spécifiques des plaquettes telles que la β -thromboglobuline, la protéine S, le facteur 4 plaquettaire PF4 et le facteur de croissance plaquettaire PDGF.

Les granules λ ou lysosomes

Ils contiennent des enzymes hydrolytiques dont des hydrolases, des cathepsines D et E, des proélastases et des collagénases [26] [1]. La sécrétion de leur contenu ne survient qu'en cas de stimulation plaquettaire maximale et certaines enzymes libérées telles que les hydrolases, peuvent contribuer à la destruction d'agrégats plaquettaires, et donc à la résorption des thrombi.

Les mitochondries et les grains de glycogène

Elles sont environ une dizaine par plaquette et fournissent l'énergie indispensable aux fonctions de sécrétion et d'agrégation via les réactions de phosphorylation oxydative et de glycolyse [27].

Le cytosquelette plaquettaire

Il joue un rôle majeur dans la physiologie plaquettaire en maintenant une structure discoïde lorsque les plaquettes sont au repos en permettant leur changement de forme, l'émission de filopodes, l'adhésion et l'agrégation, et en contribuant à l'exocytose de granules [28].

Sa composition

Le cytosquelette des plaquettes est composé majoritairement d'actine et organisé en i) cytosquelette sous-membranaire constitué de courts filaments d'actine, stabilisé par la filamine (ou Actin Binding Protein ABP-280), la spectrine, la taline et la vinculine, et en ii) cytosquelette cytoplasmique, stabilisé par d'autres protéines de liaison dont la filamine. Alors que le cytosquelette sous-membranaire est connecté à la membrane plasmique via son interaction avec certaines glycoprotéines de surface et des molécules de signalisation telles que p60c-src, p62c-yes et rasGAP qui seront décrites dans le chapitre suivant, le cytosquelette cytoplasmique n'entrera en connexion avec les glycoprotéines de surface qu'après activation plaquettaire [29]. Le cytosquelette des plaquettes comporte également des microtubules agencés en une bande marginale circonférentielle interne, composée d'une spirale de 8 à 12 anneaux de polymères d' α - et β 1-tubuline, située directement sous la membrane plasmique et polymérisée à partir d'une ancre γ -tubuline. Son rôle est de maintenir la forme discoïde caractéristique des plaquettes au repos [30].

La dynamique du cytosquelette

Dans la grande majorité des cas, les 2 systèmes de cytosquelette, actine et microtubule, ont été étudiés de façon indépendante sans jamais trop insister sur leur interdépendance potentielle. Or, il semblerait qu'il puisse exister un lien fonctionnel entre le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules, notamment lors de l'activation des plaquettes par la thrombine. En effet, l'actine se concentre alors au centre de la plaquette sous forme de faisceaux denses avec des extensions périphériques vers les futures structures filopodes/lamellipodes, co-localisant avec la spirale de microtubules compactée en position centrale. De plus, l'emploi de toxines spécifiques du cytosquelette d'actine, cytochalasine D et latrunculine A, démontre que c'est bien sous la dynamique de l'actine F que se compactent des microtubules lors de l'activation des plaquettes [31].

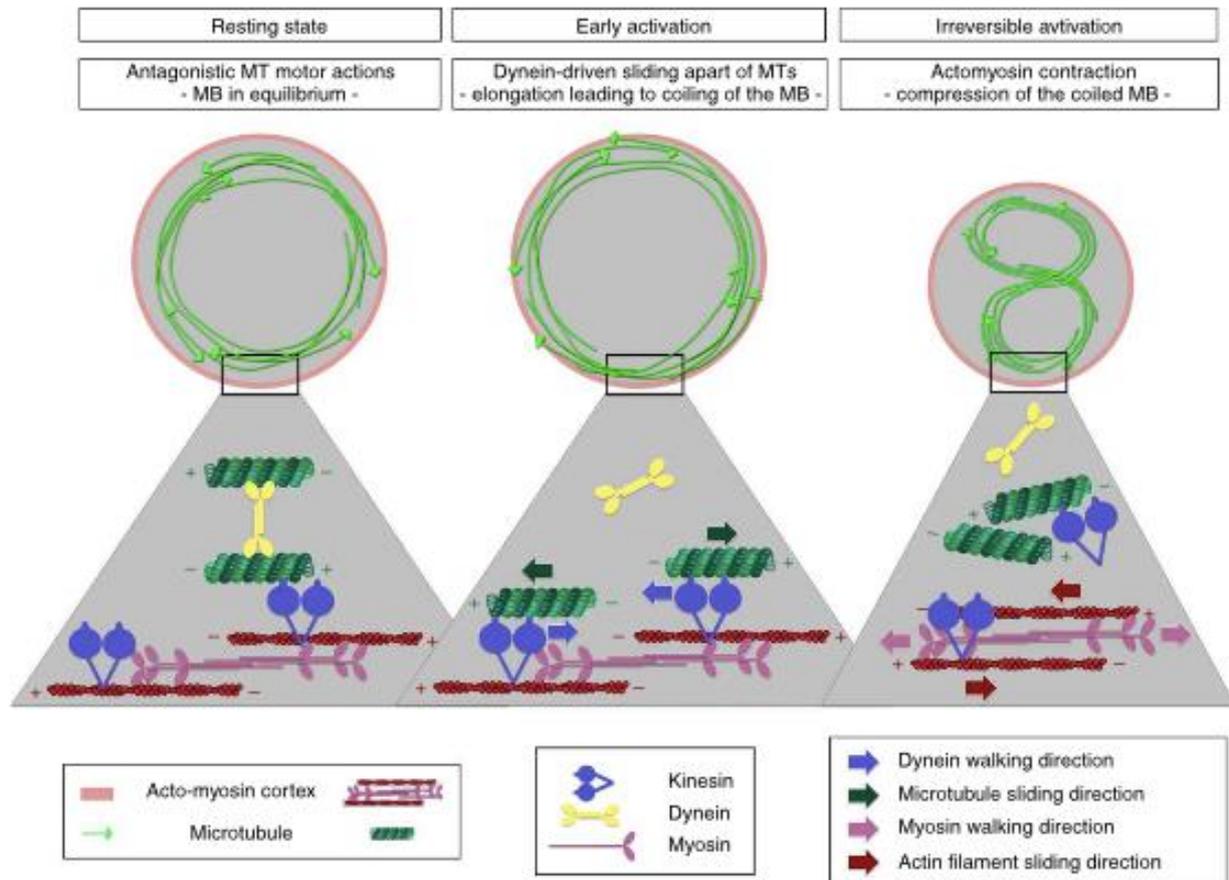


Figure 8 : Le rôle des protéines motrices du cytosquelette au cours de l'activation des plaquettes. Schéma reprenant les séquences potentielles d'événements conduisant à l'activation plaquettaire et illustrant l'organisation moléculaire supposée des microtubules et de l'actomyosine suite à un stimulus [30].

Pour autant, les acteurs moléculaires restent relativement méconnus : la myosine IIA non musculaire, un système moteur composé de kinésines et de dynéines ainsi qu'un système actomyosine pourraient contribuer au dialogue entre ces 2 systèmes (cf. Figure 8). Les séquences d'événements conduisant aux modifications morphologiques des plaquettes seraient régulées par les variations de flux calciques intraplaquettaires ainsi que les réactions de phosphorylation/déphosphorylation, ou d'acétylation de la tubuline [30].

Physiologie de l'activation plaquettaire

L'Hémostase regroupe un ensemble de réactions séquentielles, étroitement intriquées, qui assurent *in fine* l'arrêt des hémorragies de la microvascularisation (capillaires, veinules, artérioles) et le maintien de l'intégrité vasculaire.

Depuis le compartiment vasculaire, les plaquettes sont la véritable clé de voûte du contrôle du processus hémorragique, de la constitution du caillot ainsi que de sa stabilité.

Les différentes séquences d'événements

De façon schématique, les séquences d'événements cellulaires et moléculaires s'articulent autour d'un temps vasculaire puis plaquettaire ; plus précisément, après la brèche vasculaire, les plaquettes mettent en jeu une réponse plurifonctionnelle complexe, comportant les phases d'adhésion, d'activation puis d'agrégation plaquettaire.

Le temps vasculaire

La lésion endothéliale et la vasoconstriction réflexe

A l'état quiescent, l'endothélium correspond à une surface non thrombogène jouant un rôle de barrière dynamique entre les signaux du compartiment sanguin et le sous-endothélium pro-thrombogène. Il exerce une pression négative sur les plaquettes afin de les maintenir à l'état de repos notamment en i) présentant lui aussi une surface cellulaire chargée négativement grâce aux glycosaminoglycanes (GAG), dont les héparans sulfates, qui s'opposeraient aux charges négatives du glycocalyx des plaquettes et pourraient augmenter l'activité de l'antithrombine, ii) synthétisant de puissants inhibiteurs de l'activation plaquettaire, tels que la prostacycline (PGI₂) et le monoxyde d'azote (NO) qui agissent de façon autocrine/paracrine, iii) exprimant à sa surface lumenale une ecto-ADPase (CD39) responsable de la dégradation de l'ADP un agent potentialisateur de l'activation plaquettaire, iv) portant à sa surface des molécules inhibitrices de la coagulation telles que l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), la thrombomoduline (TM) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA).

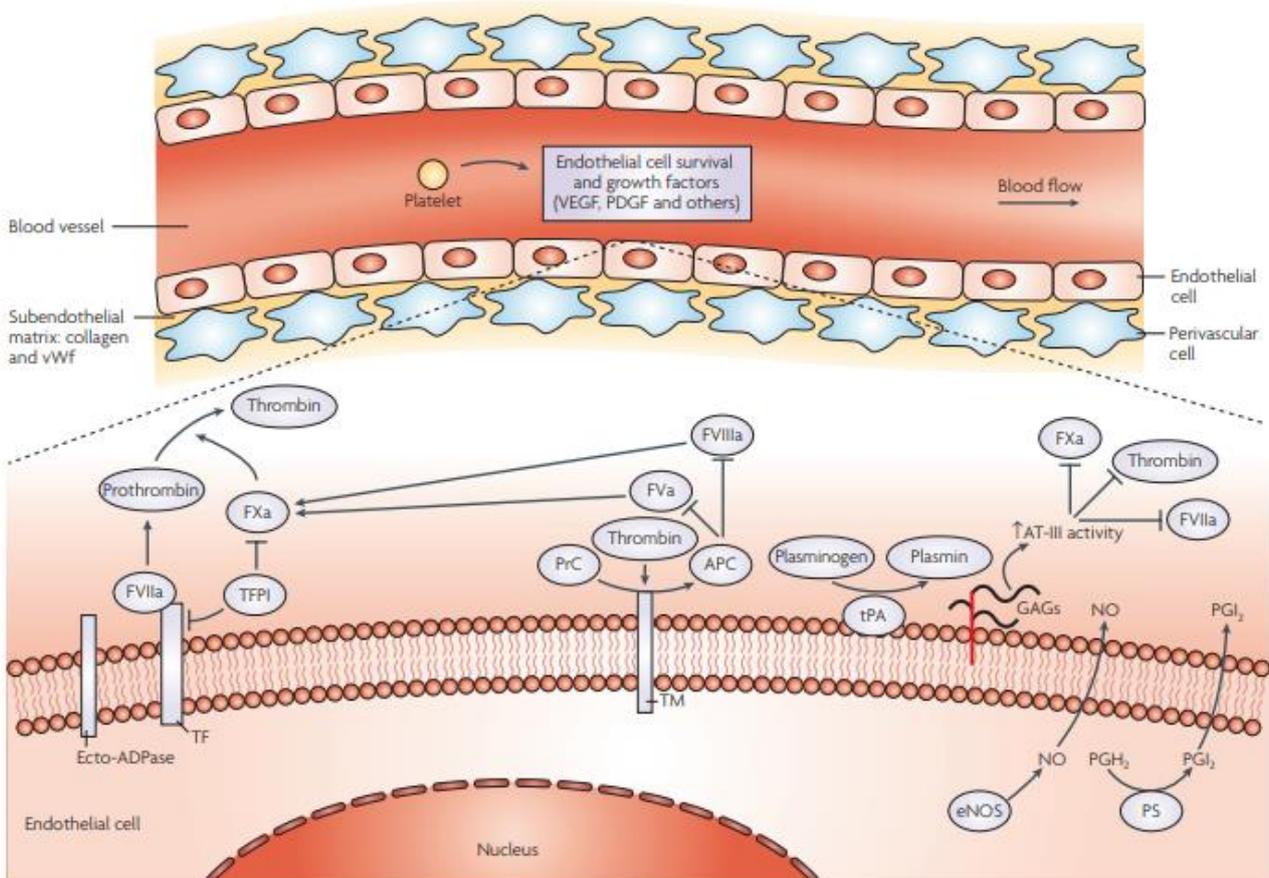


Figure 9 : Interaction plaquettes/cellules endothéliales et activité anticoagulante de l'endothélium quiescent. Des mécanismes d'ajustement entre facteurs d'activation endogène et facteurs inhibiteurs empêchent l'adhésion plaquettaire spontanée à la paroi endothéliale, et leur activation ultérieure [32].

Lorsque cette homéostasie locale se trouve perturbée, par une lésion vasculaire mettant le sous-endothélium à nu ou un dysfonctionnement des cellules endothéliales, l'endothélium lésé et les plaquettes adjacentes sécrètent alors un autre type de molécules bioactives. Ainsi, des agents agrégants tels que le Thromboxane A2 (TxA2) et le Platelet Activating Factor (PAF), des molécules vasoconstrictrices telles que l'angiotensine II et la sérotonine, ainsi que des inhibiteurs de la fibrinolyse (PAI-1) sont localement libérés.

La vasoconstriction réflexe, immédiate et transitoire, est la première réaction de l'endothélium lésé. Elle est localisée et doit permettre de stopper l'hémorragie, au mieux de réduire le flux sanguin et modifier les conditions hémodynamiques afin de favoriser l'hémostase primaire et la coagulation.

Le temps plaquettaire

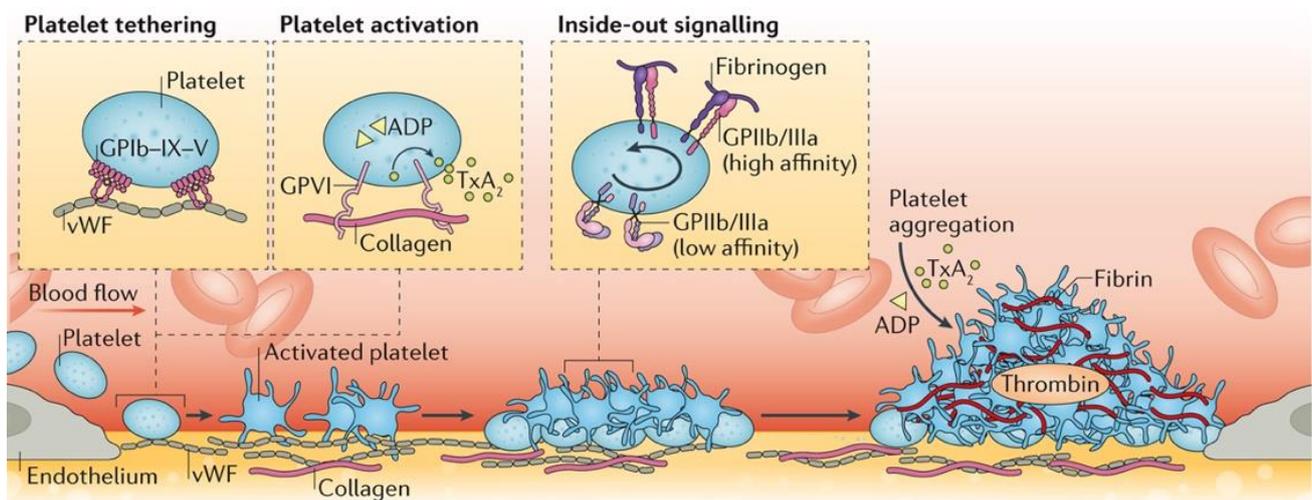


Figure 10 : Résumé des différentes étapes de la formation du clou plaquettaire lors d'une brèche vasculaire [33].

L'adhésion plaquettaire

Dès l'effraction vasculaire, les plaquettes sont recrutées par les structures sous-endothéliales mises à nu. L'adhésion peut être considérée comme biphasique ; elle met en jeu les complexes glycoprotéiques GPIb-V-IX et GPVI plaquettaires qui permettent la constitution d'une couche monocellulaire de plaquettes au sous-endothélium. La première phase voit les plaquettes ralentir sur la matrice extracellulaire du fait de l'interaction du complexe plaquettaire GPIb-V-IX avec le facteur von Willebrand (FvW) lié aux fibres de collagène sous-endothéliales. Les plaquettes vont alors rouler sur le sous-endothélium, contribuant à leur activation [34] [35]. Ainsi ralenties, l'interaction entre les fibres de collagène et la GPVI plaquettaire peut avoir lieu afin d'activer les plaquettes, entraînant un changement conformationnel des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ qui vont alors permettre l'adhésion ferme au sous-endothélium puis le recrutement d'autres plaquettes.

L'activation plaquettaire

Du fait de la stimulation des récepteurs plaquettaires par le sous-endothélium, lors de cette première séquence d'événements, et de leurs liens avec le cytosquelette plaquettaire, le changement de forme initié se poursuit par l'émission de filopodes et la sécrétion des granules plaquettaires débute. Plusieurs voies de signalisation plaquettaire sont mises en jeu à partir des agonistes solubles sécrétés, notamment l'ADP, contenu dans les granules denses, et le TxA₂, généré à partir de l'acide arachidonique (AA) endogène. Ces voies d'activation autocrines et paracrines contribuent au recrutement et à l'activation de plaquettes adjacentes. Par ailleurs, la génération locale de thrombine, puissant activateur plaquettaire, peut être initiée *via* la cascade de coagulation et participe au phénomène d'activation plaquettaire.

L'ensemble des voies de signalisation mise en jeu lors de la stimulation plaquettaire et conduisant à l'activation des intégrines est regroupé sous le terme de signalisation « inside-out ». Lorsque les intégrines activées sont engagées par interaction avec leurs ligands, elles activent des voies de signalisation regroupées sous le terme de signalisation « outside-in ».

L'agrégation plaquettaire

Enfin, l'agrégation plaquettaire correspond à la constitution de ponts interplaquettaires, résultat de la fixation du fibrinogène, plasmatique ou sécrété, à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activée. Chaque molécule de fibrinogène possède 2 sites de liaison à l'intégrine, ce qui lui permet de lier 2 glycoprotéines plaquettaires adjacentes. D'autres molécules adhésives, dont la thrombospondine, sécrétées par les plaquettes peuvent également servir de ponts entre plaquettes et sous-endothélium. L'ensemble de ces événements contribue à la formation du « thrombus blanc » qui obture la brèche vasculaire.

Lors de l'activation plaquettaire, l'exposition des phospholipides anioniques (PS) et l'émission de microparticules riches en PS rend le thrombus plaquettaire procoagulant. Celui-ci fixe les facteurs Va et Xa, génère de la thrombine par protéolyse successive, ce qui aboutit à la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Le clou plaquettaire est alors consolidé par le filet de fibrine dont l'ensemble est stabilisé par le phénomène de rétraction du caillot médié par le système moteur acto-myosine plaquettaire afin que le thrombus résiste au flux de la circulation et donc à la reprise du saignement.

Il est intéressant de noter qu'il existe une architecture locale particulière du thrombus où toutes les plaquettes qui le composent ne sont pas activées avec la même intensité et où la fibrine est spécifiquement localisée. Ainsi, un noyau de plaquettes hautement activées est regroupé au centre, fortement condensées, dégranulées, puis recouvertes d'une enveloppe de plaquettes plus faiblement activées. Il existe un gradient d'agonistes solubles et un microenvironnement physique différent entre le centre et la périphérie du thrombus ; cette particularité confère des propriétés particulières au thrombus, qui peut ainsi moduler sa stabilité, sa contractilité et sa rétraction [36].

Les différents acteurs

Acteurs plasmatiques

Le facteur von Willebrand (FvW)

Il est, avec le fibrinogène, une des protéines adhésives essentielles impliquées dans l'hémostase primaire, notamment en intervenant dans les processus d'adhésion et d'agrégation plaquettaire. Il participe également à la coagulation de par sa propriété de protéine de transport du facteur anti-hémophilique A (FVIII).

Le FvW est une glycoprotéine de haut poids moléculaire synthétisée par les cellules endothéliales (70%) et les mégacaryocytes (30%), puis stockée dans des granules de sécrétions appelés i) corps de Weibel-Palade, dans les cellules endothéliales ou ii) granules α , dans les mégacaryocytes et plaquettes [37]. Cette glycoprotéine est en réalité un polymère hétérogène de multimères de poids moléculaire variant de 500 à 20000 kDa selon leur degré de polymérisation ; les sous-unités polypeptidiques élémentaires étant reliées entre elles par des ponts disulfures [38] [39]. Le FvW circule sous forme globulaire, empêchant toute liaison avec le complexe GPIb plaquettaire.

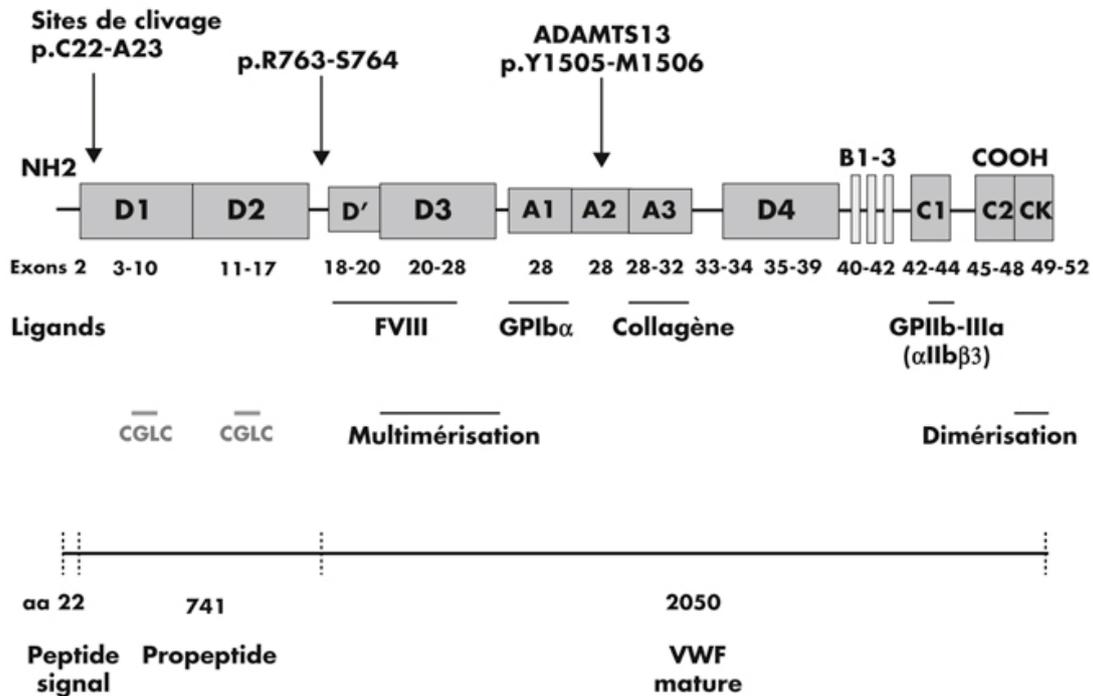


Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation structurale du FvW [40]. Une fois débarrassé de son peptide signal (SP, 22 aa) et de son propeptide (D1 et D2, 741 aa), suite à sa maturation post-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, la forme mature du FvW s'étend des domaines D' en N-Terminal à CK en C-Terminal et s'organise en 5 régions :

- les domaines D'-D3, liant le FVIII
- le domaine A1, sous forme une boucle, assurant la liaison à la GPIb
- le domaine A2, également sous forme de boucle, constituant le site de protéolyse par la métalloprotéase ADAMTS13
- le domaine A3, encore sous forme de boucle, liant le collagène
- les domaines D4-C1à6-CK, liant de nombreuses molécules dont l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$

Une fois compacté dans ses granules de stockage, le FvW suit alors des modes de sécrétion i) constitutif, en continuité de sa synthèse, notamment à partir des corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, ou ii) régulé, sécrété sous l'action d'agonistes spécifiques, notamment à partir des granules α des plaquettes activées. Le mode de sécrétion constitutif à partir des cellules endothéliales assure la principale source du FvW circulant. Les différentes étapes conduisant à la sécrétion du FvW met en jeu les membres des familles Rab et SNARE [41]. Récemment, un autre mode de sécrétion régulée du FvW impliquant l'autophagie ou se déroulant à proximité d'autophagosomes a été décrit mais nécessite des études complémentaires [42] [43].

De plus, l'ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin Type 1 repeat), synthétisée et libérée par les cellules stellaires hépatiques et endothéliales, coupe le FvW dès sa sécrétion par les cellules endothéliales, ce qui entraîne la libération de multimères de haut poids moléculaire de la surface des cellules endothéliales. Ces derniers subissent également une protéolyse entre les résidus Tyrosine 1605 et Méthionine 1606 du domaine A2 par ADAMTS13 ; le but étant d'éviter qu'ils ne s'accumulent dans la circulation, n'interagissent avec les plaquettes ou ne déclenchent des agrégats plaquettaires spontanés [44]. Ces clivages sont différemment régulés ; ainsi, l'efficacité du clivage par ADAMTS13 est positivement régulée par l'interaction du FvW avec la GPIb α au contraire de la thrombospondine (TSP1). En effet, la GPIb α en interagissant avec le domaine A1 du FvW pourrait modifier l'accessibilité de la boucle A2 à l'ADAMTS13 et favoriser le clivage du FvW une fois la brèche vasculaire comblée. Quant à la TSP1, une fois sécrétée après l'activation plaquettaire déclenchée par l'adhésion des plaquettes, elle peut interagir avec le domaine A3 du FvW et gêner l'interaction entre ADAMTS13 et les multimères de haut poids moléculaire, ce qui a pour conséquence de favoriser le recrutement de plaquettes et la formation du thrombus.

Concernant la clairance du FvW plasmatique, elle met essentiellement en jeu les macrophages hépatiques et spléniques, sans pour autant exclure la contribution d'autres types cellulaires. Les bases moléculaires de l'endocytose du FvW par les macrophages restent encore méconnues et pour l'heure, seul le récepteur scavenger LRP1 (Lipoprotein Receptor Related Protein 1) serait le mieux décrit [45].

Les déficits en FvW ont attiré l'attention, notamment en raison de l'association potentielle avec la pathogenèse de la maladie de Willebrand, mais aussi parce que le FvW est un facteur déterminant de la demi-vie du facteur de coagulation anti-hémophilique A (FVIII). Ainsi, 3 groupes de maladies sont décrites : le type 1, forme la plus courante et le type 3, forme la plus rare, sont dus à un déficit quantitatif du FvW, partiel et total, respectivement. Le type 2 concerne des déficits qualitatifs mettant en jeu une altération de la structure du FvW et sa capacité d'interaction avec les plaquettes ou le FVIII [46].

Le fibrinogène

Il s'agit d'une glycoprotéine de 340 kDa composée de 3 chaînes polypeptidiques, identiques 2 à 2, nommées A α , B β et γ , et codées par 3 gènes distincts portés par le chromosome 4. Les polypeptides sont synthétisés, glycosylés et assemblés par l'hépatocyte avant d'être sécrétés dans la circulation où le fibrinogène est retrouvé à une concentration allant de 1,5 à 4 g/L. Les $\frac{3}{4}$ du fibrinogène sont présents dans le plasma, mais aussi dans les plaquettes, plus précisément dans les granules α , où il

serait stocké après endocytose depuis le plasma. La demi-vie normale de cette glycoprotéine est de 3 à 5 jours et, en dépit de nombreuses études, son catabolisme reste encore largement méconnu. La coagulation et la fibrinolyse ne représenteraient que 2 à 3% de la consommation de fibrinogène.

Le fibrinogène est une macromolécule soluble mais qui peut se retrouver sous forme de caillot insoluble suite à sa conversion en fibrine, sous l'action d'une sérine protéase : la thrombine, activée par une cascade de réactions enzymatiques initiée notamment par une lésion vasculaire. Les caillots de fibrine sont ensuite dissous par le système fibrinolytique, qui se comporte comme un système de régulation du thrombus. Il existe d'ailleurs un équilibre très fin entre ces composantes, coagulation et fibrinolyse.

En plus de son rôle dans la formation du caillot de fibrine, le fibrinogène participe à l'étape antérieure : l'hémostase primaire, en intervenant dans l'agrégation plaquettaire. En effet, les molécules de fibrinogène bivalent forment des ponts entre les plaquettes activées en liant l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [47]. Enfin, le fibrinogène participe également à d'autres fonctions biologiques telles que l'inflammation, la cicatrisation ou l'angiogenèse [48].

Deux types de pathologies héréditaires rares du fibrinogène sont reconnus : le type I, qui inclut les déficits quantitatifs dont l'afibrinogénémie (absence de fibrinogène ou taux plasmatique $< 0,1$ g/L) et l'hypofibrinogénémie (0,1 à 1,5 g/L), et le type II qui affecte la qualité du fibrinogène circulant (taux normaux de fibrinogène 1,5-3,5 g/L). Les patients présentant un déficit quantitatif ont un phénotype hémorragique plus sévère dans le cas de l'afibrinogénémie que de l'hypofibrinogénémie ; dans les cas de dysfibrinogénémie, les phénotypes sont extrêmement variables [49].

La fibronectine & la thrombospondine

La fibronectine est constituée de 2 sous-unités, α et β , de 230 kDa chacune, réunies par un pont disulfure à leur extrémité C-Terminale et issues du même gène par épissage alternatif. Chaque sous-unité est une combinaison de 3 types de domaine se répétant plusieurs fois ; il existe plus d'une vingtaine de variants d'épissage chez l'Homme. Ces différents domaines s'aménagent en sites d'interaction spécifiques avec, d'une part des constituants moléculaires de la matrice extracellulaire (collagènes) ou du caillot (fibrine), et d'autre part des cellules (endothéliales, fibroblastes, plaquettes). Tous les variants de fibronectine possèdent un motif conservé de 3 acides aminés, Arginine-Glycine-Aspartate (RGD), qui est un site de liaison commun pour plusieurs intégrines dont $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. La fibronectine sécrétée dans le plasma est produite par le foie et circule à des concentrations relativement élevées ; la fibronectine cellulaire quant à elle, reste sous forme de

dépôts intracellulaires. Depuis longtemps, la fibronectine est suspectée de jouer un rôle dans l'hémostase primaire, cependant, il n'en existe aucune preuve *in vivo* [50].

La thrombospondine est en réalité une famille de 5 membres distincts subdivisés en 2 sous-groupes ; TSP1 et 2 composent le sous-groupe A alors que TSP3 4 et 5 appartiennent au sous-groupe B [51]. TSP1 une glycoprotéine de la matrice extracellulaire de haut poids moléculaire, stockée dans les granules α et libérée par les plaquettes sous l'effet de la thrombine. Son récepteur membranaire CD36 est également très exprimé à la surface des plaquettes.

Acteurs cellulaires

Les parois vasculaires de l'organisme sont construites sur un schéma identique comportant 3 couches, de la lumière vasculaire vers l'extérieur : i) l'intima, fine couche monocellulaire de cellules endothéliales séparées de la substance sous endothéliale par la membrane basale ii) la media, plus ou moins développée et portant les fibres musculaires et les fibroblastes, et iii) l'adventice, contenant les vasa vasorum et les ramifications nerveuses.

Les cellules endothéliales

L'endothélium est une barrière hémocompatible, correspondant à une confortable surface ininterrompue entre le sang et les substances procoagulantes du sous-endothélium, capable d'échanges sélectifs mais également de synthèse et de sécrétion de molécules biologiquement actives. La cellule endothéliale est le siège d'une importante activité biologique de synthèse et de sécrétion de substances qui vont avoir un comportement soit anti-, soit prothrombogène.

Ainsi, la thromborésistance de l'endothélium est assurée par la production et la régulation de facteurs interférant avec i) les plaquettes (PGI₂, NO, ecto-ADPase par exemple), ii) la coagulation (thrombomoduline, GAGs, α 2-macroglobuline par exemple) et iii) la fibrinolyse (tPA, uPA, thrombospondine). Au contraire, sous l'effet, de molécules impliquées dans les processus de coagulation ou inflammatoires, les propriétés thrombogènes de l'endothélium sont révélées.

De plus, les cellules endothéliales synthétisent certains des composants sous-endothéliaux de la matrice extracellulaire (MEC) éminemment thrombogènes, tels que les collagènes de la membrane basale (type IV), de la matrice sous-endothéliale (types I, III, V, VI) ou interstitiels (types I, III, V, VI), des glycoprotéines de structure dont la laminine, des protéoglycans, de la fibronectine, de la thrombospondine, du FvW, et du facteur tissulaire.

Le sous-endothélium

Il correspond à la zone sous-intimale thrombogène des vaisseaux sur laquelle s'amarrent les cellules endothéliales ; il permet l'adhésion préférentielle des plaquettes et l'activation de la coagulation. Sa composition, déjà évoquée ci-dessus, correspond à un mélange de macromolécules issu de l'activité métabolique des cellules endothéliales sus-jacentes : collagènes, laminines, thrombospondine, fibronectine, FvW, etc...

Les plaquettes

Elles font l'objet des 2 chapitres précédents ; fragments anucléés de mégacaryocytes médullaires, elles sont libérées dans le sang où elles se comportent comme des cargos, prêtes à répondre à de très nombreux stimuli.

Une fois les séquences d'événements et les acteurs conduisant à une hémostase primaire efficiente connus, nous allons nous intéresser aux voies de signalisation mises en jeu au sein des plaquettes. Certaines seront davantage détaillées que d'autres, le but n'étant pas d'en établir un catalogue exhaustif, mais de savoir localiser le niveau cellulaire ou moléculaire impliqué ou la voie de signalisation responsable de tel ou tel trouble de l'hémostase primaire (adhésion, agrégation, amplification/sécrétion, ou stabilisation).

Les différents couples d'acteurs du temps plaquettaire

La distinction de séquences différentielles lors de l'hémostase primaire a permis de définir 2 types de ligands : des molécules d'adhésion et des ligands solubles.

