HAL
open science

Plaquettes sanguines et entretien de l'inflammation post-infectieuse

Pauline Damien

To cite this version:

Pauline Damien. Plaquettes sanguines et entretien de l'inflammation post-infectieuse. Hématologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013. Français. NNT : 2013STET018T . tel-01081116

HAL Id: tel-01081116

https://theses.hal.science/tel-01081116

Submitted on 7 Nov 2014

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

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

THESE de l'Université Jean Monnet de Saint Etienne,
Pôle de recherche et d'enseignement supérieur de Lyon

Pour l'obtention du **DIPLOME DE DOCTORAT en Sciences, Ingénierie, Santé**

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2013 par

Pauline DAMIEN

PLAQUETTES SANGUINES ET ENTRETIEN DE L'INFLAMMATION POST-INFECTIEUSE

Pr. M-C ALESSI	Rapporteur	Inserm - Université de Marseille (FR)
Dr. E. BOILARD	Rapporteur	CHULQ - Université de Laval (CA)
Pr B. PAYRASTRE	Examinateur	Inserm - Université de Toulouse (FR)
Pr. B. POZZETTO	Examinateur	EA3064 - Université de Saint-Etienne (FR)
Dr. H. HAMZEH-COGNASSE	Co-encadrante	EA3064 - Université de Saint-Etienne (FR)
Pr. O. GARRAUD	Directeur de thèse	EA3064 - Université de Saint-Etienne (FR)

THESE de l'Université Jean Monnet de Saint Etienne,
Pôle de recherche et d'enseignement supérieur de Lyon

Pour l'obtention du **DIPLOME DE DOCTORAT en Sciences, Ingénierie, Santé**

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2013 par

Pauline DAMIEN

PLAQUETTES SANGUINES ET ENTRETIEN DE L'INFLAMMATION POST-INFECTIEUSE

Pr. M-C ALESSI	Rapporteur	Inserm - Université de Marseille (FR)
Dr. E. BOILARD	Rapporteur	CHULQ - Université de Laval (CA)
Pr B. PAYRASTRE	Examinateur	Inserm - Université de Toulouse (FR)
Pr. B. POZZETTO	Examinateur	EA3064 - Université de Saint-Etienne (FR)
Dr. H. HAMZEH-COGNASSE	Co-encadrante	EA3064 - Université de Saint-Etienne (FR)
Pr. O. GARRAUD	Directeur de thèse	EA3064 - Université de Saint-Etienne (FR)

A mes parents.....

…Les deux guerriers les plus puissants sont
la patience et le temps N'oublie pas que les
grandes réalisations prennent du temps et
qu'il n'y a pas de succès du jour au lendemain…
Léon Tolstoï

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais, tout d'abord, remercier l'ensemble des membres du jury, les professeurs Marie-Christine ALESSI et Bernard PAYRASTRE ainsi que le Docteur Eric BOILARD pour avoir accepté et pris le temps de juger ce travail. Je profite d'ailleurs de l'écriture de ce manuscrit pour remercier une nouvelle fois le Dr Eric Boilard de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux dans son laboratoire, ainsi que l'accueil qu'il m'avait été réservé.

Je remercie vivement le Professeur Bruno POZZETTO, directeur du GIMAP, d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinateur mais aussi de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je me souviens encore de ce jour de décembre 2006, où j'ai été reçue dans son bureau pour un stage d'ESTBB. Merci d'avoir cru en moi dès le début.

Toute ma gratitude va à mon directeur de thèse, le Professeur Olivier GARRAUD. Je le remercie de s'être battu pour l'obtention de ma bourse mais aussi pour son encadrement, sa disponibilité et son écoute. Il m'est impossible de ne pas mentionner ses capacités de relecture et de valorisation des travaux.

J'ai une reconnaissance sans limite pour le Docteur Hind HAMZEH-COGNASSE, ma co-encadrante de thèse. Je la remercie profondément de s'être tant investie dans ce travail et de m'avoir accordé toute sa confiance. C'est tellement agréable d'avoir pu compter sur sa disponibilité et sa bonne humeur au quotidien. Merci Hind de m'avoir toujours soutenu dans les bons et les moins bons moments…beaucoup ne l'auraient pas fait. L'aboutissement de cette thèse est notre réussite à toutes les deux. J'espère pourvoir conserver notre chaleureuse relation au-delà du GIMAP.

Je souhaite aussi remercier le Docteur Fabrice COGNASSE. Il n'apparait pas officiellement dans l'encadrement de cette thèse mais m'a aussi beaucoup aidée. C'est notamment grâce à son encadrement au cours de mon master que j'ai pu arriver jusqu'à la thèse. Je garderai en tête nos virées dijonnaises et le congrès plaquettes à Varsovie.

Je remercie vivement l'Etablissement Français du Sang, Auvergne-Loire pour son soutien financier, ainsi que l'ensemble du personnel que j'ai pu côtoyer au cours de ma thèse. Je tiens aussi à remercier les donneurs de sang qui, en plus de l'importance de leur don, m'ont permis d'effectuer la majeure partie de mes travaux.

Un petit mot également pour l'Université Jean Monnet et l'Ecole Doctorale Science Ingénierie Santé 488 pour leur soutien financier tant pour mon allocation de recherche que pour démarrer le projet plaquettes-muqueuse.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du GIMAP, que j'ai pu cotoyer de près ou de loin, qu'ils soient chercheurs ou étudiants. Je ne peux me permettre la liste exacte (je m'en excuse d'avance) mais je pense notamment à Blandine, Fabienne, Agathe, Benjamin, Thomas B., Olivier D., Amélie, Rachel, Nico, Phil, Julie, Séverine, Thibaut....avec une pensée particulière pour Fahd et Alex, les copains du bureau d'à côté. Merci à tous pour vos conseils et votre bonne humeur. C'est un peu une famille le GIMAP.

Un petit mot également pour les collaborateurs bactériologistes et virologistes de l'Hôpital Nord….Merci pour vos conseils et la mise à disposition des souches bactériennes et des milieux de culture. Je remercie également les services de gastroentérologie et d'anatomo-pathologie des Professeurs Xavier ROBLIN et Michel PEOCH' pour le protocole plaquettes-MICI et celui des maladies infectieuses du Professeur Fréderic LUCHT pour le protocole plaquettes-HIV.

Je ne sais comment valoriser mes collègues de la « Platelet team ».

Kim-Anh nous étions embarquées dans le même navire qu'est le doctorat. Tu dois être la personne que j'ai la plus vue au cours de ces trois dernières années, surtout quand on commençait notre seconde journée après 18h ! En tous cas, tu as réussi la traversée avec brio et je t'en félicite. Je te souhaite plein de bonnes choses dans ta future vie professionnelle ainsi que personnelle.

Marie-Ange, ce fut un plaisir de t'accueillir dans l'équipe, au sein de laquelle tu t'es d'ailleurs très vite intégrée. Bien évidement je te remercie pour toute ton aide technique, les mots ne sont pas assez forts pour t'exprimer ma gratitude. C'était aussi très agréable de pouvoir partager avec toi « mes bavardages de filles ».

Charles-Antoine, merci à toi aussi pour ton aide. Tu es devenu au fil des années bien plus qu'un collègue. C'est un plaisir de venir au labo pour partager ta sympathie, ta bonne humeur et ton humour. Je te remercie pour ton soutien et tes conseils en tous genres…Merci « papa ».

Un petit mot pour les stagiaires qui ont participé à nos travaux : Marine, Océane, Marie, Amandine, Bérengère, Sophie, Emeric,….

Merci également aux collègues de Robespierre pour leur collaboration : Sandrine, Jocelyne, Chaker, Caroline,…

Je souhaite remercier le laboratoire BiiGC de la Faculté de Médecine chez qui j'ai réalisé une grosse partie de mes manips. Merci à Zhiguo pour tous tes conseils en microscopie, ta gentillesse et ta disponibilité. Je remercie également le Docteur Alain GUIGNANDON et Norbert LAROCHE du laboratoire LBTO pour les essais de vidéomicroscopie.

Je remercie également Séverine, Delphine, Françoise et Serge qui forment l'équipe enseignante de microbiologie de l'IUT, où j'ai effectué une grosse partie de mon activité d'enseignement. Je dois avouer que venir faire la lecture des milieux à 7h du matin n'a pas toujours été facile...mais ce fut pour moi une expérience très enrichissante.

Plongée le nez dans la recherche, mes pensées vont vers les personnes tendres et vigilantes qui m'ont aidé à me vider la tête. Je pense particulièrement aux copains doctorants de la Faculté de Médecine ; Wafa, Marine, Yann, Fiona, Bin Minh. Merci à tous d'avoir ouvert vos apparts pour nos petites soirées improvisées.

Une pensée pour mes amis Julie et JP ; merci pour les moments passés à Saint-Etienne, à Rives mais surtout nos WE inoubliables au Villeret….

Mon passage au GIMAP m'aura aussi permis de rencontrer deux très bons amis. Sandrine, la distance ne nous a pas éloignées au cours des cinq dernières années donc ça ne devrait pas commencer maintenant ! Quant à Roulien, trop de souvenirs pour les exposer ici d'autant plus qu'ils ne sont pas tous avouables ! Tu es parti trop tôt de Saint-Etienne, mais c'est toujours un plaisir de partager mes pensées du jour par SMS.

Enfin, je tiens à remercier ma famille de tout mon cœur. Merci Olivier pour ton aide, tes encouragements, ta patience mais surtout ton amour….même à distance. J'espère qu'on partagera bien d'autres évènements que la thèse.

Le mot de la fin ira à mes parents sans qui je ne serais rien. Merci à eux de m'avoir toujours suivie et encouragée dans mes choix personnels ainsi que dans mes études. Je vous dois tant….je vous aime.

SOMMAIRE

RESUME 1
INDEX DES ABREVIATIONS 3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 9
INTRODUCTION GENERALE 12
ETAT DE LA LITTERATURE 16
CHAPITRE 1 - REPONSE INFLAMMATOIRE PLAQUETTAIRE AU COURS DE L'INFECTION 17
I - Plaquettes et virus 18
A. Récepteurs viraux à la surface des plaquettes 19
B. Les mégacaryocytes et les virus 21
C. Rôle des plaquettes dans la défense antivirale 22
D. Activation plaquettaire et inflammation liée aux virus 24
E. Les plaquettes dans l'entretien de l'inflammation liée à HIV-1 26
II - Plaquettes et infections bactériennes 31
A. Les plaquettes à l'interface entre infection bactérienne et thrombose 31
B. Mécanismes d'interactions entre les plaquettes et les bactéries 33
1) Rôle de la Glycoprotéine IIb-IIIa 33
2) Rôle de la Glycoprotéine Ibα 35
3) Les récepteurs du complément 37
4) Le récepteur FcγRIIA 39
5) Les toxines bactériennes 40
6) Les Toll Like Receptors 40
C. Effets des bactéries sur la fonction plaquettaire 46
1) Internalisation des bactéries 46
2) Activation des plaquettes par les bactéries 49
(a) Effet sur l'agrégation 49
(b) Effet sur la libération de facteurs immunomodulateurs 52
(c) Libération de molécules plaquettaires anti-bactériennes 54
D. Rôle fonctionnel des TLR plaquettaires 58
1) Le TLR4 plaquettaire 59
2) Le TLR2 plaquettaire 62
3) Le TLR9 plaquettaire 64
4) Signalisation TLR dans les plaquettes 65
5) Le NFkB plaquettaire 70
E. Plaquettes – bactéries : Focus sur l'infection à *Staphylococcus aureus* 73
III - Rôle des plaquettes dans la physiopathologie du sepsis 79
A. Généralités sur le sepsis 79
B. Sepsis et activation plaquettaire 81
1) Sepsis et coagulopathie 81
2) Sepsis et molécules plaquettaires inflammatoires 82
C. Apoptose plaquettaire dans le microenvironnement du sepsis 85
D. Implication des plaquettes dans la NETose liée au sepsis 88
CHAPITRE 2 – COOPERATION DES PLAQUETTES ET DES AUTRES CELLULES DE L'INFLAMMATION DANS L'INITIATION ET L'ENTRETIEN DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE 94
I - Les plaquettes dans l'initiation de la réponse inflammatoire endothéliale 95
A. Adhésion initiale et roulement des plaquettes à la surface de l'endothélium 96
B. Adhésion stable des plaquettes à l'endothélium inflammatoire 98
C. Amplification par les plaquettes du phénotype inflammatoire endothélial 100

II - Participation des plaquettes au recrutement des leucocytes vers l'endothélium 104
A. Les chimiokines plaquettaires 104
B. Les plaquettes en tant qu'effecteurs du recrutement secondaire des leucocytes 107
C. Adhésion des plaquettes aux leucocytes..... 107
D. Rôle des plaquettes dans l'activation tardive des leucocytes 110
E. Rôle des plaquettes dans la migration des leucocytes 112

III - Impact du microenvironnement inflammatoire sur l'interconnexion plaquette –leucocyte. 115

IV - Coopération plaquettes- autres cellules de l'inflammation : application aux pathologies inflammatoires..... 119
A. L'athérosclérose 119
B. Pathologies pulmonaires 123
1) Acute Lung Injury (ALI)..... 123
2) Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI) 125
3) Les allergies respiratoires – Asthme..... 130
C. Polyarthrite rhumatoïde..... 133
D. Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) 137

OBJECTIFS DE L'ETUDE 143

RESULTATS 145

MANUSCRIT I.....
HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY ALTERS INFLAMMATION LINKED TO PLATELET CYTOKINES IN HIV-1–INFECTED PATIENTS 146

MANUSCRIT II .....
INHIBITION OF PLASMA-ABSORBED, MEMBRANE-BOUND CD14 ABOLISHES SOLUBLE CD40L SECRETION BY LPS-STIMULATED HUMAN PLATELETS 151

MANUSCRIT III.....
NF-KAPPAB LINKS TLR2 AND PAR1 TO CYTOKINE SECRETION IN HUMAN PLATELETS 167

MANUSCRIT IV.....
HUMAN PLATELETS SENSE DIFFERENTIALLY VARIOUS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EXOTOXINS AND ADAPT SUBSEQUENT IMMUNOMODULATORY MOLECULE SECRETION PROFILES 197

MANUSCRIT V .....
NEUTROPHIL CHEMOATTRACTION PROMOTES PLATELET EXTRAVASATION AND INFLAMMATORY FACTOR RELEASE 225

TRAVAUX EN COURS 257

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 270

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 284

ANNEXES 312

PARTICIPATION AUX TRAVAUX DE RECHERCHE DU LABORATOIRE 313

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 315

RESUME

Les plaquettes sanguines sont des cellules anucléées qui jouent un rôle majeur dans l'hémostase. Au-delà de cette fonction, elles possèdent une composante inflammatoire multifacette ; recouvrant la détection du signal de danger, la libération de cytokines et la migration leucocytaire.

Dans ce contexte, la première partie de ces travaux met en avant la capacité des plaquettes à mettre en place une activation de type inflammatoire en réponse à un pathogène. En effet, lors de l'infection à HIV les plaquettes sont dans un état d'hyperéactivité et libèrent des facteurs immunomodulateurs pouvant participer à l'inflammation observée chez les patients infectées. D'une manière parallèle, les plaquettes présentent une sensibilité aux bactéries, faisant intervenir les TLR2 et 4 mais aussi par les exotoxines, voire les bactéries entières. Le profil de la réponse inflammatoire induite est assez conséquent et diversifié pour participer à la physiopathologie du sepsis.

La participation des plaquettes à l'inflammation concerne également leur interconnexion avec les neutrophiles. La seconde partie des travaux traite d'ailleurs de cette coopération qui ne semble pas s'arrêter à la barrière endothéliale, car lors de leur extravasation les neutrophiles transportent avec eux les plaquettes ; qui sont encore capables d'entretenir l'inflammation au niveau du site inflammatoire (ici, modèle de l'alvéole pulmonaire).

La diversité du répertoire moléculaire plaquettaire, mis en avant au cours de cette thèse, qui participe à l'inflammation ouvre plusieurs possibilités quant à l'élaboration d'anti-plaquettaires qui pourraient moduler une réponse inflammatoire exacerbée.

Mots-clés : plaquettes, inflammation, HIV, *S.aureus*, TLR, NFκB, complexes plaquettes/neutrophiles, chimioattraction

INDEX DES ABRÉVIATIONS

A :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine di-phosphate

ALI : Acute Lung Injury

AMPc : Adénosine mono-phosphate cyclqiue

ARDS : Acute Respiratory Distress Syndrome

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ATP : Adénosine tri-phosphate

B

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

C

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

ClfA : Clumping factor A

ClfB : Clumping factor B

CLP : Cecal Ligation and Puncture

D

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

E

E.coli : *Escherichia coli*

EI : endocardite infectieuse

F

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

Fas : Apoptosis Stimulating Fragment

FLS : Fibroblast-like synovocytes

FnbpA : Fibronectin binding protein A

FnbpB : Fibronectin binding protein B

FT : Facteur Tissulaire

G

GMPc : Guanosine mono-phosphate cyclique

GP : Glycoprotéine

GSK3β : Glycogen synthase kinase 3 beta

H

HAART : Highly Active Antiretroviral Therapy

HCV : Hepatitis C virus

hBD-1 : human beta-defensin-1

HIMEC : Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells

HIV : Human Immunodeficency Virus

HLA: Human Leucocyte Antigen

HNA : Human Neutrophil Antigène

Hsa : Hemagglutinin salivary antigen

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell

I

ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule-1

ICAM-2: InterCellular Adhesion Molecule-2

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IsdA : Iron-regulated surface determinant A

IsdB : Iron-regulated surface determinant B

IsdH : Iron-regulated surface determinant H

ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

J

JAM-3 : Junctional adhesion molecule-3

K

KO : Knock-out

L

LBP : LPS-binding protein

LPS : lipopolysaccharide

M

Mac-1: Macrophage-1 antigen

MAPk : Mitogen activated proteins kinase

MC : Maladie de Crohn

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

MICI : Maladie Inflammatoire Cryptogénétique de l'Intestin

MIP-1 : Macrophage inflammatory protein 1

MIP-2 : Macrophage inflammatory protein 2

MK : Mégakaryocyte (mégacaryocyte)

MMP :Matrix Metallo-protease

MPP : Microparticule plaquettaire

MSCRAMM : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene (88)

N

NAP-2 : Neutrophil-activating peptide-2

NET : Neutrophil Extracellular Trap

NFκB : Nuclear Factor kappa B

O

OCS : Open canaliculary system (système canaliculaire ouvert)

P

P. aeruginosa *: Pseudomonas aeruginosa*

P. gingivalis *: Porphyromonas gingivalis*

PadA : Platelet adherence protein A

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PAR : Protease-activated receptor

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PF4 : Platelet Factor 4

PI3K : Phosphoionositide 3-kinase

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PMN : Polymorphonuclear leukocytes

PMP: Platelet Microbicidal Proteins

PR : Polyarthrite rhumatoïde

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

PRR : Pattern-Recognition Receptor

PS: Phosphatidylsérine

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

Pyk2 : Prolin-rich tyrosine kinase-2

R

RANTES : Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

RCH : Rectocolite hémorragique

RGD : arginine-glycine-acide aspartique sequence

ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactives à l'oxygène)

S

S. aureus *: Staphylococcus aureus*

S. epidermidis *: Staphylococcus epidermidis*

S. gordonii *: Staphylococcus gordonii*

S. pyogenes : *Streptococcus pyogenes*

S. sanguinis *: Streptococcus sanguinis*

sCD40L : Soluble CD40 Ligand

SEB : *S. aureus* entérotoxine B

sGC : Soluble guanylyl cyclase

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome

Sar : Staphylococcal accessory regulator

SrpA : Serine-rich protein A

SSL : Staphylococcal superantigen like

T

TLR: Toll Like Receptor

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

TRALI : Transfusion Related Acute Lung Injury

TRAP : Thrombin Receptor Activating Peptide

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta

TXA_2 : Thromboxane A_2

U

uPA : urokinase-type plasminogen activator (urokinase)

uPAR : urokinase-type plasminogen activator receptor

V

VASP : vasodilator-stimulated phosphoprotein

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1

W

vWF : vonWillebrand factor (facteur de vonWillebrand)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 - DU MEGACARYOCYTE A LA PLAQUETTE 13
FIGURE 2 - LA MIGRATION DES NEUTROPHILES, UN PHENOMENE CLE DE L'INFLAMMATION 15
FIGURE 3 - VUE D'ENSEMBLE DES RECEPTEURS PLAQUETTAIRES IMPLIQUES DANS LES INTERACTIONS PLAQUETTES-VIRUS 19
FIGURE 4 - INTERNATION DES PARTICULES DE HIV-1 DANS LES PLAQUETTES 27
FIGURE 5 - IMPLICATION DE LA GPIIB-IIIA DANS L'ADHESION DES BACTERIES AUX PLAQUETTES 34
FIGURE 6 - IMPLICATION DE LA GPIB DANS L'ADHESION DES BACTERIES AUX PLAQUETTES 37
FIGURE 7 – LES FACTEURS DU COMPLEMENT DANS LA LIAISON DES BACTERIES AUX PLAQUETTES 38
FIGURE 8 - RECONNAISSANCE DES PAMPS PAR LES TLRS 42
FIGURE 9 - MISE EN EVIDENCE DES TLRS PLAQUETTAIRES 44
FIGURE 10 - INTERNALISATION DE *S.AUREUS* DANS LES PLAQUETTES 47
FIGURE 11 - STIMULATION BACTERIENNE ET AGREGATION PLAQUETTAIRE 52
FIGURE 12 - EFFET INHIBITEUR DES PLAQUETTES SUR LA CROISSANCE DE *S. AUREUS* 55
FIGURE 13- EFFET DE L'ENGAGEMENT DU TLR4 PLAQUETTAIRE SUR L'EPISSAGE D'ARNM IL-1B 61
FIGURE 14 – SIGNALISATION ASSOCIEE AUX TLR DANS LES CELLULES EUCARYOTES 66
FIGURE 15 - EXPRESSION DES MOLECULES DE SIGNALISATION DE 68
FIGURE 16 - CASCADE D'ACTIVATION DU COMPLEXE NFKB 71
FIGURE 17 - INTERCONNEXION ENTRE *S.AUREUS* ET LES PLAQUETTES 78
FIGURE 18 - ROLE DU CD40L DANS L'ALTERATION DE L'ARCHITECTURE PULMONAIRE LORS DU SEPSIS 83
FIGURE 19 – MECANISMES DE LA NETOSE 89
FIGURE 20 - IMPLICATION DES PLAQUETTES DANS LA NETOSE 91
FIGURE 21 - ADHESION ET ROULEMENT DES PLAQUETTES A LA SURFACE DE L'ENDOTHELIUM L'INFLAMMATOIRE 98
FIGURE 22 - CONSEQUENCE D'UNE ADHESION FERME DES PLAQUETTES A LA SURFACE DE L'ENDOTHELIUM 102
FIGURE 23 - MODELISATION DE L'ACTIVATION DE MAC-1 AU COURS DE L'ADHESION PLAQUETTE-NEUTROPHILE 109

FIGURE 24 - REPERTOIRE MOLECULAIRE DE L'INTERACTION PLAQUETTE-MONOCYTE/NEUTROPHILE 110
FIGURE 25 - EFFET DE L'ADHESION DES PLAQUETTES SUR L'ACTIVATION TARDIVE DES MONOCYTES/NEUTROPHILES 112
FIGURE 26 - IMPLICATION DES PLAQUETTES DANS LA PERMEABILITE ENDOTHELIALE ASSOCIEE A LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE 114
FIGURE 27 - IMPACT DES PLAQUETTES SUR LA PHYSIOLOGIE LYMPHOCYTAIRE 117
FIGURE 28 - LE CD40L DANS LES INTERCONNEXIONS PLAQUETTE-LEUCOCYTE 118
FIGURE 29 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'IMPLICATION DES PLAQUETTES DANS LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE ASSOCIE AU DEVELOPPEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE 122
FIGURE 30 - PHYSIOPATHOLOGIE DU TRALI SELON LE MODELE DOUBLE FRAPPE 126
FIGURE 31 - PRESENCE DE NET DANS LES POUMONS DE SOURIS TRALI , ... 130
FIGURE 32 - IDENTIFICATION DES COMPLEXES PLAQUETTE-EOSINOPHILE DANS LES VAISSEAUX DE POUMONS DE SOURIS EXPOSEES A UN ALLERGENE AEROSOLISE 132
FIGURE 33 - PRESENCE DES PLAQUETTES A PROXIMITE DES FENESTRATIONS ENDOTHELIALES OBSERVEES DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE 134
FIGURE 34 - LIBERATION DE MICROPARTICULES PLAQUETTAIRES DANS LE LIQUIDE SYNOVIAL DE PATIENTS ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOÏDE 136
FIGURE 35 - CARACTERISTIQUES DE DIFFERENCIATION ENTRE LA RECTOCOLITE HEMORRAGIQUE (RCH) ET LA MALADIE CROHN (MC) 137
FIGURE 36 - MODELE DE RECRUTEMENT DES PLAQUETTES DANS LA MUQUEUSE INTESTINALE DES MICI : ACTIVATION ET SECRETION ELECTROGENIQUE 141

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 - CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI) DES PLAQUETTES SUR DES PATHOGENES ISSUS DE LA CAVITE BUCCALE 56
TABLEAU 2- CRITERES CLINIQUES DU DIAGNOSTIC D'UN SIRS 79
TABLEAU 3 - CHIMIOKINES PLAQUETTAIRES 105
TABLEAU 4 - CRITERES CLINIQUES D'IDENTIFICATION D'UN ACUTE LUNG INJURY (ALI) 123
TABLEAU 5 - CONCENTRATION EN SCD40L CONTENUE DANS LES PRODUITS PLAQUETTAIRES TRANSFUSES ET ASSOCIES A SURVENUE D'UN TRALI 128

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les plaquettes sanguines sont de petits éléments (2-5 µm) circulants anucléés, résultant de la fragmentation de leur précurseur hématopoïétique, résident de la moelle osseuse: le mégacaryocyte (MK). La formation des plaquettes est divisée en plusieurs stades de maturation (mégacaryocyte, pro-plaquettes, pré-plaquettes, plaquettes), réparties entre la niche ostéoblastique de la moelle osseuse et la circulation sanguine (**figure 1**) [1].

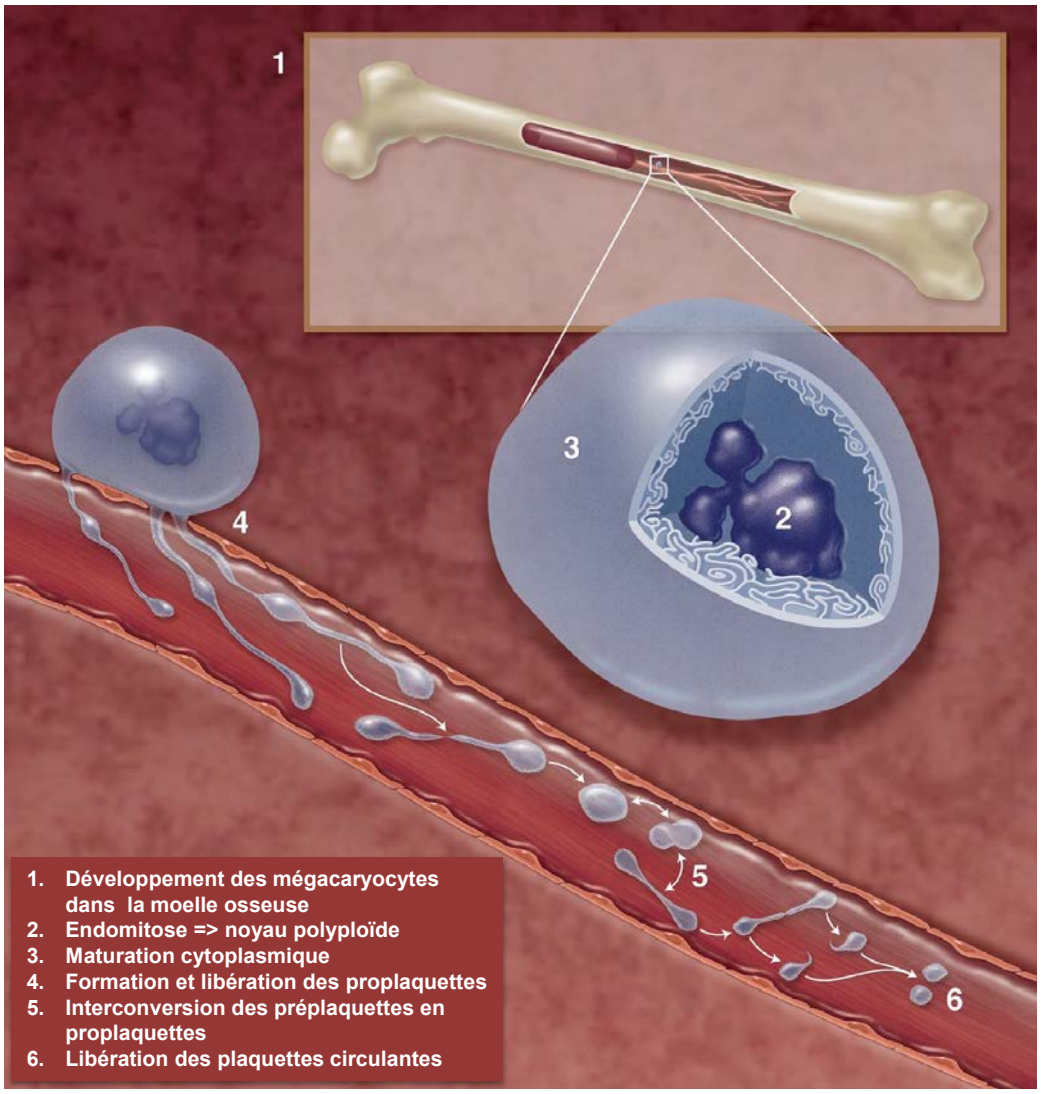


Figure 1 - Du mégacaryocyte à la plaquette
D'après Machlus *et al.* [1]

(1) *Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en mégacaryocyte (MK) sous l'effet de la thrombopoiétine.* ***(2)*** *Les MK subissent des endomitoses successives (2 à 128n).* ***(3)*** *Les MK matures développent des invaginations complexes et continues avec la membrane plasmique externe. Celles-ci initient la formation des pro-plaquettes.* ***(4)*** *Les MK migrent en direction de la niche vasculaire où ils étendent les pro-plaquettes et les libèrent dans les vaisseaux sinusoïdes. Le MK entier est converti en pro-plaquettes, son noyau est exsudé et phagocyté.* ***(5)*** *Une fois dans la circulation sanguine il y a interconversion entre pro-plaquettes et pré-plaquettes.* ***(6)*** *Une fois la taille optimale atteinte, la fission des pro-plaquettes crée deux plaquettes.*

Chez l'homme, ce processus dure en moyenne cinq jours [1]. En conditions physiologiques, chaque mégacaryocyte produit en moyenne entre 1 000 et 3 000 plaquettes [2]. Historiquement, les plaquettes étaient considérées comme des débris cellulaires mais au fil des années elles se sont révélées comme essentielles à l'hémostase. Lors d'une lésion vasculaire, elles adhèrent au sous-endothélium (*via* leur glycoprotéine (GP) VI et leur complexe GPIb-IX-V) ; s'enchaine ensuite deux vagues d'activation faisant intervenir de nombreux récepteurs (GPIIb-IIIa, P2Y12, P2Y1, « platelet-activated receptor » (PAR),…) et molécules de signalisation («Phosphoionositide 3-kinase" (PI3K), « mitogen activated proteins kinases » (MAPk), « phospholipase C » (PLC), « protéine kinase C » (PKC)) ; menant à un réarrangement du cytosquelette, à une agrégation et à la libération du contenu granulaire. Cette réponse est très rapide et permet un comblement efficace des brèches vasculaires [3]. Pendant longtemps, cette fonction a d'ailleurs été la seule attribuée aux plaquettes.

Au milieu des années 2000, plusieurs études sont venues élargir le rôle des plaquettes, plaçant celles-ci dans le « continuum immunitaire » et bouleversant ainsi les connaissances concernant la fonction plaquettaire.

Les plaquettes contiennent dans leurs granules α des facteurs immunomodulateurs de type facteurs de croissance, cytokines et chimiokines libérés au cours de leur activation [4]. Ces premières observations permettent notamment de faire le lien entre les évènements thrombotiques et inflammatoires observés dans nombreuses pathologies cardiovasculaires (endocardites, athérosclérose). Parmi tous les facteurs libérés, une attention particulière est portée au CD40-Ligand (CD40L), molécule fondamentale dans l'activation des leucocytes [5], [6].

L'implication des plaquettes dans la réponse immunitaire a également été confortée par le fait qu'elles expriment des « Toll like Receptors » (TLR) fonctionnels, récepteurs clés dans la reconnaissance de motifs conservés à la surface des pathogènes [7]. De par cette caractéristique les plaquettes pourraient alors être considérées comme des sentinelles de l'immunité innée.

Les plaquettes interagissent également avec les leucocytes par un contact direct ou indirect *via* le fibrinogène [8], [9]. Dans ce contexte, les microparticules plaquettaires (MPP) ont aussi leur importance, elles qui étaient jusqu'à présent reconnues pour leur activité pro-thrombotique [10].

L'analyse fine du fonctionnement des plaquettes a même permis de montrer qu'elles sont capables de produire *de novo* des facteurs immunorégulateurs alors qu'elles sont anucléées [11].

L'ensemble des observations concernant l'implication des plaquettes dans l'immunité innée ont principalement été faites individuellement. Cependant, elles révèlent que les plaquettes possèdent l'arsenal nécessaire pour participer à des mécanismes complexes tel que l'inflammation. D'un point de vue moléculaire, l'inflammation implique des molécules immunomodulatrices, solubles (chimiokines, cytokines) ou cellulaires (sélectines, intégrines), menant à l'extravasation des leucocytes, afin qu'ils puissent exercer leur fonction inflammatoire directement au niveau muqueux (**figure 2**) [12].

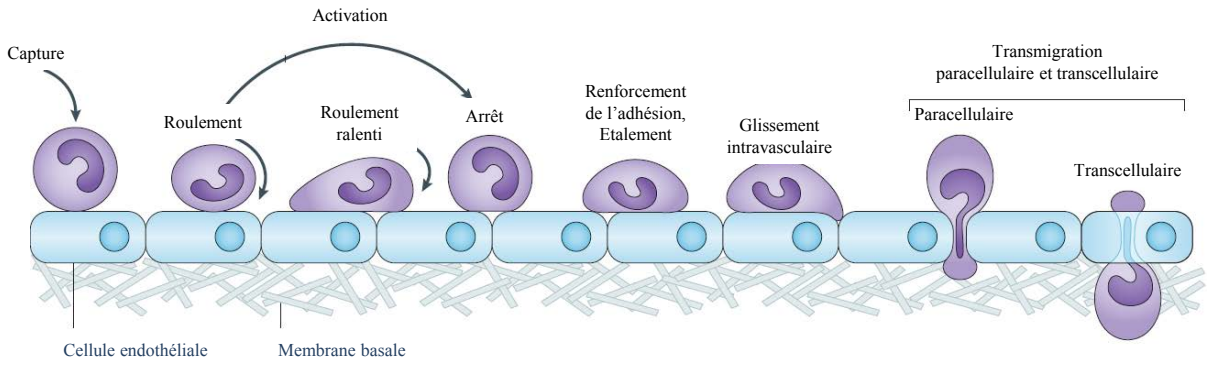


Figure 2 - La migration des neutrophiles, un phénomène clé de l'inflammation

D'après Ley *et al.* [12]

Le processus d'extravasation des leucocytes se décompose en plusieurs étapes (1) Attachement des leucocytes à l'endothélium, ce qui implique des chimiokines et les sélectines leucocytaire. (2) Roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium provoqué par l'instabilité des interactions impliquant les sélectines. Cette étape permet aux leucocytes de se rapprocher de l'endothélium et de s'activer. (3) Les neutrophiles activés expriment des intégrines qui leur permettent d'adhérer fermement à l'endothélium. (4) L'adhésion des leucocytes s'accompagne d'un remodellage cellulaire facilitant leur migration. (5) La diapédèse peut être paracellulaire (ouverture des jonctions serrées) ou transcellulaire (formation de pores transcellulaire).

L'implication exacte des plaquettes dans le processus inflammatoire n'est pas encore bien décrite et pose de nombreuses questions. La majorité de ces questions reposent principalement sur l'induction de relargage des cytokines plaquettaires et la coopération des plaquettes avec les leucocytes. C'est à quoi nous allons en partie tenter de répondre dans ce manuscrit, en utilisant aussi bien des modèles d'inflammation aiguës que chroniques.

ETAT DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 - REPONSE INFLAMMATOIRE PLAQUETTAIRE AU COURS DE L'INFECTION

Le répertoire moléculaire des plaquettes, spécialisé dans la réparation et, de plus en plus dans l'immunité innée [13] font de ces « cellules » des élements sanguins uniques. La reconnaissance des plaquettes en tant que cellule est encore controversée, principalement de par son absence de noyau. Cependant, la multitude de fonctions qui leur sont nouvellement associées et présentées dans ce manuscrit conforte notre choix de les considérer comme telles tout au long de ces travaux. La réponse plaquettaire, que l'on croyait seulement impliquée dans l'hémostase est en fait extrêmement complexe et probablement ajustée au besoin. Dans ce chapitre, nous aborderons le potentiel inflammatoire des plaquettes face à une invasion pathogène, plus précisément lorsque celle-ci met en jeu des bactéries ou des virus. Nous nous attarderons sur leur capacité à déclencher directement une réponse immuniatre, allant de la reconnaissance du pathogène à l'orchestration de son élimination.

I - Plaquettes et virus

La thrombopénie est un phénomène fréquemment observé durant une infection virale. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'expliquer [14] :

1) Destruction par les macrophages des plaquettes opsonisées avec des IgG ou fixées à des leucocytes
2) Séquestration des plaquettes dans la rate
3) Diminution de la thrombopoïèse
4) Action directe ou indirecte des virus sur les plaquettes

Dans la mesure où ce manuscrit se focalise sur l'effet de l'infection sur la fonction plaquettaire, et en particulier son rôle inflammatoire, seule les deux dernières hypothèses seront discutées dans ce paragraphe. Encore peu explorée, l'adhésion directe des particules virales à la surface plaquettaire se présente aujourd'hui comme un phénomène actif. En effet, outre l'adhésion des virus au FcγR2A par l'intermédiaire d'une IgG, les plaquettes peuvent directement fixer les virus par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

A. Récepteurs viraux à la surface des plaquettes

La reconnaissance des virus par les plaquettes peut impliquer des récepteurs spécifiques des virus (conservés au cours de la différenciation cellulaire) ou bien des glycoprotéines de surface dont la fonction hémostatique initiale est détournée par les virus. La **figure 3** schématise les différentes interactions possibles ainsi que les molécules plaquettaires mises en jeux.

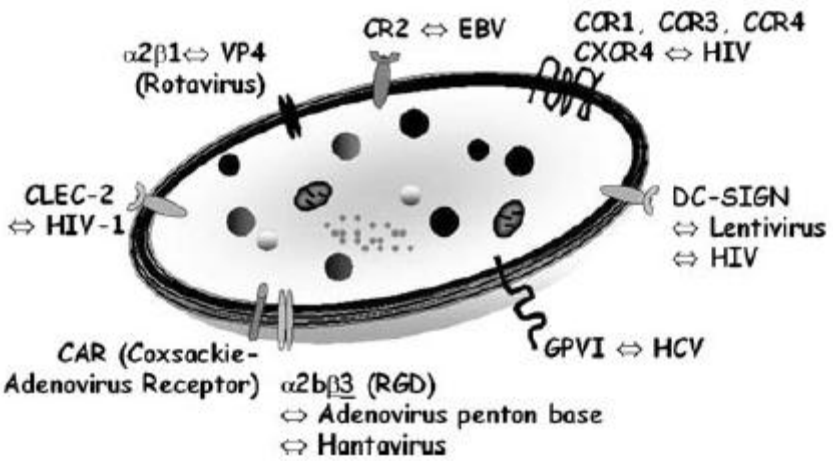


Figure 3 - Vue d'ensemble des récepteurs plaquettaires impliqués dans les interactions plaquettes-virus
D'après Flaujac *et al.*[14]

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

Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous focaliserons seulement sur l'interaction entre les plaquettes et l' «Human Immunodeficiency Virus » (HIV).

En 2006, Boukour *et al.*, mettent en évidence le « dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin » (DC-SIGN) à la surface des plaquettes [15]. Ce récepteur, constitué de lectines de type C, est classiquement décrit sur les macrophages et les cellules dendritiques, où il lie les hydrates de carbone de type mannose, une classe de « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMP) communément retrouvée sur les bactéries, virus et moisissures. Pour les cellules dendritiques, ce récepteur alternatif du HIV internalise le virus dans un compartiment résistant à la trypsine. En aval, la dégradation des virions est médiée par l'acidification de l'endosome ou sous l'action du protéasome. S'ensuit alors uniquement une présentation de type CMH-I. Certains virions échappent à cette dégration et peuvent directement être transmis aux lymphotcytes T permissifs.

Il a été montré que l'endosome formé à la suite de l'engagement du DC-SIGN permettait de conserver le pouvoir infectieux du virus pendant plusieurs jours [16]. Le DC-SIGN est aussi important pour le rapprochement des cellules dendritiques aux lymphocytes T car il lie leur protéine membranaire ICAM-3 [16].

La présence du DC-SIGN sur les plaquettes a été démontrée par diverses approches techniques (cytométrie en flux, immunomarquages, Western-Blot et RT-PCR). Les résultats de cytométrie en flux montrent que 15% des plaquettes sont positives pour le DC-SIGN. Cette proportion peut sembler faible, mais elle est équivalente à celle observée pour les cellules dendritiques pour lesquelles l'efficacité du récepteur a déjà été prouvée. Les expériences de Western-Blot présentent un signal spécifique à 44 KDa, équivalent à celui obtenu avec des cellules reportrices [15].

Un immunomarquage à l'or montre que la protéine est principalement localisée à la membrane plasmique, mais également retrouvée au niveau du système canaliculaire ouvert (OCS) et des granules α [15].

L'expression du DC-SIGN sur les plaquettes est spécifique et ne résulte pas de l'adsorption de la molécule à partir du plasma. En effet, l'acide ribonucléique (ARN) de DC-SIGN peut être amplifié par RT-PCR à partir d'une culture de mégacaryocyte [15].

Concernant la fonctionnalité de ce récepteur au niveau des plaquettes, elle a été déterminée grâce à l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-DC-SIGN. Des clichés de microscopie électronique montrent que, contrairement aux plaquettes contrôles, les plaquettes pré-incubées avec l'anticorps anti-DC-SIGN ne permettent pas de visualiser des virions de lentivirus modifié de type HIV à l'intérieur des plaquettes, alors que ces derniers restent détectables dans le milieu extracellulaire [15]. Ces résultats supportent donc la fonctionnalité du DC-SIGN en tant que récepteur responsable de l'internalisation du HIV au sein des plaquettes.

Le « C-type lectin-like receptor 2 » (CLEC-2), autre lectine présente à la surface des plaquettes, a également la possibilité de lier le HIV. Bien qu'une fraction substantielle des virions se lie au DC-SIGN l'utilisation d'un anticorps bloquant CLEC-2 permet aussi de diminuer l'internalisation des particules virales. Ce récepteur vient donc compléter la fonctionalité du DC-SIGN dans l'internalisation du HIV. Ces deux lectines sont donc nécessaires pour assurer une adhésion optimale de HIV-1 sur les plaquettes [17] .

Les plaquettes possèdent le CXCR4, qui malgré l'absence de CD4 sur les plaquettes matures, pourrait participer à l'adhésion du virus à la surface des plaquettes. En cytométrie de flux, aucun signal n'est observé pour l'autre co-récepteur au HIV, le CCR5 [18].

B. Les mégacaryocytes et les virus

Les récepteurs décrits pour l'adhésion des virus aux plaquettes matures peuvent également être retrouvés sur leurs précurseurs mégacaryocytaires, leur permettant d'interagir avec divers virus tels que les paramyxovirus, virus de la famille herpès et les retrovirus incluant HIV-1. Il est cependant intéressant de noter qu'il existe quelques différences entre les récepteurs exprimés par les plaquettes et par leurs précurseurs. La plus intéressante dans le cadre de ces travaux de thèse concerne les récepteurs au HIV-1. Les MK humains immatures expriment le CD4, décrit comme fonctionnel. Effectivement, ce récepteur suffit à HIV-1 pour infecter une lignée mégacaryocytaire [19]. L'expression de ce récepteur diminue au cours de la maturation mégacaryocytaire et il n'est plus du tout exprimé par les plaquettes, contrairement au DC-SIGN dont l'expression reste constante tout le long de la maturation du MK ainsi que pour sa progénie [14].

Lorsque les MK sont exposés *in vitro* à une suspension d'HIV-1, ils sont capables d'endocyter la particule entière, y compris l'enveloppe [14]. Comme décrit pour les cellules dendritiques, les virions internalisés se retrouvent soit dans la lumière du système membranaire de démarcation où ils conservent leur intégrité, soit à l'intérieur de petites vésicules possédant un environnement acide (activité phosphatase acide) qui conduira à la destruction du virion. Ce processus d'endocytose a été confirmé *ex vivo* sur des MK humains isolés de moelle de patients infectés par HIV-1[20] .

La réplication virale au sein du MK a été observée pour plusieurs types de virus (HIV-1, HCV (Hepatitis C virus), CMV humain) [14] et pourrait être à l'origine d'une diminution de la thrombopoïèse.

Une étude concernant l' herpès-virus humain de type 6 a montré que la charge virale est corrélée au nombre de transfusions plaquettaires requises lors d'une greffe allogénique, signifiant que l'infection virale a un impact sur l'efficacité des précursseurs hématopoïétiques à restaurer une numération plaquettaire adéquate [21].

Pour HIV-1, l'analyse de MK isolés à partir de la moelle de patients séropositifs thrombopéniques montre la présense de transcrits viraux ainsi qu'une petite quantité de glycoprotéines virales. Ces résultats suggèrent que l'infection directe de MK pourrait contribuer à la thrombopénie observée chez ces patients.

La diminution de l'hématopoïèse dans un contexte d'infection virale résulte de deux principales possibilités : i) la multiplication virale porte atteinte à la survie du mégacaryocyte (exploré avec les HHV-6 et 7) ou ii) il y a une réduction de la production de thrombopoïétine. Cette deuxième hypothèse a été proposée suite aux observations faites au cours de l'infection à HCV montrant qu'un agoniste du recepteur de la TPO, l'elthrombopag, améliorait la réponse des patients au traitement à l'interféron (IFN) [22].

Bien que l'infection virale induit une thrombopénie, les plaquettes peuvent participer en retour à la réponse anti-virale de l'organisme.

C. Rôle des plaquettes dans la défense antivirale

Si les molécules plaquettaires anti-bactériennes sont de plus en plus étudiées, les données sont pauvres concernant l'activité anti-virale des plaquettes. Cependant, plusieurs études portant sur les plaquettes isolées déterminent des mécanismes moléculaires clairement impliqués dans l'activité antivirale. Il a été précédemment décrit que l'internalisation des lentivirus dans les plaquettes peut avoir deux issues. D'une part, les particules virales localisées dans les vésicules d'endocytose conservent leur intégrité et d'autre part, celles situées dans le système canaliculaire relié à la surface cellulaire présentent des altérations morphologiques [15]. Dans le deuxième cas de figure, il été montré que le compartiment canaliculaire ouvert contenant les particules virales a fusionné avec les granules dont le contenu peut très probablement dégrader les particules virales.

Quant aux virions non dégradés présents dans les vésicules d'endocytose, ils pourraient être éliminés indirectement lors la phagocytose des plaquettes par les macrophages de la rate [15]

Les plaquettes constituent une source non négligeable de « Regulated on activation normal T cell expressed and secreted » (RANTES) et de « Macrophage inflammatory protein-1 » (MIP-1), molécules montrés comme deux facteurs majeurs anti-HIV-1 [23]. Ces deux molécules agissent sur la réplication virale d'une manière directe par leur propriété anti-HIV intrinsèque (blocage du CCR5) ou indirectement *via* leur propriété chimioattractante. Cependant, le recrutement des leucocytes à proximité du site d'infection est à double tranchant car ce mécanisme apporte de nouvelles cibles pas encore infectées. En parallèle du RANTES et du MIP-1, les plaquettes contiennent aussi dans leurs granules du «Platelet Factor 4» (PF4) et du SDF-1. En se liant au CXCR4, ces facteurs plaquettaires peuvent participer à l'inhibition de la réplication des souches d'HIV à tropisme X4.

Au-delà de son affinité pour le CXCR4, la molécule PF4, constituant majoritaire des granules α des plaquettes, semble également limiter la réplication d'HIV indépendemment du tropisme viral. Le PF4 a, en fait, la capacité d'interagir avec la protéine d'enveloppe gp120 de HIV-1, à une position proche du site de liaison du CD4. *In vitro*, cette adhésion diminue significativement la fixation du virus et son entrée dans trois lignées de lymphocytes T $CD4^+$ différentes (MT-2, PM1 et sup-T1). Il est possible d'envisager un encombrement stérique ou le masquage du site de liaison du CD4. Cependant le PF4 ne semble pas avoir d'action inhibitrice sur la réplication du HIV-2 ni du SIV [24], [25].

L'implication indirecte des plaquettes dans la clairance virale a également été montrée dans un modèle murin d'infection par le virus de la chorio-méningite lymphocytaire. Dans cette étude, la déplétion des plaquettes résulte en une mauvaise clairance virale due à la diminution des réponses T cytotoxiques. Afin d'exercer ce rôle sur les lymphocytes T, les plaquettes mettraient en jeu leur intégrine β3 et le CD40L [26].

Par ailleurs, il a récemment été publié que la présence de plaquettes lavées dans une culture de « peripheral blood mononuclear cells » (PBMC) limitait la réplication de la souche NL4-3 de HIV-1, avec à 6 jours, une diminution de la concentration en p24 et de l'activité luciférase. Cette inhibition de la réplication virale est favorisée lorsque les plaquettes sont préalablement activées par un analogue de la thrombine, ce qui confirme bien un effet anti-viral des composés plaquettaires solubles et/ou exprimés à la membrane après activation [24].

Enfin, bien que les « neutrophil extracellular trap » (NET) aient principalement été étudiés dans la réponse antibactérienne (mécanisme de défense des neutrophiles présenté en détails dans la partie Chapitre 1 –III D), il a été constaté que l'incubation, *in vitro,* de particules de HIV-1 avec des NET entraine la dégradation du virus *via* la myéloperoxidase et de défensines α contenues dans ce réseau d' acide désoxyribonucléique (ADN) [27]. Dans cette expérience *in vitro*, la formation de NET est induite par le PMA. Il est cependant possible, qu'*in vivo,* les NET produits par la présence conjointe de neutrophiles et de plaquettes présentent les mêmes propriétés anti-HIV-1.

C'est ce qu'observe l'équipe de Kubes dans un modèle murin d'infection par le poxvirus MYXV [28]. Ces auteurs observent un recrutement des plaquettes associées aux neutrophiles au niveau de la vascularisation hépatique et la formation de NET permettant de limiter la réplication virale et les atteintes hépatiques.

La réponse anti-infectieuse, notamment antivirale, induit une inflammation systémique associée à l'activation des cellules de l'immunité. Nous verrons donc dans la prochaine partie comment l'infection virale active les plaquettes et comment ces dernières participent à l'inflammation systémique.

D. Activation plaquettaire et inflammation liée aux virus

L'interaction directe des virus avec les plaquettes peut conduire à une activation de type inflammatoire des plaquettes. Ainsi, le contact *in vitro* entre l'adénovirus et les plaquettes induit une activation plaquettaire qui se traduit par l'augmentation rapide de l'expression du CD62P membranaire [29]. Dans cette même étude, l'infection de souris sensibles à ce virus montre, quant à elle, une formation accrue d'agrégats plaquettes-leucocytes, mettant en jeu les récepteurs CD62P des plaquettes, et le « P-selectin glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1) des leucocytes (monocyte, neutrophiles), accroissant alors la libération de microparticules tant plaquettaires que leucocytaires.

D'autre part, lors d'une infection virale les plaquettes peuvent aussi participer à l'activation d'un autre type de cellules impliquées dans la défense immunitaire, les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques. Cette hypothèse se base sur des observations obtenues à partir d'un modèle murin infecté par l' Hepatitis B virus (HBV).

Le recrutement des lymphocytes cytotoxiques au niveau hépatique ainsi que l'altération tissulaire associée à l'activité de ces cellules sont considérablement réduits lorsque les animaux sont déplétés en plaquettes. La transfusion de plaquettes permet de restaurer le dépôt lymphocytaire au niveau hépatique et par conséquence, la gravité de la pathologie hépatique associée ; alors que ceci est impossible avec la transfusion de plaquettes dont les capacités d'activation sont bloquées. Le microenvironnement viral induit donc une activation plaquettaire, nécessaire pour le recrutement des lymphocytes T. Pourtant, l'utilisation d'un anticoagulant n'a aucun effet, ce qui suggère donc que l'activation plaquettaire mise en jeu dans ce mécanisme de recrutement des lymphocytes est indépendant d'une activation hémostatique des plaquettes [26]. Ces travaux laissent à penser que ce serait plus la fonction inflammatoire des plaquettes qui contribue à la pathogénie de l'infection à HBV.

La dualité des fonctions hémostatiques et inflammatoires des plaquettes est pourtant particulièrement mise en avant au cours des infections virales. Les modifications endothéliales dues à l'environnement viral vont favoriser l'adhésion et l'activation des plaquettes. La thrombine générée lors cette activation va amplifier l'inflammation.

L'activation endothéliale, par le virus de la dengue par exemple, entraine l'expression d'E-selectine. Les plaquettes se lient alors à l'endothélium *via* le CD62P. Ce dernier étant un marqueur d'activation, il devient le témoin d'une activation plaquettaire au cours de l'infection par le virus de la dengue [30]. Une autre étude montre que lors d'une infection par un adénovirus, le facteur de vonWillebrand » (vWF) est libéré massivement dans les deux heures qui suivent l'infection et les cellules endothéliales surexpriment la molécule « vascular cell adhesion molecule-1 » (VCAM-1), une autre protéine d'adhésion pour les plaquettes [29]. Cette accumulation de plaquettes au niveau des vaisseaux est à l'origine de la formation du thrombus et pourrait donc expliquer les évènements athéro-thrombotiques liés à certaines infections virales [14].

L'activation de l'endothélium vasculaire et des plaquettes est une caractéristique de l'infection à HIV-1 connue depuis de nombreuses années [31]. Du fait des complications cardiovasculaires fréquentes au cours de cette infection, la contribution des cellules endothéliales à l'inflammation systémique au cours de l'infection [32] et l'activation plaquettaire [33], [34] ont été largement étudiées mais l'étude de la participation des

plaquettes à l'inflammation a quelque peu été négligée. C'est cet aspect de l'infection à HIV-1 qui sera abordé dans la prochaine partie.

E. Les plaquettes dans l'entretien de l'inflammation liée à HIV-1

L'origine de l'activation persistante de l'immunité et de l'inflammation systémique chronique n'est pas totalement connue. La translocation microbienne due à la déficience immunitaire des tissus lymphoïdes associés aux intestins semble être un « bon » candidat [35].

D'autres possibilités sont également proposées comme les co-infections, notamment à CMV, et la faible dose de virus échappant au traitement anti-viral « Highly Active Antiretroviral Therapy" (HAART). Dans ce paragraphe nous nous intéresserons exclusivement à l'implication des plaquettes, en tant que cellules de l'inflammation.

Comme décrit pour les MK, les plaquettes ont la capacité d'internaliser le HIV. Cette observation avait déjà été faite il y a très longtemps mais peu d'intérêt y avait été porté. Les expériences *in vitro* faites avec des plaquettes mises en contact avec un surnageant de PBMC infectées montrent que les virions sont internalisés dans les premières 30 minutes. Les analyses de microscopie électronique montrent que le virus est internalisé entièrement, conservant même son enveloppe et son ultrastructure **(figure 4)**. Le fait que le virus ait conservé son intégrité, jusqu'à la conservation de l'enveloppe, montre qu'il n'est pas entré dans la plaquette par fusion mais plutôt par endocytose, ce qui va dans le sens de l'implication du DC-SIGN. La rapidité d'entrée du virus dans les plaquettes fait que, jusqu'à présent, il est techniquement impossible de montrer des clichés de fusion. Les petites vésicules contenant jusqu'à quatre virions, présentant un aspect clair et ne renferment rien d'autre [36].

Les images de microscopie électronique démontrent qu'il y a également des particules virales localisées dans la lumière de l'OCS. Contrairement à l'aspect des virions contenus dans les endosomes, les particules virales contenues dans l'OCS apparaissent gonflées avec une forme peu délimitée **(figure 4)**. Le marquage de la p24, protéine de capside du HIV, colocalise avec celui du collagène et du CD62P qui sont des marqueurs des granules α [14], [15]. Il y a donc, à un moment donné fusion de l'OCS contenant les virions avec des granules α dont le contenu est toxique pour le virus [36].

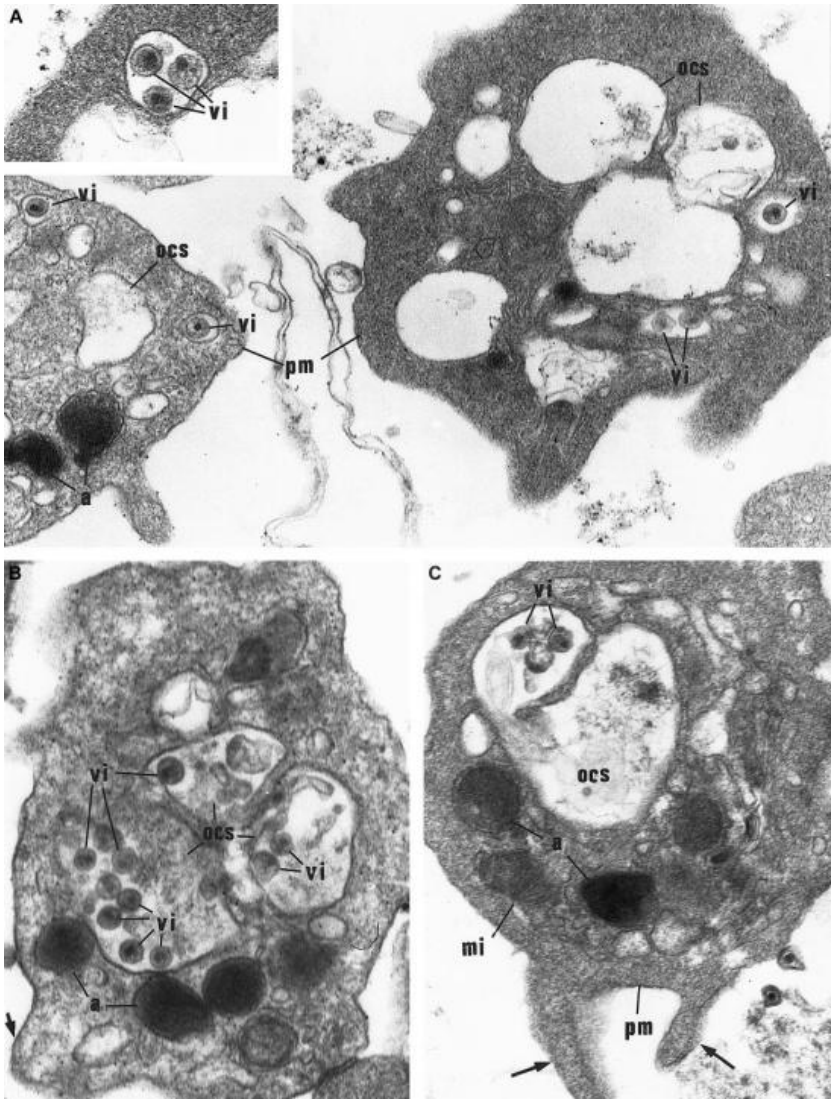


Figure 4 - Internation des particules de HIV-1 dans les plaquettes
D'après Youssefian *et al*. [36]

(A) ***Internalisation des particules de HIV dans des structures de type endosome.*** *Au stade précoce de l'internalisation les particules virales* ***(vi)*** *sont retrouvées dans de petites vacuoles caractéristiques des structures endosomales, englobant chacune une à 2 particules et localisées proche de la membrane plasmique* ***(pm). (a)*** *indique les granules α. Grossissement X 36 8000; encart X 55 200.*
(B) *et* ***(C) Les particules virales sont également retrouvées dans le système canaliculaire ouvert (OCS).*** *Il est possible que cette étape intervienne dans une phase d'internalisation plus tardive. Les plaquettes présentent une morphologie activée : forme sphérique, émission de pseudopodes (flèches), OCS dilaté.(mi) indique les mitochondries. Grossissement X 41 850*

De la même manière que ce qui s'opère dans les mégacaryocytes, i) soit les particules virales sont en contact avec des molécules antivirales contenues dans les granules α plaquettaires, ce qui mène à leur destruction ; ii) soit les plaquettes protègent et transportent les virions à l'intérieur de vésicules intraplaquettaires robustes.

Le mécanisme permettant de distinguer le devenir des virions, s'il existe car il n'est pas impossible que les virions se retrouvent dans l'OCS d'une manière passive, n'est pas encore connu mais ces observations doivent être prises en compte dans la physiopathologie du HIV.

L'interaction décrite ci-dessus a également un effet biologique à plus large échelle car les plaquettes ayant endocyté les virus expriment le CD62P à leur surface, témoignant de leur activation. Cependant ce marqueur peut aussi bien servir à la destruction, par les macrophages, des plaquettes infectées, qu'à l'activation d'autres cellules inflammatoires [14] ; démontrant encore une incertitude dans le but de l'internalisation du HIV à l'intérieur des plaquettes.

Les plaquettes activées lors de l'infection sont donc susceptibles de libérer un certain nombre de facteurs inflammatoires. Ainsi, il a été montré que le taux plasmatique de CD40L soluble (sCD40L) est plus élevé chez les patients HIV-1 ; la thérapie antirétrovirale [37] augmenterait même ce taux.

La libération de sC40L plaquettaire lors d'une infection à HIV implique la protéine Tat d'HIV. Cette protéine virale se lie aux plaquettes par le CCR3 et l'intégrine β3. Les plaquettes stimulées par Tat sont même capables d'induire, *in vitro* et *in vivo*, une activation de lymphocytes B allant jusqu'à une réponse anticorps IgG [38].