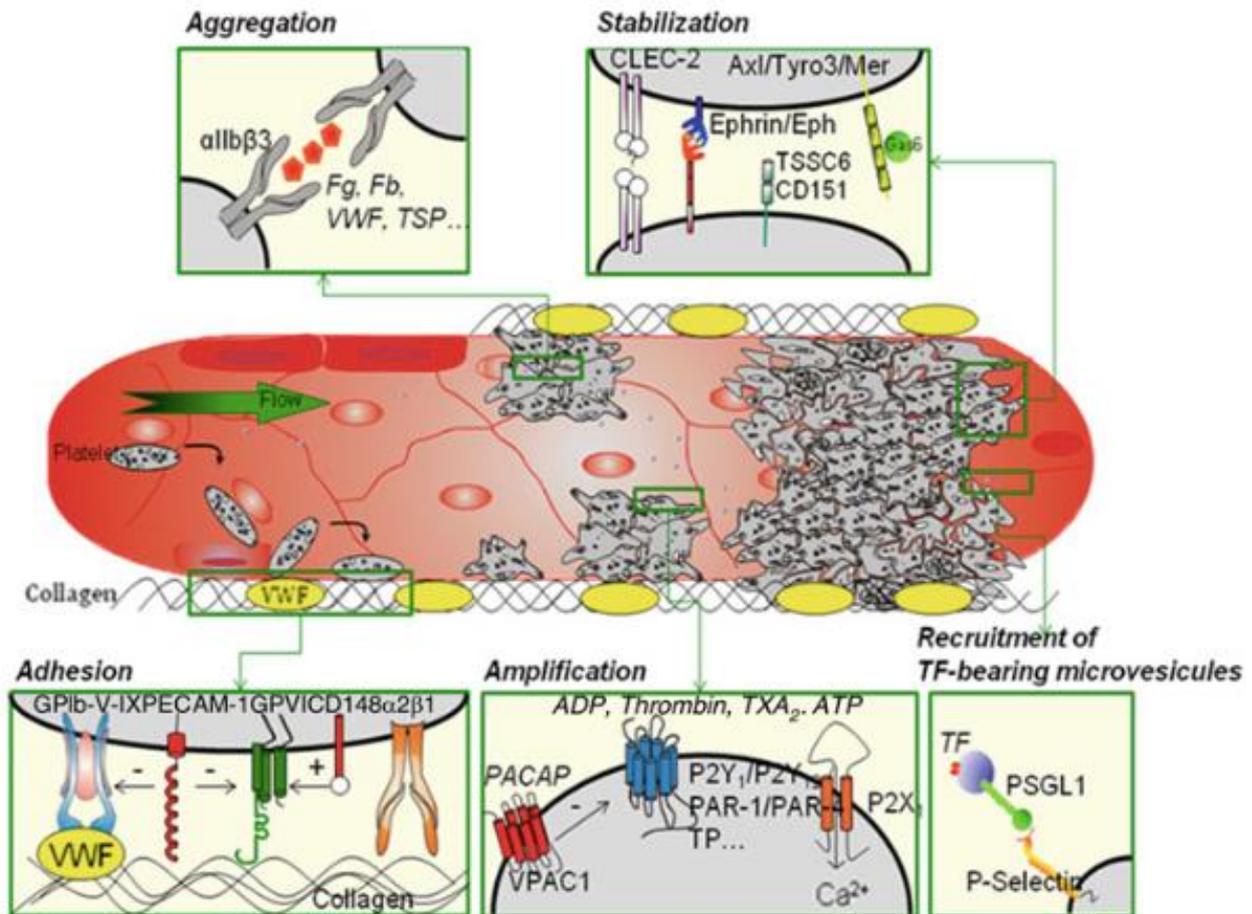


Figure 12 : Aperçu des récepteurs plaquettaires impliqués dans l'activation des plaquettes [52].

La lésion vasculaire induit l'exposition de la MEC sous-endothéliale, conduit à la décélération des plaquettes circulantes, permettant un contact plus prolongé des récepteurs plaquettaires avec certains composants de la MEC, à l'origine de l'activation des plaquettes.

L'adhésion des plaquettes à la lésion vasculaire constitue la première étape de la formation du thrombus, et implique les interactions entre le FvW et GPIb-IX-V et entre le collagène et GPVI et/ou l'intégrine $\alpha 2\beta 1$.

L'activation plaquettaire est associée à des modifications i) de la forme des plaquettes, ii) de la sécrétion de granules, iii) de la synthèse de TxA_2 et iv) des événements de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation de l'intégrine $\alpha 2\beta 3$. Le changement de sa conformation lui permet alors de se lier à des ligands tels que le fibrinogène et le FvW, favorisant les interactions plaquettes-plaquettes (agrégation) et la formation du thrombus.

	Ligands	Récepteurs	Voies de signalisation
Protéines d'adhésion	FvW	GPIb-IX-V	Lyn-Rac1-PI3K-Akt NO PLCγ2 Fcy
	Collagène	GPVI α2β1	ITAM-Fyn/Lyn-Syk-LAT/PI3K-Akt/ PLCγ2
	Fibrinogène	GPIIbIIIa	Outside-in
Protéines solubles	Thrombine	PAR1 PAR4	G _q -PLCβ G _{12/13} -Rho-GEF G _i -AMPC & PI3K
	ADP	P2Y1 P2Y12	G _q -PLCβ-Ca ²⁺ /ERK G _i - AMPC & PI3K
	TxA2	TP1/TPα TP2/TPβ	G _q G _{12/13}

Table I : Principaux couples ligands # récepteurs mettant en jeu des protéines adhésives ou des protéines solubles, ainsi que les voies de signalisation principales.

Mettant en jeu des protéines adhésives

Exemple du couple FvW # complexe GP1b-IX-V

Le récepteur GPIb-IX-V est quasiment exclusivement restreint à la membrane plaquettaire ; celle-ci en porte environ 25000 copies. Ce récepteur plaquettaire est en réalité un complexe composé de 4 protéines membranaires distinctes : GP1bα (CD42b, 135kDa), GP1bβ (CD42c, 26 kDa), GPIX (CD42a, 20 kDa) et GPV (CD42d, 82 kDa) dans les proportions 2 :2 :2 :1 (cf. Figure 13).

Ces protéines sont codées par des gènes distincts portés par les chromosomes 17 pour *GP1BA*, 22 pour *GP1BB* et 3 pour *GP5* et *GP9* ; elles appartiennent à la famille des Leucine-Rich Repeat (LRR family). Chaque sous-unité est composée i) d'un domaine transmembranaire hélicoïdal, ii) d'une queue intracellulaire courte et iii) d'un long domaine N-Terminal extracellulaire, portant les domaines riches en Leucine. La GP1bα n'est pas reliée de façon covalente aux GPIX et GPV, en revanche, elle est associée aux GP1bβ par des ponts disulfures, le tout formant des trimères GP1bα-GP1bβ-GPIX centrés sur une GPV. Chacune est nécessaire à l'expression du complexe GPIb-IX-V à la membrane plasmique [53].

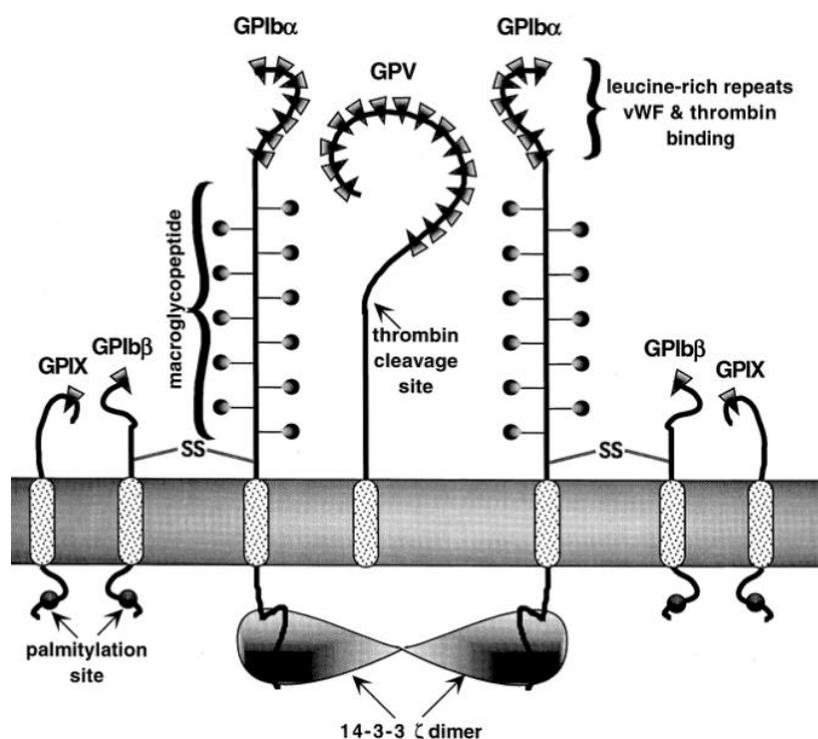


Figure 13 : Parties extracellulaires du complexe GPIb-IX-V. La GPIb α interagit avec son ligand préférentiel, le FvW, mais également avec d'autres ligands tels que la thrombospondine, des facteurs de la coagulation (FXI, FXII), la thrombine, le kininogène de haut poids moléculaire ou la P-sélectine [54].

Au niveau intraplaquettaire, la queue cytoplasmique de GPIb α interagit avec la filamine A, des PI3Ks et la protéine adaptatrice 14-3-3 [55]. De même, les domaines intracellulaires des GPIb β et GPV peuvent se lier à la calmoduline et l'adaptateur 14-3-3 [56], alors que celui de GPIX ne semble s'associer à aucune protéine.

Lors de la fixation du FvW au complexe GPIb-IX-V, plusieurs signaux intracellulaires sont déclenchés, et concourent à l'adhésion stable des plaquettes *via* l'activation de l'intégrine α IIb β 3 et la sécrétion d'ADP (cf. Figure 14). La voie Lyn/Rac1/PI3K/Akt fait intervenir les tyrosines kinases Src et Lyn ; elles s'associent, à partir de la queue cytoplasmique de GPIb α , aux protéines adaptatrices 14-3-3 qui recrutent la PI3K [57]. Autre voie de signalisation pouvant être impliquée en aval du complexe GPIb-IX-V, la voie du NO ; l'activation PI3K/Akt pourrait induire la synthèse de NO [58] et conduire à l'activation des MAPKs [59] et à la production de TxA₂. Cette voie NO-sGC (soluble guanylate cyclase)-GMPc a été décrite dans l'adhésion des plaquettes sur matrice de FvW, confirmant ainsi l'importance de cette voie dans l'activation d' α IIb β 3 [60].

Indépendamment des PI3Ks, la liaison du FvW au complexe GPIb-IX-V est capable d'activer directement la PLC γ 2 assurant une première libération de Ca²⁺ [61] et activant la PKC. Ca²⁺ et PKC sont des acteurs majeurs de la fonction plaquettaire, nécessaires au ralentissement et à l'adhésion des plaquettes ainsi qu'à la première activation de l'intégrine α IIb β 3. En effet, la PLC γ 2 induit l'activation de CalDAG-GEF1, facteur d'échange de Rap1, un élément clé de l'activation α IIb β 3 *via* notamment le recrutement de la taline.

L'activation de GPIb-IX-V peut conduire à la phosphorylation de résidus tyrosine de motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) présents sur les récepteurs Fc γ RIIA ainsi que sur Fc γ R associée à GPVI [62], qui participerait à l'amplification de la sécrétion des plaquettes.

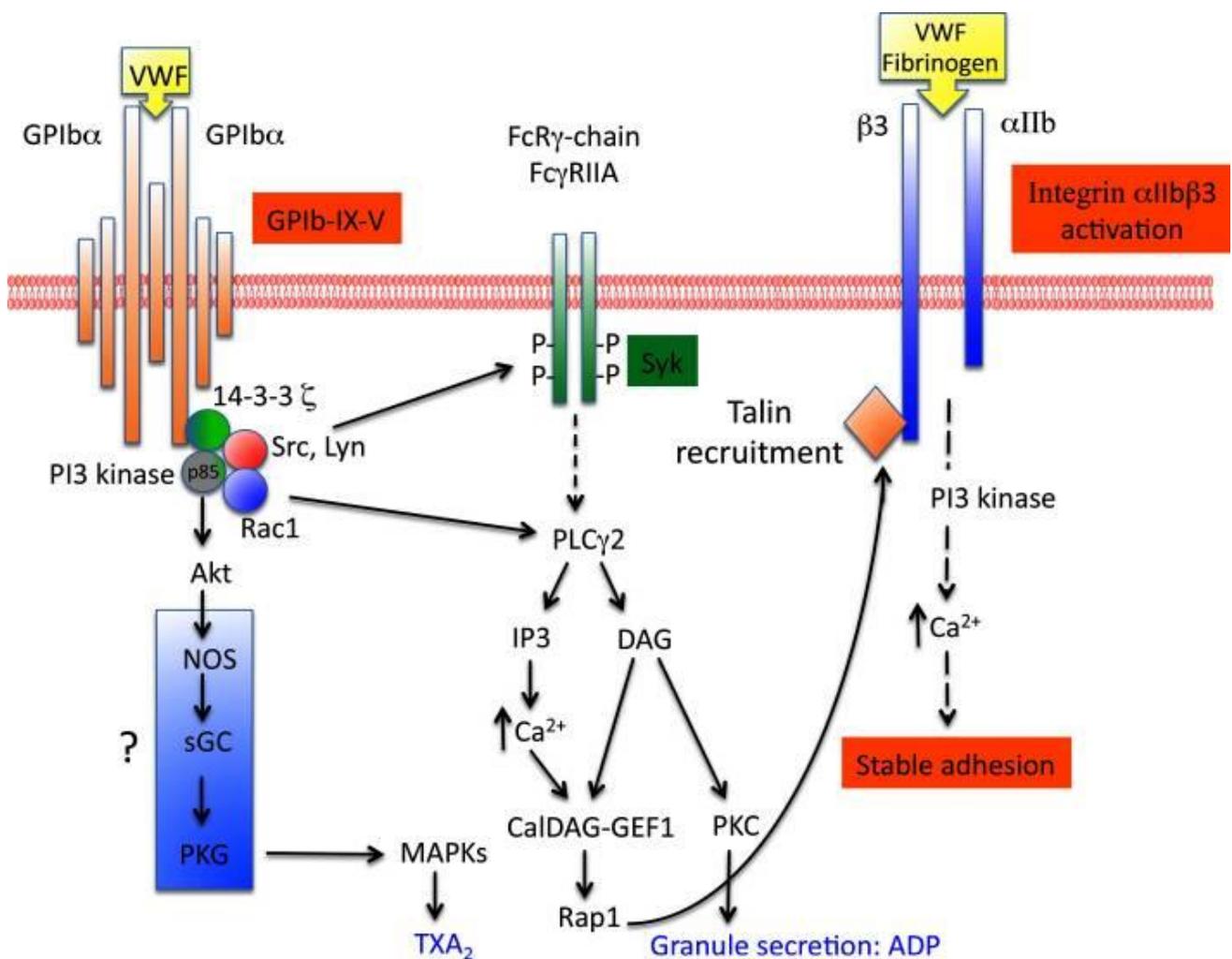


Figure 14 : Signalisation plaquettaire induite par le complexe GPIb-IX-V et conduisant à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 [54].
sGC : guanylate cyclase soluble.

Enfin, GP1b α présente une particularité : elle peut être clivée par la métalloprotéase ADAM17 et libérer un fragment soluble dans le plasma, la glycojalicine [63]. Ce phénomène permettrait de limiter la réactivité plaquettaire en réduisant la densité du complexe GPIb-IX-V à la membrane plaquettaire [64].

Exemple du couple collagènes # récepteurs GPVI

Le ralentissement des plaquettes, par leur interaction avec le FvW et le sous-endothélium lésé, permet d'engager secondairement les récepteurs GPVI au collagène, et donc de renforcer l'activation et l'adhésion des plaquettes.

Comme évoqué précédemment, le collagène est un composant important du sous-endothélium puisqu'il représente environ 20 à 40 % des protéines de la MEC vasculaire. Il en existe de plusieurs types, certains plus thrombogènes que d'autres, c'est le cas pour les types I et III, ils permettent tous au FvW de se dérouler sur l'endothélium lésé.

GPVI est un récepteur transmembranaire d'environ 60 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig), exclusif de la lignée mégacaryocytaire. GPVI est présente à la membrane plaquettaire à une densité variant de 1000 à 5000 copies/plaquette [65]. Sa structure est caractérisée par i) 2 domaines extracellulaires de type Ig liant le collagène fibrillaire grâce à des motifs de reconnaissance spécifiques GPO (Glycine-Proline-Pyrrolysine) [66], ii) un domaine transmembranaire contenant une Arginine positivement chargée qui assurent une liaison non covalente avec la chaîne γ du récepteur FcR γ (homodimère de 2 chaînes à motifs ITAM) et iii) un domaine intracytoplasmique comportant des zones riches en Proline, qui permettent le recrutement des Tyrosine kinases de la famille Src (Fyn et Lyn) par leurs domaines SH3 [67].

Lors de la liaison du collagène, le regroupement des complexes GPVI-FcR γ en « clusters », entraîne le démasquage des motifs ITAM des FcR γ puis leur phosphorylation sur les résidus Tyrosine par les kinases Fyn et Lyn de la famille des Src kinases. Cette étape conduit i) au recrutement et à l'autophosphorylation de la tyrosine kinase Syk (Spleen tyrosine kinase), puis ii) à la formation d'un macrocomplexe de signalisation comprenant notamment les protéines adaptatrices LAT (Linker for Activation of T cells), SLP76 (Src Homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa), Gads (Grb2 adaptator downstream of Shc), enfin iii) à l'activation des PI3Ks, α puis β , et de la PLC γ 2. L'activation de cette dernière requiert 2 événements complémentaires : l'interaction avec LAT *via* son domaine SH2 [68] et la stabilisation à la membrane *via* la liaison de son domaine PH au PI(3,4,5)P3, produits de la voie des PI3Ks [69]. Ainsi activée, la PLC γ 2 hydrolyse son substrat et

génère du DAG et de l'IP3, seconds messagers indispensables à l'activation des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, à l'agrégation plaquettaire et à la sécrétion des granules [70].

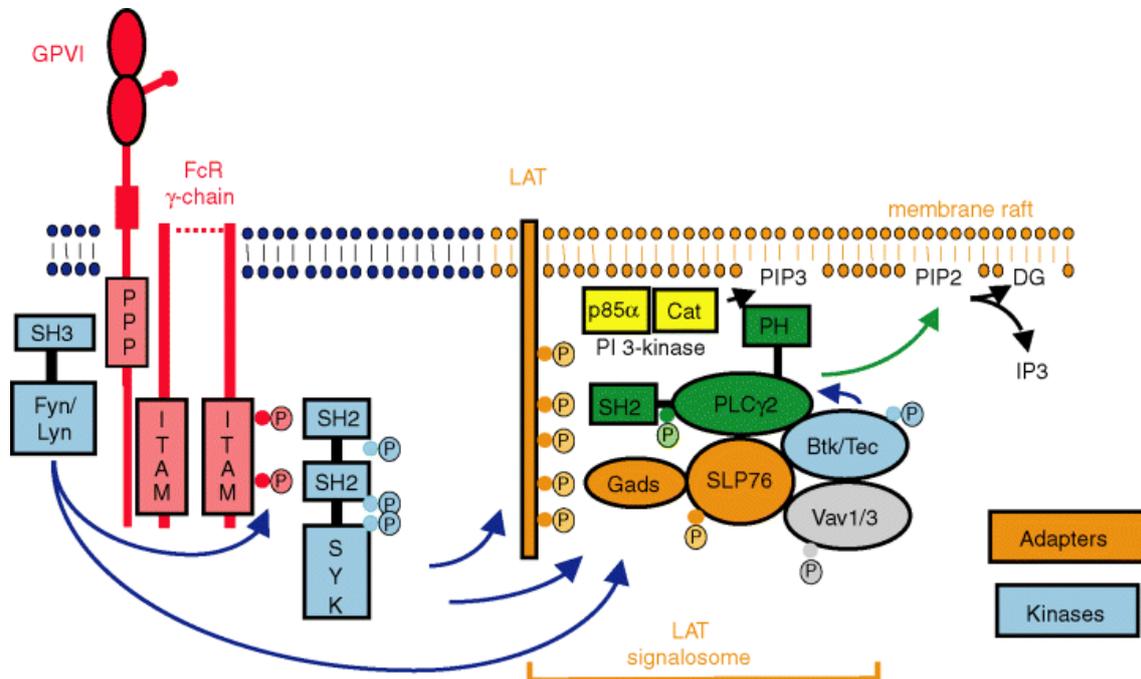


Figure 15 : Voies de signalisation dépendantes de la GPVI [71][72]. ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif. PLC γ 2 : phospholipase $\text{C}\gamma$ 2.

De la même façon que pour le complexe GPIb-IX-V, GPVI est le siège d'un clivage protéolytique, dans son domaine extracellulaire, par ADAM10 et 17 [73]

Exemple du couple fibrinogène # intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, ou GPIIb/IIIa, est le récepteur de divers ligands, tels que la fibronectine, le FvW, la vitronectine, toutefois, son principal ligand demeure le fibrinogène. Elle joue un rôle fondamental dans les différentes étapes conduisant à la formation du thrombus, telles que l'étalement, l'agrégation, et la rétraction du clou fibrinoplaquettaire.

Exclusivement exprimée dans les mégacaryocytes et les plaquettes, à hauteur de 50 000 à 80 000 copies/ plaquette selon l'état d'activation plaquettaire [74]. Elle est composée de 2 sous-unités, αIIb et β3 , reliées de façon non covalente, chacune présentant un large domaine extracellulaire où se fixent les différents ligands évoqués, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique couplée à différents effecteurs intraplaquettaires de signalisation et/ou

d'organisation du cytosquelette. Plus précisément, la sous-unité α IIb est composée d'une chaîne lourde 117 kDa et d'une chaîne légère de 23 kDa reliées entre elles par un pont disulfure, et la sous-unité β 3 correspond à une chaîne polypeptidique unique de 95 kDa constituée de nombreux ponts disulfures intramoléculaires avec un domaine cytoplasmique indispensable à l'activation de l'intégrine.

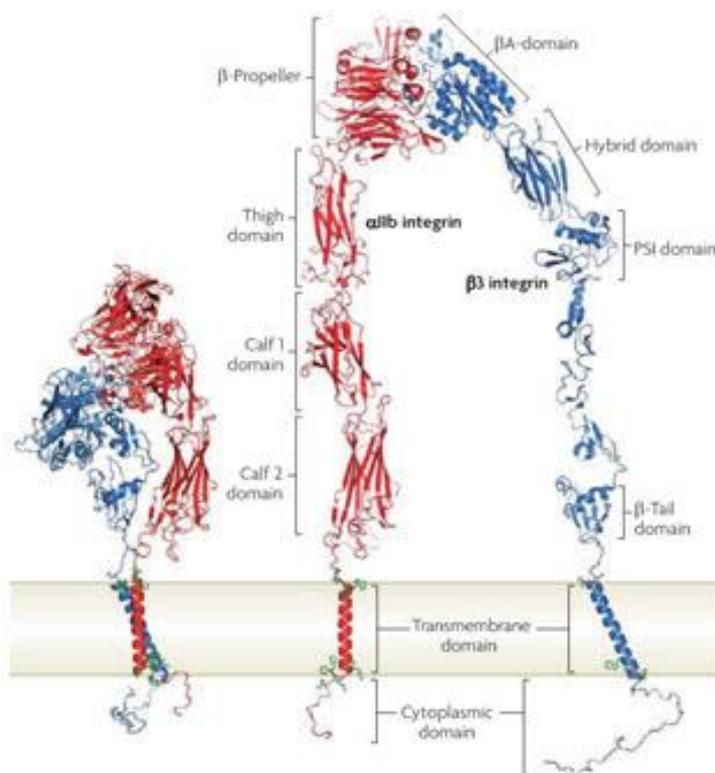


Figure 16 : Structure de l'intégrine α IIb β 3 et changement conformationnel suite à son activation (Academic OneFile Document).

Au repos, l'intégrine α IIb β 3 se trouve dans une conformation de faible affinité, incapable de se lier à ses ligands (cf. Figure 16). L'activation des plaquettes par des molécules d'adhésion (collagène, FvW) et des agonistes solubles (ADP, TxA2, thrombine) génère une signalisation « inside-out » à l'origine du changement conformationnel de l'intégrine. Le recrutement et l'activation séquentielle d'effecteurs intraplaquettaire clés tels que la taline 1, la kindline 3, Rap1b, RIAM (Figure 17) avec la queue cytoplasmique de la sous-unité β 3, permettent de connecter l'intégrine et le cytosquelette d'actine et de l'activer [75].

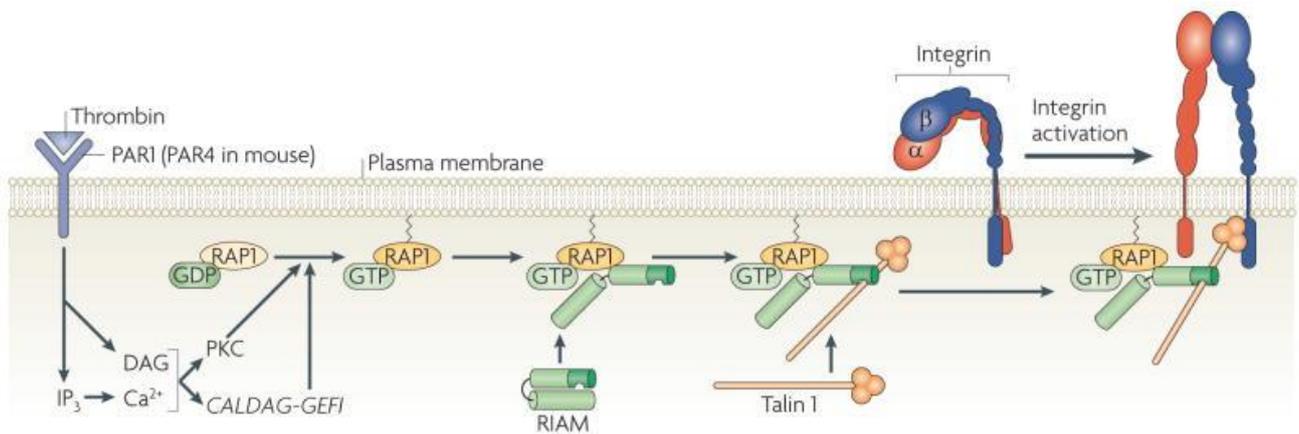


Figure 17 : Activation « inside-out » de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [75].

DAG : diacylglycérol. CALDAG-GEF1 : diacylglycerol-regulated guanine-nucleotide-exchange factor 1. RIAM : Rap1-GTP-interacting adaptor molecule.

La liaison du fibrinogène à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et le regroupement en clusters des intégrines à Figure 17 : Activation « inside-out la membrane plaquettaire va induire la signalisation « outside-in ». De nombreuses protéines de signalisation viennent en effet interagir et s'organiser pour constituer les points d'adhésion focale [76]. La signalisation « outside-in » organisée au pied des intégrines engagées entraîne la réorganisation du cytosquelette plaquettaire et l'activité contractile (étalement des plaquettes, rétraction du clou fibrinoplaquettaire) [75] [77].

Mettant en jeu des protéines solubles

Les agonistes solubles sécrétés par la plaquette (ADP, TxA₂) ou issus de la cascade de la coagulation (thrombine) assurent l'amplification de l'activation plaquettaire, le recrutement de plaquettes circulantes, la croissance et la stabilité du thrombus. Seul un de ces agonistes, jouant un rôle important dans l'amplification de l'activation plaquettaire, sera détaillé : l'ADP.

Exemple du couple ADP # récepteurs P2Y

L'ADP est un nucléotide contenu dans les granules denses à des concentrations de l'ordre du mM ; lors de l'activation plaquettaire, il est sécrété et se fixe sur ses récepteurs purinergiques spécifiques P2Y₁ et P2Y₁₂. L'activation plaquettaire, en réponse à l'ADP, nécessite l'engagement de ces 2 récepteurs. Alors que le récepteur P2Y₁ initie l'activation plaquettaire en réponse à l'ADP, le récepteur P2Y₁₂ amplifie cette activation *via* la sécrétion de granules denses et la génération de TxA₂, permettant une agrégation irréversible et la formation d'un thrombus stable.

Le récepteur P2Y1 est présent à raison d'environ 150 copies/plaquette et joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse à l'ADP. Couplé à la protéine G_q, il induit l'activation de la PLCβ et l'élévation du Ca²⁺ intraplaquettaire à l'origine d'un changement de forme de la plaquette.

Le récepteur P2Y12 a une expression davantage restreinte aux plaquettes [78] qui en possèdent environ 425 exemplaires en moyenne. Il est couplé à une protéine G_i hétérotrimérique à l'origine de l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) (voie G_{iα}-AC-AMPC-PKA-VASP (vasodilatator-stimulated phosphoprotein)) et d'une voie activatrice de la PI3K (voie G_{iβγ}-PI3K-Akt-PKC-Rap1b). Le récepteur P2Y12 joue un rôle clé dans l'activation plaquettaire car il amplifie la stimulation induite par tous les autres agonistes, ce qui en fait une excellente cible pharmacologique dans la prévention des thromboses artérielles.

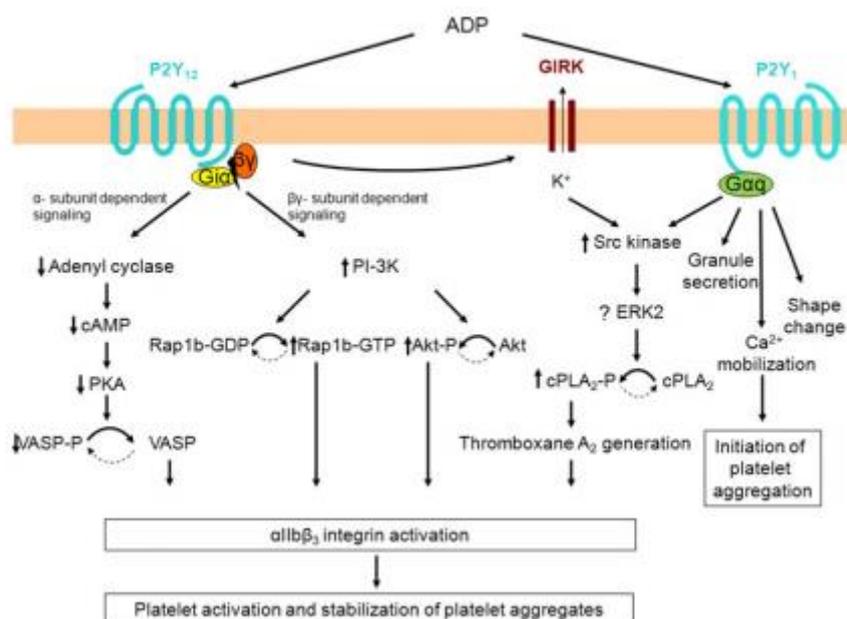


Figure 18 : Récepteurs P2Y plaquettares à l'ADP [79].

Akt dans la fonction plaquettaire

Un peu d'histoire...

En 1977, le groupe de Stephen Staal identifie et clone pour la première fois l'oncogène v-Akt à partir du rétrovirus AKT8 dont le pouvoir leucémogène est initialement décrit chez la souris AKR et sur une lignée de cellules épithéliales pulmonaires (CCL64) [80]. Quatre ans plus tard, 3 laboratoires indépendants caractérisent son homologue cellulaire : une Sérine/Thréonine kinase de 57kDa, que Bellacosa et Tsichlis nomment c-Akt [81]. Par des techniques de biologie moléculaire (PCR dégénérée), le groupe de Hemmings identifie la kinase et la nomme RAC, pour Related to A- and C-kinase [82]. Toujours à l'aide de l'outil moléculaire (screening de banque d'ADNc), Woodgett et Coffey définissent cette protéine kinase et l'appellent PKB, pour Protein Kinase B, du fait de sa forte similarité avec les PKA et PKC [83]. *In fine*, Akt/PKB est une Sérine/Thréonine kinase qui appartient à la superfamille de protéines kinase AGC, pour cAMP-dependent protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C, dont elle possède des analogies de structures, notamment au niveau du domaine catalytique, et des mécanismes d'activation communs.

Le nom « Akt » ne se réfère pas à sa fonction, mais il semble se rapporter à la lignée murine AKR, dans laquelle des lymphomes thymiques se développent spontanément du fait de la présence du

virus AKT8. La lettre « t », venant de « transforming », fait référence au pouvoir transformant de cet oncogène.

Depuis une dizaine d'années maintenant, cette protéine fait l'objet de recherches intensives car son activation intervient en aval de voies de signalisation dépendantes de la PI3K et associées aux phénomènes de transformation cellulaire et de réponse à l'insuline, notamment [84].

Localisations tissulaire, cellulaire et subcellulaire des Akt

Avant tout, il faut souligner qu'aucune des trois isoformes d'Akt n'est spécifique des plaquettes, toutes ont des expressions ubiquitaires [85]. La distribution tissulaire des différentes isoformes d'Akt a pu être précisée grâce à l'utilisation de technique de RT-PCR, tant chez l'Homme que la souris.

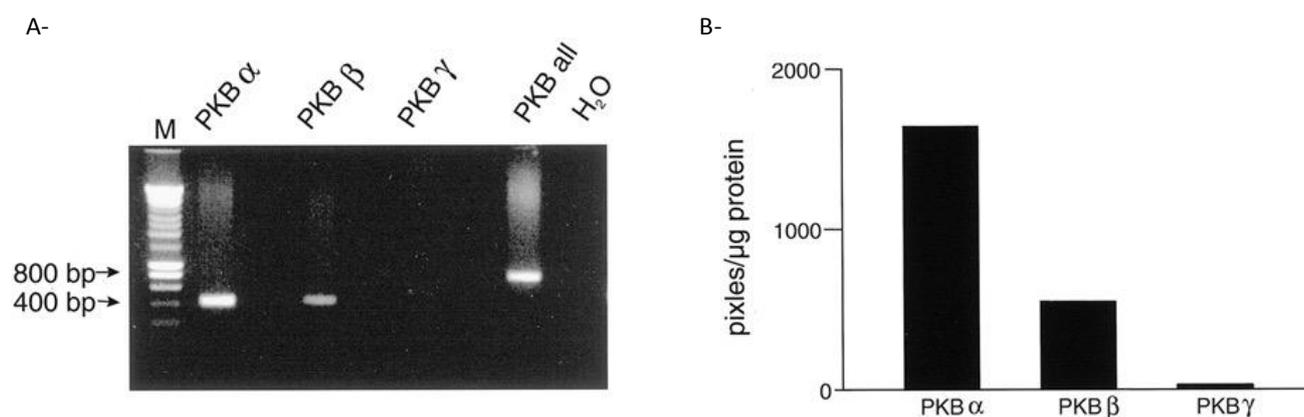


Figure 19 : Expression des différentes isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines. A. RT-PCR Akt à l'aide d'amorces correspondant à des motifs de séquences communes aux 3 isoformes. B. Western-blot avec des anticorps spécifiques de chacune des isoformes [86].

PKB α : Akt1, PKB β : Akt2, PKB γ : Akt3. Akt1 serait donc l'isoforme majoritaire dans les plaquettes humaines. Plus récemment, une étude de protéomique a montré la présence des trois isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines dans l'ordre Akt1>Akt2>Akt3 [87].

Chez l'Homme, l'ARNm de Akt1 et Akt2 a été mis en évidence dans les plaquettes [88] [86] et des données similaires étaient établies pour la souris [89]. Akt1 aurait l'expression la plus ubiquitaire ; les souris KO pour cette isoforme présentent une altération générale de la croissance avec peu/pas de défaut dans le métabolisme du glucose [90]. Akt2 serait plus particulièrement présente dans les cellules β pancréatiques, les cellules musculaires squelettiques et le tissu adipeux brun ; les souris KO pour cette isoforme ont un défaut de réponse à l'insuline, une hyperglycémie et une

hyperinsulinémie [91] [92]. Le double KO Akt1 et Akt2 produit des animaux qui meurent rapidement et présentent de nombreuses malformations [93]. Akt3, dont l'expression a été plus récemment décrite dans les plaquettes [87], serait également largement exprimée dans différents tissus (cerveau, testicules, certaines cellules cancéreuses mélanocytaires, etc...) [94].

Les informations concernant les niveaux relatifs d'expression et de fonction des trois isoformes d'Akt dans les plaquettes et dans plusieurs autres types cellulaires sont encore imparfaitement connues, en partie en raison du manque d'outils moléculaires pour les quantifier précisément. Cependant, une étude protéomique a montré la présence des trois isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines avec un niveau d'abondance dans l'ordre Akt1>Akt2>Akt3 [87].

Dans les cellules au repos, la protéine Akt est cytosolique ; sous l'action de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) de classe I, la génération d'un second messenger lipidique (le phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate ou PI(3,4,5)P3) permet le recrutement d'Akt à la membrane plasmique via son domaine PH N-Terminal. Le changement de conformation qui en résulte permet la phosphorylation de 2 résidus, la Thréonine en position 308 dans la boucle activatrice du domaine kinase et la Sérine en position 473 dans un motif hydrophobe du domaine non catalytique par les kinases PDK1 et 2, ces phosphorylations sont indispensables à l'activation d'Akt.

Il faut noter qu'Akt sous sa forme active peut être retrouvée dans le noyau où elle phosphoryle certains substrats comme les facteurs de transcription FoxO. Akt1, 2 et 3 sont adressées vers le noyau en réponse à une multitude de stimuli dont le facteur de croissance IGF1, l'hypoglycémie, l'insuline, ou le NGF. Alors que le motif de localisation nucléaire d'Akt n'est pas connu, la famille de protéines du proto-oncogène TCL1 (T-cell leukemia 1) pourrait être impliquée dans le ciblage nucléaire d'Akt. Trois isoformes de TCL1 sont décrites, TCL1, TCL1B et MTCP1 (Mature T-cell proliferation) ; TCL1 se lie au domaine PH d'Akt et intervient dans la formation de complexes de haut poids moléculaire TCL1-Akt où Akt serait préférentiellement sous forme phosphorylée activée. En revanche, les 3 isoformes possèdent une séquence NES (Nuclear Export Sequence) permettant la sortie d'Akt du noyau [95].

Les différentes formes d'Akt

La famille PKB/Akt est relativement bien conservée chez les eucaryotes au cours de l'évolution ; ainsi, 60% d'identité est retrouvée entre *C. elegans* et l'Homme, et 95% entre la souris et l'Homme [96].

Trois isoformes fonctionnellement distinctes d'Akt sont décrites chez les Mammifères : Akt1/PKB α , Akt2/PKB β et Akt3/PKB γ . Codées par des gènes paralogues situés sur les chromosomes 14, 19 et 1, respectivement, elles font l'objet d'intenses recherches dès lors qu'elles ont été impliquées dans les mécanismes de transformation et survie cellulaires, ainsi que la réponse à l'insuline [97]. De plus, l'identification récente d'un polymorphisme dans le gène codant pour Akt2, associé à une réactivité plaquettaire anormale, relance l'idée selon laquelle l'activation d'Akt peut être un facteur de risque de thrombose ou de saignement chez l'Homme [98].

Structure des isoformes d'Akt

Elles sont constituées selon un schéma identique : i) un domaine PH, pour Pleckstrin Homology, en N-Terminal, ii) un domaine kinase central, et iii) un domaine régulateur en C-Terminal comportant un motif hydrophobe, caractéristique des kinases AGC.

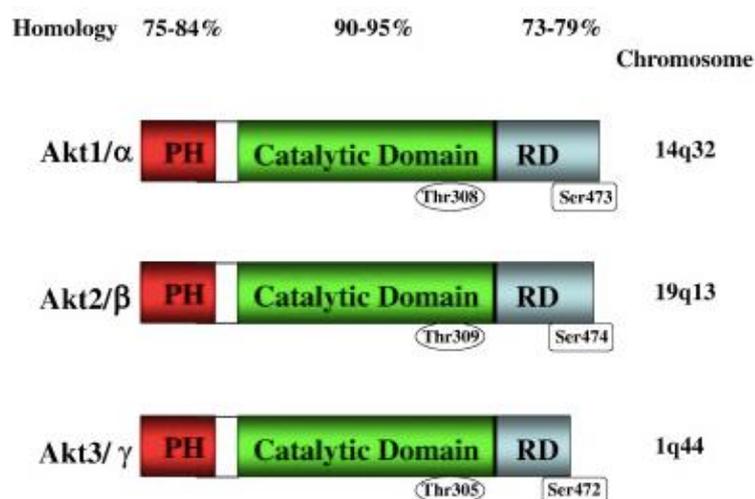


Figure 20 : Structure des différentes isoformes d'Akt [95]. PH : domaine Pleckstrine, RD : domaine régulateur. Acides aminés phosphorylés. A noter que la forme oncogénique d'Akt, v-Akt, possède un domaine d'ancrage constitutif à la membrane par myristoylation (non montré sur la figure).

En N-Terminal

Le domaine PH, homologue de la pleckstrine (Platelet and Leucocyte C kinase substrate), se compose d'environ 120 acides aminés organisés en 2 feuillets β perpendiculaires et antiparallèles, formant une sorte de tonneau, avec une hélice α amphipatique côté C-Terminal, formant un capuchon. L'ensemble est relié par des boucles de longueur variable. Initialement décrit pour la pleckstrine,

principal substrat de la PKC dans les plaquettes [99], ce domaine est en fait partagé par environ 250 autres protéines de signalisation [100] [101] [102].

Ce domaine PH fait partie d'un groupe plus large de domaine de liaison aux phosphoinositides (Pis) membranaires ; à ce jour, environ 13 autres modules de ciblage membranaire ont été décrits : C2 (PKC conserved 2), FYVE (Fab1-YOTB-Vac1-EEA1), PX (Phox), ENTH (Epsin N-terminal Homology), BARRE (Bin amphiphysin Rvs), ANTH (AP180 N-terminal Homology), FERM (band 4.1-ezrin-radixin-moesin), PTB (PhosphoTyrosine Binding), PDZ (post-synaptic density 95-disk large-zonula occludens), GOLPH3 (Golgi phosphoprotein 3), PROPPINs (b-propellers that bind polyphosphoinositides), Tubby et KA1 (Kinase-associated 1 domains). Ces différents modules possèdent une affinité et une sélectivité de liaison qui leur sont propres, en fonction du PIs considéré. Ainsi, suivant la répartition de certains PIs, les protéines qui leur sont liées via leur domaine PH, auront une répartition subcellulaire spécifique et réversible vers certaines membranes subcellulaires [103]. A ce niveau-là, il est intéressant de noter que seule une très faible proportion de domaines PH, environ 10%, est capable de lier les PIs avec de fortes affinité et spécificité, et que les PIs, qui sont sous-représentés parmi les PL membranaires du feuillet interne (0,5 à 1% des PL), jouent un rôle d'autant plus critique dans le ciblage de protéines de liaison aux membranes [104].

Effectivement, les domaines PH sont capables de lier spécifiquement certains PIs produits par les PI3Ks de classe I [101] [100] [102] [105]. D'après des analyses biochimiques indépendantes réalisées *in vitro*, il semblerait que Akt1 lie le PI(3,4,5)P3 avec une affinité 3 fois plus forte que le PI(3,4)P2 et 6 fois plus forte que le PI(4,5)P2 et n'interagisse pas avec les PI(3,5)P2, PI3P, PI4P, PS, ou PC. De plus, les mêmes auteurs démontrent que lors de la liaison aux PIs, Akt1 n'est pas préalablement activée [106]. La liaison à ces PL membranaires est initiée par des interactions électrostatiques non spécifiques, puis suivie d'une liaison spécifique afin d'assurer un ciblage sélectif et d'augmenter le délai d'interaction avec la membrane. L'ancrage final est assuré par des résidus aliphatiques adjacents au site de liaison du lipide [102] [105]. La grande majorité des domaines PH possède un motif basique K-Xn-K/R-X-R conservé, dans lequel les lysines (K) et les arginines (R) jouent un rôle important dans la formation des liaisons hydrogène avec la tête des PIs. D'autres résidus basiques situés à d'autres endroits du domaine PH peuvent également présenter une forte affinité de liaison et créer une poche de liaison unique [107]. De plus, l'analyse de mutants ponctuels pour certains résidus du domaine PH interagissant avec les PIs révèle que, outre son rôle de translocation à la membrane, le domaine PH permettrait la reconnaissance ultérieure par les kinases responsables de l'activation d'Akt [108]. Enfin, il semblerait que seul un résidu Tryptophane en position 80 du domaine PH soit particulièrement conservé entre les 3 isoformes d'Akt ; sa mutation en Alanine confère une résistance à certains inhibiteurs d'Akt. Les auteurs suggèrent que cet acide aminé pourrait jouer un rôle critique dans la liaison et/ou l'orientation spatiale de l'inhibiteur qui

stabiliserait ainsi certaines interactions moléculaires au sein du domaine PH et maintiendrait Akt dans une configuration inactive en n'exposant pas les 2 sites de phosphorylation régulateurs, Thréonine 308 et Sérine 473 dont nous reparlerons plus loin [109].

Outre des interactions protéines-PIs, les domaines PH permettraient des interactions protéines-protéines, notamment avec les protéines G et plus précisément leurs sous-unités $\beta\gamma$, comme le suggèrent les analyses de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire [110].

Ce domaine PH facilite ainsi le recrutement direct d'Akt à la membrane plasmique, permettant de l'orienter secondairement vers une zone appropriée du compartiment cellulaire, ou au contact de protéines régulatrices ou de substrats.

Dans la région centrale et en C-Terminal

Le domaine catalytique kinase de Akt/PKB présente un fort degré de similitude avec d'autres kinases AGC, telles que la PKA, PKC, p70S6K ou p90RSK, ce qui représente environ plus de 80 kinases [111]. Un résidu d'intérêt hautement conservé entre les différentes Akt/PKB se trouve dans cette région, plus précisément au sein d'une séquence consensus T(F/L)CGT, il s'agit du résidu Thréonine T308 pour Akt1, T309 pour Akt2 ou T305 pour Akt3, dont la phosphorylation active partiellement Akt/PKB et serait un préalable à sa stabilité et/ou son activation enzymatique [112] [111]. Il est situé entre les motifs DFG et APE de la boucle d'activation, côté C-Terminal du domaine kinase.

Le domaine RD régulateur fait suite au domaine kinase ; long de 160 acides aminés environ, il contient un motif hydrophobe d'une quarantaine d'acides aminés comportant une séquence F-X-X-F/Y-S/T-Y/F caractéristique de la famille des kinases AGC, où X peut être n'importe quel acide aminé. Ainsi, pour les isoformes d'Akt, la phosphorylation du résidu Sérine (S473 pour Akt1, S474 pour Akt2 ou S472 pour Akt3) dans le motif hydrophobe FPQFSY, ajoutée à la phosphorylation préalable du résidu Thréonine dans la boucle d'activation du domaine catalytique, est nécessaire à son activation complète [113] [114].

Activation des isoformes d'Akt

Les phosphorylations régulatrices majeures

L'activation d'Akt nécessite la phosphorylation des 2 résidus clés précédemment cités : par exemple sur Akt1, la T308 située dans la boucle d'activation du domaine catalytique et la S473 dans le motif hydrophobe du domaine C-Terminal. Cette double phosphorylation est nécessaire à une activation pleine et entière d'Akt.

La Protéine Kinase Dépendante des Phosphoinositides 1 (PDK1) est responsable de la phosphorylation de la T308 ; cette première phosphorylation est un prérequis dans l'activation d'Akt [112]. PDK1 accède à la T308 d'Akt1, suite aux changements conformationnels d'Akt, secondaires à l'ancrage du domaine PH aux PI(3,4,5)P3 ou PI(3,4)P2 membranaires. Ainsi, dans la conformation inactive, le domaine PH est inhibiteur, puis la configuration PH-in est levée par l'interaction entre le domaine PH et le lipide. La conformation d'Akt devient alors active, PH-out, la Thréonine 308 ainsi dévoilée devient accessible à la phosphorylation par PDK1 [115]. La particularité d'Akt par rapport aux autres protéines kinases substrat de PDK1, est de posséder un site de liaison au PI(3,4,5)P3.

L'activation d'Akt est ensuite rendue maximale par la phosphorylation de la S473 grâce à l'action de PDK2, récemment identifiée comme étant mTORC2 (mechanistic target of rapamycin complex 2) [116]. En effet, Akt dépourvue de la S473 a une activité qui est diminuée ; la phosphorylation de S473 stabilise celle de T308 et l'état activé global d'Akt [112]. S473 est la cible de l'action de mTORC2 qui, de la même façon que pour PDK1, ne peut accéder à la S473 que si le domaine PH interagit avec les PIs membranaires, autrement dit, que si la configuration d'Akt en PH-out.

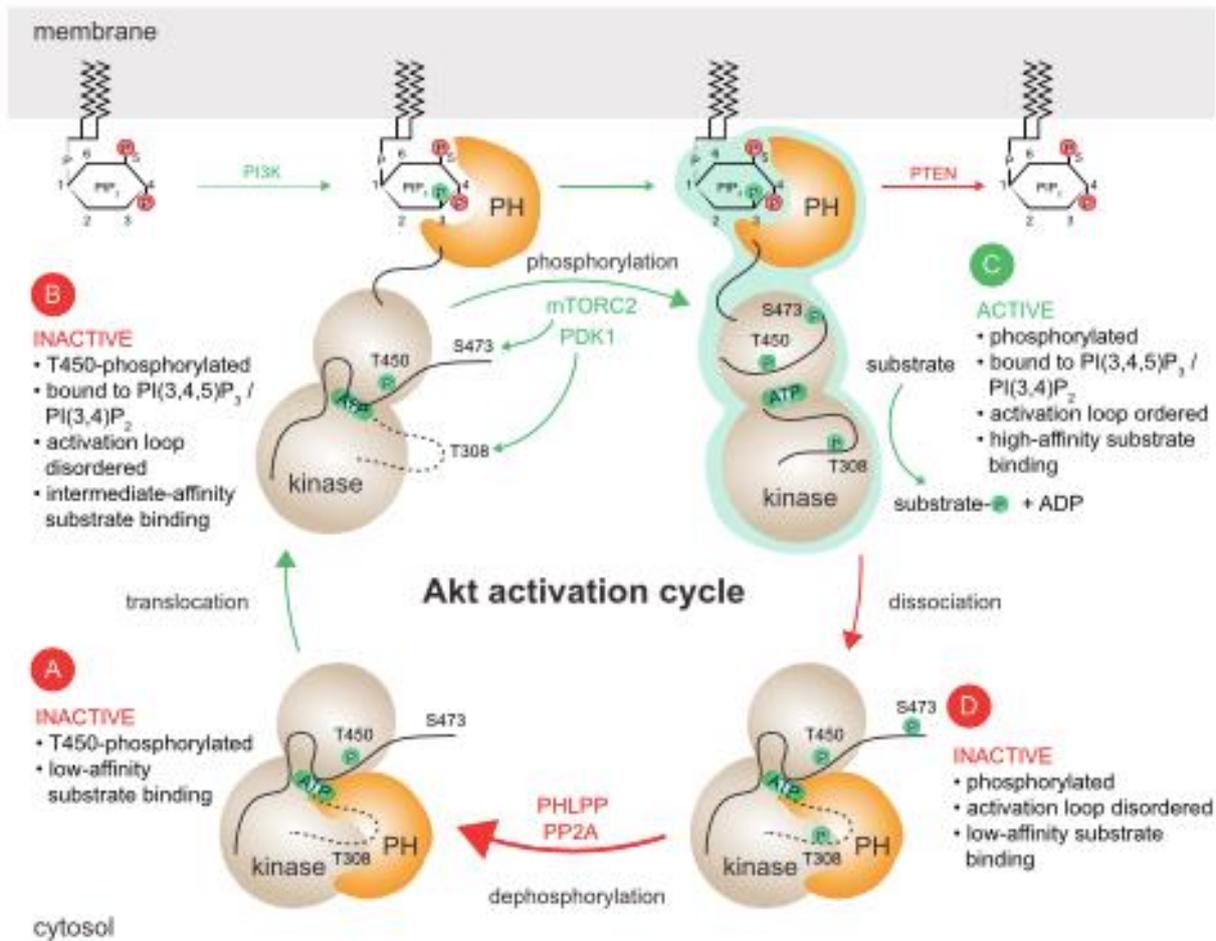


Figure 21 : Schéma de la régulation d'Akt adapté d'après Ebner et collaborateurs [117].

La durée de la phosphorylation d'Akt est relativement courte [115] [118]. Il existerait, de la même façon que pour l'activation d'Akt, un mécanisme allostérique d'inactivation qui rendrait possible la déphosphorylation dans le cytoplasme uniquement si Akt est décrochée de la membrane plasmique.

Autrement dit, Akt n'est phosphorylée et donc active que lorsqu'elle est liée à une membrane [117], limitant ainsi la phosphorylation des substrats d'Akt à la proximité d'une membrane lipidique riche en PI(3,4,5)P₃ plutôt que dans le compartiment cytosolique. Le fait qu'il y ait des molécules d'Akt localisées aux endomembranes ne remet pas en question ce mode de régulation ; un autre PI peut servir d'ancrage à des pools distincts d'Akt [119]. Il n'est cependant pas impossible qu'il existe une forme d'Akt activée non ancrée à des membranes, notamment dans le noyau.

Les autres modifications post-traductionnelles importantes

Il existe d'autres modifications post-traductionnelles permettant vraisemblablement de réguler l'activation, l'inactivation, la localisation subcellulaire et la spécificité de substrat d'Akt.

D'autres acides aminés d'intérêt ont été cartographiés suite à des analyses de phosphoprotéomique ; cependant, les mécanismes sous-jacents à leur modification, ainsi que leur signification physiologique restent, pour la grande majorité des cas, méconnus.

Au-delà des phosphorylations diverses, l'acétylation pourrait jouer un rôle dans la translocation membranaire d'Akt ; par exemple, l'acétylation du résidu K14 du domaine PH par SIRT1, une histone désacétylase, serait requis pour la liaison d'Akt aux Pls [120]. De même l'oxydation de certains résidus Cystéine spécifiquement dans le domaine de liaison d'Akt2 apporterait la preuve d'une régulation différentielle pour cette isoforme puisque ces résidus ne sont pas retrouvés dans Akt1 ou Akt3 [121]. Concernant la dégradation d'Akt, la voie du protéasome est évoquée devant l'ubiquitinylation du résidu K48 [122], ainsi que la voie de la SUMOylation du fait de la modification de plusieurs résidus Lysine dont K276 [123].

L'arrêt du signal activateur par les phosphatases

L'arrêt du signal est assuré par des phosphatases agissant sur le PI(3,4,5)P3, PTEN et INPP4B, mais également par 2 phosphatases agissant directement sur Akt, PP2A (proteine phosphatase 2A) et PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatases).

Les PI(3,4,5)P3-phosphatases

Les enzymes qui contrôlent la concentration du PI(3,4,5)P3 ou du PI(3,4)P2 peuvent affecter la régulation de l'activation d'Akt. Actuellement, la Pls phosphatase la mieux caractérisée dans les plaquettes est la Src-homology 2 domain-containing inositol 5 phosphatase 1 (SHIP1) chargée de déphosphoryler les PI(3,4,5)P3 en position D5. Des travaux réalisés sur des souris KO SHIP1, montrent que cette phosphatase est un élément important de la signalisation plaquettaire ; SHIP1 joue un rôle positif dans l'agrégation plaquettaire en réponse à différents agonistes et contrôle la contractilité et l'organisation du thrombus [124].

PTEN (a phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), est une 3-phosphatase qui catalyse la déphosphorylation de l'inositide en position D3 du PI(3,4,5)P3 [125]. Son expression dans les plaquettes a été détectée où elle contribue à la régulation du taux de PI(3,4,5)P3 et à l'activation plaquettaire induite par le collagène [126].

Les phosphatases directes d'Akt

PP2A (Protein Phosphatase 2A) assure la déphosphorylation inactivatrice de la T308 d'Akt [127] par l'action directe de sa sous-unité régulatrice ; selon le type cellulaire considéré, ces sous-unités régulatrices diffèrent [128] [129]. L'inhibition sélective de cette phosphatase par l'utilisation de siRNA, dans des mégacaryocytes murins, augmente la liaison au fibrinogène induite par la thrombine et apporte une preuve que la PP2A régule négativement la signalisation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [130].

Les PHLPP (PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase), en déphosphorylant la S473 [131], contribuent à l'inhibition des effets cellulaires dépendants d'Akt. Pour l'heure, il n'existe pas d'étude sur les conséquences de leur inhibition sur l'activité plaquettaire chez l'Homme.

Les voies de signalisation d'amont et d'aval

Les PI3Ks

Voies d'activation de la voie PI3Ks-Akt dans les plaquettes

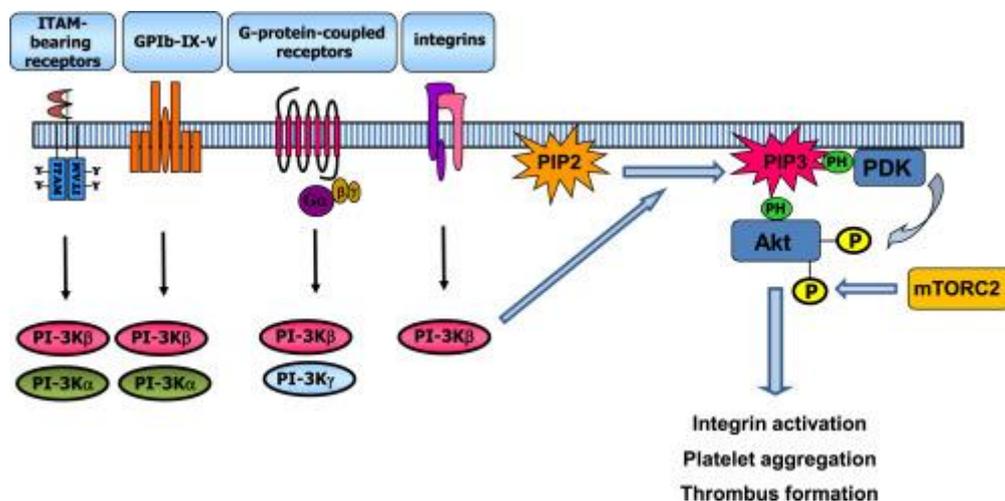


Figure 22 : Activation des PI3Ks dans les plaquettes [132]. Quatre principaux types de récepteurs favorisent l'activation plaquettaire : les récepteurs à motif ITAM (GPVI, FcγRIIA), le récepteur du FvW (complexe GPIb-IX-V), les RCPG (récepteur couplé à la protéine G, pour les agonistes solubles, thrombine, ADP, TxA2) et les intégrines ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ pour le fibrinogène, $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ pour le collagène).

Structure des PI3Ks

Il existe différentes isoformes de PI3K chez les Mammifères qui sont regroupées en 3 classes (classe I, II et III) selon les spécificités de substrat lipidique *in vitro*, la structure protéique et le mode de régulation.

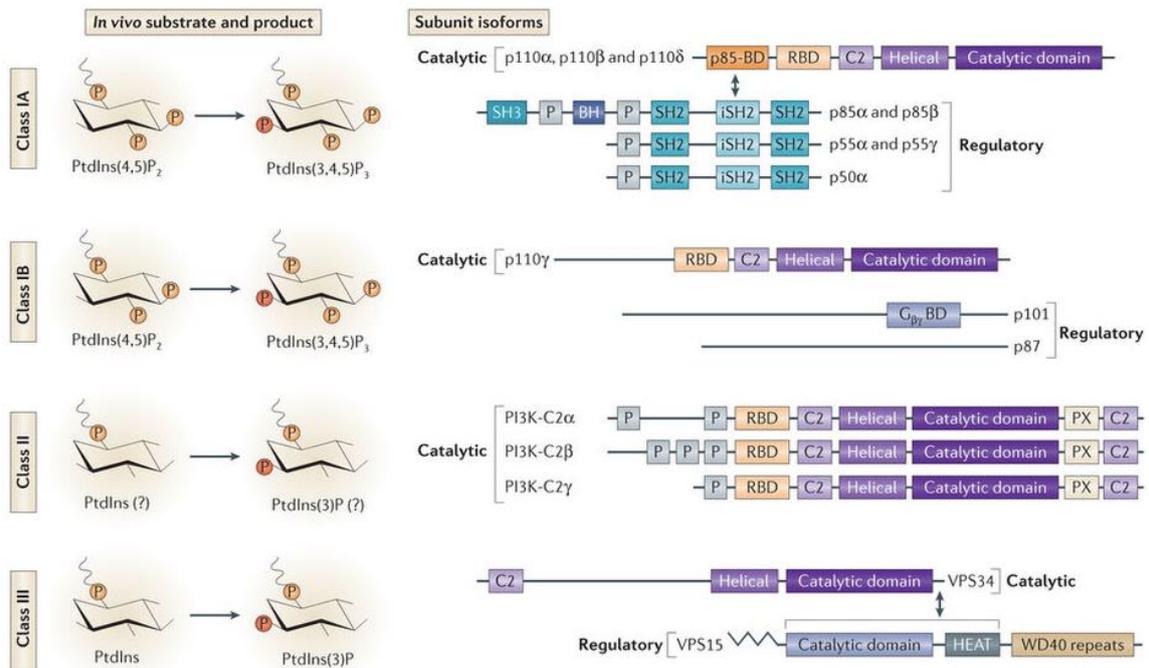


Figure 23 : Les 3 classes de PI3Ks chez les Mammifères : structure schématique des sous-unités catalytiques et régulatrices et des substrats biologiques [117].

La classe I est subdivisée à son tour en classe IA (isoformes catalytiques p110α, β et δ) et IB (isoforme γ). Ces enzymes sont des hétérodimères comprenant i) une isoforme catalytique p110 et ii) une sous-unité régulatrice (p85α, p55α, p50α, p85β, p55γ, p101 ou p84). La distribution tissulaire des PI3K de classe I est relativement grande cependant l'isoforme δ semble spécifique des globules blancs et des plaquettes. Ces enzymes sont particulièrement impliquées dans la régulation de voies de signalisation cellulaires.

Concernant les PI3Ks de classe II, leur expression est ubiquitaire pour PI3KC2α et β mais restreinte à certains tissus (foie, prostate, sein, glandes salivaires) pour PI3KC2γ [133]. Il est à noter que ces kinases sont des monomères, elles ne possèdent pas de sous-unité régulatrice identifiée mais des domaines additionnels en N et C-Terminal qui favorisent les interactions avec des protéines susceptibles de moduler leur activité catalytique.

Enfin, les PI3Ks de classe III n'ont qu'un seul représentant, Vps34, dont l'expression est ubiquitaire. Elle est sous forme d'hétérodimère avec une sous-unité régulatrice vps15.

Spécificité de substrat

Les PI3Ks sont des lipides kinases qui phosphorylent les PIs en position D3 du cycle inositol. Les PI3Ks de classe I phosphorylent le PI(4,5)P2 en PI(3,4,5)P3, les PI3Ks de classe II phosphorylent le PI et le PI4P en PI3P et PI(3,4)P2 respectivement et la PI3K de classe III phosphoryle le PI en PI3P.

Certains produits de PI3K de classe I sont détectés suite à l'activation des plaquettes par la plupart, sinon tous les agonistes, notamment la thrombine, le TxA2, et dans une moindre mesure l'ADP. Le PI(3,4,5)P3 est synthétisé de façon très rapide, suivi du PI(3,4)P2, synthétisé dans un deuxième temps et de façon dépendante de l'engagement de l'intégrine GPIIb/IIIa. Il est admis que ces PIs aident à déclencher des processus intracellulaires en liant les domaines PH de protéines effectrices, telles qu'Akt, et leur permettant de s'associer à la membrane où elles deviennent partie active de complexes de signalisation.

Voie(s) d'amont PI3K-dépendante(s)

Assez rapidement, Akt a été positionnée en aval des PI3Ks de classe I et de la production de PI(3,4,5)P3. L'activation de ces PI3Ks avait été associée à la stimulation de récepteurs à activité tyrosine kinase [134] impliqués dans le métabolisme, la croissance et la survie cellulaires [135]. En fait, de nombreux travaux sont en faveur d'une activation d'Akt initiée indifféremment par la stimulation de récepteurs tyrosine kinase ou de RCPG via le recrutement membranaire et l'activation d'isoformes spécifiques de PI3Ks de classe I [136].

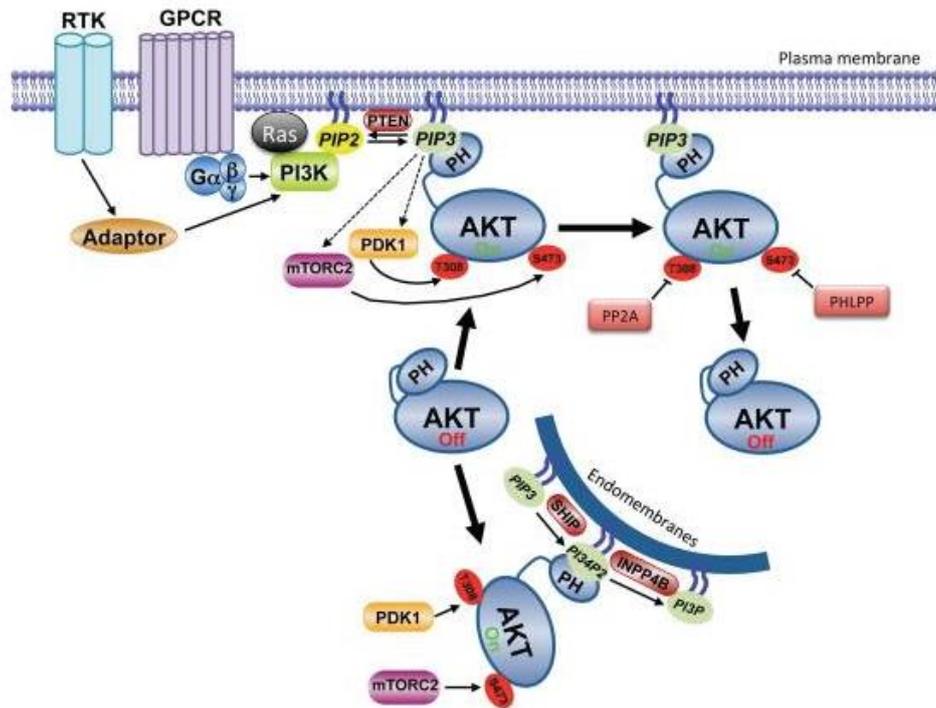


Figure 24 : La stimulation des RTK ou RCPG conduit à l'activation de PI3K et la production de PI(3,4,5)P3 (PIP3) au niveau de la membrane plasmique [97]. Akt cytosolique est inactive ; recrutée à la membrane, elle se lie au PI(3,4,5)P3 par l'intermédiaire de son domaine PH. La double phosphorylation par PDK1/mTORC2 conduit à une activation complète de la protéine Akt. PP2A et PHLPP régissent la fin du signal Akt. A noter, l'existence d'un pool endomembranaire d'Akt.

La synthèse du PI(3,4,5)P3 par les PI3Ks de classe I est rapide et transitoire. Ce lipide, quasi indétectable dans les cellules au repos, est considéré comme un second messager lipidique qui va pouvoir se lier à différentes protéines, en particulier Akt. Dans tous les cas, la transduction du signal PI3K/PI(3,4,5)P3/Akt est transitoire ; la régulation négative étant assurée par le suppresseur de tumeur PTEN, qui déphosphoryle le PI(3,4,5)P3 en PI(4,5)P2 [137].

Voie(s) d'aval

La littérature rapporte plus d'une centaine de substrats différents pour Akt, ce qui suggère un répertoire d'effecteurs extrêmement diversifié qui s'exprimera ou pas selon le contexte cellulaire. Les cibles d'Akt sont de classes différentes, incluant des lipides/protéines kinases, des facteurs de transcription, des régulateurs des petites protéines G, des régulateurs du trafic intracellulaire, des enzymes du métabolisme, des régulateurs du cycle cellulaire, etc..., phosphorylées sur les résidus

Sérine/Thréonine du motif RXXXS/T-φ, où X est un acide aminé quelconque et φ un résidu hydrophobe. Ce motif n'est pas exclusivement spécifique d'Akt ; certaines protéines le portent sans pour autant avoir été identifiées comme substrat d'Akt. De plus, certaines protéines caractérisées substrat d'Akt possèdent une version modifiée de ce motif ; ainsi AMPK (AMP-regulated protein kinase) et ACLY (ATP-citrate lyase) possèdent un résidu Proline à la place du résidu Arginine canonique [138] [139].