Le sCD40L plaquettaire nouvellement libéré, en synergie avec la protéine Tat, active et recrute les monocytes (expression de molécules d'adhésion) ce qui favorise l'inflammation [39]. La forte concentration en sCD40L des patients HIV est notamment impliquée dans le recrutement de monocytes au niveau de l'endothélium de la barrière cérébrale entrainant ainsi une augmentation de sa perméabilité ; ce qui explique pourquoi les patients HIV qui présentent des désordres neurocognitifs ont une concentration plasmatique de sCD40L plus élevée que les autres patients HIV [40]. L'utilisation d'acide valproïque, un médicament stabilisateur d'humeur, diminuerait la libération de sCD40L en agissant directement sur les plaquettes [41].

Récemment, une augmentation de CD40L a aussi été montrée sur des plaquettes de macaques (*Macaca nemestrina*) préalablement infectés par voie intraveineuse par deux souches de SIV [42].

Les conséquences de la liaison de Tat sur les plaquettes ne se limitent pas à la libération du CD40L mais elle augmente également le PF4 [40]. La protéine Tat est décrite pour induire la libération de « Platelet Derived Growth Factor » (PDGF) par les astrocytes, il est donc possible d'imaginer que ce mécanisme soit également présent dans les plaquettes [43]. La protéine virale a également la particularité d'induire la libération de MPP [38]. Cette observation pourrait, en partie, expliquer pourquoi les patients infectés présentent un taux de microparticules circulantes plus élevé que des sujets non infectés.

L'IL-18 est une cytokine importante dans la défense contre le HIV-1. Elle induit le relargage d'IFNγ à partir des cellules T et des cellules Natural Killer. De plus, elle augmente l'effet cytolytique des lymphophyctes T et la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ Th1. Au cours de l'infection à HIV-1, Ahmad *et al.* on observé que le taux plasmatique de cette protéine est augmenté [50] et ils ont pu montrer que l'origine de l'IL-18 était plaquettaire [45].

Les études citées ci-dessus montrent que les plaquettes activées constituent une réelle source de facteurs inflammatoires. De ce fait, la communauté scientifique s'est intéressée aux plaquettes comme effectrices de l'inflammation chronique chez les patients HIV-1 sous « Highly Active Antiretroviral Therapy" (HAART).
Une étude a suivi l'évolution de l'activation des cellules endothéliales et des plaquettes jusqu'à 24 mois après la mise en place de thérapie antirétrovirale. Ces deux types cellulaires sont activés chez les patients infectés non traités. La thérapie antirétrovirale s'accompagne d'une diminution des marqueurs d'activation de l'endothelium (VCAM-1, « Monocyte Chemoattractant Protein 1 » (MCP-1), vWF). En revanche, l'expression du CD62P reste élevée sur les plaquettes ce qui traduit un état activé durable des plaquettes [46]. Landro *et al*. montrent de plus que le traitement antirétroviral n'induit pas de diminution des facteurs plaquettaires solubles sCD40L, RANTES, « Neutrophil-activating peptide-2" (NAP-2) et LIGHT alors que son efficacité est mesurable par une diminution de la quantification de l'ARN viral et un recouvrement des cellules T $CD4^+$ [47]. Les plaquettes participent donc bien à l'inflammation persistante observée chez les patients sous HAART. Ces facteurs pourraient également être associés à l'augmentation du risque cardiovasculaire.

La mise en place d'un traitement antirétroviral pourrait en outre augmenter la libération de facteurs inflammatoires plaquettaires. Dans l'étude précédente, les auteurs montraient une augmentation de NAP-2 après 12 mois d'HAART. D'autres travaux montrent qu'il est en de même pour le sCD40L [41], [48]. En fait, il existe une hyperactivité des plaquettes chez les patients recevant de l'abacavir, un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse utilisé dans certains traitements [48]. De ce fait les plaquettes, en plus de libérer leurs molécules solubles préstockées, seraient plus sensibles à l'agrégation ; cela pourrait expliquer pourquoi l'administration d'abacavir est associée de pathologies cardiovasculaires, notion qui reste néanmoins controversée [49], [50]. Au niveau moléculaire, l'abacavir agit sur la cascade plaquettaire impliquant l'oxyde nitrique, la guanylate cyclase soluble et la guanosine mono-phosphate cyclique (GMPc) en émoussant la capacité inhibitrice du NO sur l'activité hémostatique des plaquettes [48]. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse activent également la « glycogen synthase kinase 3 beta » (GSK3β) pour la libération de CD40L. L'acide valproique, inhibiteur de la GSK3β, s'est révélé efficace pour prévenir la libération excessive de CD40L, dans le sang circulant, liée à l'utilisation de combinaisons de médicaments antirétroviraux [41], [51].

Les inhibiteurs de protéase, autres molécules utilisées dans les traitements antirétroviraux sont décrits pour entrainer la formation de complexes plaquettes-leucocytes pouvant également mener à l'activation plaquettaire [52].

En conséquence, il est important de développer des molécules adjuvantes permettant de limiter les effets délétères des thérapies antirétrovirales. Les plaquettes développent une large réponse inflammatoire, qu'elles conservent pendant le traitement. Elles semblent donc être une bonne cible pour limiter l'inflammation chronique associée à l'infection à HIV-1 en réduisant plus particulièrement l'agrégation, la libération de molécules inflammatoires et leurs molécules d'adhésion.

II - Plaquettes et infections bactériennes

A. Les plaquettes à l'interface entre infection bactérienne et thrombose

1) *Exemple de l'endocardite infectieuse*

Bien que de diverses natures, les pathologies cardio-vasculaires peuvent être d'origine infectieuse comme décrit par *Beynon et al.* concernant l'endocardite infectieuse (EI) [53]. Les principaux agents bactériens mis en cause dans l'EI sont *Staphylococcus aureus (S. aureus)*, *Streptococcus sanguinis (S. sanguinis) ou Streptococcus gordonii (S. gordonii)*. Selon les études épidémiologiques, la bactériémie menant au développement cette pathologie peut être la conséquence d'une intervention locale mais peut également avoir une origine plus distante comme l'administration récurrente de drogue ou une intervention chirurgicale dentaire.

En créant un environnement inflammatoire les bactéries adhèrent à l'endothélium valvulaire, augmentent sa perméabilité menant ainsi à l'exposition de facteur tissulaire (FT)

* subendothéliaux. Les plaquettes circulantes adhèrent alors au sous-endothélium et leur activation hémostatique conduit à la formation d'un thrombus pouvant mener à l'ischémie artérielle voire à l'embolie pulmonaire [54]. L'EI constitue alors une pathologie liant inflammation et hémostase, dans laquelle il a longtemps été admis que l'activation des plaquettes s'effectuait indirectement.

Dans l'EI, l'analyse d'un thrombus fraîchement formé au niveau du myocarde montre la présence de bactéries à l'intérieur du clou plaquettaire [55]. Les premières hypothèses suggéraient que cette présence bactérienne venait stabiliser le clou plaquettaire, grâce à l'action d'enzymes bactériennes spécialisées dans la coagulation (la coagulase pour *S. aureus* [56] ou le « clumping factor » (Clf) pour les autres *staphylococci* [57]) ; mais sans pour autant participer directement à l'activation des plaquettes.

Au cours du sepsis, on observe la formation de microthrombi au niveau des capillaires sanguins [58]. De la même façon que pour l'EI, ce phénomène était imputé à l'environnement inflammatoire qui favoriserait l'agrégation plaquettaire. L'étude d'*Osterud et al*. permet d'ailleurs d'appuyer cette hypothèse, car les auteurs montrent que, dans le sepsis sévère, les monocytes circulants présentent une augmentation dans l'expression de facteur tissulaire favorisant ainsi l'agrégation plaquettaire [59].

A partir de 2005, les publications décrivant le rôle des plaquettes dans l'immunité ont remis d'actualité d'anciennes observations qui portaient sur l'interaction directe des plaquettes et des bactéries [60] ; suggérant alors que la liaison des bactéries sur les plaquettes devrait même être prise en compte dans la réponse immunitaire. Aujourd'hui, le nombre croissant d'études portant sur le potentiel inflammatoire des plaquettes révèle que ces cellules expriment une variété de récepteurs, de molécules solubles, de facteurs de signalisation, aussi bien hémostatiques qu'inflammatoires, qui permettent de les positionner comme des effecteurs directs de la défense antibactérienne, fonction présentée dans les sections suivantes.

2) Rôle inflammatoire et thrombotique des microparticules plaquettaires

Les plaquettes font également le lien entre thrombose et inflammation de par la production des microparticules.

Les microparticules plaquettaires (MPP) sont des vésicules phospholipidiques (100-1000 nanomètre) libérées après bourgeonnement de la membrane plasmatiques des plaquettes. De ce fait, les MP expriment les mêmes antigènes que leurs cellules parentales c'est-à-dire la GPIIb-IIIa, la GPIb, le CD31, le CD61 et le CD62P ; ce qui leur permet d'être distinguées des microparticules dérivées d'autres types cellulaire (globules rouges, leucocytes, monocytes, cellules endothéliales). Ainsi, les MPP constituent 70 et 90% des vésicules circulantes. Les MPP diffèrent des exosomes par leur taille mais aussi par le fait qu'elles ne résultent pas de l'exocytose de corps multivésiculaires [61].

Les MPP sont libérées par les plaquettes activées, en apoptose ou en sénescence. Le détachement de la membrane plasmique du cytosquelette d'actine, principalement induit par l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire, est un élément central dans la l'induction de cet évènement.. Le calcium interagit alors directement avec des protéines impliquées dans la protéolyse du cytosquelette telles que la calpaïne [62]. La formation de MPP peut également être indépendante du calcium et fait alors intervenir le facteur C5b-9 du complément et l'activation de protéines kinases comme la calmoduline [63].

L'infection bactérienne semble également être à l'origine de la formation de MPP. Ceci est déjà bien décrit lors de l'engagement du TLR4 plaquettaire [64]–[66] mais également en réponse à la Shiga-toxine [67].

La formation des MPP entraine une asymétrie au niveau de la répartition des phospholipides membranaires. Les MPP circulantes expriment donc à leur surface les phosphatydilsérines, un phospholipide fortement pro-coagulant [68]. Les MPP expriment aussi le facteur tissulaire, l'initiateur majeur de la cascade de coagulation [69]. Les MPP sont également décrites comme une surface permettant, *in vitro*, la génération de plasmine ; capacité non retrouvée pour les microparticules isolées à partir de cellules endothéliales [70].

D'autre part, les MPP sont capable de délivrer des facteurs immunomodulateurs tels que le RANTES [71], l'IL-1β [64], le sCD40L [72] et peuvent aussi moduler l'activation des cellules inflammatoires telles que les neutrophiles [73], [74]. Les MPP semblent même pouvoir exercer leur activité pro-inflammatoire hors du compartiment sanguin [75].La fonction pro-inflammatoire des MPP est reprise, plus en détail, tout au long de ce manuscrit.

Enfin, la proportion de MPP dans la circulation est augmentée dans certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires [69], le sepsis [76] ou l'infection à HIV [38], ce qui suggère leur implication dans la physiopathologie de ces maladies.

B. Mécanismes d'interactions entre les plaquettes et les bactéries

A ce jour, trois mécanismes d'interactions entre les bactéries et les plaquettes sont décrits : 1) la liaison indirecte d'une bactérie à une protéine plasmatique, elle-même ligand d'un récepteur plaquettaire ; 2) la liaison directe d'une bactérie à un récepteur plaquettaire ; 3) la liaison de produits bactériens sécrétés, des toxines notamment, aux plaquettes. Les mécanismes d'interaction sont complexifiés par la diversité des récepteurs plaquettaires impliqués dans la reconnaissance bactérienne.

1) Rôle de la Glycoprotéine IIb-IIIa

En plus d'assurer leur fonction classique dans l'hémostase, les glycoprotéines plaquettaires jouent un rôle dans l'adhésion aux bactéries. Le premier récepteur plaquettaire identifié en tant que tel est la GPIIb-IIIa. Cette intégrine, spécifique de la lignée mégacaryocytaire, constitue le récepteur au fibrinogène. Son engagement conduit à l'adhésion et à l'agréation plaquettaire [77].

Les *staphylococci* expriment des récepteurs de surface spécifiques du fibrinogène et de la fibronectine **(figure 5)**. Il s'agit de protéines de surface caractérisées par des domaines riches en répétitions sérine-aspartate, appartenant à la famille des récepteurs membranaires microbiens reconnaissant des molécules d'adhésion de la matrice , « *microbial surface*

components recognizing adhesive matrix molecules», ou MSCRAMM [78]. Ces molécules confèrent aux bactéries la possibilité d'adhérer aux tissus, étape critique dans l'établissement de l'infection. Parmi les exemples les plus fréquents de MSCRAMM on retrouve chez *S.aureus* le Clf A [79], le Clf B [80], la protéine liant la fibronectine (« fibronectin binding protein » = Fnbp) A et la Fnbp B [81].

Staphylococcus lugdunensis lui se lie au fibrinogène *via* sa protéine Fbl, homologue à 58% avec le « Clumping factor A » (ClfA) [82].

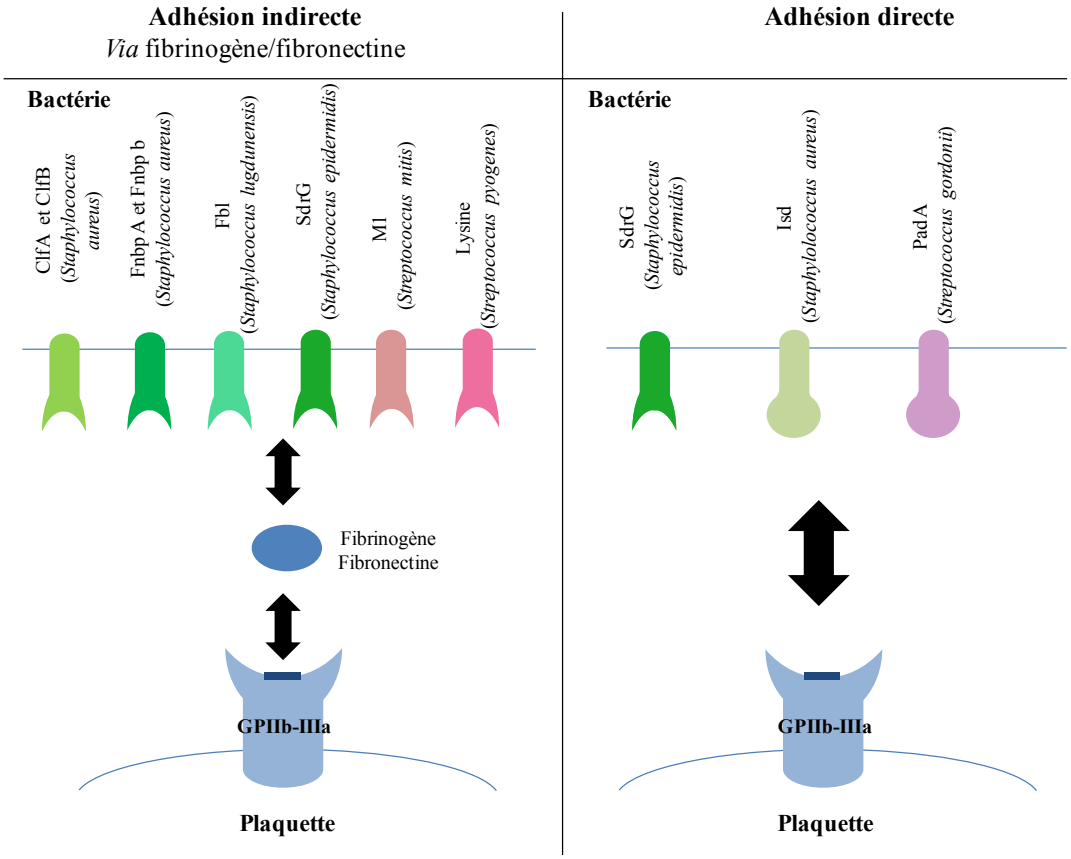


Figure 5 - Implication de la GPIIb-IIIa dans l'adhésion des bactéries aux plaquettes

Représentation schématique des différents constituants bactériens qui se lient indirectement, via le fibrinogène ou la fibronectine ***(partie gauche du schéma),*** *ou directement* ***(partie droite du schéma)*** *à la GPIIb-IIIa plaquettaire*

La liaison de *Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis)* quant à elle, est restée plus longtemps inconnue même s'il avait déjà été montré que le traitement à la trypsine d'une culture de *S. epidermidis* empêchait son adhésion aux plaquettes [83], suggérant l'implication d'un facteur membranaire. C'est Brennan *et al.* qui, en 2009, ont montré que la protéine « serine-aspartate dipeptide repeat » (Sdr) G exprimée à la surface de *S. epidermidis* est suffisante pour supporter l'adhésion de la bactérie aux plaquettes, *via* le fibrinogène [84].

Même si ces différents MSCRAM sont des protéines présentant une forte homologie, elles se lient au fibrinogène *via* différents sites de liaison. ClfA et Fbl ainsi que FnbpA et B se lient à la région C-terminale de la chaine γ du fibrinogène. « Clumping factor B » (ClfB) quant à lui trouve son site de liaison sur la région C-terminale de la chaine Aα du fibrinogène, et SdrG sur la chaine Bβ. D'autres genres bactériens peuvent également se lier au fibrinogène, notamment *Streptococcus pyogenes (S. pyogenes) via* la protéine M1 et *Streptococcus mitis via* une enzyme, la lysine [85].

Il a plus récemment été décrit que les bactéries expriment aussi des protéines de surface leur permettant de se lier directement à la GPIIb-IIIa, indépendamment du fibrinogène **(figure 5)**. C'est le cas de la SdrG de *S.epidermidis* qui en plus de lier le fibrinogène peut aussi directement cibler la glycoprotéine plaquettaire [84].

In vivo, S. aureus doit trouver une source de fer afin de permettre sa croissance et d'assurer sa pathogénicité. Pour ce faire, il exprime les protéines de type « iron-regulated surface determinants » (Isd) capables de lier l'hème de l'hémoglobine et de l'internaliser. Or, il a été montré qu'IsdB en particulier, peut se lier à la GPIIb-IIIa en absence de protéine plasmatique. Cette adhésion est inhibée en présence d'une pré-incubation des plaquettes avec un anticorps anti-GPIIb-IIIa et par l'utilisation de souches bactériennes mutées pour IsdB ce qui prouve la spécificité de la liaison [86].

S. gordonii exprime également un facteur d'adhérence aux plaquettes nouvellement décrit, le PadA (« Platelet Adherence protein A »), et pour lequel aucune autre fonction n'est connue à ce jour [87].

Le(s) site(s) de liaison mis en jeu sur la GPIIb-IIIa n'ont pas encore été cartographiés, cependant l'utilisation de peptides mimant l'enchainement arginine – glycine – aspartate, ligand classiquement décrit pour l'engagement de la glycoprotéine en condition hémostatique, empêche la fixation directe des bactéries sur la plaquette [85]. Cette observation laisse à penser que la liaison serait de même type que celle avec le fibrinogène.

2) Rôle de la Glycoprotéine Ibα

La GPIbα est une glycoprotéine membranaire, elle aussi exclusivement retrouvée au sein de la lignée mégacaryocytaire. Elle appartient à la famille des protéines riches en répétitions de leucine.

Elle est capable de lier plusieurs ligands et elle est primordiale dans l'hémostase primaire de par sa forte affinité avec le facteur de von Willebrand (vWF). Il est important de rappeler que la GPIbα est retrouvée sous forme de complexe avec la GPIbβ, la GPIX et la GPV dans un ratio de 2 : 2 : 2 : 1 [77].

Il a été montré que plusieurs espèces de streptocoques pouvaient directement se lier à la GPIbα **(figure 4)**. Cette interaction fait intervenir une famille de protéines bactériennes riche en sérine et fortement glycosylées. Cette famille inclue la « serine-rich protein A » (SrpA) de *S. sanguinis* [88] ainsi que la « glycosylated streptococcal protein B » (GspB) et l' « hemagglutinin salivary antigen » (Hsa) de *S. gordonii* [89]. Ces protéines bactériennes, présentant une forte homologie, vont se lier sur les acides sialiques des récepteurs de l'hôte. La protéine « staphylococcal accessory regulator » (Sar) P exprimée par *S. aureus* permet également l'adhésion aux plaquettes [90]. Le fait que SraP et GspB soient moléculairement très proches permet d'émettre l'hypothèse que la laison SraP-plaquettes pourrait passer par la GPIbα.

Bien que moins nombreuses que celles liant le fibrinogène, des protéines bactériennes sont capables de se lier au vWF **(figure 6)**. Il a été montré que la protéine A de *S. aureus* est capable de se lier au vWF [91] qui, à son tour, interagit avec la GPIBβ. Il en est de même pour une protéine, pas encore totalement caractérisée, présente à la surface d' *Helicobacter pylori.* Cette étude portant sur l'interaction plaquette-bactérie impliquant le vWF montre que le vWF déjà lié à une bactérie n'a pas besoin de force de cisaillement pour adhérer à la GPIBβ [92].

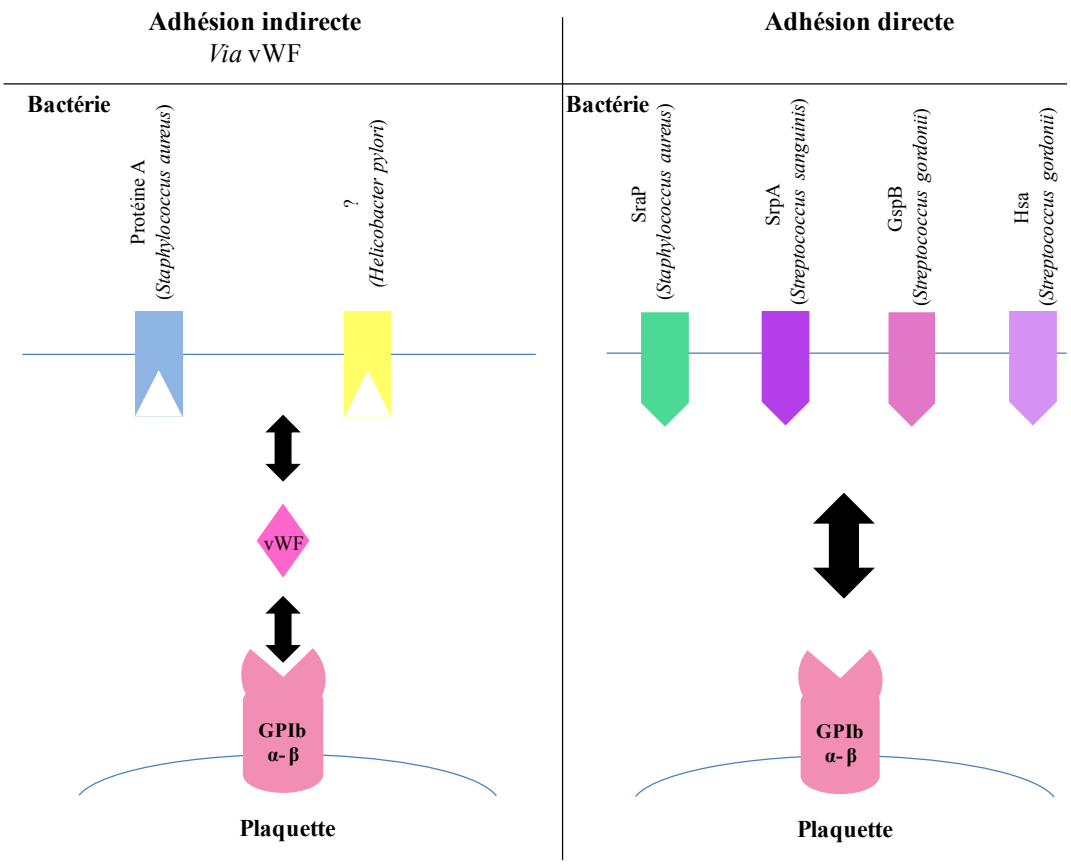


Figure 6 - Implication de la GPIb dans l'adhésion des bactéries aux plaquettes

Représentation schématique des différents constituants bactériens qui se lient indirectement, via le facteur de von Willebrand ***(partie gauche du schéma),*** *ou directement* ***(partie droite du schéma)*** *à la GPIb α-β plaquettaire .*

3) *Les récepteurs du complément*

La littérature décrit la capacité des plaquettes à interagir avec le système du complément. Ceci est principalement observé pour les plaquettes activées permettant ainsi leur clairance, mais aussi pour les plaquettes dans un environnement pathologique **(figure 7)**. Par exemple, le C5b-9 est retrouvé à un niveau détectable à la surface des plaquettes chez 14% des patients atteints d'une pathologie impliquant les artères coronariennes. D'un point de vue moléculaire, le complément est capable d'activer les plaquettes en induisant l'expression de facteurs pro-coagulants, tel que le complexe pro-thrombinase, à la surface de la cellule [93].

D'autres part, les protéines du complément interagissent avec les bactéries aussi bien par la voie classique que la voie alterne [94].

S. sanguinis, par exemple, induit une agrégation plaquettaire impliquant le complément [95]. Les ClfA et B de *S. aureus* induisent également une agrégation dépendante du complément [96].

Les plaquettes expriment le gC1q-R, le récepteur du premier composant du complément C1q et pourrait ainsi servir de récepteur aux bactéries recouvertes de ce facteurs du complément. L'expression du gC1q-R à la surface plaquettaire est largement augmentée après activation de la plaquette [97]. L'activation des plaquettes se traduit aussi par l'augmentation du CD62P à la membrane, décrit pour lier la C3b, une autre protéine du complément [98].

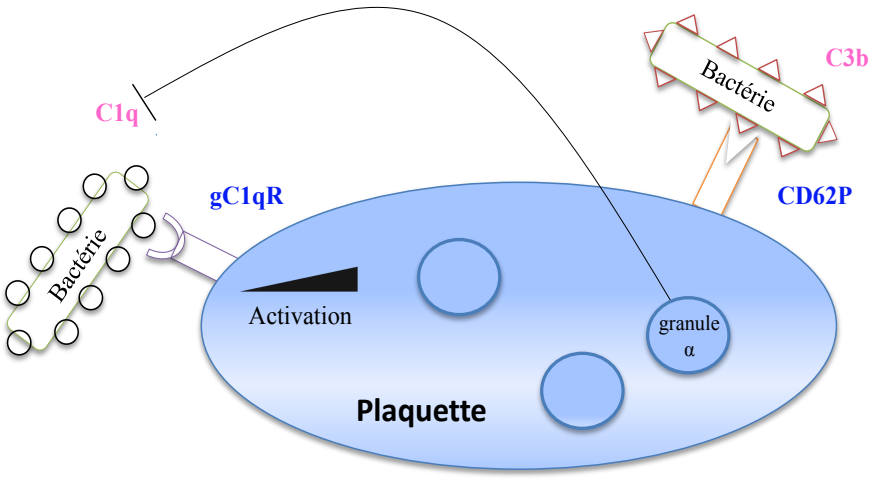


Figure 7 – Les facteurs du complément dans la liaison des bactéries aux plaquettes

Les bactéries recouvertes du facteur C1q peuvent être reconnues par le récepteur gC1q (gC1qR) présent à la surface plaquettaire. L'expression de ce récepteur est augmentée au cours de l'activation plaquettaire. Les granules α contiennent un inhibiteur du C1q qui limite l'interaction entre le C1q et le gC1qR.
Le CD62P exprimé par les plaquettes activées est capable de reconnaitre le C3b du complément

Cette interaction des plaquettes avec le complément peut être bivalente. D'un côté les plaquettes peuvent aider à la destruction des bactéries en augmentant l'activité du complément, mais du fait qu'elles lient les protéines du complément elles peuvent, elles mêmes devenir la cible de l'activité lytique du complément. C'est notamment ce qui s'observe dans des cas de purpura thrombopénique [93]. Cependant les plaquettes possèdent dans leur granule α un inhibiteur de C1, qui lors de la stimulation plaquettaire permettrait de moduler l'activation du complément [99].

Cette notion de la liaison plaquette-bactérie par les molécules du complément fait appel à un mécanisme plus immunologique qu'hémostatique mettant ainsi en avant la double fonctionnalité des plaquettes.

4) Le récepteur FcγRIIA

L'expression de ce récepteur immunitaire, qui reconnait le domaine Fc des immunoglobulines (Ig) de type G (IgG), est classiquement décrite pour les phagocytes tels que les neutrophiles et les monocytes. Le FcγRIIa permet la liaison et l'internalisation de complexes immuns impliquant une IgG, qu'ils soient solubles ou cellulaires. Ce mécanisme est régulé par le fait que les IgG complexées ont une forte affinité pour le récepteur alors que cette dernière est très faible pour les IgG monomériques [100].

Les plaquettes sanguines expriment également le FcγRIIa[101] . A ce jour, c'est le seul type de récepteur Fcγ décrit sur les plaquettes. Une des premières fonctions associée au FcγRIIa plaquettaire relève de sa contribution dans la physiopathologie d'affections autoimmunes. Reilly *et al*. ont décrit que dans les cas de thrombopénies induites par l'héparine, les autoanticorps ayant reconnu les complexes PF4-héparine se lient au FcγRIIa plaquettaire. L'engament du récepteur conduit alors à une forte activation hémostatique suivie de la clairance des plaquettes activées [102].

Les IgG liées aux bactéries sont également capables d'être prises en charge par ce récepteur plaquettaire. Au même titre que pour les leucocytes, les complexes immuns ayant liés le FcγRIIa peuvent même être internalisés dans les plaquettes [103].

La stimulation d'autres récepteurs plaquettaires par les bactéries nécessite très souvent l'engagement simultané du FcγRIIa afin d'obtenir une réponse plaquettaire efficiente (voir paragraphe traitant de l'activation plaquettaire suite à une stimulation bactérienne : Chapitre 1- I C). Ceci suggère un lien entre l'engagement du FcγRIIa et les mécanismes d'agrégation.

En moyenne, les plaquettes expriment environ 5 000 copies de FcγRIIa [85]. Compte tenu du nombre important de plaquettes circulantes, celles-là représentent ainsi le plus riche réservoir de FcγRIIa et en fait donc une cellule non négligeable dans la réponse plaquettaire anti-bactérienne.

5) Les toxines bactériennes

Les bactéries peuvent également sécréter des toxines, capables d'activer les plaquettes.

Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) secrète une famille de protéase à cystéines appelée les gingipaïnes. Ces toxines sont capables de reconnaître le récepteur « protease-activated receptor » (PAR) 1 plaquettaire et de le cliver d'une manière analogue à la thrombine, ce qui le rend donc fonctionnel [104].

L'α-toxine, exprimée par les souches de *S. aureus*, se lie à la membrane bi-lipidique des plaquettes pour y former un pore suivi d'un flux de calcium, semblable à celui induit par un ionophore calcique [105]. D'autres toxines capables de former des pores à la surface des plaquettes sont également décrites. On recense la streptolysine O pour *S. pyogenes* [106] et la pneumolysine pour *Streptococcus pneumoniae* [107].

S. aureus et *S. pyogenes* produisent une superfamille de toxines dite SSL (« staphylococcal superantigen like ») et connue pour avoir un effet superantigène. L'une d'entre elles, la SSL5 interagit directement avec la GPIbα *via* les résidus de sialyllactosamine qui terminent sa chaîne de glycanes. Cette toxine présente également une affinité directe pour la GPIV [85].