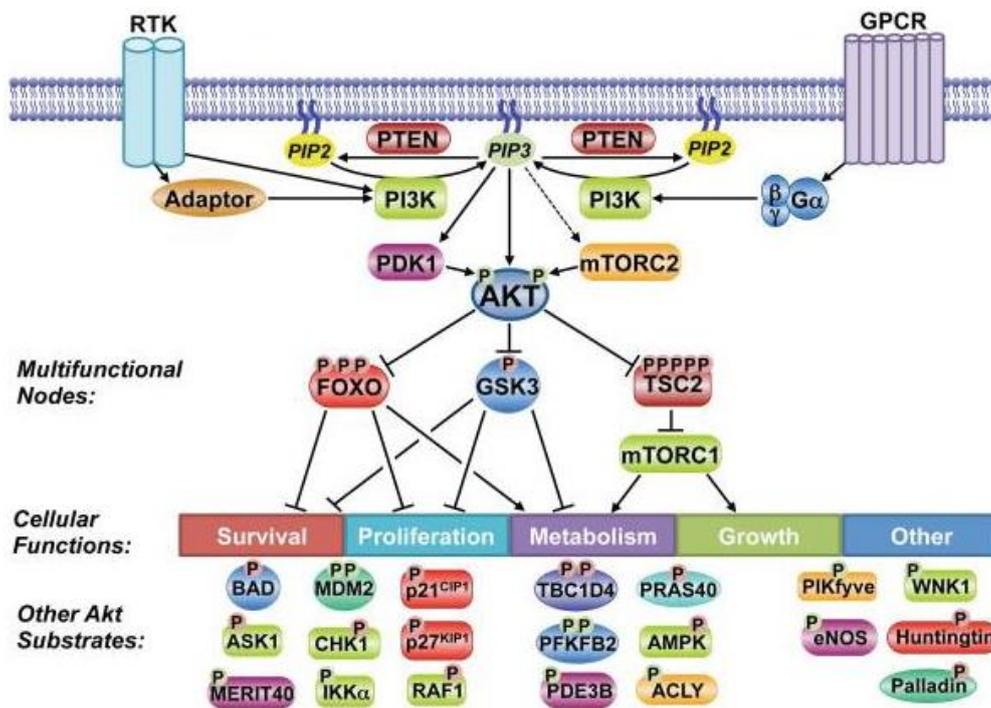


Figure 25 : Substrats et fonctions des protéines impliquées dans le réseau Akt [97].

Les différentes isoformes d'Akt possèdent des fonctions cellulaire et tissulaire spécifiques ; de façon générale, au travers de ses nombreuses cibles cellulaires, Akt est impliquée dans la survie cellulaire, la prolifération, la croissance, les modifications des voies métaboliques

Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)

Historiquement, GSK3 est un des premiers substrats d'Akt à avoir été identifié [140] et son identification a permis de définir un motif consensus de phosphorylation qui sert de screening pour la mise en évidence de nouveaux substrats d'Akt.

Il existe 2 isoformes de GSK3, GSK3α et GSK3β, qui partagent 85% d'homologie de structure et donc un certain nombre de fonctions communes ou redondantes alors que d'autres seront probablement plus spécifiques selon les tissus. GSK3 participe à différentes voies de signalisation dont celle Wnt-

β caténine indépendante de la voie Akt-PI3K. Elle possède une activité endogène basale et se trouve inhibée par l'action de facteurs de croissance ; Akt exercerait son action inhibitrice par la phosphorylation du motif conservé S21 et S9 N-Terminal de GSK3 α et GSK3 β , respectivement.

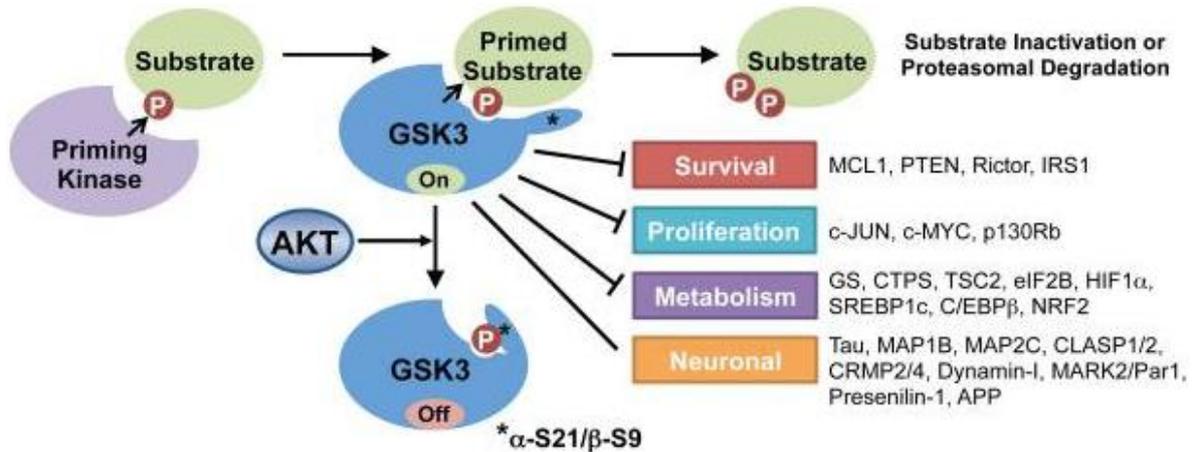


Figure 26 : Régulation de GSK3 et phosphorylation de son substrat [97]. GSK3 reconnaît ses substrats et les phosphoryle uniquement si ceux-ci sont préalablement phosphorylé par une kinase d’amorçage enfin, les substrats reconnus par des ligases et orientés vers la voie de dégradation par le protéasome. GSK3 régule ainsi différentes fonctions cellulaires, de survie, de prolifération, métabolique ou neuronale. Akt, par la phosphorylation de GSK3, bloque l’accès de GSK3 à ses substrats pré-activés ; en d’autres termes, les facteurs de croissance activant Akt régulent positivement certaines fonctions cellulaires évoquées grâce à l’inhibition de GSK3.

La famille des facteurs de transcription Forkhead Box O (FoxO)

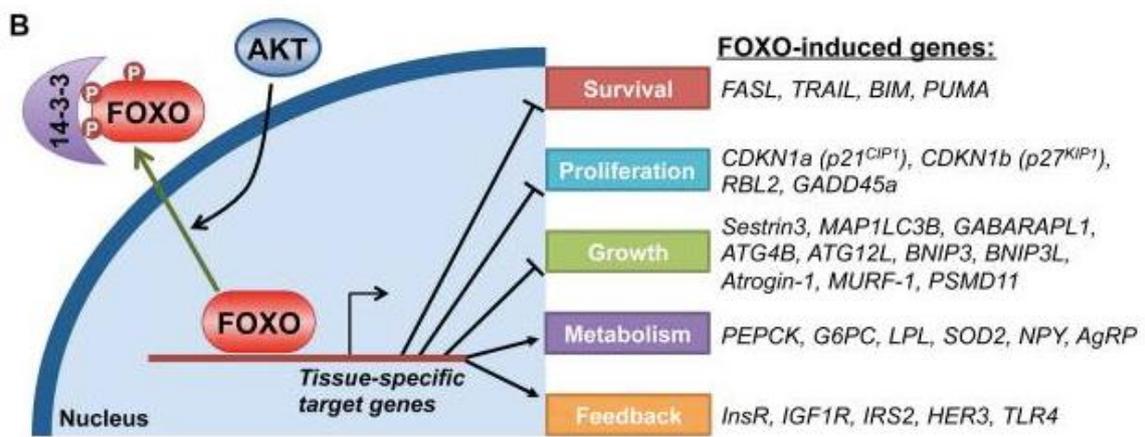


Figure 27 : Régulation des cibles transcriptionnelles des membres de la famille FoxO [97]. La phosphorylation de FoxO par Akt conduit à sa séquestration cytosolique par les protéines 14-3-3 et l'atténuation de l'expression des gènes cible.

Cette famille de facteurs de transcription regroupe les facteurs FoxO1, 3, 4 et 6 qui contrôlent un ensemble varié de gènes cible [141]. L'activation de la voie PI3K-Akt conduit à la translocation de ces facteurs de transcription FoxO en dehors du noyau et donc à l'extinction du programme transcriptionnel des gènes cibles. En effet, Akt induit la phosphorylation directe de 3 résidus générant des motifs de reconnaissance pour la famille des protéines 14-3-3, ce qui facilite l'exportation et la séquestration des protéines FoxO vers le cytoplasme. Akt supprime l'expression de gènes sous le contrôle de FoxO et impliqué dans l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, le catabolisme et l'inhibition de la croissance, ou les changements métaboliques [142] [141]. De fait, les phénotypes engendrés par la perte de la signalisation Akt seront le résultat d'une transcription soutenue des gènes sous le contrôle de FoxO et impliqués dans de nombreux processus physiologiques fondamentaux.

Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) et le mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1)

Le principal mécanisme d'activation de mTORC1 par Akt en aval de facteurs de croissance tels qu'IGF1 est la phosphorylation inhibitrice de TSC2, connu également sous le nom de tubérine. TSC2, avec TSC1 et TBC17 [143], composent TSC, un complexe hétérotrimérique qui fonctionne comme une protéine activatrice de GTPase (GAP) spécifique de la petite GTPase Rheb. Rheb-GTP est alors convertie en Rheb-GDP [144]. Dans sa forme liée au GTP, Rheb se lie directement à mTORC1 et l'active ; le complexe TSC est donc un puissant inhibiteur de mTORC1. Par ailleurs, de nombreux facteurs de croissance convergent vers TSC mais la manière précise dont TSC intègre ces signaux ainsi que leur impact relatif sur l'activité de mTORC1 selon les contextes cellulaires restent des questions ouvertes [145].

Enfin, il est intéressant de noter que mTOR peut être directement phosphorylé par Akt en S2448, mais la signification fonctionnelle de cette phosphorylation est inconnue [146].

Par la régulation de la voie TSC-Rheb-mTORC1, Akt relie les signaux de facteurs de croissance majeurs à un nœud de signalisation important car responsable du contrôle des principaux changements métaboliques assurant la croissance cellulaire [145]. Cette voie est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses.

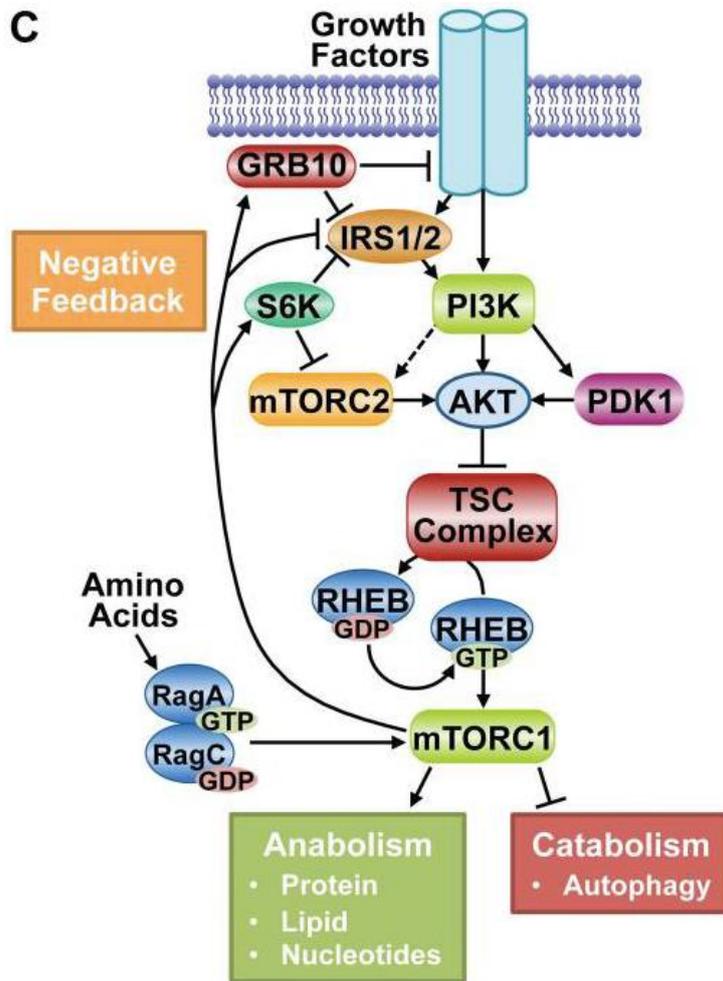


Figure 28 : Régulation de mTORC1 via le complexe TSC [97]. Akt stimulé par un facteur de croissance, vient phosphoryler TSC2, entrainant une dissociation permettant à Rheb de se charger en GTP et d'activer mTORC1[145].

La majorité des substrats d'Akt sont phosphorylés et fonctionnellement régulés par les 3 isoformes ; cependant, certains substrats sont spécifiques de l'une ou l'autre des isoformes d'Akt, ce qui explique vraisemblablement les différences phénotypiques observées selon les conditions physiopathologiques. Toutefois, les mécanismes qui contribuent à cette sélectivité, ainsi que les nouveaux sites de phosphorylation attendent une validation plus poussée [147] [148].

Candidats effecteurs dans les plaquettes

Parmi les cibles potentielles d'Akt dans les plaquettes, la NO-synthase endothéliale (eNOS), le transporteur GLUT3, l'intégrine $\beta 3$, GSK3 β ou PDE3A pourraient être de bons candidats mais des

études supplémentaires sont nécessaires. Néanmoins, plusieurs travaux montrent un rôle important de la phosphorylation inhibitrice de GSK3 β par Akt [149] [150]. Ainsi, alors que le rôle d'Akt dans la régulation de l'activation plaquettaire n'est pas contesté, le mécanisme précis reste mal défini [151].

Caractéristiques du réseau de signalisation Akt

Mécanismes de rétrocontrôle négatif

Comme toutes les voies de signalisation, la voie PI3K-Akt est soumise à un rétrocontrôle négatif strict. Outre les phosphatases qui hydrolysent le PI(3,4,5)P3 et celles qui déphosphorylent Akt, il existe plusieurs mécanismes de rétrocontrôle négatif contrôlant l'activation transitoire d'Akt.

Par exemple, l'activation de mTORC1 favorise la dégradation des substrats du récepteur de l'insuline IRS1 et IRS2 par de multiples événements de phosphorylation de la Sérine, soit directement, soit par l'intermédiaire de S6K ou d'autres protéines kinase, réduisant ainsi considérablement l'activation de PI3K [152] [153]. Une autre protéine adaptatrice, GRB10 (Growth Factor Protein 10), est une cible directe de mTORC1 et régule négativement le récepteur tyrosine kinase à l'insuline [154]. De plus, il existerait des relations croisées entre mTORC1 et mTORC2 qui agit sur l'activation complète d'Akt. En effet, S6K1 phosphoryle des Thréonines (T1135, T86, T398) de mTORC2 qui devient moins efficace pour phosphoryler à son tour Akt sur la S473 réduisant son activation [155] [156].

Cross-talk entre voies de signalisation et redondance

Il existe de multiples points de régulation croisée entre la voie PI3K-Akt et les autres voies de signalisation ; les éléments intégrant les signaux de régulation croisés peuvent être soit les composants eux-mêmes de la voie, soit leurs effecteurs. Les voies PI3K-Akt et Ras-ERK sont par exemple capables d'interagir à plusieurs niveaux pour réguler efficacement les processus de croissance et de prolifération cellulaire [97].

Implications physiopathologiques

Compte tenu du large spectre de substrats et de fonctions d'Akt, il n'est pas surprenant que cette Sérine/Thréonine kinase soit impliquée dans diverses réponses cellulaires et tissulaires aux hormones, facteurs de croissance, cytokines ou facteurs neurotrophiques.

Enseignement des souris KO

L'étude des souris KO indique qu'Akt1, Akt2 et Akt3 ont des fonctions à la fois redondantes et spécifiques [157]. Ainsi, tous les tissus semblent exprimer une ou plusieurs isoformes, Akt1 est la plus largement exprimée, Akt2 serait davantage présente dans les tissus sensibles à l'action de l'insuline, enfin Akt3 serait plus abondante dans le tissu cérébral.

Comme évoqué précédemment, les souris KO Akt1 présentent un retard de croissance et une élévation de la mortalité périnatale [158] [92].

Les souris KO Akt2 développent toutes un syndrome apparenté à un diabète [92]. De plus, les souris KO pour Akt2 dans les cellules hématopoïétiques présentent une diminution des lésions athérosclérotiques [159], contrairement à celui Akt3 qui présente une augmentation de ces lésions [160]. Les résultats des KO Akt1 montrent des résultats contradictoires, soit une aggravation des lésions, soit aucune différence, et s'expliquent probablement par les fonds génétiques différents des souris KO utilisées par les équipes [85].

Le double KO Akt1 et Akt2 entraîne de graves défauts de développement avec de nombreuses malformations et une mortalité rapide après la naissance [161].

Enfin, les souris KO Akt3 sont viables mais présentent une atrophie cérébrale prononcée [162] [163], ainsi que plusieurs anomalies sévères du développement [157].

Exemples d'implication d'Akt en physiopathologie chez l'Homme

Syndromes de métabolisme exacerbé

Les anomalies génétiques impliquées sont associées à une activation constitutive de la voie PI3K-Akt-TSC-mTORC1 ainsi que des mutations somatiques i) de PI3KCA, sous unité catalytique de la PI3K α de classe I ii) d'une des 3 isoformes d'Akt, iii) de mTOR, ou iv) des mutations activatrices de PTEN ou des composants du complexe TSC [164].

Les manifestations cliniques de ces troubles vont de petites lésions cutanées à des proliférations excessives tumorales dans certains tissus, et à une susceptibilité accrue aux tumeurs. Par exemple, le syndrome de Proteus (PS), qui fait partie de ces syndromes, associe des malformations vasculaires graves à une mutation d'Akt1, sur le Glutamate en position 17 modifié en Lysine (E17K) du domaine PH, qui confère une localisation membranaire et une activation constitutive d'Akt1 [165]. La même mutation sur Akt2, ne développe pas de PS mais une hypoglycémie insulino-dépendante. Sur Akt3, cette mutation est associée à des proliférations cérébrales, dont une mégalencéphalie [166]. Dans ces syndromes, la voie mTOR semble avoir une importance particulière car certains de ces patients mis sous inhibiteurs de mTORC1 présentent des améliorations cliniques.

L'oncologie

De nombreuses mutations conférant une hyperactivation d'Akt ont été retrouvées dans des tumeurs solides ainsi que des hémopathies. Ces mutations intéressaient des récepteurs de facteurs de croissance type tyrosine kinase (EGFR, HER2), mais également PTEN, INPPP4B et PHLPP conduisant à une hyperactivation d'Akt [167].

Dans certaines situations, notamment le cancer du sein, la mutation d'Akt E17K est retrouvée mais pour qu'il y ait tumorigenèse, elle doit être associée à d'autres mutations [168] [169]. De même, la mutation E17K sur Akt3 a été identifiée comme récurrente dans le mélanome [170].

Ce domaine est celui pour lequel les inhibiteurs d'Akt ont été le plus largement développés, étant donné que plus de 50% des tumeurs chez l'Homme ont une hyperactivation d'Akt. Des effets intéressants, notamment d'un point de vue thérapeutique, ont été observés avec les nouveaux inhibiteurs des PI3Ks de classe I, cependant, leur utilisation est largement limitée par la toxicité importante associée [171]. Par ailleurs, la grande complexité de la signalisation et du mode de régulation d'Akt, ainsi que l'émergence de résistance aux inhibiteurs d'Akt dans certains cas, sont autant de défis qui restent à surmonter.

L'angiogenèse

Akt1 semble être l'isoforme majeure qui contribue aux fonctions physiologiques des cellules endothéliales normales et des cellules musculaires lisses sous-jacentes ; l'activation d'Akt1 par le facteur de croissance endothélial VEGF stimule prolifération, migration et survie des cellules endothéliales [172]. Il faut noter que la perte d'Akt1 dans un des modèles murins KO Akt1 existant est associée à une augmentation des lésions d'athérosclérose sévères probablement liée à la dysfonction des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses [173].

La réponse à l'insuline

Chez les Mammifères, l'activation d'Akt par l'insuline participe au métabolisme du glucose : la voie de signalisation PI3K-Akt induite par l'insuline conduit à la translocation rapide du transporteur de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique, assurant ainsi la clairance du glucose circulant et l'absorption dans le tissu adipeux et le tissu musculaire [174]. Akt2 s'associe aux vésicules contenant GLUT4 et participe à leur trafic et fusion à la membrane plasmique en réponse à l'insuline [175].

De plus, la signalisation Akt, toujours en réponse à l'insuline/IGF1 dans le muscle squelettique accroît la synthèse protéique tout en diminuant la dégradation [176] ; mTORC1, par l'induction de la synthèse protéique et l'inhibition de l'autophagie, serait un des principaux éléments contribuant à l'effet orexigène de l'insuline/IGF1.

Des mutations dominantes négatives rares d'Akt2 sont retrouvées dans des histoires familiales de diabète génétique [177]. De plus, la signalisation d'Akt est atténuée dans l'insulino-résistance qui fait partie de la pathogenèse dans le diabète de type 2 ; cette résistance à l'insuline peut en partie s'expliquer par une activation chronique des voies de rétrocontrôle négatif de la voie PI3K-Akt.

Fonctions des isoformes d'Akt plaquettaires

La recherche de polymorphismes génétiques sur des gènes codant pour des protéines de la signalisation plaquettaire retrouve plusieurs gènes associés à une dysfonction des plaquettes humaines, dont le gène codant pour Akt2 (Jones CI *et al*, Blood 2009). De plus, des études réalisées *ex vivo* chez l'Homme ou à partir de modèles murins permettent de mieux comprendre la contribution des différentes isoformes d'Akt à la fonction plaquettaire.

Ainsi, chez la souris, la délétion d'Akt1 est à l'origine d'un allongement du temps de saignement *in vivo*, et d'une altération des fonctions d'agrégation et de sécrétion en réponse à la thrombine ou au

collagène *in vitro*. De plus, les anomalies de l'agrégation plaquettaire, de la liaison du fibrinogène, de la sécrétion d'ADP et de la mobilisation des stocks calciques, en réponse à la thrombine suggèrent un impact précoce de l'absence d'Akt1 sur les voies de signalisation plaquettaires [172] [58].

De même, la délétion d'Akt2 chez la souris montre une altération de la fonction plaquettaire caractérisée par un défaut de la liaison au fibrinogène et une sécrétion diminuée des granules α et denses, secondaire à la stimulation par la thrombine [89]. Néanmoins, ce défaut mis en évidence *in vitro* n'est pas suffisant pour empêcher l'hémostase car le temps de saignement à la queue de ces souris KO Akt2 n'est pas modifié. Enfin, étant donné qu'aucune anomalie de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène n'a été constatée chez les souris KO Akt2 ; les auteurs ont estimé que la perte d'Akt2 pouvait être compensée par la présence d'Akt1, spécifiquement pour cet agoniste [89]. La phosphorylation d'Akt1 pourrait être préférentiellement activée par les voies de signalisation induite par le collagène.

De plus, les délétions combinées en Akt1(+/-) et Akt2(-/-) suggèrent que ces 2 isoformes ont des fonctions partiellement redondantes dans l'activation plaquettaire chez la souris [178].

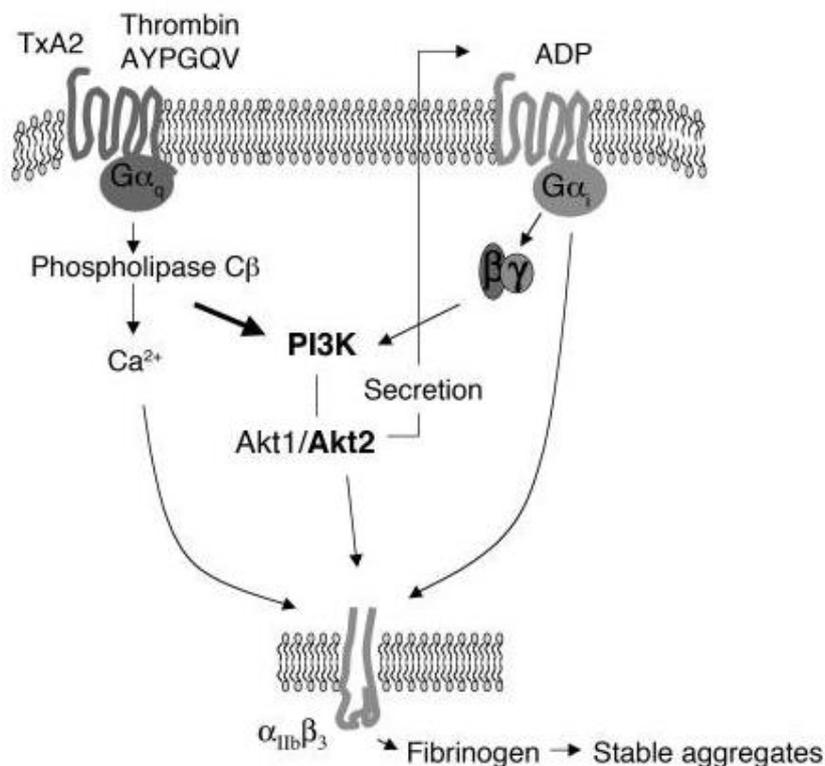


Figure 29 : Rôle d'Akt dans l'agrégation plaquettaire chez la souris [89]. Akt est activée selon une voie dépendante de la PI3K par le TxA2 ou la Thrombine ; cette activation favorise la sécrétion d'ADP

contenu dans les granules denses. La stimulation secondaire des récepteurs P2Y12 amplifie l'activation d'Akt et améliore la formation et la stabilisation des agrégats.

Chez l'Homme, il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteur d'Akt1 ou 2 *in vitro* réduisait l'agrégation plaquettaire, suggérant un rôle similaire pour d'Akt. Ces résultats restent critiquables dans le sens où la spécificité de ces inhibiteurs n'est pas encore parfaitement démontrée [179].

Ainsi, malgré les années de recherche, le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) Akt impacterait l'activation plaquettaire reste(nt) assez mal caractérisé(s). Ce qui semble le plus admis serait le lien entre Akt et la sécrétion plaquettaire des granules α et/ou denses, cependant, le mécanisme spécifique par lequel Akt régule la fonction sécrétoire des plaquettes reste à définir, ainsi que les substrats impliqués [85]. Autre point pour lequel les chercheurs semblent s'accorder : le rôle d'Akt dans la régulation de la fonction de l'intégrine α IIb β 3 qui est soumise à 2 modes de régulation, « inside-out » et « outside-in », mais là encore, la séquence d'événements cellulaires n'est pas précise [85].

Ainsi, bien que l'implication d'Akt dans la régulation de l'activation plaquettaire ne soit pas contestée, le mécanisme précis, probablement multifactoriel, par lequel Akt agit reste à définir.

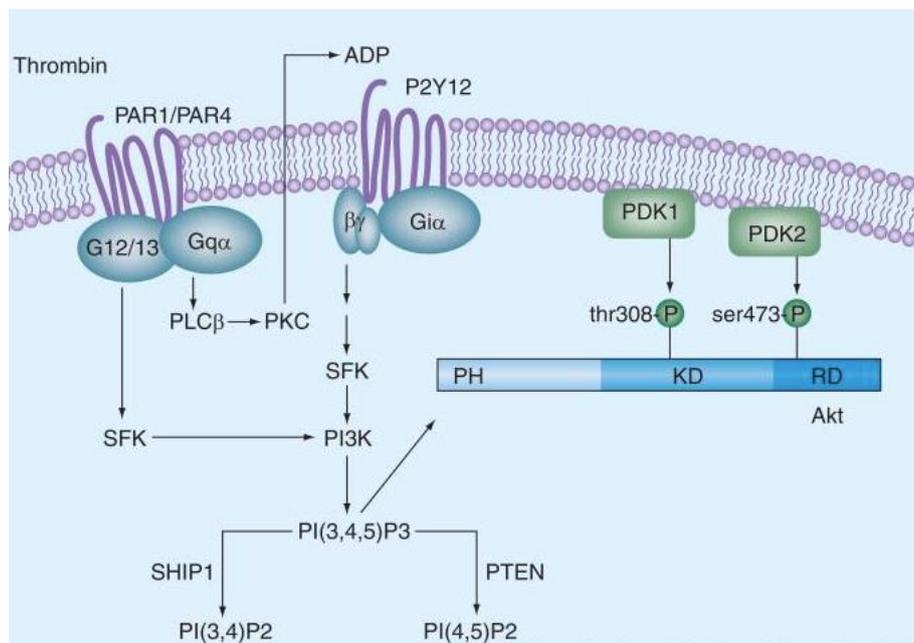


Figure 30 : Mécanismes supposés de l'activation d'Akt par la thrombine, l'ADP et le TxA2 dans les plaquettes humaines [85]. Ces agonistes induisent la production de PI(3,4,5)P3 dépendante de PI3K. PLC : phospholipase C, SFK : Src family protein, SHIP : Src homology 2-containing inositol phosphatase.

Anomalies plaquettaires congénitales

Compte tenu du rôle des plaquettes sanguines dans l'hémostase primaire et la coagulation, toute altération de la fonction plaquettaire est associée à une symptomatologie hémorragique de sévérité variable typiquement cutanéomuqueuse. Il peut s'agir d'un purpura, d'ecchymoses spontanées ou faciles, de métroménorragies, de gingivorragies spontanées ou au brossage, d'épistaxis récidivants, et plus rarement d'hématomes.

Le caractère acquis, de loin le plus fréquent, est évoqué devant l'absence d'antécédents personnels ou familiaux et la nature relativement brutale de la symptomatologie fonctionnelle ; au contraire, les atteintes constitutionnelles sont beaucoup plus rares, de survenue précoce dans la vie de l'individu et présentent une composante familiale.

Concernant les pathologies plaquettaires héréditaires, elles peuvent être i) quantitatives, ceux sont les thrombopénies constitutionnelles, ou ii) qualitatives, ceux sont les thrombopathies constitutionnelles, voire iii) les deux à la fois.

Les thrombopénies constitutionnelles

Il s'agit avant tout d'un groupe de pathologies chroniques rares, de prévalence méconnue, pour lesquelles la numération plaquettaire est inférieure à 150 G/L et dont l'origine constitutionnelle n'est envisagée qu'après avoir exclu les principales étiologies de thrombopénies acquises.

L'histoire familiale hémorragique commune constitue un élément d'orientation probant, de même la notion de consanguinité oriente vers ces maladies à transmission autosomique récessive. Enfin, l'existence d'anomalies extra-hématologiques fait également partie de la cohorte d'éléments diagnostiques, rendant d'ailleurs la thrombopénie plus ou moins accessoire au sein d'un syndrome polymalformatif. Un autre argument robuste est la réponse cortisonique ou aux immunoglobulines intraveineuses ; en effet, contrairement au purpura auto-immun, première cause de thrombopénie isolée de l'enfant, les thrombopénies constitutionnelles répondent peu/pas aux traitements immunomodulateurs alors que les transfusions de plaquettes ont toute leur place.

L'expression clinique de ces thrombopénies constitutionnelles dépend bien évidemment du diagnostic mais reste malgré tout extrêmement variable d'un individu à l'autre, y compris au sein d'une même famille. De plus, la corrélation entre l'expression hémorragique déjà évoquée (cutanéomuqueuse, précoce, etc...) et la numération plaquettaire n'est pas obligatoire. Enfin, l'examen clinique doit également rechercher un retard staturopondéral et/ou mental, une surdité, un syndrome dysmorphique. L'ensemble de ces éléments conduit à des explorations à visées étiologiques, telles qu'un bilan biologique, osseux, cardiaque, ORL, rénal, ou psychomoteur. L'hémogramme permet d'apprécier directement le morphotype des plaquettes ainsi que de mesurer leur taille ; ce dernier paramètre traduit en Volume Plaquettaire Moyen (VMP) est actuellement le critère le plus utilisé pour le classement de ces thrombopénies. Au laboratoire la thrombopénie sera définie comme macrocytaire au-delà d'un VMP à 11 fL, normocytaire pour un VMP entre 7 et 11 fL inclus, ou microcytaire pour tout VMP < 7 fL. Cette mesure est associée à une formule plaquettaire et une recherche d'anomalies morphologiques des autres lignées hématopoïétiques. Ainsi, en dépit de la grande hétérogénéité clinique et biologique, et de la méconnaissance de certains mécanismes physiopathologiques, l'orientation diagnostique est basée en premier lieu sur l'existence de signes extra-hématologiques puis, devant leur absence, sur l'estimation du VMP et la recherche d'une thrombopathie associée.

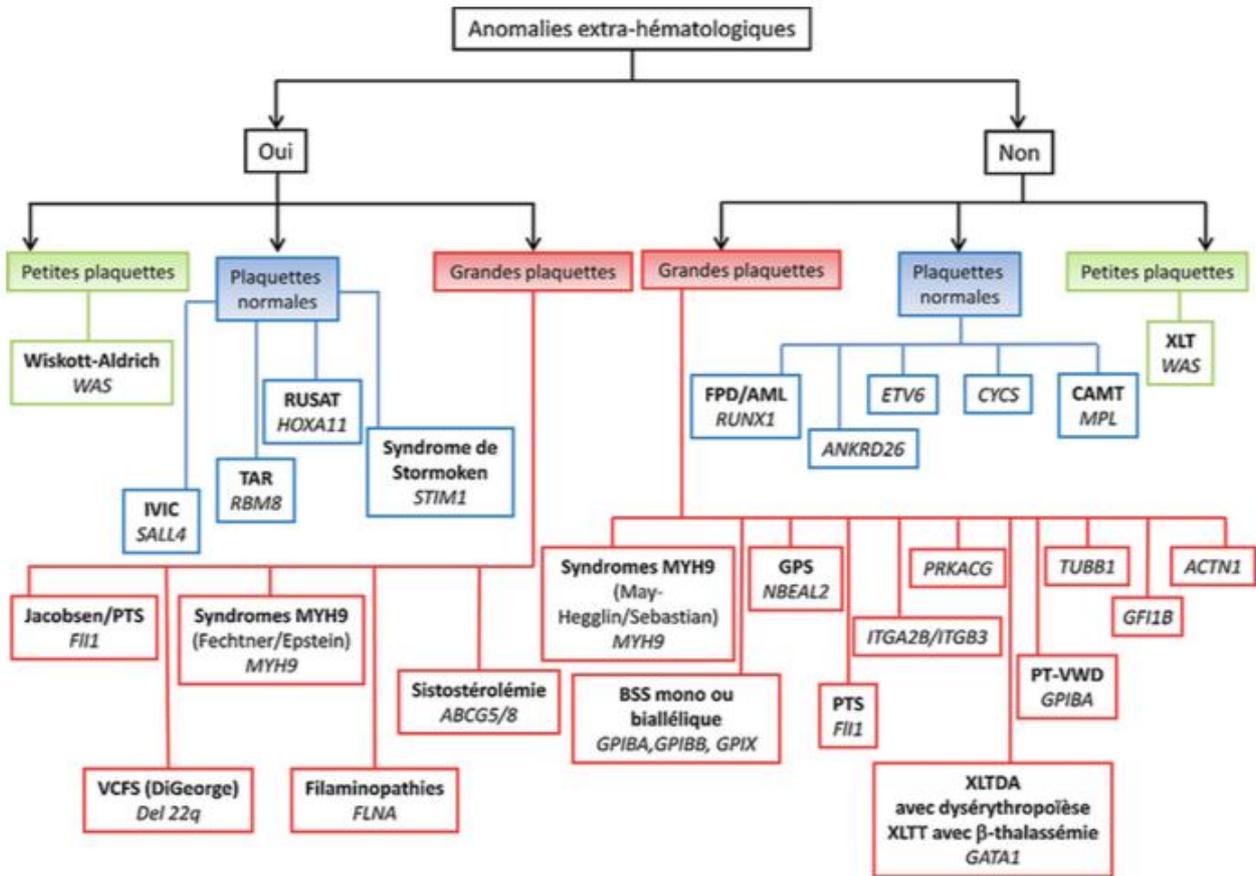


Tableau II : Algorithme diagnostique d'une thrombopénie constitutionnelle associant la présence d'anomalies extra-hématologiques et la taille des plaquettes [180].

Actuellement, plus d'une vingtaine de gènes ont été identifiés comme responsables de thrombopénies constitutionnelles et décrits comme acteurs importants de certaines phases de la mégacaryopoïèse, telles que la phase précoce, l'endomitose ou l'étape plaquettoène.

Les thrombopénies causées par un défaut de la phase précoce de la mégacaryopoïèse

Elles partagent toutes un défaut quasi-complet de mégacaryopoïèse, et concourent à une thrombopénie précoce majeure associée à des concentrations sériques de TPO très élevés.

La thrombopénie par amégacaryopoïèse congénitale : CAMT

Elle est due dans plus de 60 % des cas à une mutation du récepteur de la TPO, *MPL* ; de transmission autosomique récessive, elle est associée à un risque hémorragique majeur et d'évolution vers l'aplasie médullaire. Il existe plusieurs variants rattachés à des niveaux de thrombopénie plus ou moins profonde mais l'aplasie est quasi-systématique [181].

La thrombopénie avec absence de radius : TAR syndrome

Le tableau hématologique est relativement proche de celui de la CAMT, avec une thrombopénie majeure et des saignements précoces, mais qui tendent à se normaliser avec l'âge. Le signe pathognomonique est l'absence bilatérale de radius, pouces présents, ainsi que dans 15 à 30 % des cas, une atteinte cardiaque. Le gène qui semble atteint est *RBM8A*, mais son rôle dans la mégacaryopoïèse n'est pas encore complètement décrit [182].

La thrombopénie avec amégacaryopoïèse et synostose radio-ulnaire : RUSAT

Transmise sur un mode autosomique dominant, la RUSAT est due à la mutation du gène *HOXA1*. D'un point de vue biologique, la RUSAT se rapproche de la CAMT et d'un point de vue clinique, la RUSAT présente un signe pathognomonique comme le TAR syndrome, à savoir une synostose radio-ulnaire.

Les thrombopénies causées par une anomalie de la phase d'endomitose des mégacaryocytes

Les thrombopénies d'intensité variables sont associées à un défaut de maturation nucléaire des mégacaryocytes et un risque de développement d'hémopathies.

La thrombopénie familiale avec prédisposition aux leucémies aiguës : FPD/AML

Le gène impliqué dans cette thrombopénie est *RUNX1* qui correspond à un facteur de transcription du complexe CBF, Core Binding Factor, responsable de la répression du gène *MYH10* codant pour une myosine impliquée dans la transition entre les stades mitotique et endomitotique. Dans le mégacaryocyte anormal, cette protéine MYH10 reste exprimée ce qui produit des mégacaryocytes hypoploïdes, de petite taille et pauvres en granules α . Par ailleurs, ce type de thrombopénie modérée est associé avec un sur risque de développer une hémopathie, type syndrome myélodysplasique (SMD) ou leucémie aiguë (LA).

La thrombopénie Paris-Trousseau (TCPT) et le syndrome de Jacobsen (JBS)

Ces thrombopénies correspondent à l'expression de 2 variants de délétion d'un même facteur de transcription mégacaryocytaire FLI1 impliqué dans la différenciation mégacaryocytaire. D'un point de vue morphologique, ceux sont des macrothrombopénies donc des grandes plaquettes contenant 1 granule α géant et aucun granule dense [183]. D'un point de vue clinique, le JBS combine retards psychomoteur et staturopondéral, anomalies cardiaques et malformations des doigts et de la face.

La thrombopénie liée à ETV6

ETV6, comme FLI1, correspond à un facteur de transcription de la famille ETS se comportant comme un répresseur et pour lequel au moins 4 variants sont identifiés dans des familles thrombopéniques et présentant une hémopathie touchant la lignée érythroblastique [184].

Les thrombopénies avec mutation de GATA1

Comme précédemment évoqué dans le premier chapitre sur la mégacaryopoïèse, GATA1 correspond à un facteur de transcription clé des différenciations érythrocytaire et mégacaryocytaire du fait de son action sur le progéniteur commun CMP. Les variants de GATA1 entraînent des thrombopénies liées au chromosome X avec des signes de dysérythropoïèse (XLTD) ou de β -thalassémie (XLTT) ; des signes de dysmégacaryopoïèse avec altération de la structure et des certaines fonctions plaquettaires peuvent être associés.

La thrombopénie par mutation sur le gène GFI1B

Encore un facteur de transcription agissant comme un répresseur nécessaire à la différenciation des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire. Des mutations de GFI1B ont été retrouvées dans des familles combinant une macrothrombopénie et des signes de dysmégacaryopoïèse, notamment des fonctions plaquettaires anormales et une diminution du contenu en granules α .

La thrombopénie liée à ANKRD26

Le complexe RUNX1/FLI1 est un répresseur de l'expression de l'ankyrine D26 qui est une étape nécessaire à la formation des proplaquettes. Les mutations connues du gène codant pour ANKRD26 sont localisées en 5'UTR juste niveau du site de liaison de RUNX1/FLI1 et sont à l'origine de la persistance de l'expression de l'ANKRD26 et de l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK1-2 induite par la TPO. Il en résulte une thrombopénie modérée à sévère avec de nombreux

mégacaryocytes de petite taille et hypolobulés [185]. Ces thrombopénies sont également associées à un risque accru de développer une hémopathie, type leucémie aiguë myéloïde (LAM) [186].

Le syndrome des plaquettes grises (GPS)

Il correspond à un syndrome hémorragique très rare, modéré à sévère, associant une macrothrombopénie chronique et un déficit en granules α , conférant un aspect caractéristique aux plaquettes en coloration en May-Grünwald-Giemsa (MGG). L'anomalie moléculaire en cause, transmise sur un mode autosomique récessif le plus souvent, est une protéine à domaine BEACH codée par le gène *NBEAL2* et dont le rôle dans la biogenèse des granules α n'est pas parfaitement identifié [187].

Le syndrome oculo-oto-radial (IVIC)

Il s'agit d'un syndrome malformatif rare à transmission autosomique dominante, de pénétrance variable, causé par des mutations sur le gène *SALL4* dont le trait le plus constant est une courbure radiale avec des malformations des doigts (triphalangisme, anomalie du pouce), des os du carpe et du radius/cubitus. La thrombopénie est secondaire et légère.

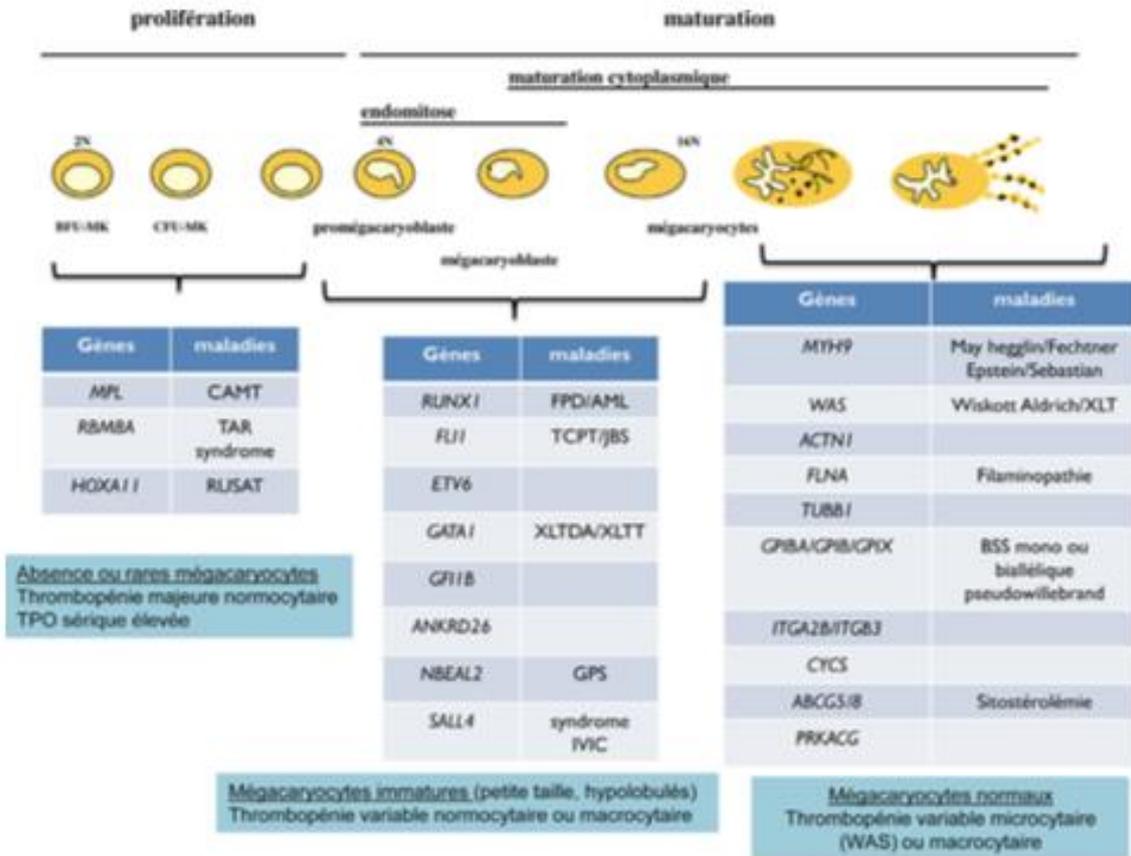


Figure 31 : Gènes impliqués dans les thrombopénies en fonction des différentes étapes de la mégacaryopoïèse [180].

Les thrombopénies causées par un défaut de la plaquettopogenèse

Alors que les mégacaryocytes médullaires et leur maturation sont quasi-normaux, c'est la formation des proplaquettes qui se trouve altérée dans ce type de thrombopénie. Concernant les gènes responsables, ils sont, pour leur grande majorité, en lien avec des protéines du cytosquelette.

Le syndrome MYH9

Il s'agit en fait d'un ensemble de différents syndromes qui combine de façon systématique, une macrothrombopénie, un syndrome hémorragique modéré et la présence d'inclusions leucocytaires de taille variable appelées corps de Döhle. Puis selon le cas, une surdité, une néphropathie et/ou une cataracte peuvent être associées. Le gène Myosin Heavy Chain 9 (*MYH9*) est le seul gène responsable de ces syndromes et plus d'une quarantaine de mutations différentes ont été recensées ; sa transmission se fait sur un mode autosomique dominant, avec toutefois plus d'un tiers

de cas sporadiques [188]. *MYH9* code pour la chaîne lourde de myosine IIA non musculaire (NMMHC-IIA) qui correspond à une protéine motrice contractile du cytosquelette impliquée dans les phénomènes de migration, de cytokinèse et de maintien de la forme cellulaire.

Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) et la thrombopénie liée à l’X (XLT)

Les thrombopénies de ces 2 entités sont modérées à sévères, mais surtout elles sont à microplaquettes (VMP < 7 fL). Les WAS ont souvent un déficit immunitaire associé avec une susceptibilité aux infections, à l’eczéma, aux maladies auto-immunes et aux lymphomes non hodgkiniens ; c’est le niveau d’expression résiduel de la protéine responsable WASp, spécifique des cellules hématopoïétiques et impliquée dans la polymérisation de l’actine, qui conditionne le tableau clinique [189]. La transmission se fait sur un mode autosomique récessif et lié à l’X.

Le nombre et la morphologie de mégacaryocytes médullaire ne sont pas altérés, le défaut de la plaquetto-genèse s’explique par un relargage prématuré des plaquettes dans la moelle osseuse où elles sont alors phagocytées par les macrophages [190].

La thrombopénie liée à l’ α -actine 1 (ACTN1)

La protéine α -actine 1 participe à l’organisation du cytosquelette ; elle est donc impliquée dans la formation des proplaquettes. Des mutations du gène *ACTN1* ont été mises en évidence chez des patients présentant une macrothrombopénie associée à un syndrome hémorragique mineur.

La thrombopénie liée à TUBB1

La tubuline β 1 est la seule tubuline β présente dans les mégacaryocytes ; elle lie la tubuline α et constitue les microtubules. Il n’y a pas réellement d’anomalies fonctionnelles mais uniquement une altération de la formation des proplaquettes qui est à l’origine d’une thrombopénie à grandes plaquettes [191].

Le syndrome de Bernard-Soulier

Il s’agit encore d’un ensemble de syndromes selon que la mutation est mono ou bi-allélique sur les gènes *GPIBA*, *GPIBB*, ou *GPIX* qui codent pour des protéines du complexe GP1b-IX-V liant le FvW et assurant l’adhésion des plaquettes au sous-endothélium lors d’une brèche vasculaire. Bien que le mécanisme de la thrombopénie ne soit pas parfaitement décrit, il serait là encore lié à un défaut de formation des proplaquettes du fait d’un défaut d’interaction du complexe GP1b-IX-V avec le cytosquelette [192].

De plus, cette macrothrombopénie à plaquettes géantes est associée à une thrombopathie puisque les plaquettes présentent une diminution voire une absence totale d'agglutination à la ristocétine, du fait d'une anomalie de la GP1b. La symptomatologie clinique est précoce et modérée à sévère et ces défauts sont transmis sur un mode autosomique récessif.

Le syndrome de Di George ou syndromes vélo-cardio-faciaux (VCFS)

Ces syndromes sont relativement fréquents (environ 1/4000 naissances) et caractérisés par une dysmorphie faciale typique, des malformations cardiaques et vasculaires, une hypoplasie thymique et des parathyroïdes responsable d'un déficit de l'immunité cellulaire et d'une hypocalcémie. L'anomalie responsable est une délétion hémizygote d'une région chromosomique portant le gène *GP1BB*, à l'origine d'une macrothrombopénie comparable au syndrome de Bernard-Soulier. Le tableau extra-hématologique est fonction de la taille de la région délétée.

La maladie de pseudo-Willebrand plaquettaire (PT-VWD)

D'un point de vue fonctionnel, elle correspond à une maladie hémorragique comparable à une maladie de Willebrand de type 2B mais l'élément moléculaire en cause résulte d'une mutation gain de fonction du gène *GP1BA* responsable d'une augmentation de l'affinité du FvW pour le complexe GP1b-IX-V. La liaison spontanée du complexe GP1b-IX-V aux hauts poids moléculaires de FvW entraîne une accélération de leur clairance ; le test diagnostique d'agglutination plaquettaire aux faibles doses de ristocétine (0,5 mg/mL) repose d'ailleurs sur cette propriété.

L'affection est transmise sur un mode autosomique dominant, génère une macrothrombopénie parfois fluctuante, et témoigne de l'importance de l'interaction entre le complexe GP1b-IX-V et le FvW dans la maturation des mégacaryocytes.

Les thrombopénies liées à ITGA2B/ITGB3

Ces gènes codent pour les sous-unités GPIIb et GPIIIa de l'intégrine α IIb β 3 ; leur mutation conduit à un déficit quantitatif ou fonctionnel responsable de la thrombasthénie de Glanzmann, thrombopathie sans thrombopénie. C'est une maladie rare, mais dont l'incidence augmente dans les communautés à fort taux de consanguinité, telles que les populations manouches qui porte une mutation commune, dite gypsy [193].

La thrombopénie liée à CYCS

La voie apoptotique intrinsèque liée au relargage du cytochrome c (CYCS) des mitochondries est essentielle à la formation des proplaquettes [194]. Deux variants de CYCS ont été décrits associés à des thrombopénies [195] [196].

Thrombopathies constitutionnelles

La démonstration de l'existence de thrombopathies constitutionnelles liées à des défauts de signalisation intracellulaire est relativement récente et compliquée par la difficulté de mise en évidence de ces défauts de signalisation [197]. En effet, ces difficultés s'expliquent d'une part, par la richesse de la signalisation intraplaquettaire, parfois redondante, ou possiblement compensée, et d'autre part, par la disponibilité des outils d'exploration cellulaire et/ou moléculaire.

Anomalies des protéines impliquées dans les propriétés adhésives des plaquettes et la stabilisation de leur agrégation

Les mutations responsables de défauts qualitatifs et/ou quantitatifs des récepteurs plaquettaires ont une expression hémorragique parfois sévère ; elles ont déjà été évoquées précédemment car elles sont également pourvoyeuses de thrombopénies. C'est le cas du syndrome de Bernard-Soulier, de la pseudo-maladie de Willebrand plaquettaire et de la thrombasthénie de Glanzmann.

Pathologies liées à un défaut de l'initiation de l'activation plaquettaire

Défaut de récepteurs membranaires

Récepteur P2Y₁₂ à l'Adénosine Diphosphate (ADP)

L'ADP est sécrétée lors de l'activation plaquettaire, puis agit de façon autocrine et paracrine *via* les récepteurs membranaires purinergiques P2Y₁, couplés G_q et responsables d'une mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire à l'origine du changement de forme des plaquettes, et P2Y₁₂, couplés G_i et impliqués dans les variations des taux d'AMPc, véritable senseur de l'activation plaquettaire [198].

L'ADP participe aux étapes d'activation et d'agrégation plaquettaires et joue également un rôle de potentialisateur de l'action d'autres agonistes plaquettaires.

Dans les quelques cas décrits et associés à une symptomatologie hémorragique, les anomalies moléculaires congénitales du P2Y₁₂, transmises sur un mode autosomique récessif sont responsables d'une diminution significative des sites de liaison à l'ADP attribuée i) à une diminution de la synthèse du récepteur [199] [200], ou ii) à une altération de la liaison ligand-récepteur [201], ou iii) à une anomalie du recyclage et/ou trafic intracellulaire du récepteur [202], ou encore iv) à un défaut de couplage du récepteur à sa protéine G [203].

Récepteur GPVI au collagène

La GPVI est le récepteur du collagène sur les membranes plaquettaires, impliqué notamment dans les étapes d'adhésion et d'activation plaquettaires. Chez l'Homme, les déficits en GPVI sont rares, associés à une symptomatologie hémorragique légère et davantage retrouvés dans des contextes acquis, notamment dysimmunitaires.

Les premiers déficits décrits correspondent à des cas de mutations hétérozygotes composites associées à une diminution de l'expression de GPVI et une altération de sa fonctionnalité. Ainsi, chez une fillette de 10 ans, les auteurs ont mis en évidence 2 anomalies génétiques : une mutation ponctuelle dans l'Ex3 sur un allèle, combinée à une insertion de 5 nucléotides dans l'Ex4 de l'autre allèle [204]. De même, chez un autre patient, une délétion sur un allèle combiné à une mutation non-sens sur l'autre allèle ont été décrites [205]. Plus récemment, des mutations homozygotes ont été retrouvées dans une petite cohorte de patients chiliens non issus d'une même famille [206].

Récepteur au TxA₂

Le TxA₂ produit par les plaquettes agit de façon autocrine sur les récepteurs TP spécifiques et exprimés à la membrane plaquettaire ; il participe à l'activation des plaquettes *via* l'induction de la PLA₂ et Rho.

Actuellement, un défaut quantitatif responsable d'une diminution de l'expression du récepteur TP [207], ainsi que 3 anomalies qualitatives provoquées par des substitutions d'acides aminés sur le récepteur TP [208] [209] [210] ont été décrits. Ces variants naturels, associés à une symptomatologie hémorragique modérée, ont ainsi permis de définir des acides aminés particulièrement importants pour la fonctionnalité du récepteur au TxA₂. C'est le cas de l'Arginine 60, impliquée dans le couplage du récepteur à sa protéine G [208], de même l'Aspartate 304, critique pour la liaison du ligand à son récepteur [203], ou le Tryptophane 29 du premier domaine transmembranaire nécessaire à l'expression du récepteur à la surface plaquettaire [210]. Un autre acide aminé, l'Asparagine en

position 42, est également responsable d'une diminution de l'expression du récepteur à la surface membranaire et associé à un saignement chez le patient pour lequel cette anomalie hétérozygote a été décrite [211].

Défaut des voies de signalisation

Protéines G et régulateurs

Les plaquettes humaines portent à leur membrane de nombreux RCPG différemment couplés aux protéines G, $G_{i/z}$, G_s , G_q ou $G_{12/13}$; la littérature rapporte un certain nombre de cas de mutations touchant ces protéines G, ou certains de leurs régulateurs, et associés à des histoires hémorragiques ou thrombotiques.

Par exemple, la sous-unité α de G_s , codée par le gène *GNAS* et transmettant un signal positif vers l'adénylate cyclase à l'origine d'une augmentation de l'AMPc, est retrouvée mutée dans des familles de patients où un phénotype de polyendocrinopathie domine plus largement. Toutefois, les tests fonctionnels *ex vivo* probants servent davantage à étoffer la caractérisation de ces syndromes plus qu'à démontrer les réelles conséquences hémorragiques ou thrombotiques de ces mutations [212].

De même, une mutation hétérozygote familiale sur la Glycine 23 de RGS2 (Regulator of G-protein signaling 2), un membre des protéines RGS régulatrices de l'activité GTPasique intrinsèque des sous-unités α des protéines G, conduit à une diminution de l'activité G_s et de la production d'AMPc, ainsi qu'à une anomalie de la formation des plaquettes et un risque thrombotique [213].

PLC β

La PLC existe sous plusieurs isoformes réparties en 3 types : PLC β , PLC γ , et PLC δ ; dans les plaquettes, se trouvent au moins 7 isoenzymes de PLC. La PLC β 2 est l'isoforme majoritaire, suivie par la PLC γ 2 ; la PLC β 2 est activée en aval des protéines G_q des récepteurs TP α , PAR1 ou P2Y1 et contribue à la production des seconds messagers DAG et IP3 plaquettaires.

L'étude d'une patiente et son fils, présentant notamment des saignements modérés, une altération de l'agrégation plaquettaire et de la sécrétion de sérotonine, avait conduit à la mise en évidence de taux anormalement bas de l'ARNm de PLC β 2, spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire [214] [215]. Toutefois, le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) sous-jacent(s) restai(en)t à élucider mais tendai(en)t à démontrer qu'un défaut de l'expression de protéines spécifiques de voies de signalisation intraplaquettaires puissent en partie expliquer une symptomatologie hémorragique.

CalDAG-GEF1

Le gène *RASGRP2* code pour le facteur d'échange de guanine de la GTPase Rap1 ; des études chez l'animal ont démontré que cette protéine était un régulateur essentiel de la signalisation inside-out des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ plaquettaires [216]. A ce jour, plusieurs mutations de *RASGRP2* ont été décrites ; la plus récente est une conversion de la Glycine 305 en Aspartate affectant, à la fois l'expression et la fonction de CalDAG-GEF1 et responsable de saignements sévères nécessitant notamment le recours à la transfusion de plaquettes ou de facteur VIIa [217].

Kindline

La kindline participe à la régulation de la signalisation « inside-out » plaquettaire ; en se fixant à l'extrémité cytoplasmique de la sous-unité β3 , elle agit comme un coactivateur, ou comme une protéine de conformation de la taline1 et/ou d'autres molécules de liaison. Chez l'Homme, la perte de fonction de la kindline conduit à une dysfonction non seulement plaquettaire, mais également leucocytaire, puisqu'elle participe également à l'activation des β intégrines leucocytaires. L'association de ces défauts leucocytaire et plaquettaire est identifiée comme un déficit immunitaire primitif de l'adhésion leucocytaire de type III (LADIII) et intéresse le gène *FERMT3* (fermitin family homolog 3), situé sur le chromosome 11 et codant pour la kindline3.

Pathologies liées à un défaut d'amplification de l'activation plaquettaire

Défauts de granules plaquettaires

Ce groupe de thrombopathies est relativement hétérogène puisqu'il peut intéresser l'une ou l'autre des étapes de la genèse des granules, leur chargement, leur stabilité ou leur sécrétion ; les répercussions au contraire sont communes avec un syndrome hémorragique.

Défauts des granules α

Il est dominé par le syndrome des plaquettes grises déjà évoqué ci-dessus.

Il existe d'autres syndromes extrêmement rares associant divers atteintes systémiques et affectant les granules α , tels que le syndrome ARC pour Arthrogrypose-Insuffisance rénale-Cholestase [218], le syndrome des plaquettes Québec [219] et le syndrome de Paris-Trousseau [220].

Défauts des granules denses ou syndrome du pool vide

Là encore, il s'agit de thrombopathies très rares caractérisées par une absence de granules denses intraplaquettaires qui contribue à un syndrome hémorragique modéré. Il existe différentes formes de maladies du pool vide : i) quantitatives ou ii) qualitatives, c'est-à-dire avec un nombre normal de granules denses mais des contenus anormaux ou non fonctionnels, qui peuvent être isolées ou associées à d'autres pathologies héréditaires, comme c'est le cas pour le syndrome de Hermansky-Pudlak ou de Chédiak-Higashi [221].

Défaut de l'activité procoagulante des plaquettes

L'activité procoagulante des plaquettes est assurée par leur capacité à exposer les phosphatidylsérines (PS) sur le feuillet externe de leur membrane plasmique lors de l'activation plaquettaire. Ces derniers servent d'ancrage aux facteurs Va et Xa de la coagulation et contribuent ainsi à la génération de thrombine. La propriété de redistribuer les PS membranaires est rendue possible grâce à une protéine à activité scramblase dépendante du Ca^{2+} , TMEM16F [18] [19] [222].

Le syndrome de Scott, caractérisé par des saignements du post-partum ou post-opératoires sévères, est responsable d'une diminution de l'activité procoagulante des plaquettes du fait de la non exposition des PS au feuillet externe des plaquettes. Cette perte de fonction est due à une mutation dans le gène TMEM16F qui génère des protéines tronquées dans leur région N-Terminale incapables d'assurer la fonction scramblase plaquettaire.

Introduction du travail

Le laboratoire d'Hématologie, qui est également Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires depuis 2005 (renouvelé en décembre 2017), reçoit de nombreux cas de patients nécessitant l'exploration de la fonction plaquettaire dans son ensemble, afin de définir l'existence, ou pas, d'une anomalie congénitale à l'origine d'une thrombopénie ou d'une thrombopathie. Ces anomalies présentent une très grande diversité ; elles peuvent être isolées, ou au contraire, associées à tout un cortège de signes hématologiques ou extra-hématologiques, comme abordé dans le chapitre V de l'introduction bibliographique. Dans tous les cas, ces pathologies plaquettaires sont des troubles rares. Ils sont toutefois progressivement mieux identifiés grâce à une meilleure connaissance de la mégacaryopoïèse et des constituants plaquettaires, une meilleure exploration des fonctions plaquettaires et enfin, la constitution d'arbres diagnostiques plus précis. En effet, selon la nature de l'anomalie identifiée, différents groupes sont définis tels que les anomalies de la production, de l'agrégation, de la sécrétion ou de l'adhésion plaquettaires.

A l'initiative du Professeur Sié, un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC1206808) destiné à développer et standardiser une approche de dépistage des anomalies de signalisation en aval des récepteurs d'agonistes plaquettaires majeurs, applicable en pratique clinique, a été déposé en 2012, et suivi des premières inclusions en 2013. Il s'agit d'une étude diagnostique pilote avec un recrutement prospectif de patients pour lesquels soit, une thrombopathie est parfaitement identifiée, soit l'anomalie plaquettaire de signalisation n'est pas identifiée mais doit être caractérisée.

Ce type de thrombopathie par anomalie de transduction du signal est rapporté de façon exceptionnelle et concerne jusqu'à présent des déficits enzymatiques de la voie de l'acide

arachidonique (cyclooxygénase et thromboxane synthase plaquettaires), des défauts au niveau de certaines protéines G [223] [213] [212], des anomalies du métabolisme des PIs par déficit en PLC β 2 [224], et plus récemment, un déficit en kindlin3, qui abolit l'activation « inside-out » des intégrines et reproduit ainsi le syndrome de Glanzmann sans déficit en intégrine α IIb β 3 [225] et CalDAG-GEFI qui régule la GTPase Rap1b, un régulateur majeur d' α IIb β 3 [226]. Le caractère exceptionnel de la description de ces thrombopathies dans la littérature internationale s'explique en partie par i) l'authentique rareté de ces pathologies, ii) leur expression clinicobiologique modérée, en partie liée à la redondance des voies de signalisation intraplaquettaires, et enfin iii) la difficulté de mise en évidence de l'anomalie suspectée par des tests biologiques dont l'écueil principal est d'exiger des volumes sanguins considérables et/ou d'être de mise en œuvre difficile.

L'objectif principal de ce PHRC était de développer et de valider une nouvelle approche standardisée de dépistage d'anomalies de signalisation en aval des récepteurs d'agonistes plaquettaires majeurs préalablement définis sur la base des connaissances de l'équipe INSERM U1048, dirigée par le Pr Payrastre. Ainsi, la technologie de CMF Multiplex Phosphoflow barcoding (BD Biosciences) a été adaptée pour cribler un certain nombre de conditions, agoniste *versus* agoniste + inhibiteur (cf. figure ci-dessous).

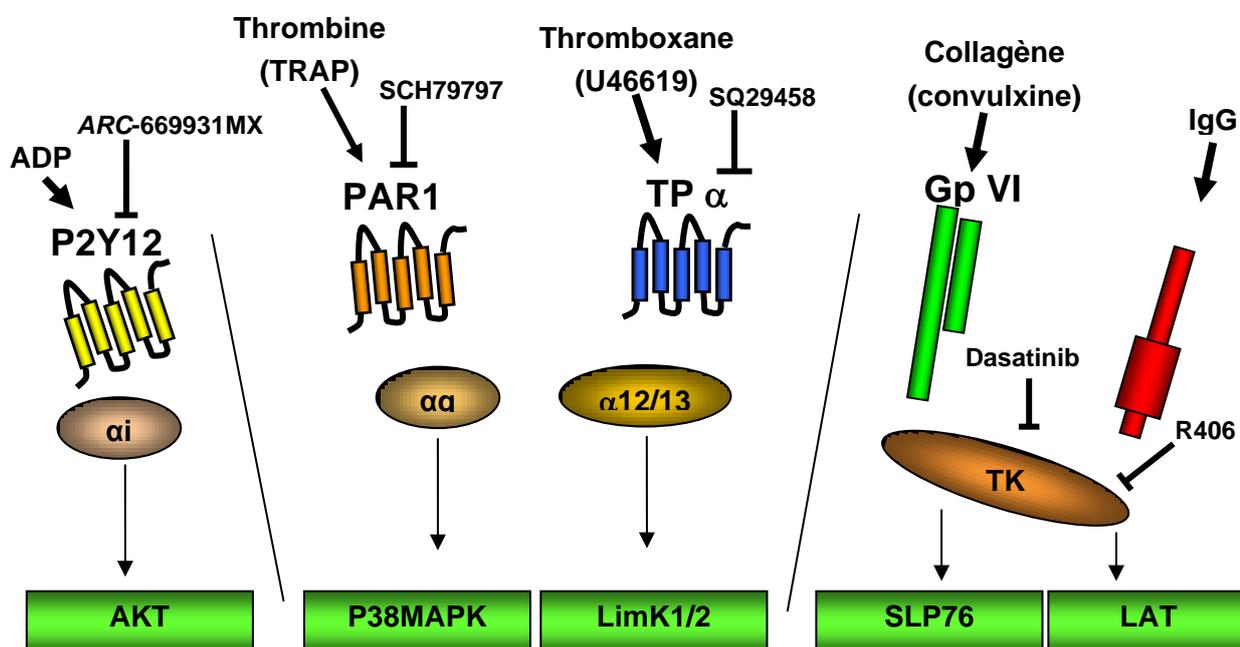


Figure 32 : Représentation schématique des marqueurs moléculaires validés en CMF en aval des principaux récepteurs plaquettaires (PHCR 1206808).

De plus, parmi les objectifs secondaires du PHRC, pour les cas de thrombopathies de diagnostic non identifié, et dans la mesure où des anomalies de signalisation étaient identifiées puis confirmées sur un prélèvement contrôle, il était prévu leur caractérisation.

C'est ainsi qu'une patiente que le Professeur Sié suit, depuis plus de 10 ans maintenant a finalement été testée pour rechercher un défaut dans une des voies de signalisation en aval des récepteurs PAR1 à la thrombine, P2Y12 à l'ADP, TP1 au TxA2 et GPVI au collagène. Madame Monique S., âgée de 65 ans est connue pour des troubles hémorragiques modérés secondaires à une dysfonction plaquettaire probable.