6) Les Toll Like Receptors

Les plus étonnants des immunorécepteurs décrits chez les plaquettes sont les « Toll Like Receptor » (TLR). Cette famille de récepteurs a été mise en évidence pour la première fois par R. Medzhitov en 1997 [108]. Ces molécules, proches de récepteurs de type « Toll » précédemment décrits chez la drosophile, sont intégrées dans la catégorie des « Pattern-Recognition Receptor » (PRR), dont la fonction est de détecter des motifs répétés et fonctionnels exprimés par les pathogènes, nommés PAMP. Au début des années 2000, l'augmentation du nombre de molécules inclues dans la famille des PRR (les TLR, les récepteurs NOD, les récepteurs au mannose, les récepteurs aux lectines,….) a modifié certains concepts de l'immunologie, montrant que l'immunité innée possède des récepteurs dédiés, senseurs des agressions pathogènes [109].

A noter également que les TLR possèdent des ligands endogènes pouvant provoquer ou accélérer une inflammation : Heat Shock Protein 60 et 70, fibrinogène, produits de cellules en apoptose [110].

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I possédant : i) des ectodomaines riches en leucines repliés en feuillets β, permettant l'interaction avec les

PAMP ; ii) un domaine transmembranaire ; et iii) un domaine « Toll-Interleukin-1 Receptor » (TIR) cytoplasmique, fondamental dans la transduction du signal. A ce jour, 10 TLRs sont décrits chez l'homme, contre 13 chez la souris **(figure 8)**. Les TLR 12 et 13 ne sont pas décrits chez l'homme [110]. Concernant le TLR11, il a la particularité de posséder une séquence reconnue comme un codon stop par la machinerie transcriptionelle humaine. Cependant, la profiline de *Toxoplasma*, ligand du TLR11 murin est reconnu par l'organisme humain. L'existence d'une forme protéique tronquée mais fonctionnelle du TLR11 est alors supposée [111].

Les PAMP reconnus par les TLR peuvent être des lipides, des lipoprotéines, des protéines ou des acides nucléiques provenant aussi bien de bactéries, virus, champignons ou parasites. De plus, la reconnaissance des PAMP par les TLR peut se faire dans différents compartiments cellulaires, dont la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes [110]. Après engagement, chaque TLR déclenche une réponse biologique qui lui est propre et adaptée au PAMP reconnu. Ces différences ont été expliquées par la découverte de différentes molécules adaptatrices venant se lier au domaine TIR ; cela inclut le « Myeloid differentiation primary response gene (88)" (MyD88), TIRAP, « TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta) (TRIF) et TRAM. Ces adaptateurs activent diverses voies de signalisation.

Suivant le TLR mis en jeu, on recense la translocation nucléaire des facteurs de transcription comme : le « Nuclear Factor kappa B » (NFκB) à un stade précoce et tardif (tous les TLR), l'AP-1 (tous sauf TLR 3), l'« Interferon Regulation Factor » (IRF) 3 (TLRs 3 et 4) et IRF 7 (TLRs 7/8/9). Ces voies conduisent à la synthèse de cytokines inflammatoires ainsi qu'à la production d'interféron de type 1 (IFN I) [110] **(figure 8)**.

Initialement, l'expression des TLR a été décrite sur les cellules de l'immunité, comme les macrophages, les cellules dendritiques, puis pour les lymphocytes B ainsi que certaines classes de lymphocytes T. Ces récepteurs sont des molécules clés dans la défense de l'organisme car ils sont à l'interface entre la reconnaissance d'un signal de danger (pathogène ou endogène) et l'initiation de réponses immunitaires de diverses natures (inflammation, libération de molécules impliquées dans l'induction de la réponse adaptative). L'exemple soulignant le mieux leur importance est l'activation des TLR présents à la surface des cellules dentritiques. Les voies de signalisation mises en jeu menent à la libération de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à l'« up-régulation » de molécules qui potentialisent la fonction de

présentation antigènique (CMH de classe II, IL-12, CD80) et par conséquence l'activation des lymphocytes T [112].

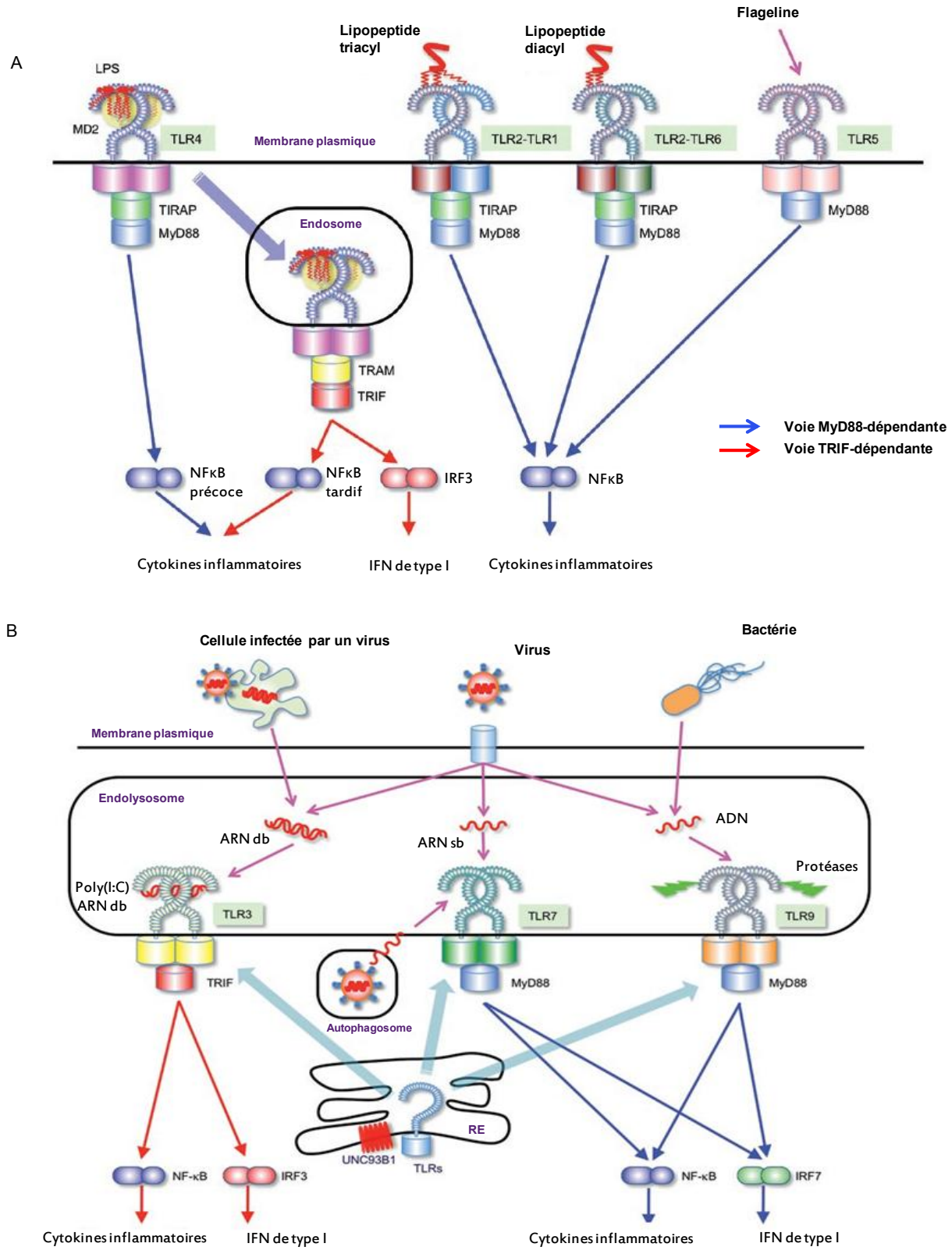


Figure 8 - Reconnaissance des PAMPs par les TLRs (membranaires ou intracytoplasmiques)
D'après Kawai *et al.* [93].

(A) Reconnaissance des PAMP par les TLR exprimées à la surface de la membrane plasmique.
Le lipopolysaccharide (LPS) engage le TLR4 à condition que ce dernier soit complexé avec le MD-2 : cinq des six chaines lipidiques du LPS lient le MD-2 et la chaine restante s'associe avec le TLR4.
La formation d'hétéromères TLR4-MD-2-LPS permet le recrutement des molécules adaptatrices TIRAP et MyD88 qui initient alors la transmission du signal menant à l'activation précoce du NFκB et à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (voie MyD88).
Après ce premier signal, le complexe TLR4-MD-2-LPS est alors internalisé sous forme d'endosome et déclenche une nouvelle transduction du signal en recrutant les molécules adaptatrices TRAM et TRIF, qui conduisent à l'activation tardive du NFκB ainsi qu'à celle d'IRF3 pour la synthèse d'interféron de type I (IFN de type I) (voie TRIF).
Les hétérodimères TLR2-TLR1 et TLR2-TLR6 reconnaissent respectivement les lipopeptides bactériens triacétylés et diacétylés. Deux des trois chaines lipidiques des lipopeptides triacétylés interagissent avec le TLR2, et la troisième avec le canal hydrophobe du TLR1 (absent pour le TLR6). TLR2-TLR1 et TLR2-TLR6 induisent l'activation du NFκB via le recrutement des molécules adaptatrices TIRAP et MyD88.
Le TLR5 reconnait la flagelline et activie le NFκB via le recrutement du MyD88.
(B) ***Reconnaissance des PAMP par les TLR intracellulaires (situés au niveau des endolylososomes)***
Le TLR3 reconnait les ARN double-brins (ARN db) dérivés des virus ou de cellules infectées par un virus. L'ARNdb lie les parties N-terminales et C-terminales , toutes deux situées en position latérale de la surface convexe de l'ectodomaine du TLR3; et favorise ainsi la formation d'un homodimère via la région C-terminale. Le TLR3 active la voie TRIF qui induit la synthèse d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires.
Le TLR7 reconnait les ARN simple-brin (ARN sb) dérivés des virus à ARN sb et libérés dans les endolysosomes. Le recrutement du MyD88 permet l'activation du NFκB ainsi que de l'IRF7 ce qui conduit respectivement à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de d'IFN de type I. De plus, l'autophagie est un mécanisme impliqué dans la délivrance d'ARN simple brin au niveau des vésicules exprimant le TLR-7.
Le TLR9 reconnait l'ADN dérivé aussi bien des virus à ADN que des bactéries. Un clivage protéolytique par les enzymes cellulaires est nécessaire pour une transduction en aval. Le TLR9 engagé recrute le MyD88 qui active le NFκB et l'IRF7.
A l'état basal, les TLR 3, 7 et 9 sont principalement localisés au niveau du réticulum endoplasmic (RE) et trafiquent ensuite en direction des endolysosomes où ils sont engagés par leurs ligands. L'interaction d'UNC93B1 (protéine du RE) avec les TLR au niveau du réticulum endoplasmique est essentielle pour leur adressage en direction des endolysosomes.

Les TLR sont aussi exprimés par des cellules considérées comme non immunitaires mais étant à l'interface entre le milieu extérieur et le système immunitaire, notamment les fibroblastes et les cellules épithéliales [113].

Les cellules les plus étudiées quant au rôle de leurs TLR sont les cellules dendritiques et les macrophages. Des travaux ont montré que la voie de signalisation empruntée par un même TLR diffère selon le type cellulaire et le microenvironnement inflammatoire, ce qui augmente la spécialisation de la réponse TLR-dépendante. Ainsi, le TLR2 est capable de distinguer une stimulation bactérienne d'une stimulation virale, et d'adapter sa réponse. Ceci n'est pas valable pour l'ensemble des TLR2 car seuls les monocytes inflammatoires sont capables de faire cette distinction [114].

Les TLR sont essentiels à l'immunité mais des réponses inappropriées peuvent *a contrario* provoquer des inflammations chroniques et aiguës, ainsi que des maladies auto-immunes (provoquées par la reconnaissance de ligands endogènes) [115].

En 2004, l'équipe Japonnaise de Yokoyama montre la présence des TLR 1 et 6 à la surface des plaquettes, avec une éventuelle implication de ces derniers dans le processus d'athérosclérose [116]. Dans la même année, les travaux menés par notre équipe viennent compléter ces observations par la mise en évidence des TLR 2, 4 et 9, aussi bien à leur surface plaquettaire, qu'au niveau ctyoplasmique ; et que l'expression de ces TLR pouvait être modulée en fonction de l'état d'activation des plaquettes [117] **(figure 9)**.

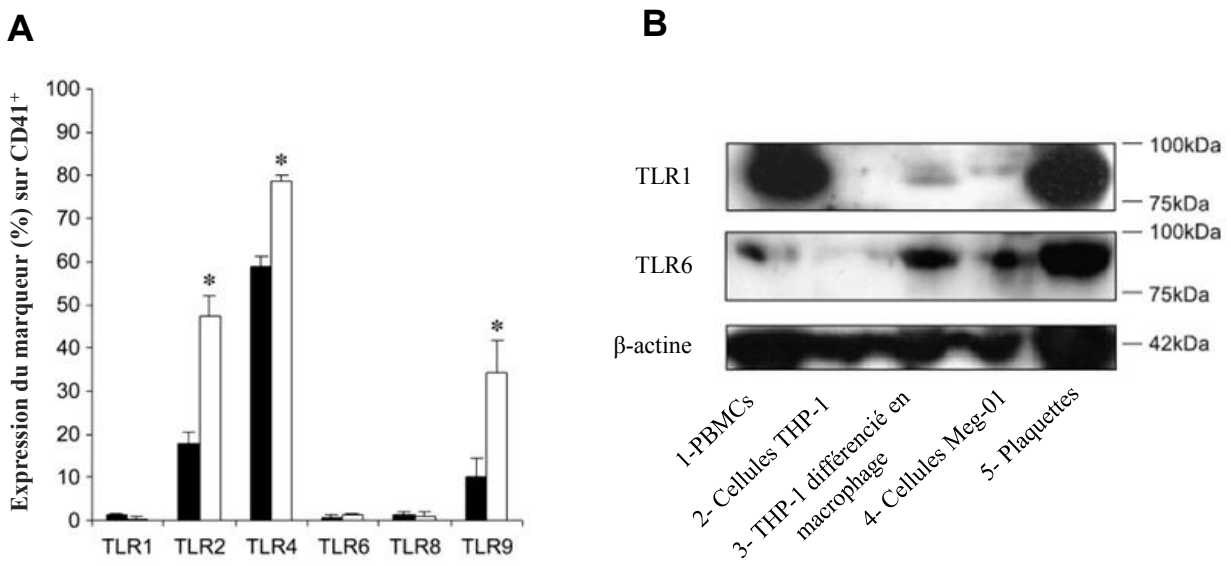


Figure 9 - Mise en évidence des TLRs plaquettaires
D'après Cognasse *et al.* [100] et Shiraki *et al.* [99]

(A) ***Expression des TLR plaquettaires d'après Cognasse et al. Les plaquettes testées sont issues*** *de mélanges de concentrés plaquettaires, conservées 5 jours. L'utilisation de plaquettes perméabilisées (□) ou non (■) permet d'obtenir les pourcentages d'expression des TLR en position intracellulaire et membranaire. Les pourcentages d'expression sont restreints à la population CD41$^+$ et exprimés sous forme de moyenne ± écart-type, avec n=5.*
(B) Expression des TLR plaquettaires d'après Shiraki et al. *Détection des protéines par Western-Blot. Les PBMC et les cellules THP-1 différenciées en macrophages servent de contrôle positif, les cellules THP-1 non différenciées de contrôle négatif. Les cellules Meg-01 ont précédemment été cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Les plaquettes sont isolées de PRP frais et lavées deux fois en tampon de lavage (100 mM NaCl, 8.5 mM Tris, 8.5 mM dextrose et 1mM EDTA). Les protéines des différents lysats cellulaires ont été séparées sur un gel de polyacrylamide 10% et immunomarquées avec des anticorps anti-TLR1, anti-TLR6 et un anti- β-actine servant de témoin de charge.*

L'expression des TLR plaquettaires est aussi observée chez les rongeurs [118], qui constituent un modèle répandu pour l'étude de ces molécules. La caractérisation de TLR à la surface de thrombocytes de poulets vient étendre le champ d'étude [119].

Le fait que des ARNm codant pour les TLR soient détectés dans le mégacaryocyte (MK) indique une expression continue de ces récepteurs au sein de la lignée mégacaryocytaire et non une capture de la circulation [116], [118]. De plus, plusieurs travaux montrent l'expression des TLRs aussi bien sur une lignée de mégacaryoblastes humains [116] et sur des MK murins ou isolés de donneurs humains [118], [120], ce qui confirme l'origine de l'expression des TLR plaquettaires. Cependant il n'est pas exclu que les TLR solubles retrouvés dans le plasma puissent venir s'ancrer dans la membrane plasmique des plaquettes et venir renforcer la défense contre les pathogènes.

L'expression du TLR 4 augmente au cours du processus de maturation des MK. Ce récepteur présente même une cinétique d'expression semblable à celle du CD41 [121]. Il en est de même pour le TLR9, pour lequel le nombre de transcrits augmente considérablement à partir de cinq jours de différenciation des MK en pro-plaquettes [120]. Comme pour les leucocytes, l'expression des TLR plaquettaires devient donc de plus en plus conséquente au cours de la thrompoïèse, comme si ces molécules étaient requises pour une fonctionalité optimale des plaquettes matures ; ce qui est encourageant pour supporter leur fonctionalité.

Contrairement au rôle des TLR plaquettaires qui est de plus en plus exploré, et sur lequel nous reviendrons dans une partie dédiée (Chapitre 1 – I D), le rôle fonctionnel des TLRs sur les mégacaryocytes reste peu étudié. Deux études [121], [122] ont montré que des souris $TLR4^{-/-}$ présentent des deficits dans la numération de leurs plaquettes circulantes et réticulées comparément aux souris sauvages, suggérant que le TLR4 pouvait jouer un rôle dans la thrombopoïèse. De récents travaux, ont montré que l'hématopoïèse n'est pas un phénomène stéréotypé mais qu'elle peut être activée par un environnement inflammatoire [123]. Le TLR4 des précursseurs hématopoïétiques pourrait être impliqué dans cette régulation. Cette hypothèse semble se confirmer avec une étude montrant que des souris stimulées par un ligand du TLR4, à une dose non létale, présentent un nombre supérieur de plaquettes comparativement aux souris non traitées [122]. On observe également une augmentation de transcrits codant pour les TLR 1 et 6 chez des mégacaryocytes cultivés en présence d'IFNγ d'une manière dépendante de la dose et du temps dépendants [123]. Ceci pourrait être un mécanisme permettant aux plaquettes nouvellement formées d'être plus nombreuses, d'accroître leur nombre de TLR et donc d'être plus actives dans leur rôle anti-infectieux.

L'expression caractéristique des TLR à la surface des plaquettes est un argument de poids pour considérer ces cellules comme faisant partie de l'immunité. Tout comme pour le FcγRIIa, le nombre conséquent de plaquettes circulantes portant des immunorecepteurs permet de les considérer comme des sentinelles capables de détecter un danger.

En général, les récepteurs décrits ci-dessus, qu'ils aient une fonction hémostatique ou immunitaire, constituent des points d'ancrage permettant aux bactéries d'adhérer spécifiquement aux plaquettes et d'influencer leurs fonctions.

C. Effets des bactéries sur la fonction plaquettaire

La plupart des travaux s'intéressant à l'adhésion des bactéries sur les plaquettes montrent qu'il s'en suit une agrégation. Dans ce manuscrit nous ne traitons pas la coagulation mais seules les caractéristiques relevant de l'agrégation et de l'inflammation après contact avec les bactéries sont abordées.

1) Internalisation des bactéries

Lors d'une infection bactérienne systémique, le pathogène est en général capturé par les phagocytes. Dans les années 1970, lorsque Clawson s'est intéressé à l'interaction entre les plaquettes et les bactéries, il observait, occasionnellement, l'internalisation de *S. aureus* dans quelques plaquettes [60], [124], [125]. Youssefian *et al.* [36] ont confirmé ces observations. Ils se sont particulièrement intéressés à l'internalisation de *S. aureus*.

Les photographies de microscopie électronique montrent bien l'internalisation de *S. aureus* à l'intérieur des plaquettes, au sein de vacuoles indépendantes du sytème canaliculaire ouvert (OCS), suggérant une internalisation active **(figure 10)**.

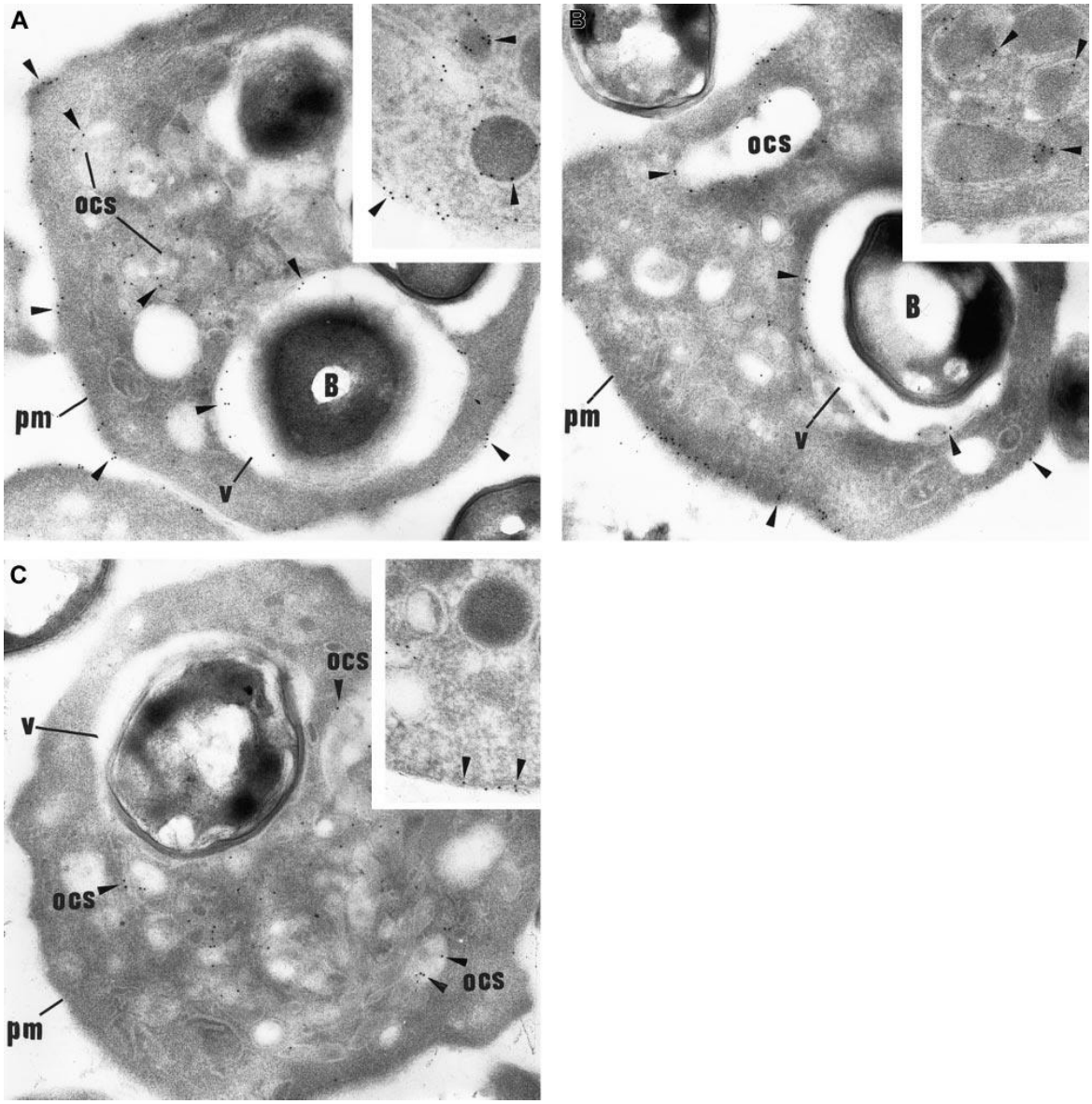


Figure 10 - Internalisation de *S.aureus* dans les plaquettes

D'après Youssefian *et al.* [36]

(**A**) ***Immunomarquage à l'or de la GPIIb-IIIa.*** *Les plaquettes ayant internalisé S. aureus* ***(b)*** *présentent un signal* ***(flèche)*** *prédominant le long de la membrane plasmique* ***(pm)*** *et de la membrane délimitant le système canaliculaire ouvert* ***(OCS).*** *De la même manière que l'OCS, la membrane délimitant les vacuoles* ***(v)*** *contenant les bactéries sont aussi fortement marquées.*
Grossissement X 23 250. Encart : Pour les plaquettes contrôles, le GPIIb-IIIa est immuno-détectée au niveau de la membrane plasmique et de la membrane des granules α; grossissement X 34 100.
(B) Immunomarquage à l'or du CD62P. *Le marquage* ***(flèche)*** *est régulier au niveau de la membrane plasmique* ***(pm)*** *et de l'****OCS****, caractéristique de l'activation plaquettaire. La membrane des vacuoles englobant la bactéries est aussi positive pour le CD62P.*
Grossissement X 23 250. Encart : Pour les plaquettes contrôles, l'expression du CD62P est absente de la membrane plasmique et restreinte aux granules α; grossissement X 34 100.
(C) Immunomarquage à l'or de la GPIb. *Le signal spécifique de la protéine* ***(flèche)*** *est détecté au niveau de la membrane de l'****OCS*** *mais pas sur celle délimitant la vacuole* ***(v)*** *contenant la bactérie; montrant ainsi que S. aureus est contenu dans un compartiment distinct de l'****OCS****. D'une manière remarquable, la GPIb est absente de la membrane plasmique* ***(pm)*** *et redistribuée dans l'****OCS****, profil d'expression caractéristique des plaquettes activées.*
Grossissement X 23 250. Encart : Pour les plaquettes contrôles, la GPIb est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique ***(pm)*** *; grossissement X 34 100.*

La capacité d'internalisation des plaquettes est meilleure lorsque celles-ci sont activées par un agoniste classique (adénosine di-phosphate (ADP) ou thrombine) mettant en avant un mécanisme commun entre activation et internalisation. Le marquage immuno-histochimique des vacuoles contenant *S. aureus* montrent la présence de CD62P, de GPIIb-IIIa et non de GPIb, phénotype correspondant bien à celui d'une membrane plaquettaire activée. La vacuole serait donc formée par invagination de la membrane plasmique (endocytose) après activation.

Une équipe japonaise a confirmé l'internalisation de *S. aureus* au sein des plaquettes, mais seulement après activation de ce celles-ci par de l'ADP. Cette même étude montre que *Porphyromonas gingivivalis (P. gingivalis)* peut aussi être internalisée au sein des plaquettes. Cependant le mécanisme d'internalisation semble s'opèrer différemment entre les deux bactéries. En effet, *P. gingivalis* est capable d'induire à lui seul, sans ajout d'autre agoniste plaquettaire, des agrégats plaquettaires suffisants pour internaliser la bactérie [126].

Où les résultats se rejoignent entre l'internalisation de *S. aureus* et de *P. gingivalis* c'est que les deux types de bactéries sont internalisés dans des vacuoles indépendantes de l'OCS [126]. Même si la finalité est la même, il est donc possible que les mécanismes d'internalisation soient différents pour une bactérie à Gram positif et une bactérie à Gram négatif, suggérant que l'une ou l'autre possède une molécule supplémentaire favorisant son internalisation. A noter que la présence, sur les clichées de l'étude de Li *et al.,* des quelques cellules de *P. gingivalis* observées au niveau de l'OCS pourrait être expliquée par un piégeage passif des bactéries au moment de l'agrégation plaquettaire [126].

Le FcγRIIa plaquettaire pourrait aussi initier l'internalisation des complexes IgG-pathogènes [103]. Une étude montre en effet que les plaquettes sont capables, après engagement du FcγRIIa, d'internaliser des billes de polystyrène (diamètre 0,5 -1,5µm) recouvertes d'IgG. Cette internalisation est inhibée par la cytochalasine D ce qui suggère la nécessité d'un remodellage de l'actine plaquettaire pour que les bactéries puissent être internalisées [127].

La question rémanente concerne le devenir des bactéries internalisées. White *et al.* ont revu les arguments en faveur de l'incapacité des plaquettes de dégrader/tuer les bactéries.

Leur argument majeur est l'absence de phagolysosome dans les plaquettes [128]. L'internalisation des bactéries dans les plaquettes leur permettrait d'échapper au système immunitaire.

Cependant, les plaquettes pourraient utiliser une autre voie pour la destruction des bactéries. En effet, l'endosome contenant les pathogènes a la capacité de fusionner avec les granules α contenant de nombreuses molécules bactéricides [36]. Enfin, il est possible pour *Escherichia coli* (*E.coli*) d'être détruit par les plaquettes, *via* une internalisation par le FcγRIIa, à condition que les bactéries aient au préalable été opsonisées par des IgG [127].

Le devenir des bactéries internalisées dans les plaquettes reste donc discuté entre défense de l'hôte ou mécanisme d'échappement de la part des bactéries. Cependant, sans aller jusqu'à l'internalisation, l'adhésion des bactéries ou des produits bactériens à la surface des plaquettes est suffisante pour induire une réponse de défense des plaquettes. Les principales réactions sont décrites dans la partie suivante.

2) Activation des plaquettes par les bactéries

(a) Effet sur l'agrégation

Du fait que la liaison des bactéries aux plaquettes implique des récepteurs également impliqués dans l'hémostase, des données montrent une agrégation dépendante des bactéries.

Les bactéries qui utilisent de manière indirecte la GPIIb-IIIa (via le fibrinogène ou la fibronectine) entrainent une agrégation similaire à celle observée avec d'autres surfaces revêtues de fibrinogène [85]. En revanche, lorsqu'il s'agit d'une adhésion directe entre la bactérie et la GPIIb-IIIa le mécanisme mis en jeu est différent et l'induction de l'agrégation est souvent controversée dans la littérature. *S. gordonii*, par exemple, qui se lie directement à la GPIIb-IIIa par sa protéine PadA n'induit pas d'agrégation [87], venant potentiellement d'une plus faible affinité pour le récepteur.

Les bactéries s'étant liées à la GPIb *via* le vWF peuvent (contrairement au vWF soluble ou immobilisé) entraîner une agrégation en absence de force de cisaillement.

C'est le cas de *S. sanguinis* et *S. gordonii* qui se lient aux plaquettes respectivement par leurs protéines SrpA et GspB. La délétion de ces deux protéines abolit complètement cette l'agrégation [85]. Ces constituants bactériens sont capables de se substituer aux forces de cisaillement, notament en assurant eux-mêmes le roulement des plaquettes.

Pour d'autres bactéries, notamment *S. pyogenes* et *S. aureus,* les forces de cisaillement ne sont pas nécessaires pour induire la formation d'un thrombus, mais l'agrégation observée ferait intervenir d'autres protéines plaquettaires. L'hypothèse émise par Cox et al. est que la liaison des bactéries à la GPIb permettrait plutôt de rapprocher les bactéries de récepteurs plaquettaires plus fonctionels, tels que le FcγRIIa ou la GPIIb-IIIa [85].