L'histoire hémorragique de la patiente se résume à une tendance hémorragique à type d'épistaxis fréquents, de gingivorragies, d'hématomes cutanés, de saignements dans l'enfance pour des blessures minimales, mais sans ménorragies après la puberté. De plus, elle a présenté des saignements importants suite à des avulsions dentaires et dans les suites opératoires d'une thyroïdectomie partielle. Enfin, elle a subi 3 épisodes hémorragiques graves, 2 hémorragies du post-partum et 1 accident de la voie publique avec traumatisme facial ayant entraîné une énoptalmie et une diplopie, qui ont nécessité le recours aux transfusions sanguines et plaquettaires. Par la suite, la tendance hémorragique de cette patiente s'est amendée ; la thyroïdectomie totale a été réalisée sous couverture transfusionnelle en plaquettes, sans complication. Ainsi, le score ISTH-BAT (Bleeding Assessment Tool of the International Society on Thrombosis and Haemostasis) est estimé à 13.

Les autres antécédents médicaux personnels de la patiente sont dominés par une spondylarthropathie ankylosante compliquée d'une aortite, pour laquelle elle est sous corticothérapie au long cours.

Enfin, la patiente ne rapporte pas d'antécédents familiaux, ni la notion de consanguinité au sein de la famille, suggérant une transmission plutôt sur un mode autosomique récessif.

Les tests de première intention réalisés au laboratoire et à plusieurs reprises, rapportent i) une numération plaquettaire normale, entre 250 et 350 G/L en moyenne, ii) l'absence de déficit en FvW ou en facteurs de la coagulation, et iii) un temps d'occlusion plaquettaire (TOP, PFA-100, Siemens Healthcare Diagnostics) normal, quelle que soit la cartouche testée, adrénaline ou ADP.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai eu l'occasion de participer aux tests de deuxième intention ; ces derniers, notamment la technique de Phosphoflow barcoding, nous amenaient à penser qu'il

pouvait y avoir une anomalie sur les protéines Akt à l'origine de la symptomatologie hémorragique et des troubles de l'hémostase au décours des épisodes aigus décrits.

Dans ce contexte, un autre de mes objectifs a été de mieux caractériser l'activation de chacune des isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines normales, préalablement stimulées par différents agonistes physiologiques. Les kits développés par la société Cisbio, basés sur des techniques de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), sont actuellement les seuls outils moléculaires permettant de suivre directement la phosphorylation activatrice des 3 isoformes d'Akt grâce à des anticorps très spécifiques de chaque isoforme. Cette étude a fait l'objet d'un partenariat avec la société Cisbio, ce qui nous a permis d'aller travailler directement sur leur site de R&D à Codolet (Gard) auprès du Dr S Bdioui qui nous a formés à l'utilisation des kits et nous les a fournis.

Les résultats obtenus nous ont permis de mieux caractériser l'activation des 3 isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines normales, ce qui nous permet d'envisager à présent d'explorer plus spécifiquement les protéines Akt de la patiente qui sera convoquée prochainement dans cet objectif.

Matériels & méthodes

Matériels

Prélèvements sanguins

Les échantillons de sang sont recueillis dans des tubes sous vide i) contenant 3,2 % de Citrate de Sodium pour les tests de fonctionnalité plaquettaire, ou ii) des tubes EDTA pour la numération et la morphologie plaquettaires (BD Vacutainer[®]).

Agonistes pour la stimulation des plaquettes

ADP (Sigma Aldrich), Collagène (Takeda) ou CRP (Collagen Related Peptide, Sigma Aldrich), Thrombine humaine (Mast Diagnostics) ou TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide–Mer14, Sigma Aldrich), analogue du TxA2 U46619 (Sigma Aldrich).

Trousses spécifiques

Les trousse de dosage de panAkt, Akt1, Akt2 et Akt3 proviennent de chez Cisbio.

Anticorps

Anticorps anti-PAC1 (BD Biosciences), anti-CD62P (BD Biosciences), anti-CD63 (BD Biosciences).

Méthodes

Préparation de plaquettes lavées

Le sang veineux anticoagulé sur citrate 0,109 M est mis à centrifuger 10 min à 200 g. Le PRP (Plasma Riche en Plaquettes) est remis en suspension dans du tampon tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, Glucose 5,5 mM, Hepes 5 mM, BSA 0,35 %, pH 7,4) supplémenté d'Apyrase 0,02 UI/mL. Les plaquettes lavées sont ensuite ajustées à une concentration spécifique selon les expériences à mener : $2,5 \cdot 10^8$ /mL pour la CMF et les agrégations plaquettaires, $3 \cdot 10^6$ /point pour les expériences d'HTRF.

HTRF® Akt total et isoformes Akt1, Akt2 et Akt3

L'HTRF (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence) est la technologie de dosage la plus fréquemment utilisée pour mesurer des analytes en phase homogène ; elle constitue d'ailleurs l'outil de choix dans les études de criblage à haut débit visant à déterminer de nouveaux candidats médicaments. Les tests HTRF sont généralement sensibles, robustes et miniaturisés (format de plaques 384 puits, volume réactionnel de 20 µL).

Cette technique combine la technologie de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology), avec la mesure en temps résolu (TR) de la fluorescence. Elle utilise des lanthanides de terres rares avec de longues demi-vies d'émission comme fluorophores donneurs.

Le principe de FRET repose sur le transfert d'énergie entre 2 fluorophores : i) un donneur de fluorescence à longue durée de vie, et ii) un accepteur de fluorescence de courte durée de vie. Cette approche permet de détecter les interactions moléculaires entre les biomolécules donneur et accepteur. En effet, lorsque les molécules sont proches l'une de l'autre ($d < 10$ nm), il y a transfert d'énergie entre les marqueurs fluorescents.

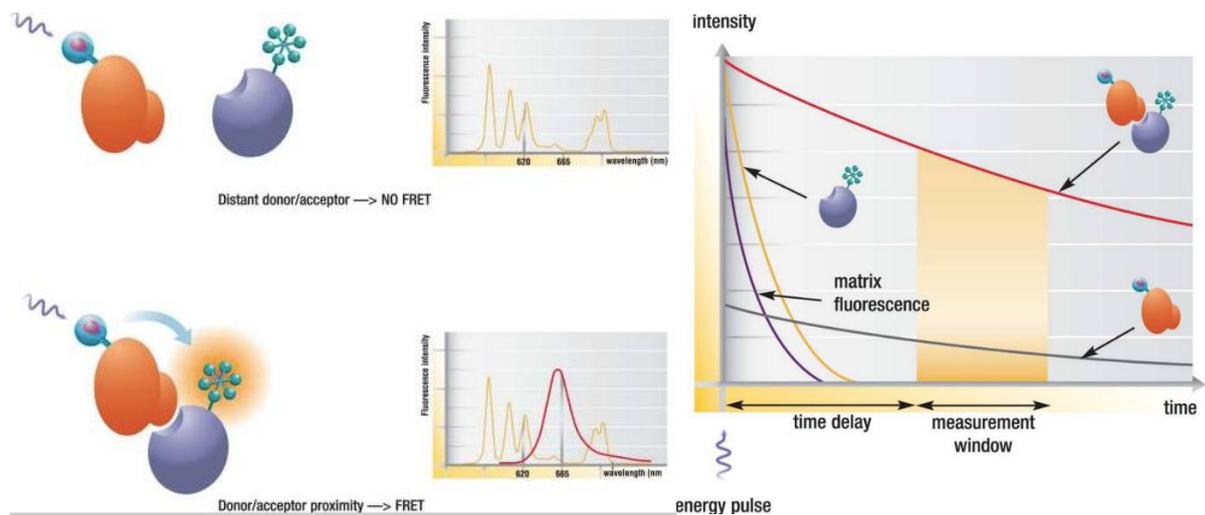


Figure 33 : Principe général du FRET : lorsque le donneur et l'accepteur sont séparés, il n'y a pas de signal FRET, une fois rapprochés, les signaux FRET sont générés (exemple émission à 665 nm). L'impulsion d'énergie provenant de la source d'excitation est suivie d'un délai, permettant à la fluorescence interférente de courte durée de vie de se désintégrer.
 Ligne rouge : intensité du signal FRET, ligne grise : émission du cryptate donneur à 620 nm, ligne jaune : signal fluorescent généré par les fluorophores accepteurs.

L'élément central donneur d'énergie est le cryptate d'Europium ; il s'agit d'un complexe d'ions de terres rares (Europium Eu^{3+}) étroitement intégré dans une structure cryptate. Ces ions ne sont pas fluorescents par eux-mêmes mais ont besoin d'une structure particulière pour être excités. Cette cage agit comme une antenne et permet à la fois la collecte d'énergie et le transfert d'ions, puis libère finalement cette énergie selon un spectre fluorescent spécifique. De plus, la structure de cette cage est maximisée par l'intégration d'ions fluorures qui empêchent le quenching des ions de terres rares par les molécules d'eau, ce qui accroît la stabilité des ions de terres rares, quelles que soient les conditions chimiques.

Les accepteurs d'HTRF ont été optimisés pour les donneurs de cryptate Europium et Terbium, et en particulier pour correspondre à leurs propriétés d'émission. La deuxième génération d'accepteurs d2 est caractérisée par des structures organiques 100 fois plus petites que le premier accepteur développé à partir d'un pigment d'algue rouge, mais affichant une série de propriétés photophysiques très proches. L'évaluation a également montré que le nouvel accepteur contribuait à une plus grande stabilité des tests immunocompétitifs, et dans certains cas, à une meilleure sensibilité du test.

Les partenaires de FRET doivent remplir plusieurs critères de compatibilité : premièrement, leurs spectres d'émission ne doivent pas se chevaucher, afin de pouvoir mesurer individuellement la

fluorescence de chacun des partenaires, deuxièmement, le rendement quantique de FRET (efficacité) doit être le plus élevé possible, troisièmement, l'émission de fluorescence doit se produire dans une région du spectre éloignée de celle produite naturellement par les protéines (décalée vers le rouge pour éviter la fluorescence intrinsèque moyenne). Les accepteurs remplissent les critères de compatibilité précédemment mentionnés. Leurs spectres d'excitation chevauchent ceux d'émission de cryptate d'Europium et Terbium, permettant ainsi au donneur d'exciter l'accepteur dont l'émission maximale est à 665 nm et s'étend sur une région où les cryptates HTRF n'émettent plus ou très faiblement. En fin de compte, le transfert d'énergie avec le donneur se produit avec un rendement quantique élevé.

Enfin, grâce à la mesure de fluorescence en temps résolu ou phase homogène, la fluorescence du bruit de fond (autofluorescence des cellules, des milieux biologiques, etc...) de courte durée de vie est éliminée. L'introduction d'un délai de 50-150 microsec entre l'excitation lumineuse initiale et la mesure de fluorescence minimise la contribution des émissions de fluorescence non spécifiques à courte durée de vie. Parallèlement, les fluorophores accepteurs d'HTRF émettent une fluorescence à durée de vie longue, signant le transfert d'énergie par proximité entre les biomolécules marquées. Il n'y a donc pas d'étapes de séparation, ce qui constitue un gain de temps, permet une miniaturisation et des mesures de cinétique.

Après préparation des lots de plaquettes lavées aux concentrations voulues (1 à 6 millions pour les expériences de doses réponse, 3 millions pour les expériences de cinétique), ces dernières sont stimulées par les différents agonistes : Thrombine 25 μ M, Collagène 9,9 μ g/mL pour les doses réponse, et ADP 10 μ M, TxA2 5 μ M, TRAP 25 μ M, ou CRP 9,9 μ g/mL pour les cinétiques à 37°C pendant 30 sec, 5 et 15 min. Les plaquettes sont ensuite lysées et les échantillons chargés sur les plaques 394 puits, conformément aux instructions du fabricant.

Agrégation plaquettaire en luminoagréométrie

La fonction plaquettaire est évaluée par luminoagréométrie dans les 2 à 4 heures qui suivent le prélèvement sanguin. Le plasma riche en plaquettes (PRP) est préparé par centrifugation du sang total à 190 g pendant 10 minutes ; un plasma pauvre en plaquettes (PPP) est obtenu après une centrifugation supplémentaire à 2500 g pendant 10 minutes. Les plaquettes sont ensuite stimulées par différents agonistes i) ADP 2,5 5 et 10 μ M, ii) TRAP 50 μ M ou iii) Collagène 3,3 μ g/mL.

Temps de rétraction du caillot

Dans des tubes à hémolyse en verre non siliconés, 600 µL de PRP sont mélangés avec du CaCl₂ 2mM et de la Thrombine humaine 3 UI/mL, brièvement agités et placés au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. Le caillot résiduel est retiré puis pesé ; la norme est <45 mg.

Cytométrie de flux sur plaquettes activées

La sécrétion des granules plaquettaires et l'activation de l'intégrine αIIbβ3 sont évaluées par cytométrie de flux. Pendant 10 min, les plaquettes en PRP sont stimulées ou non par i) l'ADP 10µM, ii) de l'U46619 5µM, iii) du TRAP 25 µM, ou iv) du CRP 9,9 µg/mL à 37°C.

Les plaquettes sont ensuite incubées à température ambiante, dans l'obscurité, pendant 15 min avec des anticorps anti-CD62P, anti-CD63, anti-PAC1, conjugués FITC (1:50). L'analyse est réalisée en utilisant un cytomètre en flux BD FACSVerserTM (BD Biosciences).

Cytométrie de flux pour Multiplex Phosphoflow barcoding (BD Biosciences)

Afin de déterminer la phosphorylation de i) Akt en position S473, ii) p38MAK en position Thr180/Tyr182, et iii) SLP76 en position Y145, les plaquettes en PRP sont stimulées ou non avec les différents agonistes (ADP 10 µM, TRAP 25 µM, CRP 9,9 µg/mL) pendant 5 et 15 min à 37°C. Ensuite, les plaquettes sont fixées au formaldéhyde 3%, perméabilisées au PBS-Triton 0,4% pendant 15 min, puis méthanol froid pendant 20 min.

Pour les conditions de multiplexage, les plaquettes sont incubées avec des sondes fluorescentes Alexa 700NHS et Alexa 405NHS pendant 1h à -4°C puis avec des anticorps spécifiques anti-phospho Akt, -phospho p38MAPK (Cell Signaling), -phospho SLP76 (Abcam) au 1:100 dans du TBS-Triton 0,4% et BSA (Bovin Serum Albumin) 3%. Un anticorps secondaire 1:1000 et conjugué à Alexa Fluor 647 (Life Technologies) est ajouté aux échantillons. Après incubation à température ambiante pendant 30 min et lavage des échantillons par centrifugation, l'analyse est réalisée au cytomètre en flux BD LSRFortessaTM (BD Biosciences), sur la plateforme de cytométrie de flux de l'institut I2MC.

Western-blots

Les plaquettes lavées de donneurs témoins et de la patiente sont lysées dans un tampon contenant 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) selon les procédures standardisées classiques. Une électrophorèse sur gel SDS-PAGE en utilisant des gels à gradient de 10% est réalisée, et transférée sur une membrane de nitrocellulose. Celles-ci sont ensuite chargées par des anticorps dirigés contre panAkt phosphorylé en T308, contre Akt phosphorylé en S473, contre GSK3 β phosphorylé en S9, contre les substrats phosphorylés d'Akt, contre panAkt, contre HSP27 (Cell Signaling Technologies), ainsi qu'un anti-phospho Akt1/2/3 en T308 (Santa Cruz Biotechnology). Ces anticorps sont ensuite révélés par chimioluminescence par des anticorps secondaires couplés à la peroxydase. L'analyse densitométrique des pistes est réalisée à l'aide du logiciel ImageLab.

Analyses statistiques

Afin de pouvoir prendre en compte la variabilité des conditions expérimentales entre les mesures, les échantillons de sujet contrôle ont été traités en parallèle avec les échantillons de la patiente. Les comparaisons entre les patients et les témoins ont été effectuées avec le test de Mann-Whitney et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme significatives (Graph Pad Prism).

Résultats expérimentaux

Caractérisation de la fonction plaquettaire de la patiente

Par différentes techniques complémentaires, nous avons progressivement mis en évidence une anomalie de la fonction plaquettaire chez Mme S (Spi.M).

Dans un premier temps, l'**agrégation plaquettaire** mesurée par méthode optique sur PRP montre d'importantes perturbations avec notamment une agrégation faible et réversible en réponse à l'ADP (5 et 10 μM) ainsi qu'une diminution de l'agrégation induite par le TRAP 50 μM et le collagène 3,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les résultats présentés dans la figure 34 sont représentatifs de la réponse obtenue lors de plusieurs consultations de la patiente (n=4).

De même, en condition de **flux** (500 sec^{-1}), sur matrice de fibrinogène, nous montrons que l'adhésion plaquettaire et la formation de microthrombi plaquettaires est retardée par rapport au témoin, de même, les thrombi formés sur matrice de collagène sont de plus petite taille (résultats non montrés). Toutefois, ces expériences n'ont été réalisées que deux fois et nécessitent d'être reproduites lors d'une prochaine visite de la patiente.

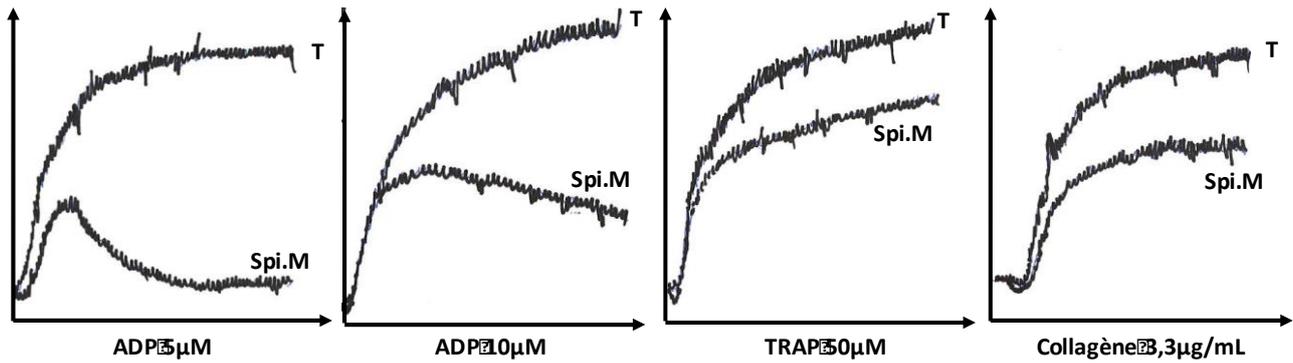


Figure 34 : Caractérisation de la fonction plaquettaire de la patiente par la technique d'agrégométrie. L'agrégation plaquettaire en PRP est mesurée par méthode optique en réponse à l'ADP 5 et 10 μM , TRAP 50 μM et Collagène 3,3 $\mu\text{g/mL}$, pendant 15 min à 37°C. T : témoin, Spi.M : patiente.

Autre paramètre d'hémostase évalué chez la patiente : le **temps de rétraction du caillot** en PRP présence de thrombine et de CaCl_2 pendant 30 min à 37°C. Nos résultats indiquent un poids résiduel pour la patiente supérieur à celui obtenu pour le témoin (100 ± 15 mg pour la patiente vs 45 ± 4 mg pour le témoin, $n=2$, figure 35.A). Bien que n'ayant été réalisée que deux fois, cette expérience suggère que la signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ et/ou l'activité contractile des plaquettes de la patiente est perturbée, ce qui devra être confirmé lors d'une prochaine visite de la patiente.

Parallèlement à ces expériences d'évaluation de la fonction plaquettaire de la patiente, une analyse des mécanismes d'activation de l'intégrine, de sécrétion et de signalisation intraplaquettaire a été réalisée en cytométrie de flux.

Ainsi, les résultats de **cytométrie de flux** utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ dans sa configuration activée montrent un défaut important de l'activation de l'intégrine suite à la stimulation des plaquettes par l'ADP, le TRAP ou l'analogue du TxA_2 aux différentes concentrations spécifiées.

En revanche, cette activation est normale lorsque les plaquettes sont activées par la voie du récepteur GPVI du collagène (activée ici par le CRP, un peptide synthétique dont la séquence $\text{GCO}-(\text{GPO})_{10}\text{-GCOG}$ imite la structure triple hélice du collagène et ne reconnaît que GPVI), suggérant que seule la signalisation « inside-out » induite par certains récepteurs ($\text{P}_2\text{Y}_1/\text{P}_2\text{Y}_{12}$, PAR_1 , $\text{TP}\alpha$) est affectée. Ce défaut de signalisation aval de ces récepteurs est confirmé par l'étude de la sécrétion

des granules. En effet, l'utilisation de l'anticorps anti-CD62P, spécifique des granules α , montre un défaut de la sécrétion des granules α chez cette patiente, secondaire à la stimulation par les mêmes agonistes, ADP, TRAP, TxA2. Enfin, l'utilisation des anticorps anti-CD63, spécifiques des granules denses, signe un défaut de sécrétion des granules denses secondaire à l'action des mêmes agonistes ADP, TRAP, TxA2. Nous pouvons également noter que l'amplitude du défaut de sécrétion des granules est plus importante pour les granules denses que les granules α chez la patiente. Enfin, nos résultats ne mettent pas en évidence d'anomalie des voies de signalisation induites par la voie du récepteur GPVI du collagène.

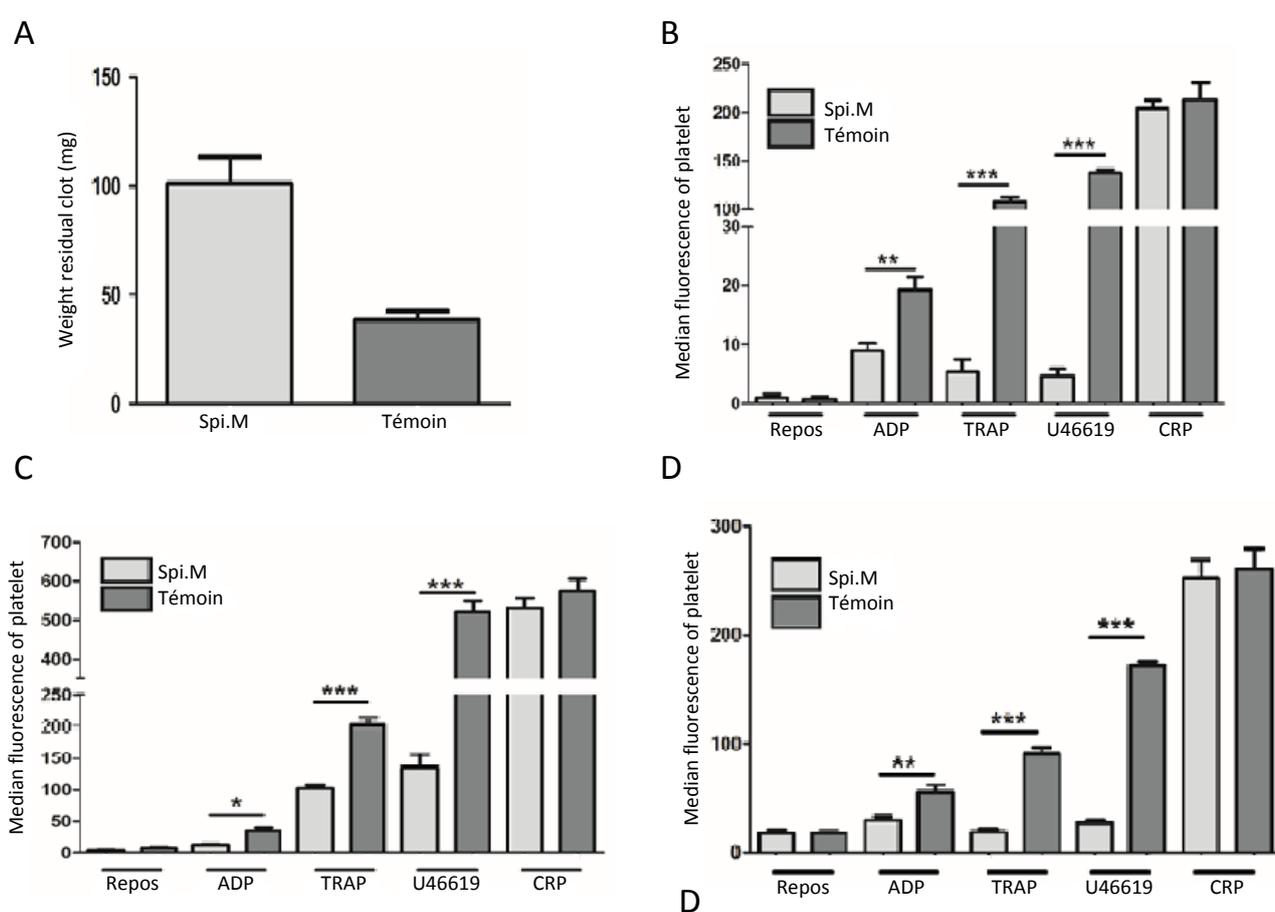


Figure 35 : Caractérisation du niveau d'activation de certaines protéines de la signalisation « inside-out » plaquettaire chez la patiente. **A.** Rétraction du caillot induit par la thrombine 3 UI/mL et le CaCl_2 20 mM pendant 30 min d'incubation à 37°C. Poids estimé du caillot résiduel en mg (n=2). **B.** Niveaux d'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ dans sa configuration activée par fixation de l'anticorps PAC1 sur des plaquettes au repos ou stimulées par l'ADP 10 μM , TRAP 50 μM , U46619 5 μM et CRP 9,9 $\mu\text{g/mL}$ mesuré par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (MFI), n=3. **C.** Niveaux d'expression de la P-sélectine par fixation des anticorps anti-

CD62P dans les mêmes conditions que précédemment. **D.** Niveaux d'expression de la granulophysine par fixation des anticorps anti-CD63 dans les mêmes conditions que précédemment. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ (n=3).

L'inclusion de cette patiente dans le PHRC et l'analyse par CMF du **Multiplex Phosphoflow**, nous ont permis de rechercher des défauts de phosphorylation sur certaines protéines clé de voies de signalisation mises en jeu par la stimulation spécifique de certains récepteurs plaquettaires. Nos résultats mettent en évidence un défaut spécifique de la phosphorylation de la protéine Akt en aval de l'ensemble des récepteurs testés : le récepteur P2Y12 à l'ADP, le récepteur PAR1 à la thrombine, le récepteur TP α au TxA2 et le récepteur GPVI au collagène. Aucune anomalie de la phosphorylation des autres protéines testées (p38MAPK, SLP76) n'a été décelée (résultats non montrés).

Chez cette patiente, l'identification de l'activation d'Akt comme seul élément de signalisation significativement altéré suite à la stimulation des différents récepteurs plaquettaires, nous a conduit à étudier les 2 phosphorylations activatrices connues pour cette protéine par **Western-blot (immunoempreintes)**, sur les plaquettes aux repos ou en conditions agrégantes, après 10 min de stimulation par l'ADP 10 μ M, le TRAP 50 μ M ou la thrombine 0,5 UI.

L'analyse semi-quantitative des immunoempreintes montrent qu'Akt est significativement moins phosphorylée sur la Thréonine en position 308 et la Sérine en position 473 suite à la stimulation par l'ADP (10 μ M), notamment en conditions non agrégantes (n=3).

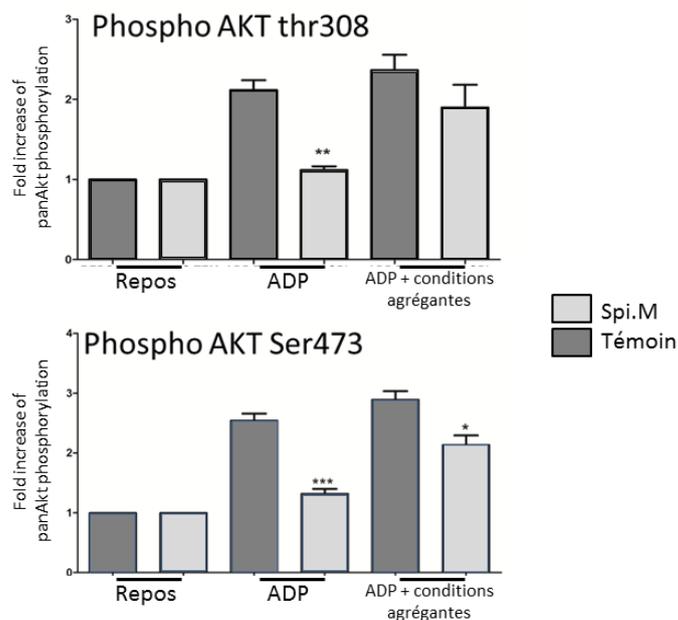


Figure 36 : Caractérisation des différentes phosphorylations activatrices d’Akt chez la patiente, suite à la stimulation des plaquettes par les différents agonistes. Analyse semi-quantitative (rapport à l’actine) des western-blots à l’aide du logiciel d’analyse d’images ImageLab. Mise en évidence des différentes formes d’Akt phosphorylées, en position T308 et S473, après stimulation par l’ADP 10 μ M, le TRAP 50 μ M ou la thrombine 0,5 UI/L. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ (n=3).

Nous avons ensuite étudié les effecteurs d’Akt en suivant le niveau de phosphorylation global des protéines susceptibles d’être des cibles d’Akt, et plus précisément, la phosphorylation de GSK3 β par Western-blots.

Les **Western-blots** réalisés sont en faveur d’une corrélation entre la diminution de la phosphorylation activatrice d’Akt sur ses 2 résidus T308 et S473, et une diminution de la phosphorylation de protéines en aval d’Akt chez la patiente, et ce pour l’ensemble des agonistes testés. De plus, en s’intéressant spécifiquement à certains effecteurs d’Akt, GSK3 β et taline. On note qu’il pourrait exister des différences selon l’agoniste utilisé ; ainsi, la voie de signalisation de l’ADP semble réellement altérée chez la patiente pour les 2 effecteurs recherchés, alors que pour le TRAP, seule la stimulation de la taline soit altérée. Toutefois, cette analyse doit être confirmée sur de nouveaux prélèvements chez la patiente.

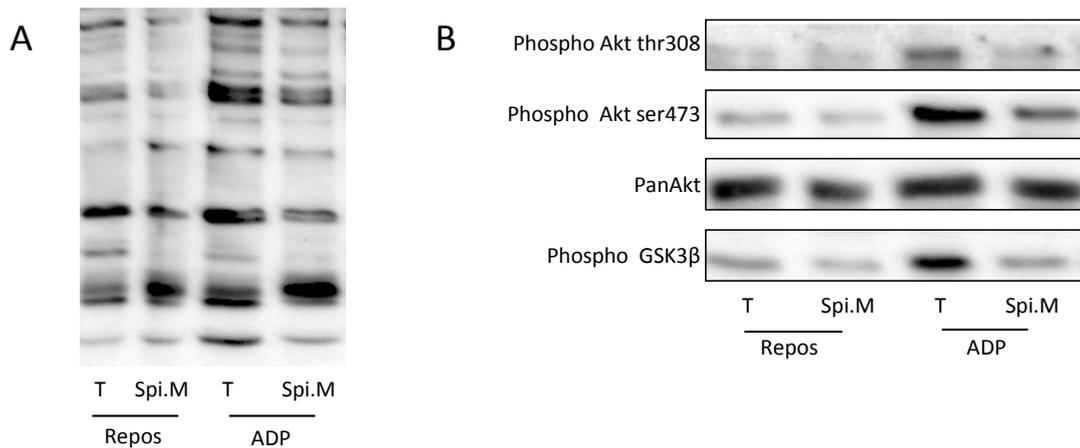


Figure 37 : Caractérisation de l'activation d'Akt et de ses voies de signalisation d'aval induites par les différents agonistes testés chez la patiente. **A.** Western-blots révélant le niveau de phosphorylation de phosphoprotéines substrats (RXRXXS*/T*) d'Akt suite à la stimulation des récepteurs P2Y12 à l'ADP 10 μ M, PAR1 au TRAP 50 μ M, TP1 au TxA2 0,5 UI et GPVI au collagène 3,3 μ g/mL, pendant 10 min, dans les plaquettes au repos (n=1). **B.** Western-blots établissant une corrélation entre les taux de phosphorylation activatrice d'Akt en T308 et S473, la phosphorylation activatrice de GSK3 β en S9, suite aux différentes stimulations (ADP 10 μ M et TRAP 50 μ M, pendant 10 min, sur des plaquettes au repos) (n=1).

Dans la mesure où les anticorps anti-phosphoAkt reconnaissent les 3 isoformes, Akt1, 2 et 3, il nous a paru important d'étudier le niveau d'expression de chaque isoforme, à la fois chez une série de donneurs sains (le niveau d'expression des 3 isoformes d'Akt étant très peu connu dans les plaquettes) et chez la patiente.

Les résultats obtenus par **Western-blots** réalisés à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque isoforme montrent que les 3 isoformes sont présentes dans les plaquettes humaines normales. En accord avec les résultats d'une étude de protéomique, Akt3 semble relativement moins exprimée qu'Akt1 et surtout Akt2 [87]. Nos résultats sont en faveur d'une diminution de l'expression de la protéine Akt2 chez la patiente par rapport à des sujets témoins.