Après une stimulation par *S. sanguinis*, impliquant la GPIb, les plaquettes libèrent le contenu de leurs granules denses qui contiennent des substances vasoactives, incluant les nucléotides adénosine ATP (adénosine tri-phosphate) et ADP (adénosine di-phosphate). Une fois libéré, l'ATP est pris en charge par les ectoATPases présentes à la surface de *S. sanguinis* et hydrolysé en ADP. L'ADP nouvellement formé ainsi que celui libéré auparavant vont pouvoir se lier sur leur récepteur plaquettaire. La voie P2Y est ainsi mise en jeu [85].

Lors de l'adhésion de *S. sanguinis* aux plaquettes, l'utilisation de l'aspirine inhibe totalement l'agrégation, suggérant aussi un rôle de la cyclo-oxygénase et la production de thromboxane (Tx) A_2. Les plaquettes exposées à *S. sanguinis* produisent bien du TxA_2 et le récepteur TPα permet ensuite d'amplifier l'activation plaquettaire en liant le TxA_2 fraichement libéré.

L'activation plaquettaire induite par *S. sanguinis* peut également mettre en jeu la voie des MAP kinases. L'équipe de McNicol a récemment montré que les MAP kinases Erk2 et p38 subissaient les étapes triphasiques de phosphorylation/déphosphorylation observées pour d'autres phosphoprotéines. L'aspirine n'a aucun effet sur la phosphorylation et la déphosphorylation d'Erk2 mais est capable d'inhiber sa phase de rephosphorylation [129].

Peu de données concernant la signalisation plaquettaire liée à l'adhésion de *S. aureus* sont disponibles. L'équipe de Cox a montré que lors de l'interaction de *S. aureus* avec les plaquettes l'agrégation induite est dépendante des voies cyclooxygénase et thromboxane [130]. Cette étude s'intéressait principalement aux mécanismes d'interaction, les mécanismes intracellulaires n'ont donc pas plus été détaillés.

D'autre part, plusieurs études s'intéressant à l'agrégation plaquettaire après adhésion bactérienne mettent en avant la nécessité de l'engagement du FcγRIIa pour une réponse effective [85]. Cependant, le fonctionnement du FcγRIIa pourrait être différent de celui classiquement décrit car si l'agrégation observée nécessite le FcγRIIa, les IgG ne semblent pas indispensables [131]. La colocalisation du FcγRIIa avec la GPIbα lors d'une stimulation bactérienne pourrait être la première étape dans la transduction du signal [131], [132].

Une des hypothèses les plus avancées concernant le rôle alternatif du FcγRIIa porte sur le remodelage plaquettaire car la séquence de la GPIb qui se lie au FcγRII (R542G543R544) est la même que celle qui se lie à l'actine durant l'activation plaquettaire [132].

Le même type d'étude a été mené sur le FcγRII et la GPIIb-IIIa. L'équipe de Newman a montré que le résidu Src de la GPIIb-IIIa, capable d'assurer un rôle de tyrosine kinase, phosphoryle le résidu « Immunoreceptor tyrosine-based activation motif » (ITAM) du FcγRII et amplifie ainsi les signaux d'activation plaquettaire [133]. La phosphorylation du motif ITAM peut se faire dans les 30s suivant la mise en contact, montrant que les voies de signalisation secondaires peuvent être mises en place très rapidement.

L'agrégation induite par une bactérie est différente de celle observée avec des agonistes plaquettaires classiques de type ADP, ATP, thrombine. Il s'agit d'une agrégation « binaire » c'est-à-dire qu'en dessous d'une certaine densité bactérienne, on n'observe pas d'agrégation, et qu'au-dessus l'agrégation est déjà maximale [134].

Le temps de latence nécessaire avant l'apparition de l'agrégation, ou « lag time », est un autre paramètre qui diffère selon que la stimulation des plaquettes est bactérienne ou non. Ce temps de latence est généralement plus élevé lors d'une stimulation bactérienne que lors d'une activation hémostatique **(figure 11)**. S'il faut compter approximativement 10s avec un agoniste hémostatique (ADP), certaines bactéries peuvent avoir un « lag time » très rapide de 90-120s alors que d'autres peuvent mettre plus de 20 minutes avant d'induire une agrégation plaquettaire. L'augmentation de la densité bactérienne peut réduire ce temps, dans une certaine limite [134]. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer les variations de « lag time » selon la bactérie : i) le temps nécessaire aux plaquettes pour lier les bactéries, d'autant plus si c'est de manière indirecte ; ii) l'activation du récepteur qui peut être moins forte.

L'agrégation plaquettaire induite par les bactéries reste néanmoins controversée et plusieurs études montrent que la stimulation bactérienne n'entrainerait pas d'agrégation mais une réponse inflammatoire plus ciblée (libération de chimiokines, activation des leucocytes, formation de NET).

Au vu des connaissances actuelles, notamment sur les TLR plaquettaires (Chapitre 1 – II B) il existe en marge de l'agrégation, d'autres réponses plaquettaires aux bactéries pouvant aller jusqu'à la libération de molécules adaptées

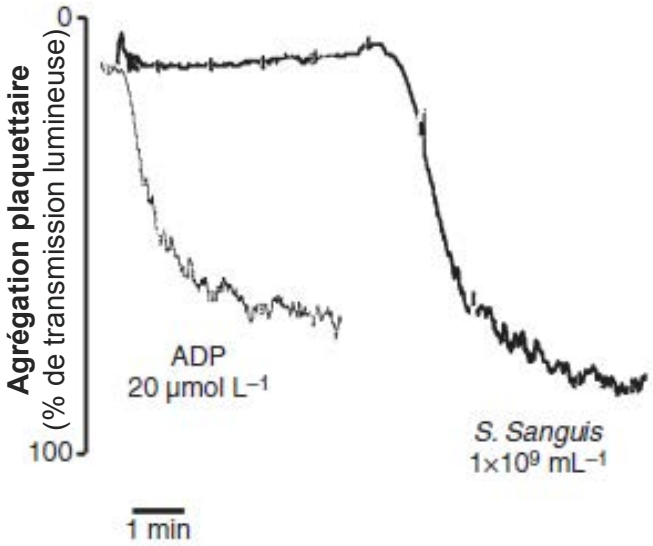


Figure 11 - Stimulation bactérienne et agrégation plaquettaire
D'après Cox *et al.* [68]

Le « lag time » se définit par le temps écoulé entre l'addition de l'agoniste plaquettaire et les premiers signes de l'agrégation. Le « lag time » observé pour une agrégation plaquettaire induite par de l'ADP est de 15 secondes alors que s'élève à 4 min lorsque les plaquettes sont en présence de Streptococcus sanguinis

(b) Effet sur la libération de facteurs immunomodulateurs

Les plaquettes possèdent dans leurs granules α de nombreuses molécules bio-actives, dont des cytokines/chimiokines, qui sont libérées au cours de leur activation leur permettant d'agir au cours de la réponse immunitaire [4], [135].

L'équipe canadienne partenaire de notre laboratoire et qui s'intéresse à la signalisation intraplaquettaire après stimulation par *S. sanguinis* a également réalisé une étude sur la

sécrétion de cytokines plaquettaires. Quatre souches de *S. sanguinis* et une de *S. gordonii* ont été utilisées pour l'étude.

L'observation d'une agrégation et de la phosphorylation de molécules de signalisation comme PCg2 et Erk confirme le rôle pro-thrombotique des streptocoques et montre aussi la libération de RANTES, de PF4, de sCD40L et de PDGF -AB ; le CD62P n'est libéré quant à lui qu'en présence d'une souche de *S. sanguinis* [136]. Une autre étude avait également montré que les plaquettes étaient capables de libérer du sCD40L et du RANTES après une stimulation avec des complexes billes-IgG, avec une absence d'agrégation et une très faible expression de CD62P [127].

L'adrénaline, connue pour stimuler la liaison du fibrinogène et l'agrégation [137], provoque un effet inverse sur la libération de cytokines plaquettaire. Le mécanisme d'inhibition mis en place n'est pas connu mais pourrait être lié à l'activation de l'oxide nitrique synthase (NOS) de type 3 après engagement des adrénorécepteurs β_2, ce qui va générer de l'oxide nitrique (NO) et du GMPc, déjà décrit pour inhiber l'activation plaquettaire [136]. Il apparaît donc clair que l'agrégation des plaquettes et l'exocytose de molécules immunomodulatrices sont deux fonctions indépendantes.

Une autre cytokine plaquettaire importante dans la réponse antibactérienne est le PF-4. Lors du syndrome de thrombopénie induite par l'héparine (« HIT syndrome »), le PF4, de par sa charge positive, se lie à l'héparine et forment à eux deux un néoantigène reconnu par les IgG. De la même manière, le PF4 soluble peut se lier aux bactéries et former ainsi un nouveau site de reconnaissance pour les IgG et les cellules effectrices de l'immunité [138]. Ceci s'observe particulèrement pour les bactéries à Gram negatif car le PF4 présente une affinité pour le lipide A bisphosphorylé du lipopolysaccharide (LPS) bactérien. Le complexe nouvellement formé va être pris en charge par des cellules phagocytaires. Le PF4 plaquettaire faciliterait ainsi la clairance de certaines bactéries.

Enfin, le CD40L est la molécule immunorégulatrice phare des plaquettes. Il s'avère que plus de 95% du sCD40L plasmatique provient des plaquettes [5]. En constituant la principale source de cette molécule, les plaquettes deviennent un élement immunorégulateur indéniable, participant aussi bien à l'activation des cellules effectrices de l'immunité innée,

qu'à celle de l'immunité adaptative car le CD40L est impliqué dans la synapse immunologique ainsi que dans la commutation isotypique des lymphocytes B.
Après activation des plaquettes, le CD40L est d'abord exposé à la membrane sous forme trimérique (forme biologiquement la plus active), il est ensuite clivé sous l'action de protéases ; la « Matrix Metallo-protease » (MMP)-9 étant pour l'instant la meilleure candidate.
A savoir aussi que la forme soluble du CD40L plaquettaire peut également avoir un effet autocrine de part la présence du CD40 à la surface des plaquettes [139].

L'implication du CD40L dans l'ensemble des fonctions plaquettaires ayant trait à l'inflammation est confirmée tout au long de ce manuscrit. Cette molécule est particulièrement considérée dans la réponse des plaquettes aux bactéries car l'engagment des TLR plaquettaires 2 [140] et 4 [140], [141] par leurs ligands bactériens est capable de moduler, spécifiquement, la libération de sCD40L (Chapitre 1 – II D2). On observe ainsi, comme pour les leucocytes, la triade : stimulation bactérienne – plaquette – libération discernée de molécules immunorégulatrices. De ce fait, le rôle du sCD40L plaquettaire dans la physiopathologie du sepsis représente un champ d'études en expansion (Chapitre 1 – II B2).

Les molécules immunorégulatrices plaquettaires présentées ci-dessus constituent un arsenal d'intérêt dans l'activation du système immunitaire menant à l'élimination des bactéries.
Le nombre croissant d'études portant sur l'interaction des bactéries et des plaquettes montrent que les plaquettes peuvent aussi influencer directement l'élimination des germes en libérant des molécules bactéricides.

(c) Libération de molécules plaquettaires anti-bactériennes

Kraemer *et al.* ont récemment montré que des plaquettes incubées avec *S. aureus* limitent la croissance de ce germe [142] **(figure 12)**.

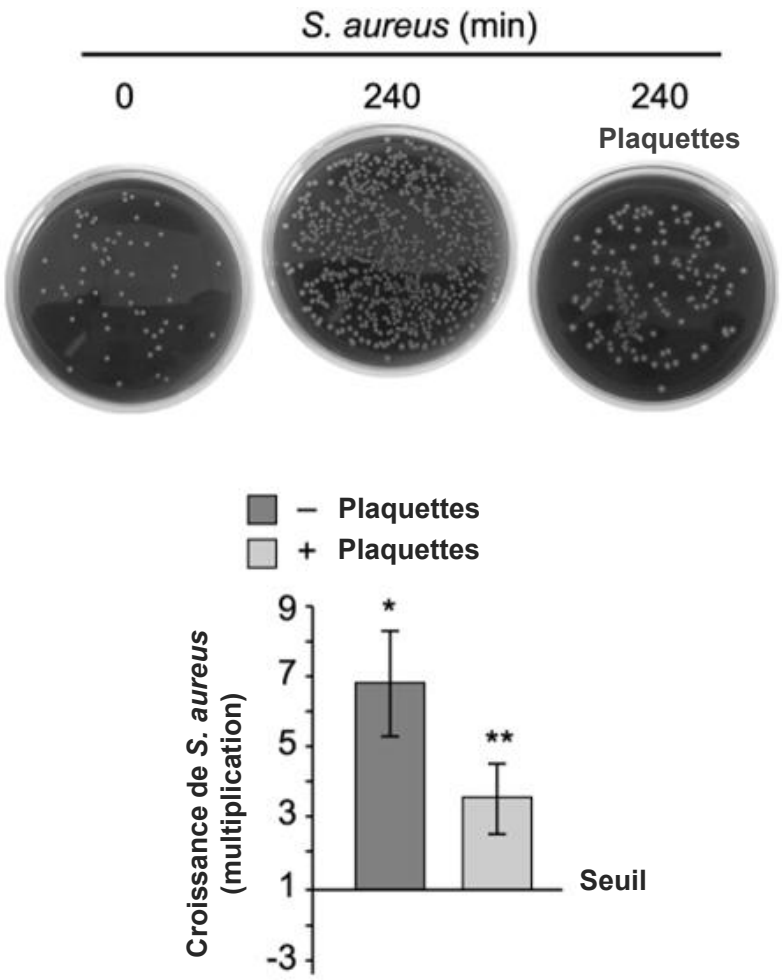


Figure 12 - Effet inhibiteur des plaquettes sur la croissance de *S. aureus*
D'après Kraemer *et al.* [125]

Un inoculum de S. aureus est cultivé pendant 240 minutes en présence ou non de plaquettes. La croissance bactérienne a ensuite été déterminée grâce à un dénombrement bactérien. ***(A)*** *Les géloses au sang sont représentatives de quatre expériences indépendantes.* ***(B)*** *Les barres d'histogramme représentent les moyennes (± SEM) du facteur d'augmentation de la croissance de S. aureus sur 240 min, par rapport à l'inoculum de départ (seuil, ligne horizontale). * augmentation significative (p<0.05) de la croissance de S. aureus par rapport au seuil de départ. ** réduction significative (p<0.05) de croissance comparativement à l'auto-génération de S.aureus.*

Il est même possible de déterminer la plus petite concentration plaquettaire permettant d'obtenir un effet bactériostatique, variable selon l'espèce bactérienne. Une étude menée en 2013 sur 17 volontaires, a permis de déterminer une concentration plaquettaire critique pour des pathogènes issus de la cavité buccale humaine : *E. faecalis* (résistant ou non à la vancomycine), *C. albicans*, *S. agalactiae*, *S. oralis* et *Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa)* [143]. Celles-là sont reportées dans le **tableau 1**. Il est à noter que la croissance de *P. aeruginosa* n'est pas inhibée par le plasma riche en plaquettes (PRP).

Tableau 1 - Concentration minimale inhibitrice (CMI) des plaquettes sur des pathogènes issus de la cavité buccale

D'après Drago *et al.* [126]

	CMI (plaquettes / µl)				
Patient n	*E. faecalis* VRE	*E. faecalis* VSE	*C. albicans*	*S. agalactiae*	*S. oralis*
1	34.475 ± 13.488	29.550 ± 11.013	88.650 ± 22.025	34.457 ± 13.504	8.618 ± 3.372
2	32.500 ± 19.902	35.750 ± 17.801	117.000 ± 29.069	39.000 ± 14.534	3.250 ± 1.112
3	5.738 ± 2.138	4.303 ± 1.069	61.200 ± 20.950	26.775 ± 10.475	3.346 ± 1.310
4	12.488 ± 3.103	16.650 ± 6.205	49.950 ± 12.410	8.305 ± 3.114	7.650 ± 2.619
5	7.613 ± 5.004	6.831 ± 5.263	112.500 ± 27.951	10.937 ± 4.279	2.734 ± 1.070
6	13.956 ± 6.949	13.956 ± 6.949	81.200 ± 27.797	8.881 ± 3.475	7.612 ± 2.837
7	6.581 ± 1.635	5.850 ± 2.006	210.600 ± 52.324	17.550 ± 6.540	26.325 ± 6.540
8	5.375 ± 3.292	5.913 ± 2.944	68.800 ± 23.552	34.400 ± 11.776	34.400 ± 11.776
9	28.425 ± 10.593	21.319 ± 5.297	75.800 ± 25.948	8.290 ± 3.243	8.290 ± 3.244
10	5.611 ± 2.195	4.809 ± 1.792	38.475 ± 14.339	12.825 ± 4.391	14.428 ± 3.585
11	24.200 ± 8.284	21.175 ± 8.284	108.900 ± 27.056	36.300 ± 13.528	33.275 ± 16.569
12	14.000 ± 4.793	13.125 ± 6.187	31.500 ± 7.826	15.750 ± 3.913	17.500 ± 10.717
13	9.075 ± 4.519	10.725 ± 5.534	39.600 ± 14.758	33.000 ± 20.208	29.700 ± 7.279
14	19.906 ± 11.682	15.641 ± 11.682	68.250 ± 25.435	15.640 ± 7.788	4.976 ± 1.947
15	24.850 ± 9.722	21.300 ± 7.938	63.900 ± 15.876	49.700 ± 19.444	6.212 ± 2.431
16	14.850 ± 10.757	11.550 ± 4.519	46.200 ± 18.075	9.900 ± 3.690	18.150 ± 9.037
17	11.375 ± 5.870	8.750 ± 5.358	86.800 ± 53.677	12.250 ± 4.793	6.125 ± 2.396
Fourchette de distribution	**5.375 – 34.475**	**4.303 – 35.750**	**31.500 – 210.600**	**8.290 – 49.700**	**2.734 – 34.400**

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne écart type
VRE : *Enterococcus* résistant à la vancomycine
VSE : *Enterococcus* sensible à la vancomycine

Cette étude est très récente ; cependant, la première démonstration du rôle antibactérien des plaquettes est très ancienne. En 1887, J. Fodor reportait déjà l'effet bactéricide de sérums chauffés comme le rappelle Michael Yeaman dans sa revue de la littérature sur le sujet [144]. La molécule thermostable mise en jeu a ensuite été identifiée et nommée lysine β. Son origine plaquettaire repose sur le fait qu'elle est libérée dans du plasma coagulé et non retrouvée dans les autres éléments sanguins.

L'équipe de Yeaman s'est particulièrement intéressée à cette fonction des plaquettes et a établi une terminologie classant ces molécules plaquettaires antimicrobiennes en tant que « Platelet Microbicidal Proteins » (PMP) [144], également retrouvées sous le terme de thrombocidines. Les PMP, au nombre de deux (PMP1 et PMP2), sont libérées sous l'induction de la thrombine ou de bactéries et diffèrent des défensines classiquement décrites par leur masse moléculaire, leur séquence et l'enchaînement de résidus lysine et arginine qui leur confère une charge cationique. Afin d'être fonctionnelles, ces molécules doivent être clivées par la thrombine et les deux sous-unités agissent d'une manière autonome mais complémentaire, en altérant la perméabilité de la paroi bactérienne [144].

Les voies de signalisation plaquettaire conduisant à la libération des PMP dépendent principalement du couple ATP/ADP et des récepteurs de type P2. *Via* la libération d'ADP, le signal est amplifié et il se produit une activation autocrine des plaquettes, pouvant même s'étendre aux plaquettes voisines [145] .

La famille des PMP a été élargie par l'intégration des kinocidines, qui regroupent les cytokines plaquettaires possédant un effet bactéricide direct [146]. Elles sont divisées en deux sous-groupes selon la nomenclature des cytokines. Les kinocidines α regroupent les cytokines de type CXC- (PF4, PBP, CTAP3 et NAP2) alors que les kinocidines β sont de type CC- (RANTES). Ces molécules présentent même un effet synergique entre elles. Par exemple, le « connective tissue activating peptide » (CTAP) 3 n'a pas d'effet sur la viabilité de d'*E. coli ;* cependant, la présence de PF4 permet de potentialiser son activité et de diminuer ainsi de 2 log la densité bactérienne alors que ce résultat n'est pas non plus obtenu pour le PF4 seul [147]. Des analyses de biochimie structurale ont permis d'identifier, chez PF4, le domaine structurel 60-74 en partie C-terminale, comme responsable de l'activité bactéricide [148].

Les kinocidines s'intègrent dans les mécanismes de l'immunité innée, dans la mesure où elles conservent leur rôle primaire qui est la chimioattraction des leucocytes, permettant une coopération entre facteurs plaquettaires et leucocytes dans la clairance bactérienne [149].

Par ailleurs, Kraemer *et al.* ont montré la présence de β défensine de type 1 humaine (hBD-1), à l'état d'ARN messager (ARNm) et de peptide, chez les mégacaryocytes et les plaquettes [142]. Ainsi, l'hBD-1 plaquettaire est libérée en réponse à l'α-toxine de *S. aureus* mais pas en réponse à la thrombine, au «Thrombin Receptor Activating Peptide » ou au PAF ce qui suggère que la libération d'hBD-1 est indépendante de la dégranulation. L'hBD-1 ne serait donc pas dans les granules α d'autant plus que les auteurs n'observent pas de colocalisation des marquages de ces granules et de l'hBD-1 [142].

Alors que Kraemer *et al.* n'ont pas pu observer l'expression d'ARNm codant les hBD-2 et 3 dans les plaquettes, d'autres travaux ont pu mettre en évidence leur présence par ELISA, Western Blot et immunohistochimie ainsi que leur activité microbicide [150, p. 3], [151].

En conséquence il apparaît que les plaquettes sont impliquées dans la réponse immunitaire anti-infectieuse, directement en libérant des facteurs anti-microbiens, et indirectement en libérant des cytokines permettant de de moduler la réponse des cellules de l'immunité. Cette deuxième fonction se fait notamment en réponse à une stimulation bactérienne *via* les récepteurs TLR.

D. Rôle fonctionnel des TLR plaquettaires

Après que les TLR plaquettaires aient été mis en évidence, plusieurs études sont venues confirmer leur expression mais aussi, et surtout, leur fonctionnalité. Les premières études montraient que l'engagement des TLR plaquettaires 2 et 4, par leurs ligands respectifs, n'entrainait pas d'agrégation, pas de surexpression du CD62P membranaire ni d'augmentation de $Ca2^{+}$ intra-plaquettaire, suggérant ainsi que ces récepteurs n'étaient pas fonctionnels chez les plaquettes[152]. Or, il s'avère que l'activation plaquettaire résultant de la stimulation d'un TLR plaquettaire, particulièrement le TLR4, est différente d'une activation de type hémostatique et induit plutôt le relargage des contenus granulaires que l'agrégation [121].

De plus, le LPS, ligand du TLR4, provoquerait une forte thrombopénie. L'équipe de Kubes a montré, dans un modèle murin, une diminution de la numération plaquettaire de 60% 4h après un traitement au LPS, contre 20% chez des souris « knock-out » (KO) pour le TLR4 [121]. Ces résultats témoignent ainsi de la fonctionnalité du TLR4 plaquettaire *in vivo*. La diminution des plaquettes circulantes après liaison du LPS peut avoir deux explications : i) une accumulation de celles-là au niveau des poumons (séquestration dépendante des neutrophiles) [153] ; et ii) une augmentation de leur phagocytose [154], [155]

1) Le TLR4 plaquettaire

Le TLR4 est le plus exprimé des TLR plaquettaires [117]. Plusieurs équipes se sont intéressées à sa fonctionnalité chez l'homme et la souris [121], [156], [157].

Le lipopolysaccharide (LPS), composant majeur de la membrane des bactéries à Gram négatif, est le ligand du TLR4. Sur les cellules eucaryotes, le TLR4 forme un complexe avec la molécule MD-2, permettant alors la fixation du LPS. D'autres protéines aident à la fixation du LPS, comme la « LPS-Binding Protein » (LBP) et le CD14 [113], [158].

Plusieurs études reportent que l'expression du TLR4 varie selon l'état d'activation de la plaquette [157], [159], [160]. Une stimulation des plaquettes par la thrombine entraine une augmentation de l'expression du TLR4, qui en synergie avec le CD62P membranaire permet une meilleure fixation du LPS [160]. Le fait que les plaquettes possèdent un pool intracellulaire de TLRs [117] peut expliquer la translocation du récepteur à la surface durant l'activation. Même si le LPS ne semble pas induire d'agrégation plaquettaire, il potentialise cependant la réponse déclenchée par de très faibles concentrations de thrombine et de collagène. Afin d'expliquer ce phénomène, les auteurs montrent que l'engagement du TLR4 potentialise l'activation de la GMPc, impliquée dans la signalisation menant à l'agrégation. Toutefois, utilisé à forte dose, LPS semble néanmoins capable d'induire une agrégation [9].

Au même titre que dans les cellules eucaryotes, la fonctionnalité du TLR4 plaquettaire est favorisée par une ou des molécules plasmatiques. L'ajout de CD14 recombinant ainsi que de LBP permet ainsi de restaurer une activation optimale des plaquettes lavées [11], [64], [160]. L'apport du CD14 par le plasma a été controversé par Zhang *et al.* qui montrent une expression membranaire de ce facteur chez des plaquettes à l'état basal [9].

Cependant ce facteur n'est pas retrouvé au stade mégacaryocytaire, il pourrait donc être capté de la circulation et adsorbé à la surface plaquettaire sous sa forme soluble ou microparticulaire. La même question se pose pour le MD-2 [161].

Plusieurs études ont investigué l'effet de l'engagement du TLR4 plaquettaire sur le relargage des molécules immunomodulatrices. Ainsi, Aslam *et al.* ont montré que l'administration de LPS O111 d'*E.coli* entrainait, chez des souris, l'augmentation du taux de « Tumor necrosis factor » (TNF)-α sérique, principalement issu des plaquettes [157].

Notre équipe, a utilisé le même LPS pour stimuler *in vitro* des plaquettes de donneurs de sang sains et constate qu'après l'engagemant du TLR4, les plaquettes ne libèrent pas leurs facteurs immunomodulateurs d'une manière binaire. En effet, l'analyse qualitative et quantitative des surnageants plaquettaires montre que l'expression de certaines molécules est augmentée (sCD40L et PF4) alors que d'autres sont inchangées (sCD62P, IL-8, EGF et TGF) voire diminuées (RANTES, angiogénine et PDGF-AB) [162]. Il existe donc chez les plaquettes, du moins suite à l'engagement du TLR4, une régulation dans la libération des cytokines.

D'autre part, il a été montré que les plaquettes sont capables de faire la distinction entre les deux types de LPS, dits lisses « smooth » ou rugueux « rough » et d'adapter leur réponse cytokinique. Ainsi, seul le LPS lisse inhibe significativement la sécrétion de PDGF-AB[163]. De plus, le LPS rugeux, contrairement au LPS lisse, potentialise la production de MPP ainsi que l'agrégation induites par TRAP (« Thrombin Receptor Activating Peptide ») [65]. La différence d'activation s'observe aussi sur la capacité des surnageants obtenus à activer des PBMC [163].

Shashkin *et al.* montrent que le LPS d'*E. coli* provoque chez la plaquette un épissage de l'ARNm codant pour l'IL1-β, et ce d'une manière plus forte qu'avec une stimulation par la thrombine [11]. Ce phénomène est moins rapide que lors de la stimulation par la thrombine mais il est plus important et surtout largement prolongé **(figure 13)**.

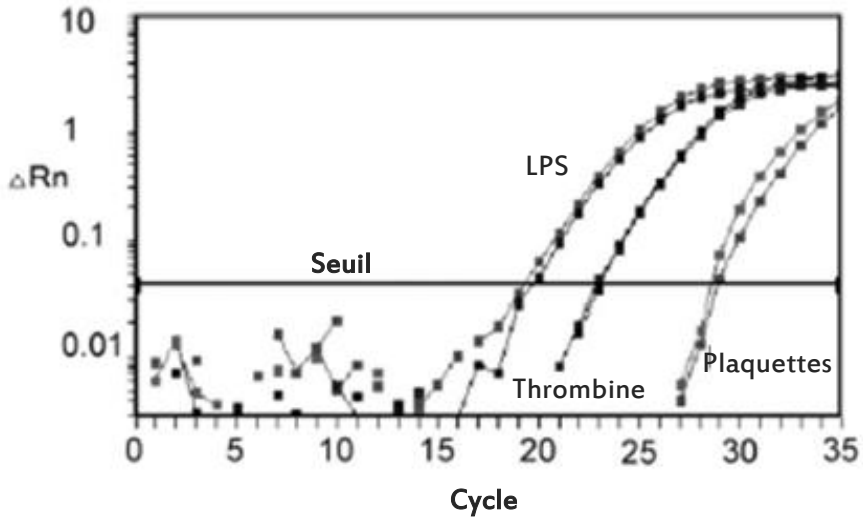


Figure 13- Effet de l'engagement du TLR4 plaquettaire sur l'épissage d'ARNm IL-1β
D'après Shaskin *et al.* [11]

Courbes de PCR en temps réel obtenues à partir d'ARNm épissés, codant pour l'IL1-β. Les amorces permettant d'obtenir les amplicons ont été « designées» dans les exons 1 et 3. Les tests sont réalisés en duplicat à partir d'ARN (8 ng d'ARN total) extraits de plaquetttes non traitées (2 courbes de droite), ou stimulées par 0,1 unités de thrombine pendant 30 min, ou par 100 ng/ml de LPS avec 150 ng/ml de CD14 recombinant et 100 ng/ml de « LPS-binding protein » pendant 3h. Δ Rn représente la magnitude du signal normalisé par rapport à l'ARN total.

Après traduction, les protéines d'IL-1β sont libérées sous forme de MPP capables d'activer des cellules endothéliales [64]. La même équipe observe des résultats similaires concernant la cyclooxygénase-2 (COX-2) [11].
De la même manière, l'engagement du TLR4 plaquettaire par le LPS augmente significativement le nombre d'ARNm épissés codant le facteur tissulaire qui sont ensuite traduits en protéines fonctionnelles [164].

Ces travaux confirment l'existence d'une machinerie transcriptionnelle/traductionnelle au sein des plaquettes et permettent de mettre l'accent sur la capacité des plaquettes à répondre finement à l'engagement du TLR4.

2) Le TLR2 plaquettaire

Le rôle fonctionnel du TLR2 plaquettaire n'a pas été appréhendé aussi largement que le TLR4. Le TLR2 est pourtant un récepteur hautement inflammatoire car il a la capacité de reconnaitre une très grande quantité de PAMPs.
Parmi ces ligands se trouvent entres autres les lipopeptides bactériens, le peptidoglycane et l'acide lipotechoïque des bactéries à Gram positif, le lipoarabinomannane des mycobactéries, le zymosan des champignons,ou encore l'hémagglutinine virale [110]. Le TLR2 forme des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6, le complexe TLR2-1 permettant de reconnaitre les lipopeptides triacétylés (bactéries à Gram négatif et mycoplasme) alors que le complexe TLR2-TLR6 permet plutôt la reconnaissance de lipopeptides diacétylés (bactéries à Gram positif, mycoplasme).
Des études structurales ont permis de comprendre le mécanisme de cette discrimination, qui se fait principalement via le canal hydrophobe présent sur le TLR1 et absent du TLR6 [110].