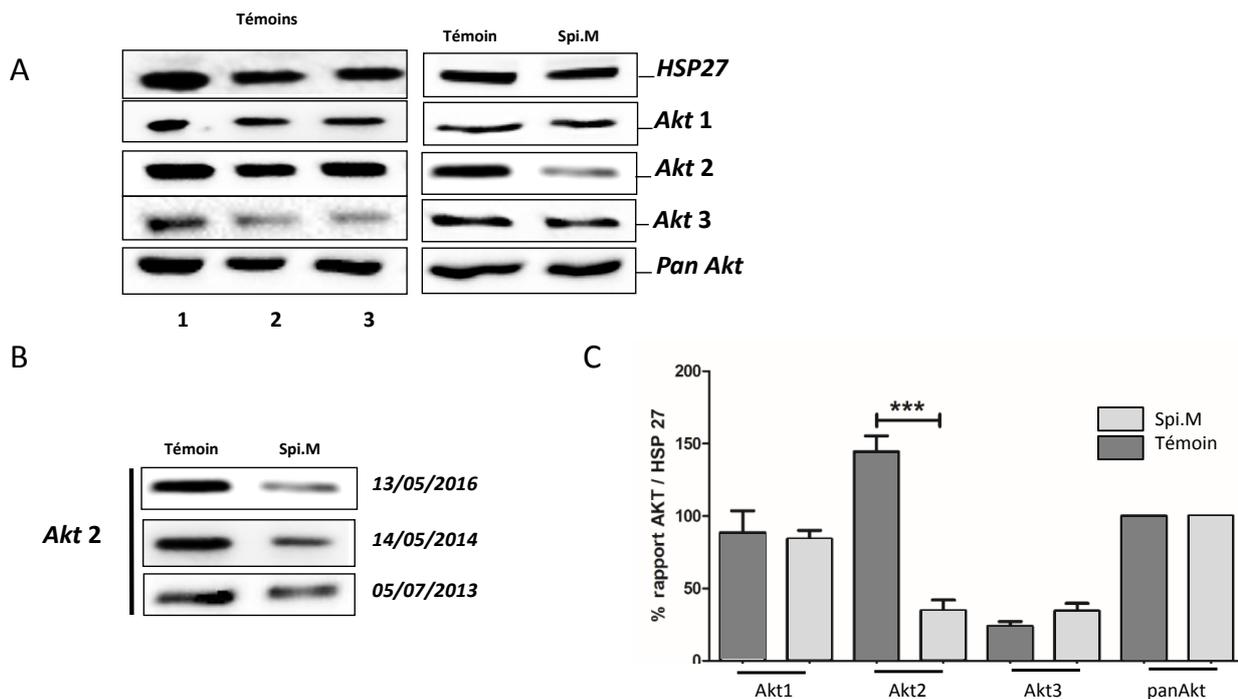


Figure 38 : Diminution d'expression de l'isoforme Akt2 plaquettaire chez la patiente. **A.** Niveau d'expression des différentes isoformes d'Akt chez des sujets témoins. Les anticorps anti-HSP27 et anti-panAkt sont utilisés pour contrôler la quantité de protéines déposée. **B.** Western-blots Akt2 dans les plaquettes de la patiente, lors de 3 de ses consultations. **C.** Analyse semi-quantitative des niveaux d'expression des différentes isoformes d'Akt dans les plaquettes de la patiente vs témoin. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ ($n=8$ pour les témoins, $n=3$ pour la patiente).

En parallèle, des analyses de RT-PCR montrent une diminution des ARNm de l'isoforme Akt2 dans les plaquettes de la patiente (résultat non montré).

Mise au point de l'utilisation des kits Cisbio de dosage de l'activation d'Akt1, 2 et 3 dans les plaquettes humaines

Pour mesurer avec précision la phosphorylation activatrice des trois isoformes d'Akt dans les plaquettes de la patiente il existe 2 méthodes i) une immunoprécipitation de chaque isoforme avec un anticorps spécifique suivi d'une immunoempreinte à l'aide d'un anticorps anti-phosphoAkt ou ii) l'utilisation de kits de dosage de la phosphorylation de chaque isoforme d'Akt par la méthode de FRET (HTRF) développé par la société Cisbio. La première méthode est très lourde et surtout

nécessite un matériel de départ important en quantité, incompatible avec une étude chez des patients. L'utilisation des kits Cisbio est au contraire très adaptée (bonne sensibilité et besoin de faible quantité de matériel). Cependant, aucune donnée n'étant disponible pour ce type cellulaire, il nous fallait mettre au point l'utilisation des kits Cisbio pour la mesure de la phosphorylation d'Akt1, 2 et 3 dans les plaquettes humaines. Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences de doses-réponses après stimulation par des agonistes forts tels que la thrombine (50 μ M) et le collagène (9,9 μ g/mL) sur 2 points de cinétique (1 et 10 minutes) en utilisant des quantités croissantes de matériel de départ (1 à 6 M de plaquettes).

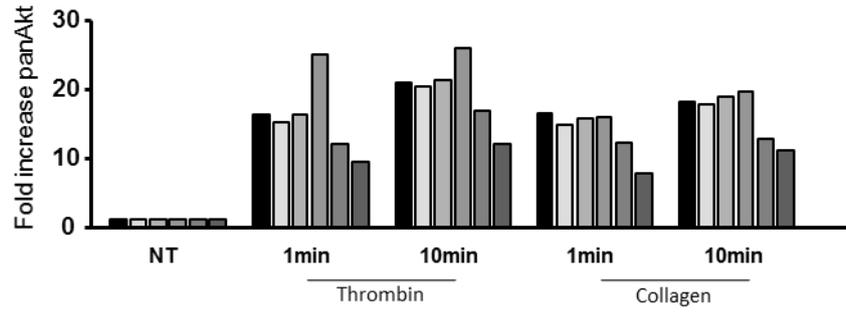
Quatre kits ont été utilisés, l'un, appelé panAkt, reconnaît l'ensemble des isoformes d'Akt phosphorylées, les trois autres reconnaissent chaque isoforme de manière spécifique. Les résultats présentés dans la figure 39 montrent que pour le kit pan Akt, une quantité de 1 à 3 millions de plaquettes est optimale avec, comme attendu, un très bon niveau de phosphorylation d'Akt induit par les deux agonistes utilisés.

Pour les kits spécifiques des isoformes d'Akt, la première observation est qu'Akt3 répond assez faiblement aux deux agonistes testés, au contraire d'Akt2 qui semble montrer une activité importante et d'Akt1 dont la phosphorylation est intermédiaire. A noter cependant que, dans la mesure où ces kits utilisent des anticorps différents pour la quantification de chaque isoforme d'Akt, il est difficile de comparer les niveaux d'expression des isoformes entre elles.

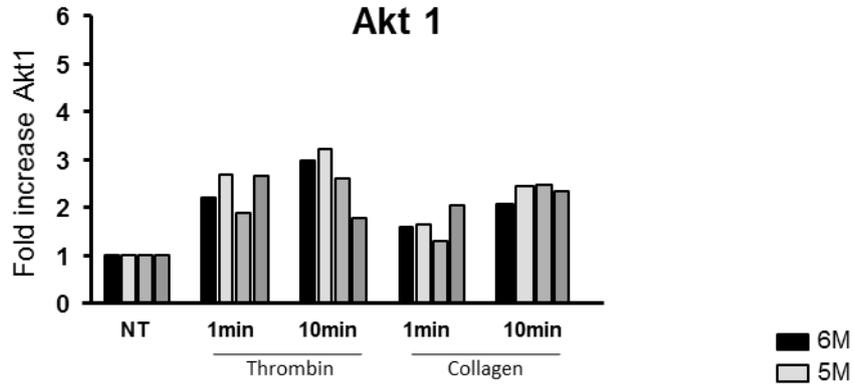
Concernant les résultats des doses-réponses pour les isoformes d'Akt, il semblerait que de meilleurs résultats soient obtenus avec les concentrations de plaquettes plus élevées, soit 5 à 6 millions. Mais, compte tenu de la quantité de sang total nécessaire pour les préparations de plaquettes lavées et des différences observées en termes d'activation des isoformes d'Akt, nous avons décidé de travailler à 3 millions de plaquettes pour l'ensemble de ces trois kits de détection.

Il est à noter que la mesure de la phosphorylation des diverses isoformes montre des niveaux d'activation plus faibles que ceux observés avec le kit panAkt (la somme du niveau d'activation de chaque isoforme est nettement inférieure au niveau observé avec le kit panAkt). Ce résultat suggère que les kits spécifiques pour chaque isoforme sont moins sensibles que le kit panAkt.

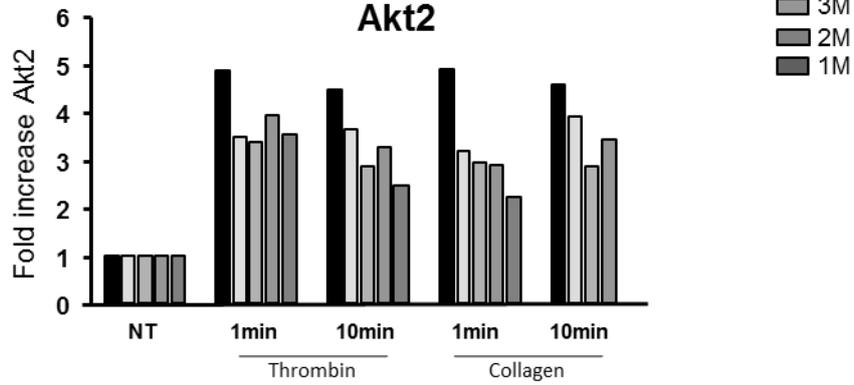
panAkt



Akt 1



Akt2



Akt3

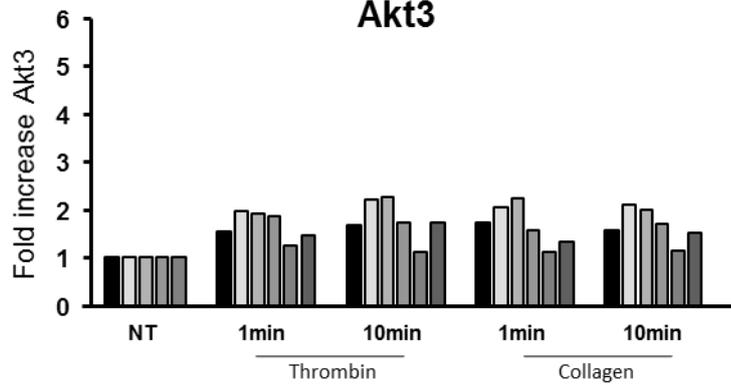


Figure 39 : Estimation de la phosphorylation activatrice d'Akt après stimulation par la thrombine ou le collagène, aux temps indiqués, et pour les différentes quantités de plaquettes lavées. Les graphes sont représentatifs des résultats obtenus pour un sujet sain, pour Akt sans distinction des isoformes, et pour les différentes isoformes Akt1, Akt2 et Akt3.

Mesure de l'activation basale d'Akt

Lors des stimulations par les différents agonistes au cours du temps, un contrôle correspondant à la même durée de traitement mais sans agoniste a été réalisé afin de pouvoir définir avec précision le niveau d'augmentation de la phosphorylation activatrice secondaire au traitement.

Ce niveau de phosphorylation de base ne varie pas au cours du temps correspondant à l'expérimentation mais, de façon intéressante, il apparaît différent en fonction des isoformes d'Akt. En effet, alors que la phosphorylation basale d'Akt1 et 2 se situe autour de 20%, celle d'Akt3 est estimée à 40% environ, suggérant un niveau basal d'activation d'Akt3 non négligeable.

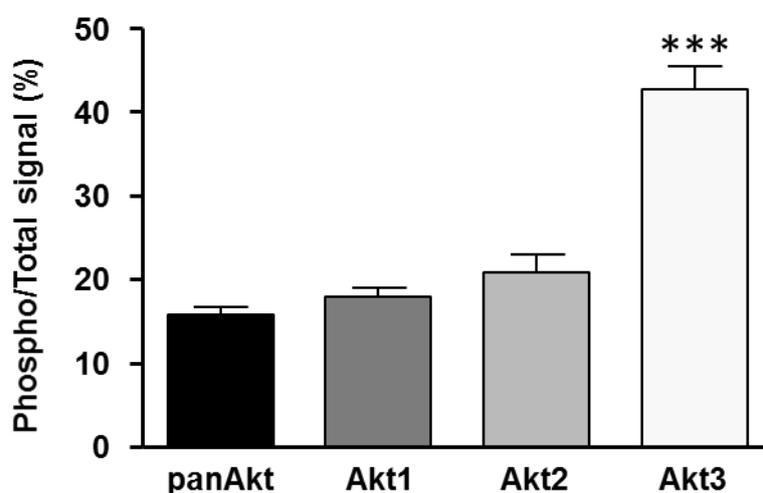


Figure 40 : Phosphorylation activatrice basale des différentes isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines de sujets sains (n=8).

Caractérisation de l'activation des isoformes d'Akt dans diverses conditions de stimulation des plaquettes humaines normales

Pour évaluer la réponse individuelle de chaque isoforme d'Akt lors d'une stimulation par différents agonistes plaquettaires physiologiques, nous avons stimulé les plaquettes par i) du CRP, puissant agoniste sélectif du récepteur GPVI qui, une fois activé, conduit à la phosphorylation sur tyrosine de la chaîne γ du récepteur du fragment constant des Ig (FcR γ), ii) du TRAP, agoniste spécifique de PAR1 couplé à différentes protéines G hétérotrimériques dont G $_q$, G $_{12/13}$ et G $_i$, iii) du TxA2 qui agit sur ses récepteurs TP α et TP β couplés aux protéines hétérotrimériques G $_q$ et G $_{12/13}$ et iv) de l'ADP qui agit sur ses 2 récepteurs spécifiques P2Y1 couplé à la protéine G $_q$ et P2Y12 couplé à la protéine G $_i$. Il est bien connu que l'activation de ces récepteurs met en jeu la voie PI3K-Akt. A noter que pour ne pas engager la voie « outside-in » des intégrines, les conditions de stimulation ont été réalisées sans agitation de manière à empêcher l'agrégation plaquettaire.

La stimulation du récepteur GPVI par le CRP (9,9 $\mu\text{g/mL}$) induit la phosphorylation d'Akt en fonction du temps de stimulation. Dès 30 sec, la phosphorylation a été multipliée par 5 environ, puis par 10 après 5 min et reste stable au-delà. Comme constaté précédemment, la mesure de la phosphorylation des diverses isoformes montre des niveaux d'activation relativement faible par rapport à ceux observés avec le kit panAkt. Les 3 isoformes d'Akt présentent des profils d'activation assez semblables. A noter toutefois qu'Akt3 est relativement faiblement activée par le CRP (moins de 2 fois).

L'activation par le TRAP (25 μM) entraîne la phosphorylation d'Akt de façon rapide (augmentation de 8 fois environ en 30 sec) et transitoire (5 puis 4 fois, respectivement à 5 puis 15 min). Bien que l'intensité de la phosphorylation activatrice des trois isoformes soit relativement faible, les résultats montrent un comportement similaire pour Akt2 et Akt3 (phosphorylation rapide et transitoire) alors que la phosphorylation d'Akt1 semble plus soutenue dans le temps.

Lors d'une stimulation par le TxA2 (5 μM), nous observons la phosphorylation activatrice d'Akt de façon progressive entre 30 sec et 15 min de stimulation. Par rapport aux autres agonistes testés, l'amplitude de la phosphorylation activatrice d'Akt est relativement modérée (environ 5 fois à 15 min). De plus, si Akt1 et 2 ont des comportements assez semblables, Akt3 est ici très faiblement activée.

CRP 9µg/ml

TRAP 25 µM

TxA2 5 µM

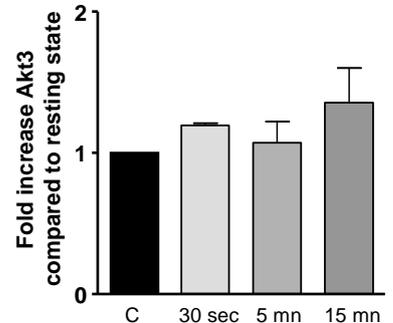
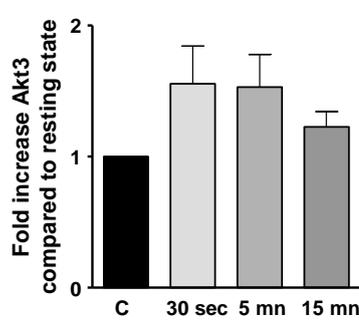
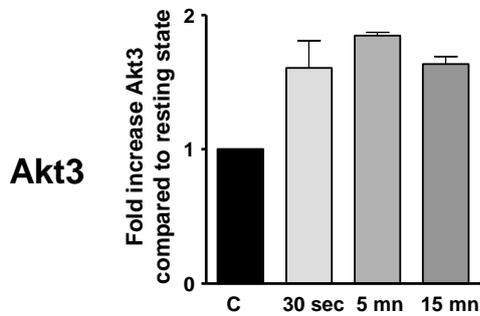
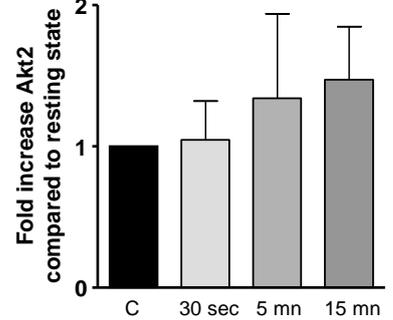
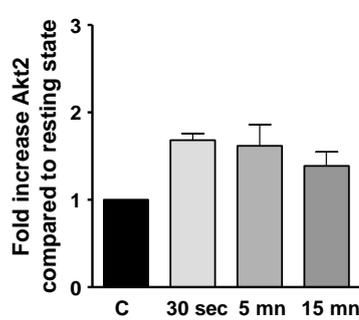
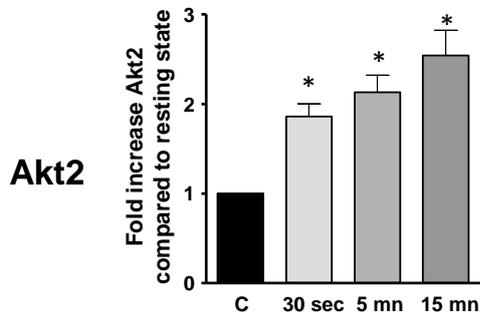
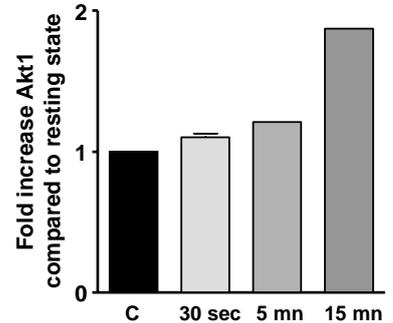
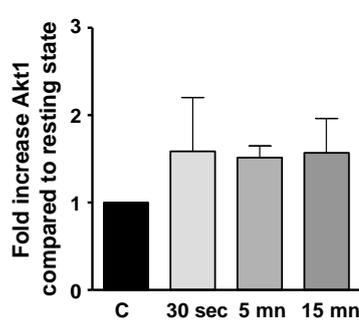
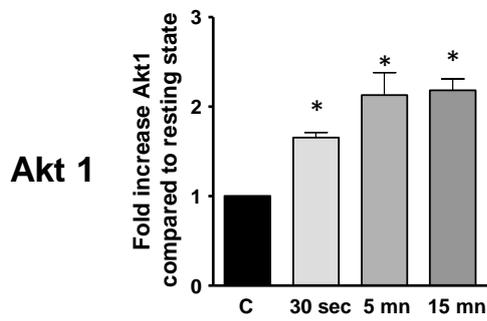
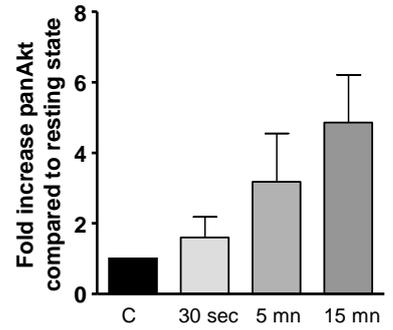
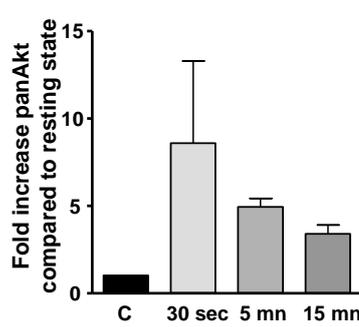
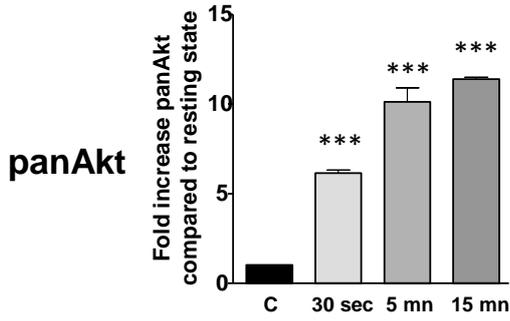


Figure 41 : Phosphorylation activatrice des différentes isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines de sujets sains, après stimulation par différents agonistes.

Enfin, lorsque les plaquettes ont été stimulées par de l'ADP (10 μ M) qui est un agoniste faible lorsqu'il est utilisé seul, nous n'avons pas pu mettre en évidence la phosphorylation activatrice des isoformes d'Akt avec ces kits de dosage. Nous avons tenté d'augmenter la quantité de plaquettes à 5 millions mais sans succès. Ces résultats suggèrent fortement que si le kit panAkt est d'un niveau de sensibilité comparable au Western-blot (immunoempreinte), les kits spécifiques des trois isoformes sont moins sensibles et nécessitent des niveaux d'activation d'Akt forts pour donner des résultats satisfaisants. Nos données montrent qu'en termes d'amplitude de réponse des différentes isoformes, c'est avec le CRP que le niveau de phosphorylation est le plus important, suivi du TRAP puis du TxA2.

Discussion et conclusions

Ces travaux nous permettent de confirmer un certain nombre de données de la littérature telles que i) l'expression des trois isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines [86], ii) l'association entre la diminution d'Akt2 et l'anomalie de l'agrégation plaquettaire en réponse à la stimulation par l'ADP ou la thrombine, mais pas au collagène [89], iii) la participation d'Akt2 à la régulation de la sécrétion des granules α et denses [85], et iv) la contribution d'Akt2 à la phosphorylation activatrice d'effecteurs tels que GSK3 β [149].

Ensuite, nous décrivons pour la première fois une association entre un défaut d'expression d'Akt2 et une dysfonction plaquettaire, probablement à l'origine de la symptomatologie hémorragique d'une patiente.

De plus, nous avons utilisé pour la première fois la technologie HTRF pour quantifier la phosphorylation activatrice des différentes isoformes d'Akt dans les plaquettes de sujets témoins, en distinguant la proportion de la protéine sous forme phosphorylée par rapport à la protéine totale. Ainsi, à l'état basal, nous décrivons pour la première fois un certain « tonus » pour Akt3, qui est à 40 % sous forme phosphorylée au repos alors que les 2 autres isoformes sont à moins de 20 %. Cette observation va dans le sens de rôles distincts pour les isoformes d'Akt, et potentiellement dans le sens d'une implication d'Akt3 davantage dans des fonctions métaboliques [94].

Contrairement à son niveau basal de phosphorylation relativement élevé, nos résultats montrent que l'intensité d'activation d'Akt3 en aval des divers récepteurs testés est généralement faible. De plus, la littérature [87] et nos résultats suggèrent qu'Akt3 est exprimée à un niveau plus faible qu'Akt1 et 2 dans les plaquettes.

En termes de cinétique d'activation, nous n'avons pas observé de différence majeure, si ce n'est la phosphorylation d'Akt1 qui semble plus soutenue dans le temps que celles des deux autres isoformes suite à l'activation du récepteur PAR1.

Peu de choses sont encore connues dans la littérature concernant le rôle spécifique et/ou le niveau de redondance des différentes isoformes d'Akt dans les voies de signalisation conduisant à l'agrégation et la sécrétion plaquettaires. Nos résultats contribuent à caractériser l'activation des trois isoformes d'Akt dans les plaquettes humaines. Cependant, ils devront être complétés par des expériences permettant d'analyser de façon statistique les cinétiques d'activation des trois isoformes d'Akt lors de l'activation des plaquettes normales par divers agonistes. Les kits Cisbio de dosage spécifique des trois isoformes d'Akt apparaissent comme l'approche technique la plus appropriée pour cette étude. Cependant, notre expérience que ces kits sont relativement moins sensibles que le kit de dosage panAkt (qui lui est très sensible) et nécessitent des niveaux d'activation d'Akt forts pour donner des résultats satisfaisants.

Quoiqu'il en soit, grâce à cette étude, nous maîtrisons à présent l'utilisation des kits Cisbio, ce qui va nous permettre d'étudier la phosphorylation activatrice des différentes isoformes d'Akt chez la patiente, en réponse à différents agonistes. Cette étape est importante pour caractériser la réactivité d'Akt2 et la comparer à celle d'Akt1 et 3 dans ce contexte.

Ainsi, nous espérons corrélérer la diminution de la quantité de protéine Akt2 et à une diminution de la phosphorylation activatrice de la protéine chez la patiente sans modification de la phosphorylation d'Akt1 et 3. Cependant, il est possible que, par le jeu des chevauchements des voies de signalisation intraplaquettaires et/ou des phénomènes de compensation, Akt1 ou 3 prennent en partie le relais d'Akt2 et soient en fait beaucoup plus activées que chez un donneur sain.

Nous chercherons à comprendre les raisons de cette diminution d'expression d'Akt2 chez la patiente. Nous quantifierons à nouveau les ARNm des différentes isoformes d'Akt plaquettaires ; les premières RT-PCR étaient en faveur d'une diminution du niveau d'expression de l'ARNm Akt2. Cette donnée nous oriente vers un problème d'expression d'Akt2 plutôt que de stabilité ou de dégradation exacerbée de la protéine.

En parallèle, il sera intéressant de savoir si, compte tenu de l'expression ubiquitaire de ces protéines, le défaut d'expression d'Akt2 est retrouvé dans les autres lignées sanguines. La patiente ne présente pas de syndrome d'immunodéficience et nos résultats préliminaires montrent un niveau normal d'ARNm Akt2 dans ses leucocytes. Plusieurs questions se posent donc : s'agit-il d'un défaut spécifique de la lignée mégacaryocytaire ? A quel moment se produit-il ? Quelle est la nature de ce défaut ?

On peut imaginer qu'il s'agisse d'un problème d'accès à la transcription du gène, impliquant potentiellement des mécanismes de méthylation, par exemple, ou d'un problème de maturation/stabilité/séquestration de l'ARNm. Ce défaut ne serait révélé qu'au cours de processus complexes de la mégacaryopoïèse.

Autant de questions auxquelles nous tenterons de répondre afin de décrire au mieux ce premier cas de thrombopathie impliquant une des isoformes d'Akt plaquettaire.

Toulouse, le 14.05.2018

Vu pour la signature
Le Doyen de la Faculté
de médecine Rangueil
Elie SERRANO

Pr Eric DELABESSE
Laboratoire d'Hématologie
U.C.T. - 0
1 avenue Irène Joliot Curie
31059 TOULOUSE Cedex 9
Tél. 05 31 15 62 29
14.5.2018

Références bibliographiques

- [1] E. M. Golebiewska et A. W. Poole, « Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond », *Blood Rev.*, vol. 29, n° 3, p. 153-162, mai 2015.
- [2] S. L. Nutt, D. Metcalf, A. D'Amico, M. Polli, et L. Wu, « Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors », *J. Exp. Med.*, vol. 201, n° 2, p. 221-231, janv. 2005.
- [3] Y. Arinobu *et al.*, « Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages », *Cell Stem Cell*, vol. 1, n° 4, p. 416-427, oct. 2007.
- [4] « Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23159853>. [Consulté le: 12-mai-2018].
- [5] L. Gilles *et al.*, « P19INK4D links endomitotic arrest and megakaryocyte maturation and is regulated by AML-1 », *Blood*, vol. 111, n° 8, p. 4081-4091, avr. 2008.
- [6] V. Baccini *et al.*, « Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes », *Blood*, vol. 98, n° 12, p. 3274-3282, déc. 2001.
- [7] D. Stegner *et al.*, « Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature », *Nat. Commun.*, vol. 8, n° 1, p. 127, 25 2017.
- [8] E. Lefrançais et M. Roberts Looney, « [The hidden face of the lung: a platelet factory and a blood progenitors reservoir] », *Med. Sci. MS*, vol. 33, n° 12, p. 1032-1035, déc. 2017.
- [9] T. Guo, X. Wang, Y. Qu, Y. Yin, T. Jing, et Q. Zhang, « Megakaryopoiesis and platelet production: insight into hematopoietic stem cell proliferation and differentiation », *Stem Cell Investig.*, vol. 2, p. 3, 2015.
- [10] V. R. Deutsch et A. Tomer, « Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside », *Br. J. Haematol.*, vol. 161, n° 6, p. 778-793, juin 2013.
- [11] V. R. Deutsch et A. Tomer, « Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside », *Br. J. Haematol.*, vol. 161, n° 6, p. 778-793, juin 2013.
- [12] E. M. Golebiewska et A. W. Poole, « Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond », *Blood Rev.*, vol. 29, n° 3, p. 153-162, mai 2015.
- [13] M. Leslie, « Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets », *Science*, vol. 328, n° 5978, p. 562-564, avr. 2010.
- [14] M. Seigneuret et P. F. Devaux, « ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 81, n° 12, p. 3751-3755, juin 1984.

- [15] L. Tang, W. Gao, et P. B. Taylor, « Force-frequency response in isoproterenol-induced hypertrophied rat heart », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 318, n° 2-3, p. 349-356, déc. 1996.
- [16] D. Kamp et C. W. Haest, « Evidence for a role of the multidrug resistance protein (MRP) in the outward translocation of NBD-phospholipids in the erythrocyte membrane », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1372, n° 1, p. 91-101, juin 1998.
- [17] D. W. Dekkers, P. Comfurius, A. J. Schroit, E. M. Bevers, et R. F. Zwaal, « Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1) », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 37, n° 42, p. 14833-14837, oct. 1998.
- [18] J. Suzuki, M. Umeda, P. J. Sims, et S. Nagata, « Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F », *Nature*, vol. 468, n° 7325, p. 834-838, déc. 2010.
- [19] T. Lhermusier, H. Chap, et B. Payrastre, « Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 9, n° 10, p. 1883-1891, oct. 2011.
- [20] J. Viaud et B. Payrastre, « [Phosphoinositides: the lipids coordinating cell dynamics] », *Med. Sci. MS*, vol. 31, n° 11, p. 996-1005, nov. 2015.
- [21] S. Bodin, H. Tronchère, et B. Payrastre, « Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1610, n° 2, p. 247-257, mars 2003.
- [22] H. Yang *et al.*, « TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation », *Cell*, vol. 151, n° 1, p. 111-122, sept. 2012.
- [23] H. van Nispen tot Pannerden, F. de Haas, W. Geerts, G. Posthuma, S. van Dijk, et H. F. G. Heijnen, « The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes », *Blood*, vol. 116, n° 7, p. 1147-1156, août 2010.
- [24] A. McNicol et S. J. Israels, « Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis », *Thromb. Res.*, vol. 95, n° 1, p. 1-18, juill. 1999.
- [25] P. Blair et R. Flaumenhaft, « Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates », *Blood Rev.*, vol. 23, n° 4, p. 177-189, juill. 2009.
- [26] C. A. Dangelmaier et H. Holmsen, « Determination of acid hydrolases in human platelets », *Anal. Biochem.*, vol. 104, n° 1, p. 182-191, mai 1980.
- [27] F. Rendu et B. Brohard-Bohn, « The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions », *Platelets*, vol. 12, n° 5, p. 261-273, août 2001.
- [28] J. H. Hartwig, K. Barkalow, A. Azim, et J. Italiano, « The elegant platelet: signals controlling actin assembly », *Thromb. Haemost.*, vol. 82, n° 2, p. 392-398, août 1999.
- [29] M. Crespin, C. Vidal, F. Picard, C. Lacombe, et M. Fontenay, « Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles », *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.*, vol. 20, n° 1, p. 63-70, janv. 2009.
- [30] K. Sadoul, « New explanations for old observations: marginal band coiling during platelet activation », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 13, n° 3, p. 333-346, mars 2015.
- [31] S. Séverin *et al.*, « Distinct and overlapping functional roles of Src family kinases in mouse platelets », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 10, n° 8, p. 1631-1645, août 2012.
- [32] H. M. W. Verheul et H. M. Pinedo, « Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, n° 6, p. 475-485, 2007.
- [33] J. D. McFadyen, M. Schaff, et K. Peter, « Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis », *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 15, n° 3, p. 181-191, mars 2018.
- [34] P. André *et al.*, « Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins », *Blood*, vol. 96, n° 10, p. 3322-3328, nov. 2000.
- [35] S. P. Jackson, N. Mistry, et Y. Yuan, « Platelets and the injured vessel wall-- "rolling into action": focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton », *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 10, n° 5, p. 192-197, juill. 2000.
- [36] J. D. Welsh *et al.*, « A systems approach to hemostasis: 1. The interdependence of thrombus architecture and agonist movements in the gaps between platelets », *Blood*, vol. 124, n° 11, p. 1808-1815, sept. 2014.
- [37] D. D. Wagner, J. B. Olmsted, et V. J. Marder, « Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells », *J. Cell Biol.*, vol. 95, n° 1, p. 355-360, oct. 1982.
- [38] Z. M. Ruggeri et G. L. Mendolicchio, « Adhesion mechanisms in platelet function », *Circ. Res.*, vol. 100, n° 12, p. 1673-1685, juin 2007.
- [39] Z. M. Ruggeri, « The role of von Willebrand factor in thrombus formation », *Thromb. Res.*, vol. 120 Suppl 1, p. S5-9, 2007.