La première démonstration de fonctionnalité pour le TLR2 plaquettaire a été faite en 2009 par Blair P. *et al*, aussi bien *in vivo*, qu'*ex vivo* [165]. La stimulation des plaquettes par du Pam_3CSK_4, un ligand de synthèse mimant le lipopeptide bactérien, provoque une activation impliquant : un signal « inside-out » de la GPIIb-IIIa, une agrégation, une adhésion des plaquettes au collagène, la translocation du CD62P ainsi que la génération de dérivés réactifs de l'oxygène. Ces phénomènes sont enrayés par l'utilisation d'un anticorps antagoniste du TLR2 ou l'utilisation de souris KO *tlr2*$^{-/-}$, prouvant bien l'engagement du récepteur. Une autre étude est venue compléter le rôle fonctionnel du TLR2 plaquettaire et montre que le Pam_3CSK_4 contrôle aussi la libération d'ATP, de thromboxane A_2 et augmente la concentation calcique intracellulaire[166]. Ces observations permettent de classer le TLR2 plaquettaire comme un récepteur thromboinflammatoire. Même si la finalité thrombotique ressemble à celle d'une stimulation classique (ADP, fibrinogène, collagène,…) les mécanismes intracellulaires mis en jeux sont bien distincts, notamment au niveau de la phosphorylation des molécules de signalisation (voies PI3K et MAPk) et des intéractions protéines-protéines (principalement pour la protéine FXIIIa impliquée dans le remodelage plaquettaire). Comparativement à une stimulation hémostatique, il existe aussi des différences dans la libération des protéines granulaires (fibrinogène, thrombospondine, PF4) qui peuvent être libérées ou séquestrées lors d'une stimulation du TLR2 [167].

Chez les macrophages, le TLR2 peut interagir avec d'autres composants de la membrane plasmique comme la GPIV (CD36), dont l'absence, chez des souris KO, diminue la détection de certains agonistes du complexe TLR2-TLR6 [168] . Ce mécanisme pourrait très bien être présent chez les plaquettes qui expriment également la GPIV, mais à ce jour aucune donnée bibliographique ne permet de le confirmer.

Il a été rapporté que l'engagement du TLR2 plaquettaire stimule aussi l'épissage des ARNm codant l'IL-1β [11]. Ce lipopeptide de synthèse était cependant moins efficace que le LPS, mais autant que la thrombine. L'épissage des ARNm codant l'IL-1β pourrait donc être régulé différemment selon le TLR mis en jeu.

Outre la fonction thrombotique du TLR2 plaquettaire, ce récepteur peut aussi induire une réponse inflammatoire de la part des plaquettes. La stimulation des plaquettes par des bactéries, en l'occurrence des périodontopathogènes (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *P. gingivalis*) a permis de montrer une libération de sCD40L d'une manière dépendante du TLR2. De plus, les patients présentant une périodontie (26 inclusions contre 19 contrôles) présentent un taux de sCD40L circulant significativement plus élevé que chez les sujets contrôles sains [140].

Par ailleurs, il a été observé que des souris infectées par *P. gingivalis* présentaient une proportion de complexes plaquettes-neutrophiles supérieure à celle observé chez des souris non infectées ou souris $TLR2^{(-/-)}$, suggérant l'implication du TLR2 plaquettaire dans la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles [165].

Assinger *et al*. confirment ces observations, et montrent que cet accroissement de complexes plaquettes-neutrophiles s'accompagne d'une élévation de la phagocytose des périodontopathogènes par les neutrophiles, necessitant que le TLR2 plaquettaire soit fonctionnel [169]. Le TLR2 plaquettaire serait nécessaire à l'activation de ces dernières qui transmettraient alors un signal activant les neutrophiles, les rendant aptes à la phagocytose.
Le signal en question pourrait impliquer des couples ligands/récepteur (CD62P/PSGL-1, CD40L/CD40, GPIIb-IIIa/CD11b) ou des cytokines plaquettaires.

De manière similaire, il a récemment été observé que les plaquettes favorisent la clairance de *S. aureus* et *Bacillus cereus* par les cellules de Kupffer.

Ces germes pris en charge par ces macrophages du foie seraient rapidement enveloppés d'un agrégat plaquettaire favorisant leur destruction. La formation de ces agrégats mettrait en jeu la GPIb plaquettaire et le vWF de cellules de Kupffer [170].

La libération d'histone provenant de cellules en apoptose est associée à une thrombose de la microvasculature. Dans un PRP citraté, il s'avère que la présence d'histones stimule la génération de thrombine, d'une manière dépendante de la dose, avec un effet notable dès 10 µg/ml [171]. L'utilisation préalable d'un anticorps monoclonal anti-TLR2 avant la stimulation par des histones (40 µg/ml) réduit le profil pro-coagulant des plaquettes qui s'observe par la diminution de l'expression membranaire des phosphatidylsérines (PS), du CD62P et du facteur V de la coagulation. Dans les mêmes conditions, le blocage du TLR2 entraine une diminution du relargage de la thrombine d'environ 50% et augmente de 40 min de temps de relargage pour les 50% restants.
Le TLR2 plaquettaire est donc impliqué dans la génération de trombine induite par les histones. Ces résultats confortent la place du TLR2 plaquettaire dans la réponse thrombo-inflammatoire. Dans le sens inverse, il est possible de considérer cette réponse comme bénéfique pour l'hôte où l'agent ayant induit l'apoptose cellulaire se retrouverait piégé dans le réseau de fibrine.

3) Le TLR9 plaquettaire

Les études portant sur la fonctionnalité des TLR plaquettaires abordent très peu le TLR9. Chez les cellules eucaryotes, le TLR9 reconnait les motifs ADN 2'-deoxyribo-Cytidine-Phosphate-Guanosine) non méthylés, couramment nommés motifs CpG, spécifiquement retrouvés chez les bactéries, les parasites et les virus. La localisation du TLR9 est limitée aux endosomes dans les cellules eucaryotes, lui permettant de reconnaitre des constituants internes aux pathogènes, souvent libérés après leur endocytose [172].

Le TLR9 plaquettaire est retrouvé aussi bien au niveau cytosolique que membranaire [117]. Les plaquettes activées surexpriment ce récepteur, que ce soit après stimulation par un motif CpG [120], ou par la thrombine [157].

Une étude récente portant sur des plaquettes humaines et murines a montré que le TLR9 intra-plaquettaire est distribué au niveau d'un sous compartiment spécifique nommé granule T, non identifié auparavant, et présentant un aspect dense au microscope électronique [120]. Cette distribution particulière des molécules TLR9 se ferait durant la formation des pro-plaquettes. Les granules T contiennent également les protéines VAMP7 et VAMP8, impliquées dans l'adressage du TLR9 à la membrane. Les CpG internalisés sont, quant à eux, localisés dans des endosomes différents des granules T. Le processus d'internalisation du complexe CpG/TLR9 par les plaquettes semble être comparable à celui décrit chez d'autres types cellulaires [120].

Le TLR9 plaquettaire a récemment été rapporté pour fixer le carboxyalkylpyrrole, produit issu de la combinaison des produits d'oxydation d'acides gras polyinsaturés et de protéines, considéré comme un signal de danger en cas de stress oxydatif [173]. Dans la plaquette, cette liaison déclenche une agrégation et une dégranulation. Par conséquent, en plus d'être des sentinelles pour la réponse immunitaire, les plaquettes seraient des senseurs de signaux de danger internes, notamment par le TLR9.

4) Signalisation TLR dans les plaquettes

Comme pour les autres récepteurs tyrosine kinase, le mécanisme de tranduction du signal par les TLR commence par la dimérisation ou l'oligomérisation induite par la fixation du ligand. Cette dimérisation provoque des changements conformationels de l'éctodomaine et permet une interaction protéine-protéine stable. Il s'ensuit un nouvel arrangement des domaines TIR formant alors une structure qui peut fixer les différentes protéines adaptatrices. L'environnement électrostatique est très important et c'est souvent une opposition de charge qui attire la protéine adaptatrice. La nature du couple ligand/récepteur est donc très importante dans cette configuration. Quatre protéines adaptatrices ont été décrites pour interagir avec les domaines TIR dimérisés : Myd88, TIRAP, TRAM et TRIF [174].

Au niveau des cellules eucaryotes, le TLR2 utilise le MyD88 pour démarrer sa cascade de signalisation. Le TLR4, lui, est capable de transduire le signal aussi bien avec le couple MyD88/TIRAP que le couple TRIF/TRAM ; on parle alors de voie MyD88-dépendante ou TRIF-dépendante. **(figure 14)**.

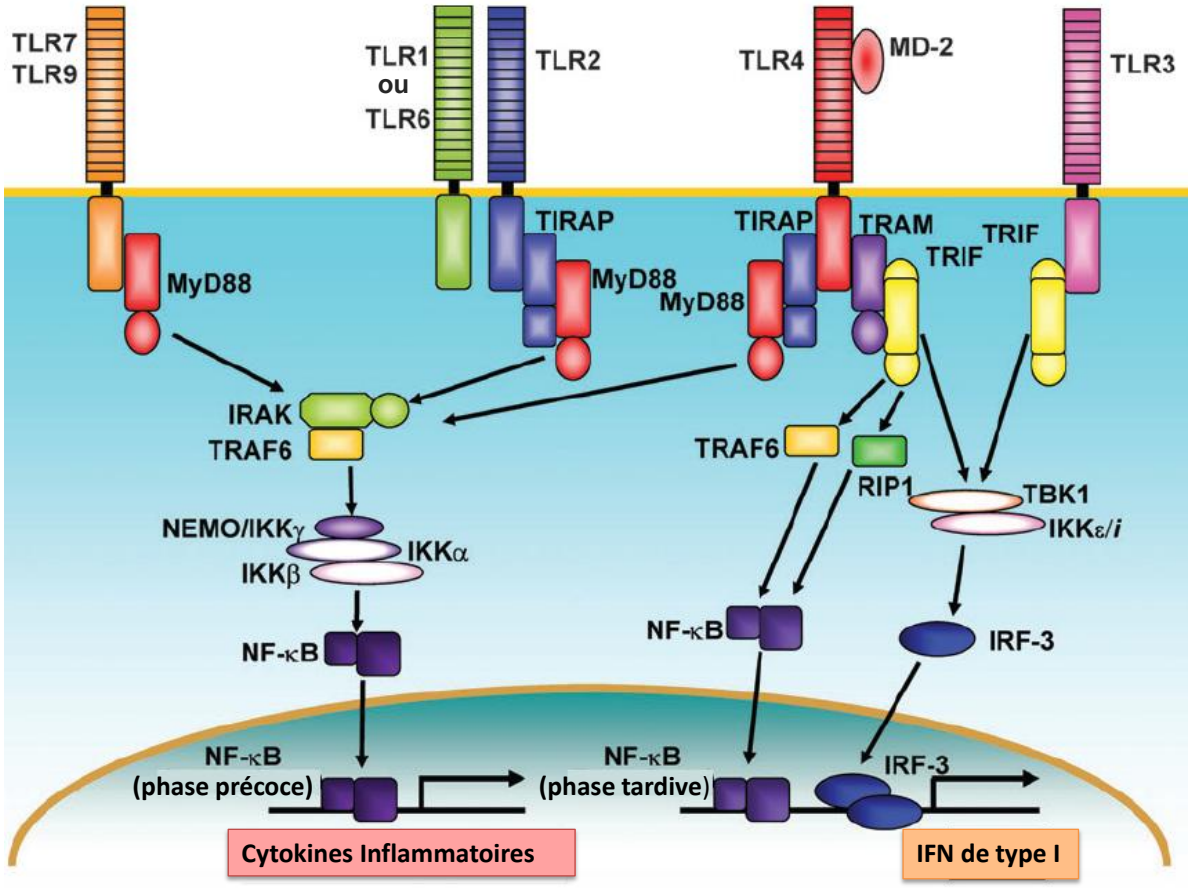


Figure 14 – Signalisation associée aux TLR dans les cellules eucaryotes
D'après Takeishi *et al.*[160]

La voie de signalisation dépendante du MyD88 fait intervenir les protéines IRAK qui pourront ensuite activer TRAF6. TRAF6 mène principalement à l'activation du complexe NFκB et à la synthèse de cytokines inflammatoires. D'un manière alternative, TRAF6 peut aussi activer IFR5 et la voie des MAP kinases (voies non représentées sur le schéma). La voie dépendente du TRIF active directement TRAF6 (indépendament d'IRAK) et rejoint la voie NFκB. La voie TRIF peut aussi activer le NFκB par le complexe RIP-1. D'autre part, TRIF cible égalment l'activation du facteur de transcription IRF3 pour la synthèse d'interféron de type I.

L'engagement du MyD88 permet à son tour de recruter IRAK4 dont l'activation déclenche, via TRAF6, plusieurs cascades de phosphorylation. Ces voies de signalisation conduisent à l'activation de trois facteurs de transcription : IRF5, NFκB et JNK (voie des MAP kinases) [110], [174]. Une fois transloquées dans le noyau, ces protéines vont être initiatrices de la synthèse de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires **(figure 14)**.

La voie TRIF-dépendante a été découverte plus tardivement. TRIF a la capacité de recruter directement TRAF6 et ainsi d'activer TAK1, de manière similaire à ce qu'il se passe pour la voie MyD88-dépendante, mais d'une manière tardive.

TRIF est aussi capable d'activer RIP1 qui va venir amplifier l'activité de TAK1. En parallèle, TRIF peut également recruter TRAF3. Son activation conduit à la dimérisation d'IFR3 ce qui lui donne sa forme activée [110].

Plusieurs équipes ont montré la présence et la fonctionnalité des TLR 2 et 4 chez les plaquettes. Cependant, la signalisation intracellulaire qui permet de transduire le signal, n'est pas complètement élucidée. Elle est d'autant plus intéressante du fait que les plaquettes sont des cellules anucléées et que la signalisation TLR conduit à l'activation de facteurs de transcription dont il serait intéressant de connaître l'utilité et la fonction au niveau des plaquettes.

Certaines équipes de recherche sont parties sur le fait que l'engagement des TLR plaquettaires permet de potentialiser les voies de signalisation classiquement décrites dans les plaquettes. C'est notamment l'exemple de l'augmentation du GMPc, d'une manière dépendante de la dose de LPS [175]. Le cGMP plaquettaire mis en jeu dans l'activation du TLR4 est bien celui lié à la signalisation PKG, car l'inhibition de cette molécule bloque la réponse plaquettaire dépendante du TLR4 [161].

L'expression du MyD88 a aussi été montrée pour les plaquettes. La mise en évidence de cette molécule en Western-Blot permet d'obtenir un signal comparable à celui obtenu avec des globules blancs [161]. De plus, l'utilisation de souris déficientes pour le MyD88 ne permet pas d'observer les phénomènes d'agrégation ni de relargague de facteurs immunomodulateurs induits par le LPS comme pour les souris sauvages [161]. Comme pour les autres types cellulaires, le MyD88 est nécessaire à la transmission du signal émis par le TLR4 plaquettaire. Son activation permet soit de faire le lien avec d'autres voies de signalisation, soit d'initier la propre voie TLR qui pourrait être présente chez les plaquettes. Cette suggestion repose sur le fait que notre équipe a montré qu'au-delà de MyD88, les plaquettes expriment la majorité des molécules classiquement impliquées dans la transduction du signal telles que TRIF, MyD88, TBK-1, IRAK-1,JNKs, MAPk, TRAF3, TRAF6, IRF-3, IKK-i, IκB-α et NF-κB p65 [176]. Pour une même quantité d'extraits protéiques, l'expression de certaines molécules est même parfois plus forte dans les plaquettes que dans les PBMC **(Figure 15)**.

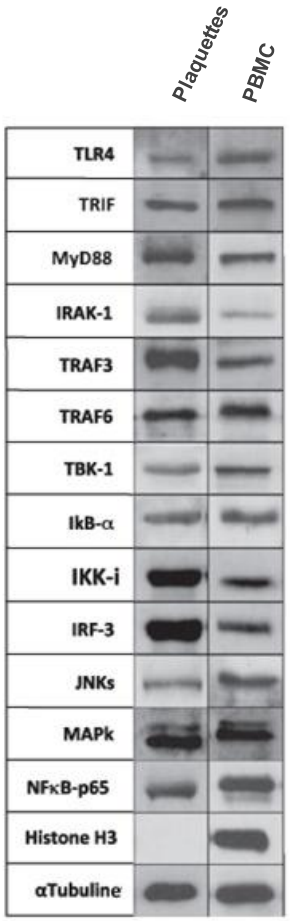


Figure 15 - Expression des molécules de signalisation de la voie TLR4 dans les plaquettes
D'après Berthet *et al.*[162]

Analyse en Western Blot des molécules de transduction du signal, à partir de 1 µg d'extraits protéiques plaquettaires. Les PBMC, cellules pour lesquelles les voies de signalisation du TLR4 sont classiquement décrites, servent de témoins positifs. L'α-tubuline est utilisée en tant que témoin de charge. L'histone H3, protéine nucléaire représente un témoin négatif des plaquettes, permettant d'exclure une contamination des extraits par des protéines issues des leucocytes. L'immunomarquage observé sur cette figure est représentatif de 15 expériences indépendantes

Comme la plupart des constituants cellulaires, la présence de ces molécules n'est pas anodine et cette signalisation pourrait être mise en jeu chez les plaquettes. Ceci expliquerait pourquoi Berthet montre une différence dans l'activation des plaquettes en fonction de l'utilisation d'un LPS de type lisse ou rugueux. La littérature montre déjà dans les leucocytes que le LPS lisse engage seulement la voie MyD88 alors que le LPS rugueux, de par sa forte affinité, est capable d'activer les deux voies. Si ce mécanisme de distinction est présent au niveau des plaquettes, l'activation de chacune des voies serait associée à une libération cytokinique différentielle.

La protéine TRAF6 a un rôle clé dans la signalisation *via* le TLR4 des plaquettes, menant à la synthèse *de novo* d'IL1-β. En effet, une stimulation directe de TRAF-6 permet d'obtenir un épissage cinq fois supérieur à celui obtenu dans des plaquettes stimulées par du LPS. L'activation de TRAF-6 est suivie par la phosphorylation d'Akt et JNK [64].
Ces phosphorylations sont suffisantes pour initier l'épissage des ARNm codant l'IL-1β. Il se produit donc une dérivation de la voie TLR4 au niveau de TRAF6, permettant au signal de passer par la voie Akt et celle des MAP kinases.

Le TLR2 plaquettaire a, lui aussi, la capacité de déclencher l'activation de protéines de signalisation normalement impliquées en aval de récepteurs hémostatiques. Lorsqu'elle a montré la fonctionnalité du TLR2 plaquettaire, l'équipe de Blair s'est intéressée à la voie PI3K/Akt dans la mesure où : i) cette voie (déjà décrite dans les plaquettes, en aval de la GPIIb-IIIa) joue un rôle dans l'agrégation, l'adhésion et la sécrétion plaquettaire [177] ; ii) dans les cellules immunitaires, le TLR2 est capable d'interagir avec la sous-unité p85 de PI3K [178] suggérant l'implication de cette voie après engagement du TLR2, indépendamment de la voie MyD88.

L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de PI3K (LY294002) préalable à une stimulation par Pam3CSK4 diminue significativement les effets engendrés par l'engagement du TLR2 plaquettaire : l'agrégation, l'adhésion, l'expression membranaire du CD62P, la formation de complexes plaquettes-neutrophiles, l'activation de la GPIIb-IIIa ainsi que la production de radicaux oxygénés [165]. Concernant la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles, l'utilisation du LY294002 diminue significativement ce phénomène mais ne l'inhibe pas complètement. Le TLR2 plaquettaire pourrait donc utiliser une autre voie conduisant à ce phénomène. La même étude montre également une phosphorylation d'Akt (Ser473), en aval de PI3K. Cependant les auteurs ne se sont pas intéressés à la libération de cytokines.

D'autres travaux montrent que lors de la stimulation de plaquettes par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans Y4* et *P. gingivalis,* le relargage de sCD40L résultant de l'engagement du TLR2 est bien régulé par le PI3K [140]. La voie PI3K n'est pas la seule à intervenir dans la libération de facteurs solubles induite par l'engagement du TLR2. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la PLC, l'U73122, empêche l'adressage du CD40L à la surface plaquettaire de la même manière que ce qui est observé lors du blocage de la voie PI3K [140].

La PLC est classiquement décrite dans la plaquette pour intervenir en aval des récepteurs PAR et GPVI conduisant à la dégranulation et à génération de thromboxane A_2.

Les voies PLC et P3IK ne sont donc pas seulement activées par une stimulation hémostatique mais également suite à l'engagement du TLR2. Cependant, leurs cinétiques de phosphorylation diffèrent selon la stimulation [167]. Ainsi, la stimulation par la thrombine induit une phosphorylation rapide et importante d'Akt, p38 et Erk. *A contrario*, la stimulation par Pam_3CSK_4 induit une phosphorylation plus progressive d'Akt et p38, suggérant que les mécanismes sont plus longs à mettre en place et que la réponse plaquettaire inflammatoire s'opère plus dans la durée que dans l'urgence.

Les études citées ci-dessus ont toutes été effectuées avec une stimulation du TLR2 par du Pam_3CSK_4, ligand triacétylé provoquant la dimérisation du TLR2 avec le TLR1. L'utilisation de MALP-2, ligand diacétylé mettant en jeu l'hétérodimère TLR 2 - 6 ne permet pas d'activer les plaquettes [166]. De plus, une pré-incubation des plaquettes avec MALP-2 réduit voire inhibe l'effet de Pam_3CSK_4. L'engagement des TLRs 2 et 6 aurait donc plus un effet antagoniste sur l'activation plaquettaire et pourrait servir de régulateur dans l'activation plaquettaire lors d'une invasion bactérienne rien qu'en bloquant l'accès au TLR2.

5) Le NFκB plaquettaire

Les diverses équipes, dont la nôtre, qui s'intéressent à la signalisation TLR dans les plaquettes ont déjà observé la présence du NFκB au sein des plaquettes (et des mégacaryocytes) [176], [179]. De part l'absence de noyau dans ces cellules, il semblait difficile de lui définir un rôle.

Néanmoins, certains facteurs nucléaires ont déjà été décrits pour avoir une fonction « non génomique » dans les plaquettes. Le meilleur exemple est l'œstrogène, connu pour réguler des voies de signalisation spécifiques (notamment Hedgehog, un facteur important pour la prolifération cellulaire) grâce à son récepteur α qui, dans les plaquettes, agit sur la fonction de la GPIV [180].

En montrant également un rôle fonctionnel non canonique du NFκB plaquettaire, l'équipe de Schattner suggère alors une autre tentative de réponse quant à la finalité de la voie TLR4 [181].

La famille du facteur de transcription NFκB comprend 5 membres : p50, p52, p65, RelB et c-Rel. Les complexes NF*κ*B sont principalement séquestrés dans le cytoplasme, dans un état inactif ; ils sont fixés aux protéines inhibitrices, les IκB. De par cette liaison, les IκB masquent la séquence de localisation nucléaire du NFκB. Après phosphorylation d'IκB (par le complexe IKK), le NFκB est libéré et transloqué dans le noyau pour activer la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité **(Figure 16)**. L'activation de NFκB en tant que facteur de transcription se fait par modification post-traductionnelle, notamment par phosphorylation et acétylation [182].

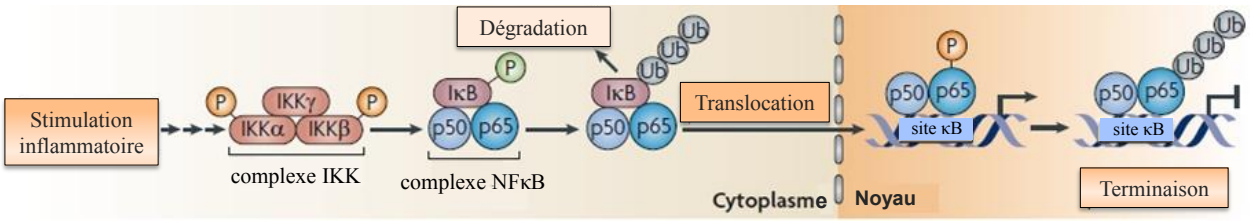


Figure 16 - Cascade d'activation du complexe NFκB

D'après Ghosh *et al.* [182]

Dans le modèle le plus simple d'activation de la voie NFκB, la transduction du signal depuis le stimulus inflammatoire entraine l'activation du complexe IKK. Il en résulte la libération de l'IκB kinase. Cette dernière peut alors venir phosphoryler IκB, la sous-unité inhibitrice du NFκB et provoque la dissociation du complexe. IκB est ubiquitinilé puis dégradé. Les sous-unités p50 et p65 du complexe NFκB sont alors libérées et transloquées dans le noyau. Elles vont alors reconnnaitre des séquences spécifiques, initiatrice de la transcritpion de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. Après la synthèse d'ARN, le signal de terminaison engendre la dégradation du NFκB.
Il existe des mécanismes de rétrocontrôle négatif, non représentés sur ce schméa, permettant de réguler ce processus.Le groupement phosphate vert représente une phosphorylation entrainant une régulation négative.Le groupement phosphate jaune représente une phosphorylation entrainant en une activation.Ub = ubiquitine

Spinelli *et al.* ont décrit un rôle non génomique atypique pour le NFκB plaquettaire, central dans l'activation hémostatique des plaquettes. L'utilisation de BAY 11-7082, un inhibiteur de la phosphorylation d'IκB (complexe également présent dans les plaquettes) limite l'activation plaquettaire induite par la thrombine, ce qui se traduit par une diminution de la formation de lamellipodes, de la stabilité du thrombus et de la rétraction du clou plaquettaire.

D'un point de vue microscopique, ceci s'observe par un retour des plaquettes à une forme discoïde alors qu'elles avaient déjà adhéré à une surface de fibrinogène [179] .

En plus d'une implication dans la réponse à la thrombine, le NFκB serait aussi mis en jeu lors de l'activation par l'ADP, l'épinéphrine et le collagène, mais pas par l'acide arachidonique, pourtant activateur plaquettaire [181], démontrant alors une certaine spécificité de sa fonction. Le NFκB serait donc impliqué dans la régulation des évènements précoces de l'activation plaquettaire. Les auteurs proposent comme fonction alternative, sa participatation dans les réarrangements du cytosquelette menant au remodelage de la plaquette, avec notament l'adressage de la sous-unité fonctionnelle directement au niveau des membranes en dynamique[179].

L'implication du NFκB plaquettaire s'observe encore dans la contraction du clou plaquettaire car ce processus passe par Bcl-3 qui est un membre de la famille I-κB-α , produit par les plaquettes en condition inflammatoire [183]. En se liant à la « Fyn-related tyrosine kinase », Bcl-3 induit une contraction complète du clou de fibrine, nécessaire à la stabilité du thrombus [184].

Des études contradictoires suggèrent que le NFκB exerce une rétrocontrôle négatif permettant de limiter l'activation plaquettaire [185]. Le complexe I-κB/NFκB plaquettaire est capable de se fixer à la PKA via son unité catabolique, inhibant son activité. Lors d'une activation des plaquettes par de la thrombine ou du collagène, I-κB est phosphorylé, ce qui libère la PKA, laquelle peut exercer son rôle de kinase sur VASP(« vasodilatator-stimulated phosphoprotein »). Une fois phosphorylé, VASP diminue les réarrangements du cytosquelette, ce qui se traduit par une diminution de l'agrégation. Ce mécanisme montre que le complexe NFκB peut être impliqué dans le signal de limitation de l'activation plaquettaire induite par la phosphorylation de VASP [186].

Le NFκB peut aussi être impliqué dans le rétrocontrôle négatif de l'activation plaquettaire de par sa liaison à PPARγ et à RXR. Ces deux facteurs de transcription ont un rôle non génomique bien établi dans la plaquette. En effet, PPARγ est décrit pour inhiber l'activation de la GPVI alors que RXR altère la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G [185].

Il existe donc une dualité du NFκB dans l'activation plaquettaire, à la fois mis en jeu au cours de la formation du thrombus et régulateur négatif de l'activation. L'activateur mis en jeu et sa concentration peut orienter l'engagement du NFκB.

La cinétique de temps et la sous-unité du NFκB impliquée sont également à prendre en compte et peuvent ainsi expliquer les divergences de la littérature. NFκB constituerait ainsi un facteur subtil impliqué dans la balance entre sur-activation plaquettaire et activation plaquettaire « juste » nécessaire pour réparer le préjudice vasculaire.

E. Plaquettes – bactéries : Focus sur l'infection à *Staphylococcus aureus*

Beaucoup d'études portent sur l'interaction des plaquettes avec *Streptococcus*, notamment les streprocoques oraux alors que comparativement peu concernent *S. aureus*. En 2005 une étude prospective a été menée dans 39 centres médicaux répartis sur 16 pays, incluant 1779 patients atteints d'IE. Il s'est avéré qu'en définitive *S. aureus* était le pathogène le plus fréquemment mis en cause avec 31,6 % des cas contre 18% pour *Streptococcus viridans* [187]. D'une manière générale, les infections invasives à *S. aureus* résistant à la méthycilline ont tendance se propager dans les centres de soins et sont responsables de taux de mortalité élevés[188]. Il est donc intéressant d'évoquer le rôle de *S. aureus* sur les plaquettes.

L'essentiel des études porte sur les molécules mises en jeu de part et d'autre lors de l'adhésion de *S. aureus* aux plaquettes **(figure 17)**. Nous nous intéresserons dans un premier temps aux interactions entre les molecules présentes dans la membrane de *S. aureus* et les plaquettes.

La protéine A, protéine de surface de *S. aureus*, est une protéine pouvant être reconnue par des anticorps anti-*S. aureus*. Les complexes immuns formés peuvent se fixer au FCγRII des plaquettes entrainant la libération de sérotonine et une agrégation plaquettaire. Cette réaction est dépendante du temps de stimulation et de la quantité des complexes immuns formés. L'activation s'avère optimale à 5 min, à partir de deux bactéries par plaquettes[130]. Dans une étude plus récente, il s'est avéré que la protéine A était, à elle seule, incapable d'induire l'agrégation mais qu'elle pouvait la maintenir [189] .

La protéine A de *S. aureus* peut aussi fixer le vWF, qui se lie la GPIbα. L'utilisation d'un anticorps bloquant le vWF inhibe partiellement l'activation plaquettaire par *S. aureus* [134], prouvant l'implication de plusieurs voies d'adhésion.

Le ClfA de *S. aureus* est aussi mis en en jeu lors de sa fixation aux plaquettes, *via* le fibrinogène[190]. Cependant, il existe un récepteur alternatif car *S. aureus* adhère aux plaquettes par l'intermédiaire du fibrinogène/fibronectine, ce qui n'implique pas forcément GPIIb-IIIa[191]. Ceci a pu être montré par une persistance d'agrégation même si les deux sites de liaison au fibrinogène présent sur la GPIIb-IIIa sont préalablement bloqués. Il n'est pas impossible que la bactérie transforme le fibrinogène afin qu'il puisse être reconnu par un autre récepteur. Ca serait ainsi une manière pour les bactéries d'accroitre leur pathogénécité.

Le FCγRIIA et la GPIIb-IIIa ont tous deux un rôle fonctionnel dans l'adhésion de *S. aureus*. L'interconnexion entre ces deux récepteurs précédemment décrite dans le manuscrit (Chapitre 1 – II B1) explique pourquoi l'agrégation induite par *S. aureus* est dépendante du FcγRIIA. Cette hypothèse correspond aussi au fait que l'engagement du FcγRII seul ne soit pas suffisant pour induire l'agrégation, car son engagement en fait là pour optimiser la fonctionalité de la GPIIb-IIIa [134].