- [40] A. Veyradier et P. Coppo, « [ADAMTS13, von Willebrand factor specific cleaving protease] », *Med. Sci. MS*, vol. 27, n° 12, p. 1097-1105, déc. 2011.
- [41] T. Nightingale et D. Cutler, « The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 11 Suppl 1, p. 192-201, juin 2013.
- [42] T. Torisu *et al.*, « Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor », *Nat. Med.*, vol. 19, n° 10, p. 1281-1287, oct. 2013.
- [43] Y. Xiang et J. Hwa, « Regulation of VWF expression, and secretion in health and disease », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 23, n° 3, p. 288-293, mai 2016.
- [44] M. Bryckaert, J.-P. Rosa, C. V. Denis, et P. J. Lenting, « Of von Willebrand factor and platelets », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 72, n° 2, p. 307-326, janv. 2015.
- [45] G. Rastegarlarlari *et al.*, « Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor », *Blood*, vol. 119, n° 9, p. 2126-2134, mars 2012.
- [46] E. Fressinaud et D. Meyer, « [Von Willebrand disease: from diagnosis to treatment] », *Rev. Prat.*, vol. 55, n° 20, p. 2209-2218, déc. 2005.
- [47] J. C. Lewis *et al.*, « Fibrinogen and glycoprotein IIb/IIIa localization during platelet adhesion. Localization to the granulomere and at sites of platelet interaction », *Am. J. Pathol.*, vol. 136, n° 1, p. 239-252, janv. 1990.
- [48] J. W. Weisel et R. I. Litvinov, « Fibrin Formation, Structure and Properties », *Subcell. Biochem.*, vol. 82, p. 405-456, 2017.
- [49] S. S. Acharya et D. M. Dimichele, « Rare inherited disorders of fibrinogen », *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.*, vol. 14, n° 6, p. 1151-1158, nov. 2008.
- [50] Y. Wang *et al.*, « Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis », *J. Clin. Invest.*, vol. 124, n° 10, p. 4281-4293, oct. 2014.
- [51] X. Wu *et al.*, « The Roles of Thrombospondins in Hemorrhagic Stroke », *BioMed Res. Int.*, vol. 2017, p. 8403184, 2017.
- [52] A. Kauskot et M. F. Hoylaerts, « Platelet receptors », *Handb. Exp. Pharmacol.*, n° 210, p. 23-57, 2012.
- [53] J. F. Dong, S. Gao, et J. A. López, « Synthesis, assembly, and intracellular transport of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 47, p. 31449-31454, nov. 1998.
- [54] M. Bryckaert, J.-P. Rosa, C. V. Denis, et P. J. Lenting, « Of von Willebrand factor and platelets », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 72, n° 2, p. 307-326, janv. 2015.
- [55] P. H. Mangin, N. Receveur, V. Wurtz, T. David, C. Gachet, et F. Lanza, « Identification of five novel 14-3-3 isoforms interacting with the GPIb-IX complex in platelets », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 7, n° 9, p. 1550-1555, sept. 2009.
- [56] R. K. Andrews et M. C. Berndt, « Adhesion-dependent signalling and the initiation of haemostasis and thrombosis », *Histol. Histopathol.*, vol. 13, n° 3, p. 837-844, juill. 1998.
- [57] Y. Wu *et al.*, « Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase », *Blood*, vol. 101, n° 9, p. 3469-3476, mai 2003.
- [58] A. Stojanovic *et al.*, « A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 24, p. 16333-16339, juin 2006.
- [59] A. Garcia, T. M. Quinton, R. T. Dorsam, et S. P. Kunapuli, « Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are essential for VWF/GPIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets », *Blood*, vol. 106, n° 10, p. 3410-3414, nov. 2005.
- [60] D. Hervé *et al.*, « Loss of $\alpha 1\beta 1$ soluble guanylate cyclase, the major nitric oxide receptor, leads to moyamoya and achalasia », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 94, n° 3, p. 385-394, mars 2014.
- [61] M. Mazzucato, P. Pradella, M. R. Cozzi, L. De Marco, et Z. M. Ruggeri, « Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalph mechanoreceptor », *Blood*, vol. 100, n° 8, p. 2793-2800, oct. 2002.
- [62] Y. Wu *et al.*, « Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling », *Blood*, vol. 97, n° 12, p. 3836-3845, juin 2001.
- [63] E. E. Gardiner, D. Karunakaran, Y. Shen, J. F. Arthur, R. K. Andrews, et M. C. Berndt, « Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 5, n° 7, p. 1530-1537, juill. 2007.
- [64] E. E. Gardiner et R. K. Andrews, « Platelet receptor expression and shedding: glycoprotein Ib-IX-V and glycoprotein VI », *Transfus. Med. Rev.*, vol. 28, n° 2, p. 56-60, avr. 2014.
- [65] M. Jandrot-Perrus *et al.*, « Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin

- superfamily », *Blood*, vol. 96, n° 5, p. 1798-1807, sept. 2000.
- [66] M. Moroi et S. M. Jung, « Platelet glycoprotein VI: its structure and function », *Thromb. Res.*, vol. 114, n° 4, p. 221-233, 2004.
- [67] R. K. Andrews, K. Suzuki-Inoue, Y. Shen, D. Tulasne, S. P. Watson, et M. C. Berndt, « Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI », *Blood*, vol. 99, n° 11, p. 4219-4221, juin 2002.
- [68] A. Ragab *et al.*, « Roles of the C-terminal tyrosine residues of LAT in GPVI-induced platelet activation: insights into the mechanism of PLC gamma 2 activation », *Blood*, vol. 110, n° 7, p. 2466-2474, oct. 2007.
- [69] M. P. Gratacap, B. Payrastre, C. Viala, G. Mauco, M. Plantavid, et H. Chap, « Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in FcgammaRIIA-mediated activation of human platelets », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 38, p. 24314-24321, sept. 1998.
- [70] S. P. Watson, J. M. Auger, O. J. T. McCarty, et A. C. Pearce, « GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 3, n° 8, p. 1752-1762, août 2005.
- [71] S. Dütting et B. Nieswandt, « Better safe than sorry: glycoprotein VI dimerization as a novel checkpoint and early biomarker of platelet activation », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, n° 3, p. 552-553, mars 2012.
- [72] S. P. Watson, J. M. Auger, O. J. T. McCarty, et A. C. Pearce, « GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 3, n° 8, p. 1752-1762, août 2005.
- [73] M. Bender *et al.*, « Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases », *Blood*, vol. 116, n° 17, p. 3347-3355, oct. 2010.
- [74] C. L. Wagner, M. A. Mascelli, D. S. Neblock, H. F. Weisman, B. S. Coller, et R. E. Jordan, « Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets », *Blood*, vol. 88, n° 3, p. 907-914, août 1996.
- [75] S. J. Shattil, C. Kim, et M. H. Ginsberg, « The final steps of integrin activation: the end game », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, n° 4, p. 288-300, avr. 2010.
- [76] M. H. Ginsberg, A. Partridge, et S. J. Shattil, « Integrin regulation », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 17, n° 5, p. 509-516, oct. 2005.
- [77] S. J. Shattil et P. J. Newman, « Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets », *Blood*, vol. 104, n° 6, p. 1606-1615, sept. 2004.
- [78] C. Gachet, « P2Y(12) receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells », *Purinergic Signal.*, vol. 8, n° 3, p. 609-619, sept. 2012.
- [79] F. Moheimani et D. E. Jackson, « P2Y12 receptor: platelet thrombus formation and medical interventions », *Int. J. Hematol.*, vol. 96, n° 5, p. 572-587, nov. 2012.
- [80] S. P. Staal, J. W. Hartley, et W. P. Rowe, « Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 74, n° 7, p. 3065-3067, juill. 1977.
- [81] A. Bellacosa, J. R. Testa, S. P. Staal, et P. N. Tsichlis, « A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region », *Science*, vol. 254, n° 5029, p. 274-277, oct. 1991.
- [82] P. F. Jones, T. Jakubowicz, F. J. Pitossi, F. Maurer, et B. A. Hemmings, « Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, n° 10, p. 4171-4175, mai 1991.
- [83] P. J. Coffey et J. R. Woodgett, « Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families », *Eur. J. Biochem.*, vol. 201, n° 2, p. 475-481, oct. 1991.
- [84] L. C. Cantley, « The role of phosphoinositide 3-kinase in human disease », *Harvey Lect.*, vol. 100, p. 103-122, 2005 2004.
- [85] D. S. Woulfe, « Akt signaling in platelets and thrombosis », *Expert Rev. Hematol.*, vol. 3, n° 1, p. 81-91, févr. 2010.
- [86] C. Kroner, K. Eybrechts, et J. W. Akkerman, « Dual regulation of platelet protein kinase B », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 36, p. 27790-27798, sept. 2000.
- [87] J. M. Burkhardt *et al.*, « The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways », *Blood*, vol. 120, n° 15, p. e73-82, oct. 2012.
- [88] M. Dittrich, I. Birschmann, S. Mietner, A. Sickmann, U. Walter, et T. Dandekar, « Platelet protein interactions: map, signaling components, and phosphorylation groundstate », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, n° 7, p. 1326-1331, juill. 2008.
- [89] D. Woulfe, H. Jiang, A. Morgans, R. Monks, M. Birnbaum, et L. F. Brass, « Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2 », *J. Clin. Invest.*, vol. 113, n° 3, p. 441-450, févr. 2004.

- [90] H. Cho *et al.*, « Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta) », *Science*, vol. 292, n° 5522, p. 1728-1731, juin 2001.
- [91] D. A. Altomare, G. E. Lyons, Y. Mitsuuchi, J. Q. Cheng, et J. R. Testa, « Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin », *Oncogene*, vol. 16, n° 18, p. 2407-2411, mai 1998.
- [92] H. Cho, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, et M. J. Birnbaum, « Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 42, p. 38349-38352, oct. 2001.
- [93] X. D. Peng *et al.*, « The growth hormone (GH)-axis of GH receptor/binding protein gene-disrupted and metallothionein-human GH-releasing hormone transgenic mice: hypothalamic neuropeptide and pituitary receptor expression in the absence and presence of GH feedback », *Endocrinology*, vol. 142, n° 3, p. 1117-1123, mars 2001.
- [94] K. Nakatani *et al.*, « Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 31, p. 21528-21532, juill. 1999.
- [95] A. M. Martelli *et al.*, « The emerging multiple roles of nuclear Akt », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1823, n° 12, p. 2168-2178, déc. 2012.
- [96] M. Hanada, J. Feng, et B. A. Hemmings, « Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1697, n° 1-2, p. 3-16, mars 2004.
- [97] B. D. Manning et A. Toker, « AKT/PKB Signaling: Navigating the Network », *Cell*, vol. 169, n° 3, p. 381-405, avr. 2017.
- [98] C. I. Jones *et al.*, « A functional genomics approach reveals novel quantitative trait loci associated with platelet signaling pathways », *Blood*, vol. 114, n° 7, p. 1405-1416, août 2009.
- [99] M. Tyers *et al.*, « Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets », *Nature*, vol. 333, n° 6172, p. 470-473, juin 1988.
- [100] M. A. Lemmon, « Membrane recognition by phospholipid-binding domains », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, n° 2, p. 99-111, févr. 2008.
- [101] M. A. Lemmon, « Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides », *Biochem. Soc. Symp.*, n° 74, p. 81-93, 2007.
- [102] T. G. Kutateladze, « Translation of the phosphoinositide code by PI effectors », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 6, n° 7, p. 507-513, juill. 2010.
- [103] T. E. Rusten et H. Stenmark, « Analyzing phosphoinositides and their interacting proteins », *Nat. Methods*, vol. 3, n° 4, p. 251-258, avr. 2006.
- [104] J. Viaud *et al.*, « Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics », *Biochimie*, vol. 125, p. 250-258, juin 2016.
- [105] K. Moravcevic, C. L. Oxley, et M. A. Lemmon, « Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity », *Struct. Lond. Engl. 1993*, vol. 20, n° 1, p. 15-27, janv. 2012.
- [106] S. R. James, C. P. Downes, R. Gigg, S. J. Grove, A. B. Holmes, et D. R. Alessi, « Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation », *Biochem. J.*, vol. 315 (Pt 3), p. 709-713, mai 1996.
- [107] K. E. Landgraf, C. Pilling, et J. J. Falke, « Molecular mechanism of an oncogenic mutation that alters membrane targeting: Glu17Lys modifies the PIP lipid specificity of the AKT1 PH domain », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 47, n° 47, p. 12260-12269, nov. 2008.
- [108] C. C. Thomas, M. Deak, D. R. Alessi, et D. M. F. van Aalten, « High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate », *Curr. Biol. CB*, vol. 12, n° 14, p. 1256-1262, juill. 2002.
- [109] C. J. Green *et al.*, « Use of Akt inhibitor and a drug-resistant mutant validates a critical role for protein kinase B/Akt in the insulin-dependent regulation of glucose and system A amino acid uptake », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 41, p. 27653-27667, oct. 2008.
- [110] D. Fushman, T. Najmabadi-Haske, S. Cahill, J. Zheng, H. LeVine, et D. Cowburn, « The solution structure and dynamics of the pleckstrin homology domain of G protein-coupled receptor kinase 2 (beta-adrenergic receptor kinase 1). A binding partner of Gbetagamma subunits », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 5, p. 2835-2843, janv. 1998.
- [111] R. T. Peterson et S. L. Schreiber, « Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family », *Curr. Biol. CB*, vol. 9, n° 14, p. R521-524, juill. 1999.
- [112] D. R. Alessi, F. B. Caudwell, M. Andjelkovic, B. A. Hemmings, et P. Cohen, « Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase », *FEBS Lett.*, vol. 399, n° 3, p. 333-338, déc. 1996.
- [113] M. Andjelković *et al.*, « Role of translocation in the activation and function of protein kinase B », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 50, p. 31515-31524, déc. 1997.

- [114] D. Brodbeck, P. Cron, et B. A. Hemmings, « A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 14, p. 9133-9136, avr. 1999.
- [115] V. Calleja *et al.*, « Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo », *PLoS Biol.*, vol. 5, n° 4, p. e95, avr. 2007.
- [116] D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, et D. M. Sabatini, « Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex », *Science*, vol. 307, n° 5712, p. 1098-1101, févr. 2005.
- [117] M. Ebner, I. Lučić, T. A. Leonard, et I. Yudushkin, « PI(3,4,5)P3 Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes », *Mol. Cell*, vol. 65, n° 3, p. 416-431.e6, févr. 2017.
- [118] N. Jethwa *et al.*, « Endomembrane PtdIns(3,4,5)P3 activates the PI3K-Akt pathway », *J. Cell Sci.*, vol. 128, n° 18, p. 3456-3465, sept. 2015.
- [119] L. Braccini *et al.*, « PI3K-C2γ is a Rab5 effector selectively controlling endosomal Akt2 activation downstream of insulin signalling », *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7400, juin 2015.
- [120] N. R. Sundaresan *et al.*, « The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy », *Sci. Signal.*, vol. 4, n° 182, p. ra46, juill. 2011.
- [121] S.-F. Wang *et al.*, « Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors », *PLoS One*, vol. 6, n° 3, p. e17621, mars 2011.
- [122] C.-H. Chan *et al.*, « Posttranslational regulation of Akt in human cancer », *Cell Biosci.*, vol. 4, n° 1, p. 59, 2014.
- [123] R. Li *et al.*, « Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis », *Cancer Res.*, vol. 73, n° 18, p. 5742-5753, sept. 2013.
- [124] S. Séverin *et al.*, « Deficiency of Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 affects platelet responses and thrombus growth », *J. Clin. Invest.*, vol. 117, n° 4, p. 944-952, avr. 2007.
- [125] T. Maehama et J. E. Dixon, « The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 22, p. 13375-13378, mai 1998.
- [126] Z. Weng *et al.*, « PTEN regulates collagen-induced platelet activation », *Blood*, vol. 116, n° 14, p. 2579-2581, oct. 2010.
- [127] N. Andjelković, S. Zolnierowicz, C. Van Hoof, J. Goris, et B. A. Hemmings, « The catalytic subunit of protein phosphatase 2A associates with the translation termination factor eRF1 », *EMBO J.*, vol. 15, n° 24, p. 7156-7167, déc. 1996.
- [128] Y.-C. Kuo, K.-Y. Huang, C.-H. Yang, Y.-S. Yang, W.-Y. Lee, et C.-W. Chiang, « Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 4, p. 1882-1892, janv. 2008.
- [129] S. Padmanabhan, A. Mukhopadhyay, S. D. Narasimhan, G. Tesz, M. P. Czech, et H. A. Tissenbaum, « A PP2A regulatory subunit regulates C. elegans insulin/IGF-1 signaling by modulating AKT-1 phosphorylation », *Cell*, vol. 136, n° 5, p. 939-951, mars 2009.
- [130] F. C. Gushiken *et al.*, « Protein phosphatase 2A negatively regulates integrin alpha(IIb)beta(3) signaling », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 19, p. 12862-12869, mai 2008.
- [131] J. Brognard, E. Sierrecki, T. Gao, et A. C. Newton, « PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms », *Mol. Cell*, vol. 25, n° 6, p. 917-931, mars 2007.
- [132] G. F. Guidetti, I. Canobbio, et M. Torti, « PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis », *Adv. Biol. Regul.*, vol. 59, p. 36-52, sept. 2015.
- [133] S. S. El Sheikh, J. Domin, P. Tomtitchong, P. Abel, G. Stamp, et E.-N. Lalani, « Topographical expression of class IA and class II phosphoinositide 3-kinase enzymes in normal human tissues is consistent with a role in differentiation », *BMC Clin. Pathol.*, vol. 3, n° 1, p. 4, oct. 2003.
- [134] T. F. Franke, « PI3K/Akt: getting it right matters », *Oncogene*, vol. 27, n° 50, p. 6473-6488, oct. 2008.
- [135] B. M. Burgering et P. J. Coffey, « Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction », *Nature*, vol. 376, n° 6541, p. 599-602, août 1995.
- [136] B. Vanhaesebroeck, J. Guillermet-Guibert, M. Graupera, et B. Bilanges, « The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, n° 5, p. 329-341, mai 2010.
- [137] A. Toker et L. C. Cantley, « Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase », *Nature*, vol. 387, n° 6634, p. 673-676, juin 1997.
- [138] D. C. Berwick, I. Hers, K. J. Heesom, S. K. Moule, et J. M. Tavaré, « The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in

- primary adipocytes », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 37, p. 33895-33900, sept. 2002.
- [139] S. Horman *et al.*, « Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491 », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 9, p. 5335-5340, mars 2006.
- [140] D. A. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, et B. A. Hemmings, « Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B », *Nature*, vol. 378, n° 6559, p. 785-789, déc. 1995.
- [141] A. E. Webb et A. Brunet, « FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 39, n° 4, p. 159-169, avr. 2014.
- [142] K. E. van der Vos et P. J. Coffey, « The extending network of FOXO transcriptional target genes », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 14, n° 4, p. 579-592, févr. 2011.
- [143] C. C. Dibble *et al.*, « TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1 », *Mol. Cell*, vol. 47, n° 4, p. 535-546, août 2012.
- [144] K. Inoki, Y. Li, T. Zhu, J. Wu, et K.-L. Guan, « TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling », *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, n° 9, p. 648-657, sept. 2002.
- [145] R. A. Saxton et D. M. Sabatini, « mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease », *Cell*, vol. 168, n° 6, p. 960-976, mars 2017.
- [146] A. Sekulić *et al.*, « A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells », *Cancer Res.*, vol. 60, n° 13, p. 3504-3513, juill. 2000.
- [147] « Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136137>. [Consulté le: 13-mai-2018].
- [148] I. Sanidas *et al.*, « Phosphoproteomics screen reveals akt isoform-specific signals linking RNA processing to lung cancer », *Mol. Cell*, vol. 53, n° 4, p. 577-590, févr. 2014.
- [149] S. F. Moore, M. T. J. van den Bosch, R. W. Hunter, K. Sakamoto, A. W. Poole, et I. Hers, « Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) α/β by protein kinase C (PKC) α and Akt promotes thrombin-mediated integrin α IIb β 3 activation and granule secretion in platelets », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 6, p. 3918-3928, févr. 2013.
- [150] P.-A. Laurent, S. Séverin, B. Hechler, B. Vanhaesebroeck, B. Payrastre, et M.-P. Gratacap, « Platelet PI3K β and GSK3 regulate thrombus stability at a high shear rate », *Blood*, vol. 125, n° 5, p. 881-888, janv. 2015.
- [151] P.-A. Laurent, S. Severin, M.-P. Gratacap, et B. Payrastre, « Class I PI 3-kinases signaling in platelet activation and thrombosis: PDK1/Akt/GSK3 axis and impact of PTEN and SHIP1 », *Adv. Biol. Regul.*, vol. 54, p. 162-174, janv. 2014.
- [152] L. S. Harrington *et al.*, « The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins », *J. Cell Biol.*, vol. 166, n° 2, p. 213-223, juill. 2004.
- [153] A. Tzatsos et K. V. Kandror, « Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation », *Mol. Cell Biol.*, vol. 26, n° 1, p. 63-76, janv. 2006.
- [154] P. P. Hsu *et al.*, « The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling », *Science*, vol. 332, n° 6035, p. 1317-1322, juin 2011.
- [155] C. C. Dibble, J. M. Asara, et B. D. Manning, « Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1 », *Mol. Cell Biol.*, vol. 29, n° 21, p. 5657-5670, nov. 2009.
- [156] L.-A. Julien, A. Carriere, J. Moreau, et P. P. Roux, « mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling », *Mol. Cell Biol.*, vol. 30, n° 4, p. 908-921, févr. 2010.
- [157] B. Dummler et B. A. Hemmings, « Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, n° Pt 2, p. 231-235, avr. 2007.
- [158] W. S. Chen *et al.*, « Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene », *Genes Dev.*, vol. 15, n° 17, p. 2203-2208, sept. 2001.
- [159] V. R. Babaev *et al.*, « Macrophage deficiency of Akt2 reduces atherosclerosis in Ldlr null mice », *J. Lipid Res.*, vol. 55, n° 11, p. 2296-2308, nov. 2014.
- [160] L. Ding *et al.*, « Akt3 deficiency in macrophages promotes foam cell formation and atherosclerosis in mice », *Cell Metab.*, vol. 15, n° 6, p. 861-872, juin 2012.
- [161] X.-D. Peng *et al.*, « Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2 », *Genes Dev.*, vol. 17, n° 11, p. 1352-1365, juin 2003.

- [162] « Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713641>. [Consulté le: 13-mai-2018].
- [163] O. Tschopp *et al.*, « Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis », *Dev. Camb. Engl.*, vol. 132, n° 13, p. 2943-2954, juill. 2005.
- [164] K. M. Keppler-Noreuil *et al.*, « PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation », *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 167A, n° 2, p. 287-295, févr. 2015.
- [165] M. J. Lindhurst *et al.*, « A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome », *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, n° 7, p. 611-619, août 2011.
- [166] « Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500628>. [Consulté le: 13-mai-2018].
- [167] V. M. Jansen, I. A. Mayer, et C. L. Arteaga, « Is There a Future for AKT Inhibitors in the Treatment of Cancer? », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 22, n° 11, p. 2599-2601, juin 2016.
- [168] J. Lauring *et al.*, « Knock in of the AKT1 E17K mutation in human breast epithelial cells does not recapitulate oncogenic PIK3CA mutations », *Oncogene*, vol. 29, n° 16, p. 2337-2345, avr. 2010.
- [169] M. L. Mancini, E. C. Lien, et A. Toker, « Oncogenic AKT1(E17K) mutation induces mammary hyperplasia but prevents HER2-driven tumorigenesis », *Oncotarget*, vol. 7, n° 14, p. 17301-17313, avr. 2016.
- [170] M. A. Davies *et al.*, « A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines », *Br. J. Cancer*, vol. 99, n° 8, p. 1265-1268, oct. 2008.
- [171] I. A. Mayer et C. L. Arteaga, « The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment », *Annu. Rev. Med.*, vol. 67, p. 11-28, 2016.
- [172] J. Chen *et al.*, « Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo », *Nat. Med.*, vol. 11, n° 11, p. 1188-1196, nov. 2005.
- [173] C. Fernández-Hernando, L. József, D. Jenkins, A. Di Lorenzo, et W. C. Sessa, « Absence of Akt1 reduces vascular smooth muscle cell migration and survival and induces features of plaque vulnerability and cardiac dysfunction during atherosclerosis », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, n° 12, p. 2033-2040, déc. 2009.
- [174] D. Bridges et A. R. Saltiel, « Phosphoinositides in insulin action and diabetes », *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 362, p. 61-85, 2012.
- [175] D. Leto et A. R. Saltiel, « Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4 », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, n° 6, p. 383-396, mai 2012.
- [176] M. A. Egerman et D. J. Glass, « Signaling pathways controlling skeletal muscle mass », *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 49, n° 1, p. 59-68, févr. 2014.
- [177] S. George *et al.*, « A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2 », *Science*, vol. 304, n° 5675, p. 1325-1328, mai 2004.
- [178] H. Yin, A. Stojanovic, N. Hay, et X. Du, « The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation », *Blood*, vol. 111, n° 2, p. 658-665, janv. 2008.
- [179] R. W. Hunter, M. T. Harper, et I. Hers, « The PKB inhibitor Akti-1/2 potentiates PAR-1-mediated platelet function independently of its ability to block PKB », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 6, n° 11, p. 1923-1932, nov. 2008.
- [180] V. Baccini et M. C. Alessi, « [Diagnosis of inherited thrombocytopenia] », *Rev. Med. Interne*, vol. 37, n° 2, p. 117-126, févr. 2016.
- [181] M. Ballmaier et M. Germeshausen, « Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical presentation, diagnosis, and treatment », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 37, n° 6, p. 673-681, sept. 2011.
- [182] E. Klopocki *et al.*, « Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 80, n° 2, p. 232-240, févr. 2007.
- [183] L. Krishnamurti *et al.*, « Paris-Trousseau syndrome platelets in a child with Jacobsen's syndrome », *Am. J. Hematol.*, vol. 66, n° 4, p. 295-299, avr. 2001.
- [184] L. Noetzli *et al.*, « Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia », *Nat. Genet.*, vol. 47, n° 5, p. 535-538, mai 2015.
- [185] P. Noris *et al.*, « Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families », *Blood*, vol. 117, n° 24, p. 6673-6680, juin 2011.

- [186] P. Noris *et al.*, « ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies », *Blood*, vol. 122, n° 11, p. 1987-1989, sept. 2013.
- [187] M. Gunay-Aygun *et al.*, « NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet α -granules », *Nat. Genet.*, vol. 43, n° 8, p. 732-734, juill. 2011.
- [188] M. Seri *et al.*, « Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium », *Nat. Genet.*, vol. 26, n° 1, p. 103-105, sept. 2000.
- [189] M. J. Massaad, N. Ramesh, et R. S. Geha, « Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1285, p. 26-43, mai 2013.
- [190] S. Sabri *et al.*, « Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment », *Blood*, vol. 108, n° 1, p. 134-140, juill. 2006.
- [191] S. Kunishima, S. Nishimura, H. Suzuki, M. Imaizumi, et H. Saito, « TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia », *Eur. J. Haematol.*, vol. 92, n° 4, p. 276-282, avr. 2014.
- [192] A. Balduini *et al.*, « Proplatelet formation in heterozygous Bernard-Soulier syndrome type Bolzano », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 7, n° 3, p. 478-484, mars 2009.
- [193] M. Fiore, X. Pillois, P. Nurden, A. T. Nurden, et F. Austerlitz, « Founder effect and estimation of the age of the French Gypsy mutation associated with Glanzmann thrombasthenia in Manouche families », *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, vol. 19, n° 9, p. 981-987, sept. 2011.
- [194] B. T. Kile, « The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets », *Br. J. Haematol.*, vol. 165, n° 2, p. 217-226, avr. 2014.
- [195] I. M. Morison *et al.*, « A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia », *Nat. Genet.*, vol. 40, n° 4, p. 387-389, avr. 2008.
- [196] D. De Rocco *et al.*, « Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, n° 2, p. 269-274, févr. 2014.
- [197] B. Payrastre, M.-C. Alessi, et P. Sie, « Physiopathologie des thrombopathies constitutionnelles », *Hématologie*, vol. 20, n° 1, p. 20-35, janv. 2014.
- [198] C. Gachet, « P2 receptors, platelet function and pharmacological implications », *Thromb. Haemost.*, vol. 99, n° 3, p. 466-472, mars 2008.
- [199] M. Cattaneo, « Bleeding manifestations of congenital and drug-induced defects of the platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate », *Thromb. Haemost.*, vol. 105 Suppl 1, p. S67-74, mai 2011.
- [200] M. Shiraga *et al.*, « Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 3, n° 10, p. 2315-2323, oct. 2005.
- [201] M. E. Daly *et al.*, « Identification and characterization of a novel P2Y 12 variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study », *Blood*, vol. 113, n° 17, p. 4110-4113, avr. 2009.
- [202] S. Nisar *et al.*, « An intact PDZ motif is essential for correct P2Y12 purinoceptor traffic in human platelets », *Blood*, vol. 118, n° 20, p. 5641-5651, nov. 2011.
- [203] Y. M. Patel *et al.*, « A novel mutation in the P2Y12 receptor and a function-reducing polymorphism in protease-activated receptor 1 in a patient with chronic bleeding », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 12, n° 5, p. 716-725, mai 2014.
- [204] B. Dumont *et al.*, « Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations », *Blood*, vol. 114, n° 9, p. 1900-1903, août 2009.
- [205] C. Hermans, C. Wittevrongel, C. Thys, P. A. Smethurst, C. Van Geet, et K. Freson, « A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 7, n° 8, p. 1356-1363, août 2009.
- [206] V. Matus *et al.*, « An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 11, n° 9, p. 1751-1759, sept. 2013.
- [207] T. Kamae *et al.*, « Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in the thromboxane A2 receptor », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 9, n° 5, p. 1040-1048, mai 2011.
- [208] T. Hirata, A. Kakizuka, F. Ushikubi, I. Fuse, M. Okuma, et S. Narumiya, « Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A2 receptor in a dominantly inherited bleeding disorder », *J. Clin. Invest.*, vol. 94, n° 4, p. 1662-1667, oct. 1994.
- [209] A. D. Mumford *et al.*, « A novel thromboxane A2 receptor D304N variant that abrogates ligand

- binding in a patient with a bleeding diathesis », *Blood*, vol. 115, n° 2, p. 363-369, janv. 2010.
- [210] A. D. Mumford *et al.*, « Platelet dysfunction associated with the novel Trp29Cys thromboxane A₂ receptor variant », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 11, n° 3, p. 547-554, mars 2013.
- [211] S. P. Nisar *et al.*, « A novel thromboxane A₂ receptor N42S variant results in reduced surface expression and platelet dysfunction », *Thromb. Haemost.*, vol. 111, n° 5, p. 923-932, mai 2014.
- [212] K. Freson *et al.*, « Genetic variation of the extra-large stimulatory G protein alpha-subunit leads to Gs hyperfunction in platelets and is a risk factor for bleeding », *Thromb. Haemost.*, vol. 86, n° 3, p. 733-738, sept. 2001.
- [213] L. Noé *et al.*, « Platelet Gs hypofunction and abnormal morphology resulting from a heterozygous RGS2 mutation », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 8, n° 7, p. 1594-1603, juill. 2010.
- [214] S. B. Lee, A. K. Rao, K. H. Lee, X. Yang, Y. S. Bae, et S. G. Rhee, « Decreased expression of phospholipase C-beta 2 isozyme in human platelets with impaired function », *Blood*, vol. 88, n° 5, p. 1684-1691, sept. 1996.
- [215] G. F. Mao, V. R. Vaidyula, S. P. Kunapuli, et A. K. Rao, « Lineage-specific defect in gene expression in human platelet phospholipase C-beta2 deficiency », *Blood*, vol. 99, n° 3, p. 905-911, févr. 2002.
- [216] M. K. Boudreaux, J. L. Catalfamo, et M. Klok, « Calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I gene mutations associated with loss of function in canine platelets », *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*, vol. 150, n° 2, p. 81-92, août 2007.
- [217] E. Bermejo *et al.*, « Marked bleeding diathesis in patients with platelet dysfunction due to a novel mutation in RASGRP2, encoding CalDAG-GEFI (p.Gly305Asp) », *Platelets*, vol. 29, n° 1, p. 84-86, janv. 2018.
- [218] P. Gissen *et al.*, « Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogyrosis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome », *Nat. Genet.*, vol. 36, n° 4, p. 400-404, avr. 2004.
- [219] C. P. M. Hayward et G. E. Rivard, « Quebec platelet disorder », *Expert Rev. Hematol.*, vol. 4, n° 2, p. 137-141, avr. 2011.
- [220] R. Favier *et al.*, « Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases », *Thromb. Haemost.*, vol. 90, n° 5, p. 893-897, nov. 2003.
- [221] J. Masliah-Planchon, L. Darnige, et S. Bellucci, « Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update », *Br. J. Haematol.*, vol. 160, n° 1, p. 5-11, janv. 2013.
- [222] M. Malvezzi *et al.*, « Ca²⁺-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel », *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2367, 2013.
- [223] A. K. Rao, « Inherited defects in platelet signaling mechanisms », *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 1, n° 4, p. 671-681, avr. 2003.
- [224] V. R. Vaidyula et A. K. Rao, « Role of Galphaq and phospholipase C-beta2 in human platelets activation by thrombin receptors PAR1 and PAR4: studies in human platelets deficient in Galphaq and phospholipase C-beta2 », *Br. J. Haematol.*, vol. 121, n° 3, p. 491-496, mai 2003.
- [225] P. Robert *et al.*, « A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 186, n° 9, p. 5273-5283, mai 2011.
- [226] G. F. Guidetti, D. Manganaro, A. Consonni, I. Canobbio, C. Balduini, et M. Torti, « Phosphorylation of the guanine-nucleotide-exchange factor CalDAG-GEFI by protein kinase A regulates Ca(2+)-dependent activation of platelet Rap1b GTPase », *Biochem. J.*, vol. 453, n° 1, p. 115-123, juill. 2013.

AUTEUR : Agnès MAUREL RIBES

TITRE : Caractérisation du rôle des isoformes d'Akt dans l'activation plaquettaire et les thrombopathies

DIRECTEUR DE THÈSE : Pr Bernard PAYRASTRE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : FACULTÉ DE MÉDECINE DE PURPAN, TOULOUSE, 29 mai 2018

Résumé en français

Les 3 isoformes d'Akt, Akt1, Akt2 et Akt3, sont exprimées dans les plaquettes humaines toutefois, leur rôle respectif reste mal défini. Chez une patiente prise en charge au Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires de Toulouse pour une symptomatologie hémorragique spontanée modérée, nous avons mis en évidence une anomalie de la phosphorylation d'Akt. Dans un premier temps, et à l'aide des outils conventionnels (agrégations, immunoempreintes, cytométrie) nous avons précisé l'isoforme responsable : Akt2. Dans un second temps, en collaboration avec la société Cisbio, nous avons quantifié par technique HTRF la phosphorylation activatrice de chacune des isoformes d'Akt dans les plaquettes de sujets sains, stimulées par différents agonistes physiologiques agissant par l'intermédiaire de différents types de récepteurs. Ce travail se poursuivra par l'analyse du défaut d'activation et d'expression d'Akt2 chez la patiente par HTRF. (133 mots)

Titre et résumé en anglais

The 3 Akt isoforms, Akt1 Akt2 and Akt3, are expressed in human platelets, however, their respective roles remain poorly known. For a patient registered at the Reference Center for Platelet Pathologies of Toulouse because of moderate spontaneous haemorrhagic symptoms, we found abnormality of Akt phosphorylation. We first characterized the patient platelet abnormality by using conventional tools (aggregations, Western-blotting, flow cytometry) and found a loss of Akt2 expression. Then, through a collaboration with Cisbio Company we quantified the activating phosphorylation of each of the Akt isoforms by HTRF technique, in healthy subject platelets, stimulated by different physiological agonists acting through different signaling pathways. This work will be ended by the analysis of the patient defect on Akt isoform expression and activation by HTRF.

Mots-Clés : Plaquette, Akt, thrombopathie, HTRF

Discipline administrative : BIOLOGIE MÉDICALE

Faculté de Médecine Rangueil – 133, route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 - France