L'obtention de mutants génétiques de *S. aureus* et l'expression de protéines candidates chez *L. lactis* (bactérie non agrégative), ont montré que le ClfB et la protéine SdrE sont également impliquées dans l'agrégation plaquettaire. Les résultats confirment également l'implication du ClfA qui d'ailleurs est le premier facteur, avant le ClfB, entrainant l'agrégation car c'est la protéine induisant le lag time le plus court. L'agrégation induite par ces deux facteurs peut être inhibée par des antagonistes de la GPIIb-IIIa, de l'aspirine ou de la prostaglandine E_1 [130]. D'autre part, l'agrégation est également observée avec des plaquettes filtrées, suggérant une liaison directe entre *S. aureus* et les plaquettes, indépendamment du fibrinogène. Les résultats observés pour la protéine SdrE sont différents. Afin de se fixer à la plaquette, la protéine bactérienne nécessite la présence d'une protéine plasmatique, autre que le fibrinogène, qui reste à identifier.

Un élément important à prendre en compte est que *S. aureus* n'exprime pas les mêmes facteurs en fonction de son stade croissance, ce qui peut représenter un biais dans les manipulations *in vitro*. Le ClfA est la protéine pro-agrégante dominante en phase stationnaire de croissance alors pour la phase exponentielle, la FnBP est majoritairement exprimée [134].

Au vu de ces indications, il devient par exemple difficile d'évaluer les résultats de Fitzgerald qui confirment sa modélisation de l'intéraction entre la FnBP et les plaquettes sur des bactéries en phase stationnaire [192].

Le système du complément est important dans l'agrégation plaquettaire induite par *S. aureus*. Il est capable de se substituer au ClfA. Dans ce cas là, le lag time sera plus long (entre 8 et 20 minutes) mais l'engagement simultané du récepteur Fcγ reste nécessaire [96].

La protéine staphylococcique IsdB, quant à elle, pourrait favoriser, l'adhésion et l'internalisation des bactéries au sein des plaquettes, en présence de fibronectine [193]. De plus, cette protéine, contrairement aux protéines « Iron-regulated surface determinant A" (IsdA) et IsdH, induirait l'agrégation des plaquettes [193].

Les travaux portant sur l'interaction entre les plaquettes et *S. aureus* ont démarré dans les années 1970 et se poursuivent encore aujourd'hui. La protéine d'adhérence EAP, sous forme d'oligomère, peut se lier directement aux glycosaminoglycanes des plaquettes [194] ; cela va provoquer la stimulation d'une thio-isomérase dans la plaquette, se traduisant par une activation plaquettaire allant de la stabilisation de la liaison du fibrinogène à l'expression membranaire de molécules d'activation plaquettaire telles que le CD62P, le CD63 et le CD40L.

En plus devoir intégrer le rôle alternatif des récepteurs de l'hémostase face à *S. aureus*, il y a aussi les récepteurs plaquettaires nouvellement décrits qui viennent augmenter l'éventail des fonctions. C'est notamment le cas du TLR2 qui, en répondant au peptiglycane de *S.aureus,* provoque dès 30 min une activation plaquettaire associée à un processus d'apoptose caractérisé par une dépolarisation de la membrane mitochondriale, l'exposition de phosphatidylsérines à la membrane plasmique et l'activation de la caspase 3. Les mécansimes de cette nouvelle réponse plaquettaire à une stimulation bactérienne sont détaillés dans la partie traitant de l'apoptose plaquettaire (Chapitre 1 – III C).

Outre les composants de la membrane et de la paroi bactérienne, les toxines de *S. aureus* peuvent également moduler la réponse plaquettaire **(figure 17)**.

Il a été montré, *in vitro*, que l'α-toxine peut interagir avec la membrane plaquettaire et induire la production de protéines microbicides et la lyse des bactéries [144]. De plus, cette toxine serait capable de générer l'agrégation des plaquettes, de façon dépendante de la dose

[183]. Elle peut également entrainer chez la plaquette, la synthèse *de novo* de BCl_3 [183], une protéine impliquée dans la rétraction du clou plaquettaire. Cette exotoxine est également à l'origine de la formation de nombreux complexes plaquettes-neutrophiles, *via* le CD62P, marqueur d'activation exprimé à la surface des plaquettes. La formation des complexes augmente l'activation des neutrophiles, mesurable par l'augmentation du CD11b. Ainsi, ces agrégats pourraient participer à la destruction des capillaires alvéolaires à l'origine des pneumonies hémorrhagiques à *S. aureus* [195].

S. aureus libère la staphylocoagulase et la « vWF binding protein ». Ces deux molécules se lient à la prothrombine et forme le complexe enzymatique dit staphylothrombine [196]. La staphylothrombine n'a pas d'action directe sur l'activation plaquettaire mais en transformant le fibrinogène en fibrine, elle va jouer un rôle dans la stabilisation de l'agrégation ainsi que dans l'initiation de l'activation secondaire.

On note toutefois que plusieurs molécules de *S. aureus* semblent *a contrario* inhiber la fonction hémostatique des plaquettes.

Dans ce contexte, il a été observé que l'entérotoxine B (SEB) provoque au niveau des plaquettes une suractivation de la PKC. Cette enzyme essentielle à la réponse plaquettaire ne se retrouve donc plus dans des conditions physiologiques et de fait ne peut assurer sa fonction. C'est pour cela que des plaquettes incubées avec SEB sont incapables d'assurer une agrégation correcte en réponse à de la thrombine [197].

L'acide lipothecoïque utilise le récepteur au PAF pour augmenter le niveau d'AMPc au sein des plaquettes. Ce dernier va alors augmenter son activité de phosphorylation sur VASP et inhiber l'agrégation et la formation de thrombus [198].

Le rôle anti-thrombotique de *S. aureus* peut également être attribué à l' « extracellular fribrinogen binding protein » (Efb). *In vitro,* cette protéine est décrite pour venir adhérer aux plaquettes (sur un recepteur non caractérisé ou sur le fibrinogène). Une fois adhérée, elle va à son tour recruter du fibrinogène mais une forme non conventionelle qui a plutôt tendance à inhiber l'activation plaquettaire. L'action inhibitrice de cette molécule a pu être confirmée in *vivo*, où elle est capable de prévenir une thrombose suite à un traitement par des agonistes plaquettaires [199].

Enfin, la staphylokinase exerce aussi une activité inhibitrice sur les plaquettes mais d'une manière différente, indirecte. Cette enzyme dégrade la plasmine et le fibrinogène, et de ce fait empêche l'agrégation [200].

Plusieurs groupes s'intéressent aussi à l'interaction de *S. aureus* et des plaquettes dans des conditions proches de celles observées *in vivo*, notamment pour conserver les forces de cisaillement. Des souris infectées par *S. aureus* développent des thrombi par un mécanisme dépendant du ClfA [201]. L'utilisation d'une molécule occupant le site de liaison du ClfA sur le fibrinogène prévient complètement l'agrégation, montrant la prédominance du ClfA malgré la multitude d'autres facteurs présents dans le microenvironnement.

Des chiens infectés par *S. aureus* vont rapidement développer un sepsis, accompagné d'un dysfonctionnement plaquettaire (réduction de la capacité d'étalement en réponse à un agoniste du PAR-4). Ce dernier résultat suggère, qu'au-delà de leur rôle dans les IE à *S. aureus*, les plaquettes participent à la physiopathologie du sepsis à *S. aureus* [202].

De plus, on observe bien une dualité dans l'effet de la bactérie *S.aureus* sur les plaquettes, témoignant de la complexité de l'interaction. L'ensemble des études se base sur la capacité pro-agrégante ou non de la bactérie ; cependant, aucune donnée ne porte sur la libération des cytokines plaquettaires, composante pourtant très importante dans le cadre d'une infection bactérienne.

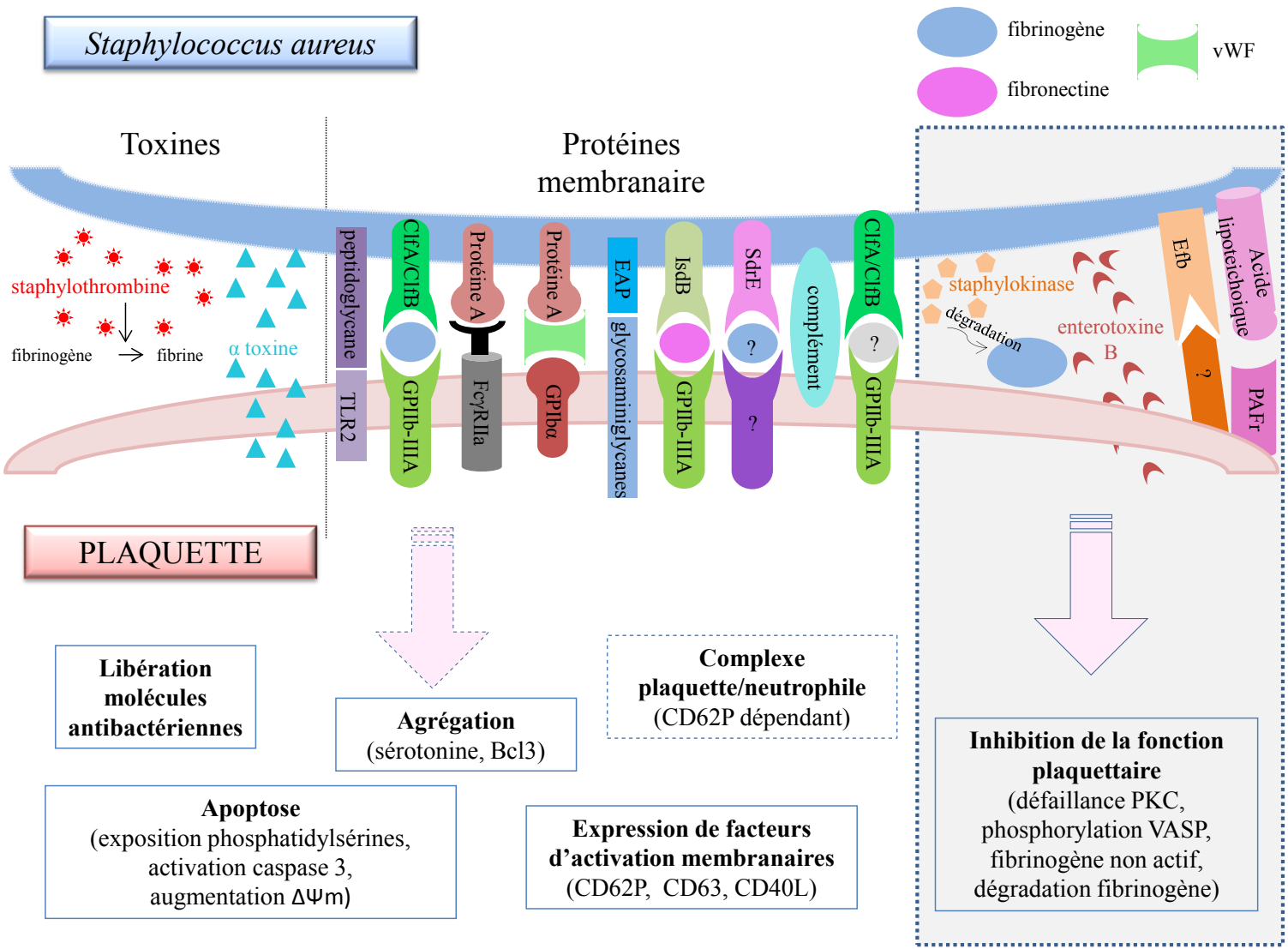


Figure 17 - Interconnexion entre *S.aureus* et les plaquettes

S. aureus a la possibilité d'induire différents types d'activation plaquettaire, aussi bien par des exotoxines que de par des protéines membranaires qui vont lier, directement ou indirectement, les plaquettes.
A contrario, certains facteurs bactériens induisent une inhibition de la fonction plaquettaire (encadrement grisé).

III - Rôle des plaquettes dans la physiopathologie du sepsis

A. Généralités sur le sepsis

Depuis 2003, le sepsis se définit par un syndrome clinique défini par la présence d'une l'infection et d'une réponse inflammatoire systémique [203]. Aux USA, le sepsis est fatal pour 210 000 personnes/an (données 2007) [204]. Une étude française, réalisée entre octobre 2009 et septembre 2011, sur 10 941 patients admis en unité de soins intensifs montre que 13,7% d'entre eux présentent les signes d'un choc septique. Parmi ces patients là, la mortalité à 28 jours était de 42% [205]. Au delà de ce fléau de santé publique, le sepsis a un fort impact socio-éconique. Aux USA, le coût annuel de prise en charge des patients s'élève à 24 milliards de dollars [206].

Plusieurs stades de sepsis ont été définis, avec des signes cliniques qui leurs sont propres [204], [206].

1) Le SIRS « Systemic Inflammatory Response Syndrome », qui est une réponse inflammatoire systémique pouvant être déclenchée par des conditions infectieuses ou non-infectieuses. Le SIRS est associé à quatre variables, décrites dans **le tableau 2** :

Tableau 2- Critères cliniques du diagnostic d'un SIRS
D'après Iskander *et al.* [206]

1 – Température > 38,5°C ou < 35°C
2 – Fréquence cardiaque > 90 battements/min
3 – Fréquence respiratoire > 20 respirations/min (ou $PACO_2$ < 32 mmHg)
4 – Numération leucocytaire > 12.10^3 cellules/mm^3 ou < 4.10^3 cellules/mm^3 (ou > 10% de formes immatures)

Pour répondre au critère SIRS, le patient doit présenter, au minimum, deux des critères énumérés dans le tableau. Cependant, il a été constaté grâce à une étude publiée en 2006, menée dans 198 unités de soins intensifs réparties sur 24 pays européens, que 90% des patients admis dans une unité de soins intensifs présentent un SIRS mais que la majorité n'évoluera pas vers un sepsis [206], [207]. C'est pour cela que d'autres critères ont été ajoutés afin de remplir la condition sepsis.

2) Le sepsis, qui est un SIRS accompagné d'une infection documentée.

3) Le sepsis sévère, qui est un sepsis associé à un dysfonctionnement de plusieurs organes (MOF = « Multiple Organ failure »), accompagné d'une hypoperfusion et d'une hypotension.

4) Le choc septique chez l'adulte se réfère à un état d'insuffisance circulatoire aiguë qui se caractérise par une hypotension artérielle persistante inexpliquée par d'autres causes.

Dans le sepsis associé à un germe gram-négatif, le principal inducteur de la réponse inflammatoire est le LPS. S'ensuit une activation du TLR4 et des voies de signalisation qui en découlent, conduisant à la sécretion de cytokines pro-inflammatoires. Plusieurs types cellulaires sont alors activés, dont les cellules endothéliales, les monocytes et les neutrophiles. Ces cellules ont un rôle clé en libérant de fortes concentrations d'IL-1, de TNF-α et d'IL-6. Ces cytokines sont relarguées dans les 90 minutes qui suivent l'exposition au LPS. De part leur activité pro-inflammatoire, elles amplifient l'activation cellulaire et donnent suite à une seconde vague de production de facteurs inflammatoires. Sont alors libérées d'autres cytokines/chimiokines (IL-8, MIP-1, IL-12, IL-15, IL-18, « macrophage migration inhibitory factor » (MIF), (high mobility group box » (HMGB)-1) ainsi que des médiateurs lipidiques et des radicaux oxygénés [208]. La réponse s'amplifie d'elle-même et devient exacerbée ; on parle alors « d'orage cytokinique » durant la phase précoce du sepsis [209].

De plus en plus d'études montrent qu'il est important de considérer l'inflammation stérile comme un facteur de risque pour le sepsis. Les récepteurs de type TLR et NOD reconnaissent les alarmines dérivées des tissus de l'hôte et qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire en condition pathologique ou de stress [207]. A titre d'exemple, la protéine HMGB1 est libérée durant un préjudice stérile et utilise la signalisation TLR4 d'une manière totalement indépendante d'un pathogène [210].

En parallèle de cette réponse systémique, s'observe une réponse tissulaire. L'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales provoque une perméabilité vasculaire et le recrutement des cellules inflammatoires au niveau tissulaire [211], amplifiant le processus d'inflammation aux niveau des organes.

Lors d'un sepsis sévère, de nombreux organes peuvent être endommagés et notamment les reins, le foie et les poumons. Des atteintes du système neurologique et du système cardiovasculaire sont également observées [206].

Le sepsis est la seconde cause d'atteinte pulmonaire aiguë (ALI : Acute Lung Injury) et de syndrome de détresse respiratoire aigüe (ARDS : Acute Respiratory Distress Syndrome), le second étant la complication du premier. L'ALI se caractérise par un endommagement alvéolaire initié par les neutrophiles infiltrants (Chapitre 2 – IV B). Lors de la diapédèse, les neutrophiles libèrent des facteurs inflammatoires ainsi que leur contenu granulaire contenant des protéases qui sont à l'origine de l'endommagement de l'épithélium alvéolaire. Les échanges gazeux sont alors bloqués, menant à un dysfonctionnement pulmonaire [206].

B. Sepsis et activation plaquettaire

1) Sepsis et coagulopathie

Des données datant du début des années 2000 montrent qu'entre 30 et 50% des patients en sepsis sévère présentent une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) entrainant une hypoxie des organes [212].

Lors de la réponse inflammatoire, les neutrophiles libèrent du facteur tissulaire permettant le déclenchement de la cascade de coagulation, menant à l'activation plaquettaire. L'IL-1 et l'IL-6 sont également de forts inducteurs de la coagulation [208]. Ce phénomène est amplifié par une dérégulation de la balance anticoagulante. Les patients en sepsis présentent une forte libération de PAI-1, inhibiteur naturel de la plasmine. On observe également une diminution de la protéine C, dont la forme activée est inhibitrice des facteurs de coagulation Va et VIIIa [206], [208], [213]. Ces anticoagulants naturels ont en plus de leur rôle dans la génération de thrombine, des propriétés anti-inflammatoires en jouant sur le NFκB [214].

Les espèces réactives à l'oxygène (ROS) libérées en quantité massive lors de la phase aiguë du sepsis sont aussi responsables de la coagulopathie. Ainsi, chez des souris KO pour l'oxyde nitrique synthase (enzyme produisant les ROS) et chez lesquelles un sepsis est induit, la vasoconstriction est réduite par rapport aux souris sauvages. En favorisant la vasoconstriction, les ROS participent à l'altération de la circulation au niveau des capillaires sanguins. De plus, les ROS ont un effet direct sur l'activation hémostatique des plaquettes [213] .

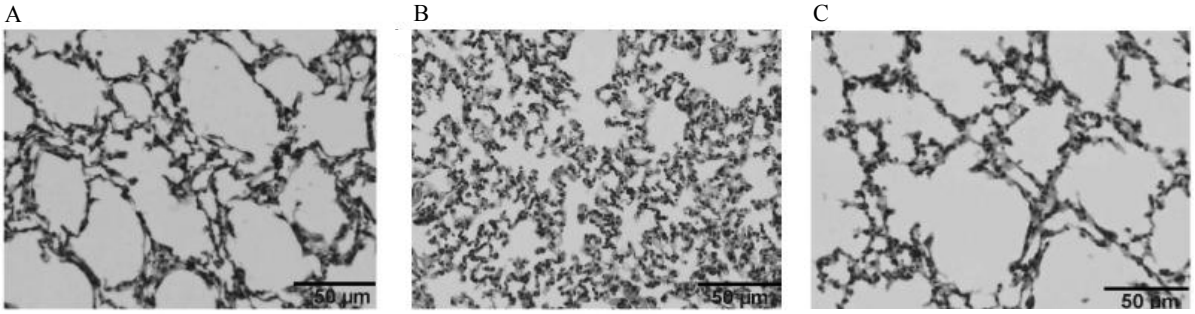
Le quatrième élément favorisant une coagulation excessive est l'augmentation des facteurs d'adhésion. Dans des modèles d'endotoxémie, l'expression des molécules d'adhésion est augmentée aussi bien au niveau des membranes plaquettaires qu'endothéliales. L'adhésion des plaquettes à l'endothélium va favoriser une activation mutuelle et une accumulation des plaquettes conduisant à l'occlusion du vaisseau [194],[198]. Par ailleurs, lors d'une endotoxémie induite dans un modèle murin de souris, il a été observé que la surexpression de la molécule endothéliale PAI-1 au niveau pulmonaire limite le recrutement *in situ* de lymphocytes T regulateurs mais favorisait le recutement de neutrophiles [216].

Les troubles de la coagulation liés au sepsis ont mis en avant le rôle des plaquettes dans la physiopathologie du sepsis, plus particulièrement au travers de leur fonction hémostatique.Toutefois, il apparaît clairement à présent que les plaquettes possèdent également une fonction inflammatoire qui leur permettrait de participer directement à l'amplification de l'inflammation associée aux phases précoces du sepsis. En plus de leur sensibilité à la thrombine, aux molécules d'adhésion et aux cytokines/chimiokines, l'hypothèse de leur implication directe dans le sepsis est aussi renforcée par l'expression des TLR à leur surface et le large panel de molécules inflammatoires qu'elles peuvent libérer au cours d'une stimulation bactérienne.

2) Sepsis et molécules plaquettaires inflammatoires

Les premiers éléments en faveur d'une participation des plaquettes à l'inflammation associée au sepsis proviennent d'études montrant que le taux de sCD40L circulant est plus élevé chez des patients en sepsis que chez des individus contrôles (appariés en âge et par sexe), mais indépendant de la sévérité du sepsis [217]–[220]. Ce sCD40L libéré au cours du sepsis est bien d'origine plaquettaire car des souris ayant subi une déplétion de leur plaquettes ne présentent pas cette élévation du taux plasmatique [221]. Une étude récente suggère que la « matrix métalloprotéinase-9 », également augmentée au cours du sepsis, serait à l'origine du clivage du CD40L plaquettaire [222]. Cette molécule possède d'importantes propriétés inflammatoires, sur de nombreuses cellules, de l'immunité ou non, et permettrait d'amplifier largement l'inflammation [223].

Dans le sepsis, le sCD40L participe au recrutement des neutrophiles. Les souris C57BL/6 déficientes pour le gène CD40L, et pour lesquelles le sepsis a été induit par « cecal ligation puncture » (CLP) ne présentent pas d'activation des neutrophiles, de formation d'œdème, ni d'infiltration des neutrophiles au niveau pulmonaire et conservent leur microarchitecture alvéolaire [221], [224] **(figure 18)**.



Souris sauvage non traitée | Souris sauvage avec CLP | Souris CD40L $^{-/-}$ avec CLP

Figure 18 - Rôle du CD40L dans l'altération de l'architecture pulmonaire lors du sepsis
D'àprès Rahman *et al.* [207]

Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine sur des sections de tissus pulmonaires
***(a)** poumons de souris contrôle comparés à des poumons de souris sauvages **(b)** ou CD40L$^{-/-}$ **(c)** 24h après induction de CLP. Barre d'échelle = 50µM*

Le sCD40L permettrait l'expression de la protéine d'adhésion « Macrophage-1 antigen » (Mac-1) par les neutrophiles, favorisant leur recrutement au niveau muqueux. Le mécanisme d'action du sCD40L ferait intervenir la « Macrophage inflammatory protein 2" (MIP-2) et son récepteur CXCR2 ; conforté par le fait qu' *in vitro*, le sCD40L recombinant ne permet pas d'augmenter l'expression de Mac-1 sur des neutrophiles en culture [221].

Le *platelet activating factor* (PAF) est une molécule synthétisée par diverses cellules, et possède une fonction de cytokine. Son récepteur, PAFR, est couplé aux protéines G et est exprimé par les cellules participant à la défense immunitaire et à la coagulation, dont les plaquettes. L'activation PAFR plaquettaire conduit à la libération de facteurs inflammatoire, à la dégranulation et à l'initiation des cascades de coagulation. En condition physiologique, la signalisation associée au PAFR est finement régulée afin d'éviter une réponse thrombo-inflammatoire excessive mais, au cours du sepsis, cette balance régulatrice est bouleversée et le PAF est alors mis en jeu dans que l'activation des neutrophiles, des monocytes, des plaquettes et la formation des complexes leucocytes-endothélium, leucocytes-plaquettes et plaquettes-endothélium [225].

Récemment, une étude a suggéré une association entre la durée de stockage de plaquettes d'aphérèse avant transfusion et la survenue de complications chez des patients d'un centre de traumatologie.

Cette étude a été effectuée sur 381 patients admis dans un centre de traumatologie et ayant reçu des concentrés plaquettaires d'aphérèse stockés de 3 jours ou moins, 4 jours ou 5 jours. Les résultats montrent que la transfusion de plaquettes stockées plus de 3 jours augmenterait le risque que le patient présente des complications, en particulier un sepsis [226]. Il a été montré qu'au cours du stockage des concentrés plaquettaires, les plaquettes s'activent et les facteurs inflammatoires plaquettaires, dont le sCD40L, sont libérés et s'accumulent [227]. Ceci suggère que les molécules inflammatoires accumulées au cours du stockage des concentrés plaquettaires, pourraient favoriser l'émergence du sepsis.

Par ailleurs, il a récemment été montré que l'IL-27 pouvait être une molécule prédictive du sepsis de l'enfant [228] et que les plaquettes activées pouvaient constituer une source non négligeable de cette cytokine [229]. La thrombine formée au cours du sepsis pourrait entrainer cette libération d'IL-27 plaquettaire.

D'autre part, il est rapporté chez des patients en sepsis, une augmentation du taux de microparticules circulantes. Plusieurs types cellulaires peuvent être à l'origine de la formation de ces vésicules : granulocytes, monocytes, cellules endothéliales et plaquettes [69]. En condition de sepsis, la libération de MP plaquettaires est accompagnée d'une augmentation du CD62P à la membrane des plaquettes et d'une augmentation d'agrégats plaquettes-monocytes [76]. Le rôle des micropaticules dans le sepsis demande à être exploré. Il a cependant été décrit que de par l'expression de facteurs tissulaires elles possèdent une forte pathogénécité procoagulante. Des études menées dans d'autres contextes ont permis de montrer que les MPP sont riches en CD40L [230] et IL-1β [64], [75] qui sont deux molécules pro-inflammatoires fortement associées à la physiopathologie du sepsis. Il devient donc important de considérer les MPP dans l'expansion de l'inflammation durant le sepsis.

Le rôle des plaquettes dans la phase inflammatoire du sepsis ne se limiterait pas à la production de molécules inflammatoires. En effet, chez des patients présentant un sepsis, il a été observé une augmentation du taux de complexes plaquettes-leucocytes circulants, plus importante d'ailleurs pour les patients avec un sepsis simple que pour ceux avec sepsis sévère. Cette diminution d'agrégats plaquettes-leucocytes peut s'expliquer par une séquestration des complexes au niveau des organes endommagés, dans les poumons par exemple [231].

Le même type d'observation a été effectué *in vitro*, où des souches de *S. aureus* isolées de bactériémie entrainent l'agrégation, la formation de complexes plaquettes-neutrophiles et l'activation des ces neutrophiles [232].

Par ailleurs, du fait que les plaquettes soient capables de se lier aux bactéries, voire de les conserver vivantes en position intracellulaire, elles pourraient favoriser leur dissémination au sein de l'organisme. Ce mécanisme a été proposé dans un modèle de souris infectées par *S. pyogenes* par voie intrapéritonéale. Les animaux déplétés en plaquettes ne sont pas capables d'assurer le transport des bactéries vers le sang, les poumons et la rate, ce qui se caractérise par une diminution de la charge bactérienne (par comptage des CFU) dans ces organes après sacrifice des animaux [233].

C. Apoptose plaquettaire dans le microenvironnement du sepsis

L'implication des plaquettes dans le sepsis se caractérise également par une thrombopénie constante chez les patients [234], [235]. Diverses études ont amené à considérer la thrombopénie comme un facteur prédictif du taux de mortalité des patients admis en soins intensifs [235], [236]. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à la diminution des plaquettes circulantes :

Lors du sepsis, les plaquettes expriment des facteurs d'activation qui favoriseraient leur séquestration dans la rate, puis leur destruction [237]. La déplétion plaquettaire peut être accélérée si le contact plaquettes-bactéries implique le système du complément [93] ou le récepteur Fc-γ [238]. De plus, le sepsis est un état pathologique qui favoriserait l'hémophagocytose des plaquettes par les macrophages est en partie dépendante du « macrophage colony stimulating factor » au cours du sepsis [239].

La défaillance de thrombopoïese est une hypothèse peu probable dans la mesure où les taux plasmatiques d'l'IL-6, de TNF-α et de thrombopoïétine sont augmentées au cours du sepsis [208], [240]. L'engagement des TLR mégacaryocytaires, au contraire, serait plutôt en faveur d'une surproduction de plaquettes.

Une autre hypothèse incrimine la coagulopathie induite par le sepsis, qui entraîne une CIVD. Des thrombi disséminés immobiliseraient les plaquettes [215]. Les résultats de Tyml *et al.* le confirment dans un modèle murin de sepsis [213].

Plus récemment, la communauté scientifique s'est intéressée à l'apoptose plaquettaire. Ce mécanisme de mort cellulaire implique une importante étape de transformation nucléaire impliquant une condensation de la chromatine, suivie de la fragmentation de l'ADN. De ce fait, ce phénomène a été restreint aux cellules nucléées. Etonnamment, l'apoptose a également été décrite au niveau des érythrocytes [241] où la mort cellulaire se produit tout en contournant les évènements qui se produisent au niveau du noyau et forme des corps apoptotique nommés echinocytes.

Classiquement, l'apoptose dite « mort cellulaire programmée » peut être déclenchée par deux types de stimuli. On parle alors de voie intrinsèque et de voie extrinsèque.

La voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs de mort cellulaire, tel que le récepteur « apoptosis stimulating fragment » (Fas) qui a pour ligand les protéines de la famille « tumor necrosis factor » (TNF). L'engagement de Fas provoque une trimérisation du récepteur qui devient alors actif, ce qui lui permet de recruter une molécule adaptatrice, « Fas-associated protein with death domain » (FADD). FADD contient également un domaine de liaison à la procaspase-8. La formation de ce complexe entraine le clivage de la caspase-8 qui est alors produite sous sa forme dimérique active. La caspase-8 va alors, soit activer la cascade séquentielle des différentes caspases, soit la voie mitochondriale décrite ci-dessous.

La voie intrinsèque se déclenche suite à un stress cellulaire, comme le stress oxydatif. En condition physiologique la protéine « B-cell lymphoma-2 » ($BCl-_2$) et d'autres protéines homologues maintiennent l'intégrité de la membrane mitochondriale. En condition de stress, ces protéines sont dégradées. Il se forme alors des pores de transition à la surface de la mitochondrie, conduisant à son gonflement puis son éclatement. Le cytochrome C est alors libéré dans le cytoplasme et va pouvoir activer la cascade des caspases [242] .

Dans les deux cas, les voies vont converger pour activer la caspase 3 qui possède de nombreux substrats. Les effets de la caspase 3 se visualisent aussi bien sur des protéines nucléaires impliquées dans la réparation de l'ADN que sur des protéines cytoplasmiques comme la gélosine qui est un régulateur de cytosquelette. Le clivage de molécules impliquées dans la structure et la réparation cellulaire va provoquer la fragmentation de l'ADN et du cytosquelette, mais la membrane plasmique reste intacte. Lors de la formation de corps

apoptotiques, il se produit une modification dans la répartition des phospholipides, appelée « flip flop membranaire », qui expose les phosphatidylsérines (PS) à la surface membranaire. Les PS constituent un signal « eat-me » pour les cellules phagocytaires, qui permettent l'élimination des corps apoptotiques [242].

Il s'avère que les plaquettes possèdent également la machinerie apoptotique. Les plaquettes expriment les caspases 1, 3, 4 et 9. Une expression plus réduite est observée pour les caspases 2, 6 et 8 et aucune expression des caspases 5, 7 et 10 n'a pu être mise en évidence. Fas n'est pas exprimé au niveau des plaquettes, mais elles possèdent d'autres récepteurs de mort cellulaires tels que DR3, DR5, le TNF-récepteur p55 et RIP. Les plaquettes expriment également les protéines de la famille Bcl-2 : Bcl-X, Bfl1, Bad, Bak, Bax et Mc1 [243] .

L'activation des ces molécules apoptotiques a été mise en évidence au cours du stockage de concentrés plaquettaires. Après 5 jours de conservation dans les conditions standards des banques de sang, la viabilité des plaquettes diminue. Cette mort plaquettaire s'accompagne de l'augmentation des PS à la surface cellulaire et d'une augmentation de l'activité de la caspase 3. L'activation de la caspase s'effectue d'une manière spécifique car l'utilisation d'un inhibiteur (z-VAD-fmt) permet de stopper ce processus. La mort plaquettaire est donc bien associée à une l'apoptose spécifique [243].

Cette première étude a montré l'indépendance de l'apoptose et de l'activation plaquettaire car l'exposition des PS était indépendante de l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation CD63 et l'activation par la thrombine n'avait aucun effet sur l'activité de la caspase 3. Cependant, la communauté scientifique n'est pas unanime. Il a même été montré qu'une stimulation par la thrombine induisait une dépolarisation de la membrane mitochondriale, l'expression de molécules pro-apoptotiques (Bax, Bak), l'activation de la caspase-3 et l'exposition des PS à la membrane [244] . L'action de la thrombine ne serait pas directe et nécessiterait la libération de facteurs plaquettaires capables d'induire l'apoptose. Lors de leur stockage, les plaquettes libèrent de nombreux facteurs solubles. Parmi eux, le TNF-α qui est un fort inducteur de l'apoptose, *via* l'induction des caspases.

La durée de vie des plaquettes pourrait donc être contrôlée par l'apoptose. La caspase-9 par exemple est requise pour la mort des plaquettes et des mégacaryocytes mais n'intervient pas dans leur production, ni leur fonctionnalité [234].

La famille Bcl-X a également été mise au cœur de la survie plaquettaire. Ces molécules détermineraient même leur durée de vie. Deux mutations faux-sens de Bcl-X sont capables d'accélérer la mort plaquettaire et d'entrainer de profondes thrombopénies [246].

Par ailleurs, il a été montré qu'une souche d'*E. coli* isolée chez un patient présentant un sepsis était capable d'induire des manifestations apoptotiques des plaquettes, telles qu'une condensation de l'actine, une baisse du potentiel mitochondrial et la dégradation de Bcl-X. L'utilisation de souches mutante et non pathogènes a permis de montrer que seules les souches pathogènes libérant des toxines formant des pores ont la capacité de dégrader Bcl-X. Il s'agit de l'α-toxine d'*E. coli* et de *S. aureus*. Ces toxines agissent probablement sur la calpaïne car cette protéine est à l'origine de la dégradation de Bcl-X. Par contre, l'inhibition du protéasome ne parvient à prévenir la dégradation de la protéine pro-apoptotique [247]. Cette étude est la première démonstration qu'une bactérie pathogène peut jouer sur le déclenchement intrinsèque de l'apoptose plaquettaire. La dégradation de Bcl-X suggère un nouveau mécanisme par lequel les bactéries pourraient provoquer la thrombopénie observée chez les patients bactériémiques. Ce mécanisme pourrait alors expliquer pourquoi la dépolarisation de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi m$) est augmentée dans les plaquettes de patients SIRS [248]. La diminution du $\Delta\Psi m$ pourrait même être associée à la progression du SIRS.

D. Implication des plaquettes dans la NETose liée au sepsis

Un autre phénomène, la formation de Neutrophil Extracellular Traps (NET), mettant en jeu les plaquettes, les neutrophiles et les bactéries, a été mis en évidence ; il pourrait avoir un rôle important dans le sepsis.

Ce phénomène a été décrit pour la première fois en 2004 ; les neutrophiles activés, notamment par de l'IL-8, libèrent au niveau des microvaisseaux leurs constituants granulaires (peptides et enzymes) et nucléaires (chromatine et histones), qui une fois combinés forment un réseau, appelé Neutrophil Extra Cellular Traps (NET) [249] **(photo 19)**. L'utilisation de la microscopie électronique à haute résolution a permis de confirmer la structure des NET qui se caractérise par des extensions extracellulaires de chromatine auxquelles sont associées des protéines globulaire. Il a également été montré qu'un environnement bactérien, ou mimé par

l'injection de LPS, entraînait, *in vivo*, la libération de NET pouvant piéger les bactéries, et donc diminuer leur dissémination au cours d'un sepsis [250].

Il a été constaté que le piégeage des bactéries au niveau des NET est supérieur en condition dynamique, représentative de la circulation sanguine [251]. Les NET peuvent atteindre un diamètre de 25 nm ; et une fois associés entre eux, ils forment une structure pouvant atteindre plus d'une centaine de nanomètres aussi bien en diamètre qu'en longueur [251].

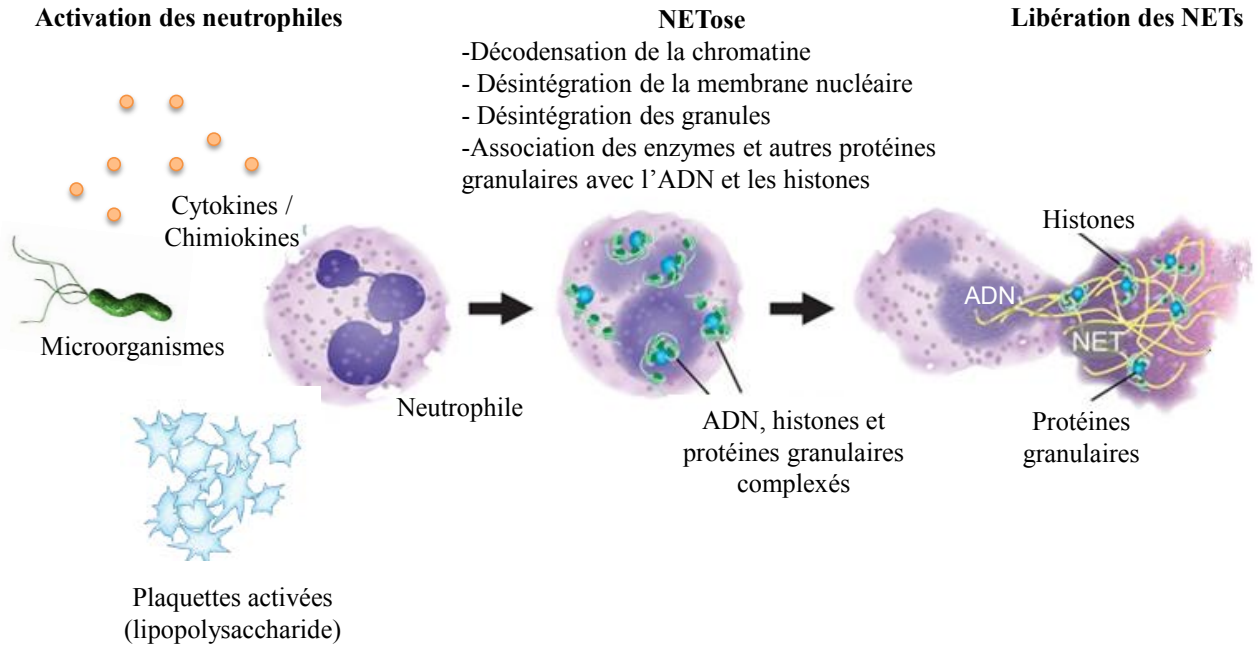


Figure 19 – Mécanismes de la NETose

D'après Mantovani *et al.* [241]

Les NET contiennent, alignés à l'ADN, les histones H1, H2A, H2B et H4 ainsi que des protéines granulaires telles que l'élastase, la myélopéroxidase, et la « bactericidal permeability increasing protein » (BPI) qui vont permettre la dégradation bactérienne [249]. Les NET sont capables d'arrêter aussi bien les bactéries à Gram positif que négatif. Les histones et la BPI ont une action protéolytique sur l'α-toxine de *S. aureus* ainsi que sur l'IpaB de *S. flexneri* [250]. *C. albicans*, bien que n'étant pas une bactérie, est également sensible aux NET mais sa destruction dépendrait seulement des protéines granulaires et non des histones [250].

La libération des NET survient dans les 5-10 minutes après la stimulation des neutrophiles. Ce laps de temps est trop court pour la mise en place d'un mécanisme d'apoptose ou de nécrose, il s'agit donc d'un mécanisme actif et non la conséquence d'une désintégration de la membrane plasmique des neutrophiles [249].

D'un point de vue moléculaire la formation des NET fait intervenir [252] :

- la peptidylarginine deiminase 4 pour la décondensation de la chromatine
- la formation de ROS, plus particulièrement de l'acide hypochloridrique, d'une manière dépendante de la NADPH oxidase pour la désintégration de la membrane nucléaire
- le cytosquelette d'actine et les microtubules pour la libération des NET

Les NET peuvent être libérés selon trois mécanismes [253] : i) un mécanisme rapide (30-60 min) mettant en jeu des vésicules ; dans ce cas, les neutrophiles restent viables ; ii) un mécanisme plus lent (3-4h) conduisant à la rupture de la membrane plasmique du neutrophiles ;iii) directement à partir des mitochondries. A ce jour, le troisième mécanisme et l'existence de NET composés d'ADN mitochondrial reste discutée, même si une étude montre que les NET seraient majoritairement composés d'ADN mitochondrial plutôt que d'ADN nucléaire [254].

D'une façon étonnante, le LPS, classiquement décrit comme un activateur des neutrophiles, n'est pas capable d'induire, *in vitro,* la libération de NET par des neutrophiles. En revanche, Clark *et al.* ont montré en 2007 dans un modèle murin que l'injection intraveineuse de LPS provoque la formation de NET dès les 5 premières minutes [251]. Une investigation plus précise a permis de montrer que la formation de NET induite par le LPS n'est pas directe et nécessite la participation des plaquettes. En effet, la stimulation des plaquettes par du LPS en présence des neutrophiles ne provoquerait pas une réponse plaquettaire classique mais favoriserait leur adhésion ; les neutrophiles qui seraient alors activés et formeraient les NET [251] **(figure 20)**.

Kraemer *et al.* ont ensuite montré que les β-défensines de type 1 libérées par les plaquettes après stimulation par des bactéries étaient responsables de la formation des NET [142].

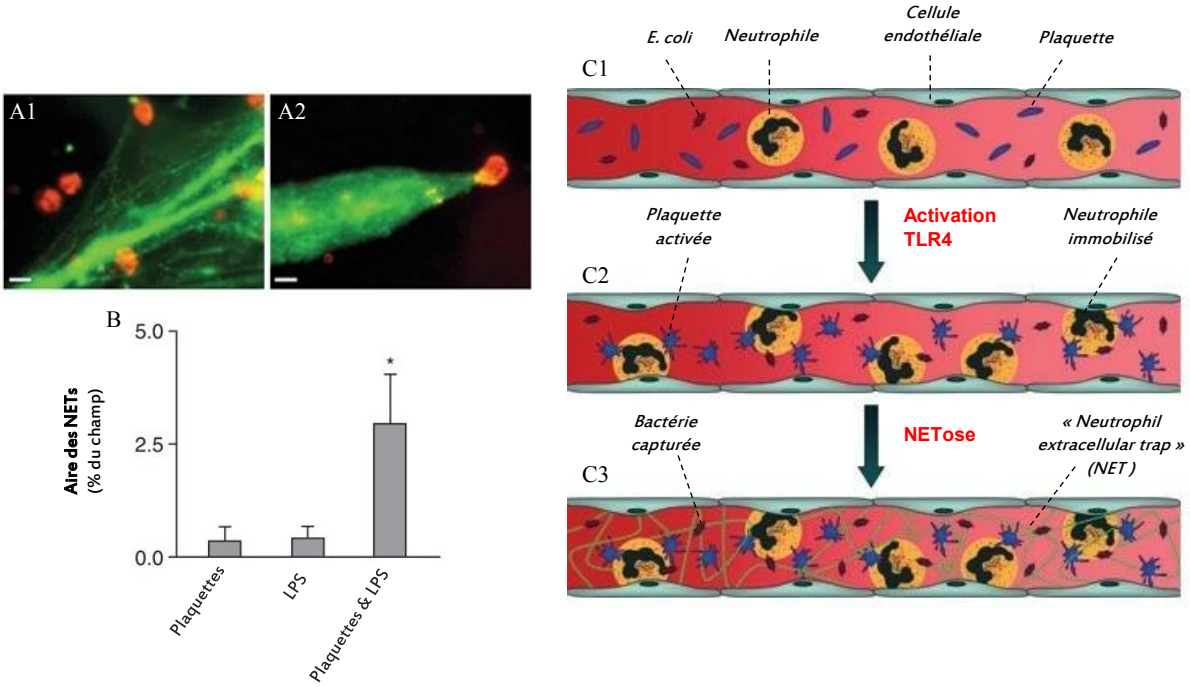


Figure 20 - Implication des plaquettes dans la NETose
D'après Clark *et al.* [240]

(A1)-(A2) *Visualisation de NET résultant de l'adhésion de plaquettes (stimulées par du LPS) à la surface des neutrophiles. Les neutrophiles sont observées en lumière blanche à travers un filtre orange (orange); l'ADN extracellulaire est marqué au Sythox Green (vert). Barre d'échelle = 10 µm.*
(B) *Quantification de la formation de NET après exposition des neutrophiles à différentes conditions. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes représentative de 3 expériences idépendantes ± SEM; $^{*}P < 0.05$ vs. les plaquettes non stimulées.*
(C) *Modèle de piégeage des bactéries dans la microvasculature. Le LPS bactérien active le TLR4 plaquettaire* ***(C1).*** *Les plaquettes activées adhèrent aux neutrophiles immobilisés au niveau de l'endothélium (sous effet du LPS)* ***(C2).*** *Les plaquettes transmettent aux neutrophiles un signal initiant la formation de NET* ***(C3)***

Kubes présente les plaquettes comme un baromètre permettant de détecter un niveau substantiel de bactéries. Les plaquettes sont activées par une concentration en LPS 100 fois plus importante que celle induisant l'activation des neutrophiles. Les plaquettes viendraient donc en aide aux neutrophiles en leur permettant de former les NET lorsque la charge bactérienne est trop forte et que leurs fonctions classiques ne sont pas suffisantes pour éliminer correctement les bactéries [250]. Les NET pourraient être la défense innée « de la dernière chance ».

Les NET ont été démontrés pour avoir un effet bénéfique sur la destruction des pathogènes lors d'une bactériémie.

En revanche, ils pourraient altérer la circulation des microvaisseaux en favorisant la formation de microthrombi empêchant de surcroît les cellules immunitaires de parvenir jusqu'aux bactéries. De plus, leurs constituants peuvent avoir un effet toxique sur les cellules de l'hôte. Cela a été confirmé *in vitro* sur des cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) [251]. *In vivo*, il a été observé, suite à la libération de NET, une hépatotoxicité mesurée par la libération d'alanine aminotransférase et une occlusion des sinusoïdes du foie [251].

D'autre part, les histones libérées dans le milieu extracellulaire possèdent une activité pro-thrombotique [171] [255], et sont capables d'activer les plaquettes *via* leurs TLR 2 et 4 [171]. Ce phénomène pourrait être extrapolé aux histones des NET ; dans ce cas les NET seraient responsables d'une sur-activation plaquettaire, pouvant aboutir à la formation de thrombi. Les potentiels effets délétères des NET mettent en perspective une nouvelle façon par laquelle la fonction plaquettaire peut être altérée au cours du sepsis.

Résumé Chapitre 1

Les plaquettes peuvent être considérées comme des sentinelles du réseau vasculaire, de par leur nombre élevé dans la circulation et l'éventail d'immunorécepteurs fonctionnels (récepteurs au complément, FcγRII, TLR) ainsi que des intégrines, classiquement décrites dans l'hémostase (GPIIb-IIIa, GPIbα), qu'elles possèdent. L'engagement de ces récepteurs, déclenche, en marge de la réponse hémostatique, la libération de cytokines/chimiokines, importantes dans l'amplification de la réponse immunitaire *via* l'activation des cellules immunitaires. Les plaquettes contiennent également des mloécules ayant un effet microbicide. Les plaquettes pourraient donc être considérées comme de véritables sentinelles contre les agents infectieux, capables d'alerter le système immunitaire et dont l'implication dans les pathologies infectieuses à risque comme les infections à HIV, à *S. aureus* et au cours du sepsis est largement reconnue

Enfin, il est intéressant de noter que l'activation plaquettaire en condition infectieuse entraine la formation de complexes plaquettes-leucocytes, mettant en jeu principalement les neutrophiles. Cette liaison entraine une activation mutuelle permettant d'accroîte le signal (phagocytose, formation de NET,….). Cette coopération avec les neutrophiles n'est pas seulement associée aux infections ; en effet, elle est également retrouvée dans les pathologies inflammatoires chroniques (pathologies intestinales inflammatoires chroniques, ALI/TRALI, allergies respiratoires). Cet aspect sera abordé dans le chapitre 2 qui montre que les plaquettes interviennent aussi dans l'entretien de l'inflammation muqueuse.

CHAPITRE 2 – COOPERATION DES PLAQUETTES ET DES AUTRES CELLULES DE L'INFLAMMATION DANS L'INITIATION ET L'ENTRETIEN DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE

Le premier chapitre de ce manuscrit a souligné la participation des plaquettes dans l'inflammation aiguë associée à l'infection, aussi bien en tant qu'effecteurs que cibles. Dans ce contexte l'activation plaquettaire, classiquement associée à l'agrégation, induisant une modification morphologique et une libération de facteurs solubles adaptés est, de plus, caractérisée par la formation des complexes plaquettes-neutrophiles ou plaquettes-monocytes [256] aboutissant dans le premier cas à la formation de NET.

La biologie vasculaire a été revue depuis une dizaine d'années ; de plus en plus d'études *in vitro* et *in vivo* montrent que les plaquettes sont capables, en conditions inflammatoires, d'adhérer à un endothélium non lésé (ne présentant aucune altération morphologique), ce qui relève d'une adhésion « inflammatoire » [257], [258].

Ces constatations n'ont pas seulement créé un nouveau paradigme mais ont aussi ouvert un nouveau champ de recherche, actuellement en expansion, concernant les conséquences physiologiques et physiopathologiques de l'adhésion des plaquettes aux cellules de l'inflammation. La stabilité de la communication entre ces différents types cellulaires, même sous de fortes conditions de cisaillement [259], est un argument de plus permettant de reconsidérer le rôle des plaquettes dans l'initiation et l'entretien de la réponse inflammatoire.

L'inflammation tient son importance de la rapidité et l'efficacité du déploiement de la réponse face à une agression, infectieuse ou non, et de son association à plusieurs pathologies humaines. Le chapitre qui suit aborde la communication établie, en condition inflammatoire, entre les plaquettes et les autres cellules de l'inflammation dans le compartiment vasculaire, ainsi que les conséquences mécanistiques et cliniques de ces interactions.

I - Les plaquettes dans l'initiation de la réponse inflammatoire endothéliale

L'endothélium ne forme pas seulement une barrière physique entre la circulation et les tissus adjacents ; les cellules endothéliales sécrètent également des médiateurs qui influencent l'hémodynamique vasculaire. Parmi ces facteurs, il y a le NO et les prostacyclines [260], [261]. Ces deux facteurs, reconnus spécifiquement par les plaquettes, exercent un effet inhibiteur sur leur activation et permettent de prévenir d'une éventuelle agrégation.

Les cellules endothéliales produisent également une ecto-ADPase, le CD39 qui dégrade l'ADP produit en faible quantité par les globules rouges et les plaquettes à l'état basal et qui pourrait initier leur activation [262]. En condition inflammatoire, l'altération du métabolisme des cellules endothéliales induit une diminution de la libération de ces modulateurs ; il n'y a alors plus d'effet antagoniste de l'activation plaquettaire [258], [262].

Le second et principal facteur à l'origine de l'adhésion des plaquettes est l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium inflammatoire. Au même titre que pour les leucocytes, l'adhésion des plaquettes s'opère en trois étapes, dont les évènements sont coordonnés [258], [259], [263]:

1) Adhésion initiale des plaquettes à l'endothélium
2) Roulement impliquant des successions d'attachement-détachement
3) Adhésion stable des plaquettes

Alors que les deux premières étapes font intervenir des sélectines, l'adhésion finale nécessite l'activation d'intégrines plaquettaires et l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Les principaux mécanismes moléculaires mis en jeux sont décrits ci-dessous :

A. Adhésion initiale et roulement des plaquettes à la surface de l'endothélium

Les cellules endothéliales activées expriment le CD62P et le vWF [264]. A l'état basal, ces deux molécules sont contenues dans des granules appelées corps de Weibel-Palade. Lors de l'activation cellulaire, les mécanismes d'exocytose et les flux calciques permettent, en quelques secondes, l'expression de ces facteurs à la membrane. Ces deux molécules sont des ligands de la GPIbα plaquettaire, ce qui permet l'adhésion et le roulement des plaquettes à la surface de l'endothélium inflammatoire (**figure 21**) [262].

L'interaction entre le CD62P et la GPIbα est similaire à celle entre le CD62P et la « P-selectin glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1), principal récepteur leucocytaire du CD62P. En effet la GPIbα tout comme la PSGL-1, est un polypeptide fortement allongé et O-glycosylé, avec des régions très anioniques contenant des tyrosine-sulfate.

Le roulement des plaquettes sur l'endothélium activé peut aussi bien être inhibé par un anticorps anti-GPIbα que par un anti-CD62P ; cela met en avant l'intérêt de cette liaison dans l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales [262], [265].

Les plaquettes ont été décrites pour exprimer une PSGL-1 fonctionnelle, ce qui suggère un mécanisme additionnel par lequel les plaquettes participeraient à l'inflammation vasculaire. C'est d'ailleurs ce qui a été montré par la microscopie intravitale, où l'utilisation d'un anti-PSGL-1 diminue le roulement des plaquettes au niveau des veinules mésentériques [266]. Cependant, cette interaction reste discutable car trois ans plus tard, Sperandio *et al.*, contestent l'expression de ce récepteur à la surface plaquettaire [267]. Ces différences peuvent s'expliquer par la sensibilité des techniques utilisées pour détecter l'expression du récepteur, car elle est 25 à 100 plus faible au niveau des plaquettes que des leucocytes [266]. De plus, l'expression du PSGL-1 est favorisée par une pré-activation des plaquettes par la thrombine [266]. Pour ce que ce couple ligand récepteur soit impliqué dans l'interaction entre les plaquettes et l'endothélium inflammatoire, il y aurait donc besoin d'un environnement très inflammatoire.

Contrairement à celui des cellules endothéliales, le CD62P plaquettaire n'est pas nécessaire à l'adhésion primaire entre les plaquettes et l'endothélium. Ceci se confirme par l'utilisation de plaquettes de souris déficientes pour le CD62P qui exercent un roulement d'une manière aussi efficace que des plaquettes de souris sauvages [268].

Le vWF libéré par les corps de Weibel-Palade est différent de celui retrouvé dans le plasma car il est plus large et plus adhérent, ce qui lui permet de rester accroché à la membrane plasmique et de retenir ainsi les plaquettes par leur GPIbα. Cependant ces différents types de liaisons des plaquettes aux cellules endothéliales ont une cinétique d'adhésion relativement courte. En effet, la liaison entre la GPIbα et le CD62P [265] est d'une faible affinité et le vWF est soumis à une protéolyse sous l'action d'ADAMTS-13 [269]. Ces interactions réversibles sont donc insuffisantes pour assurer une adhésion stable des plaquettes à l'endothélium et permettent donc le phénomène de roulement et la présence d'inhibiteurs naturels ainsi que l'absence de molécules d'adhésion spécifiques de l'inflammation, conduisent à la recirculation rapide des plaquettes dans le flux sanguin [262]. Toutefois, en condition inflammatoire, la première étape d'adhésion facilite l'interaction des plaquettes avec les récepteurs endothéliaux permettant une adhésion plus durable.

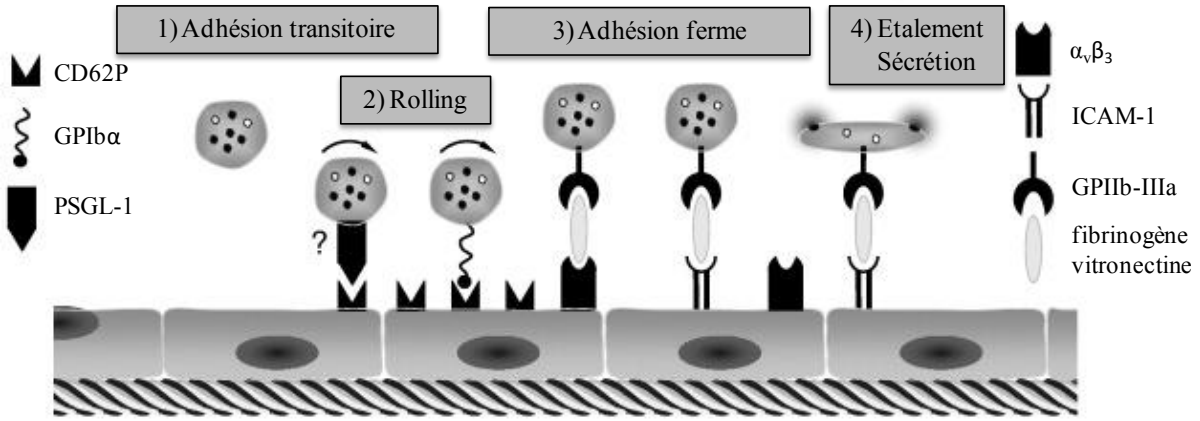


Figure 21 - Adhésion et roulement des plaquettes à la surface de l'endothélium l'inflammatoire

D'après Tabuchi *et al.* [248]

Lors d'une stimulation inflammatoire, les cellules endothéliales expriment le CD62P qui favorise l'adhésion et le roulement des plaquettes via leur GPIbα et probablement par le PSGL-1. De cette première étape, en résulte un changement conformationel de l'intégrine plaquettaire GPIIb-IIIa qui peut alors lier le fibrinogène/la fibronectine; qui à leur tour vont intéragir fermement avec $\alpha_v\beta_3$ ou ICAM-1 à la surface de l'endothélium

B. Adhésion stable des plaquettes à l'endothélium inflammatoire

L'adhésion définitive des plaquettes à l'endothélium nécessite l'expression de nouvelles molécules aussi bien à la surface endothéliale que plaquettaire. Pour le recrutement des leucocytes, c'est l'expression d'intégrines qui est à la base de ce type d'interaction [8]. Ce scénario était donc fortement suspecté pour l'adhésion ferme et irréversible des plaquettes à l'endothélium inflammatoire.

In vitro et en condition statique, l'intégrine plaquettaire β3 (la GPIIb-IIIa) initie une adhésion stable entre les plaquettes et des cellules HUVEC en culture. Le blocage de cette molécule par un anticorps ou un motif RGD (motif mimant la séquence arginine-glycine-acide aspartique du fibrinogène reconnue par la GPIIb-IIIa) diminue significativement l'adhésion des plaquettes [268], confirmant ainsi l'implication de cette intégrine. Des analyses *in vivo* chez la souris confirment également l'implication de cette intégrine *via* l'utilisation d'un modèle d'ischémie-reperfusion pour lequel l'utilisation d'un motif RGD ou des plaquettes provenant de patients atteints de la maladie de Glanzmann (déficience constitutive

en GPIIb-IIIa) ne permet pas d'observer une adhérence stable des plaquettes au niveau des arterioles et des veinules de l'intestin grêle [270].

Les observations portant sur le roulement des plaquettes rapportent que celles-là n'ont pas besoin d'être activées pour initier de manière transitoire leur adhésion à l'endothélium ; en revanche, une adhésion plus forte nécessite l'expression d'une GPIIb-IIIa sous forme activée. La plaquette commencerait donc à s'activer lors du roulement. L'engagement de la GPIbα au cours du roulement permettrait donc, comme dans le cadre de l'hémostase, l'obtention d'un signal de type « inside-out ».

L'ajout de molécules d'adhésion exogènes, telles que le fibrinogène et la fibronectine, confère une meilleure adhésion des plaquettes à l'endothélium [268]. Le fibrinogène serait donc utilisé comme molécule de liaison entre les plaquettes et les cellules endothéliales, et confirme alors pourquoi un motif RGD empêche l'adhésion des plaquettes à l'endothélium. Cette notion est étayée par des études *in vitro*, toujours dans un modèle d'ischémie-reperfusion, montrant un dépôt de fibrinogène, colocalisé avec les plaquettes adhérentes, au niveau des artérioles et des veinules au moment de la reperfusion [270]. De plus, l'utilisation d'un anticorps anti-fibrinogène au moment de la reperfusion attenue l'adhésion des plaquettes.

Du côté endothélial, l'analyse des récepteurs de cellules HUVEC révèle un engagement prédominant des molécules « intercellular adhesion molecule » (ICAM)-1 et de $\alpha_v\beta_3$. Le blocage de ces deux récepteurs par des anticorps diminue significativement l'adhésion des plaquettes, et ce d'une manière équivalente ne montrant donc aucune prédominance de l'un ou de l'autre [268]. De plus, ces deux récepteurs peuvent mettre en jeu le fibrinogène lors de la fixation des plaquettes aux cellules endothéliales[270] **(figure 21)**

La faible expression d' $\alpha_v\beta_3$ et de l' « InterCellular Adhesion Molecule-1" (ICAM-1) par les cellules endothéliales au repos permet de restreindre l'adhésion ferme des plaquettes en l'absence d'inflammation. Toutefois, il est à noter que les cellules endothéliales pulmonaires expriment constitutivement ces deux facteurs d'adhésion [271], [272]. Ainsi, la présence de ces récepteurs, en marge de leur fonction physiologique d'angiogénèse [273], prédispose donc les poumons à l'adhésion des plaquettes, ainsi qu'aux complications associées pouvant survenir dans un contexte pathologique.

Durant les étapes séquentielles du processus d'adhésion, les plaquettes emploient les mêmes récepteurs que lors d'une activation plaquettaire classique. Comme décrit ci-dessus, il y a engagement de la GPIbα, ce qui permet une réorganisation du cytosquelette et l'activation de la GPIIb-IIIa. La première caractéristique est un avantage pour le roulement car elle permet aux plaquettes d'accéder plus facilement à de nouveaux récepteurs. Quant au signal « inside out », il est primordial pour la stabilisation des plaquettes à l'endothélium et donc une activation encore plus forte.

Lors de la fixation de la GPIIb-IIIa au fibrinogène, les plaquettes continuent à s'activer. L'engagement de l'intégrine entraine l'oligomérisation des récepteurs [274] ce qui permet à la plaquette d'initier des cascades de signalisation, notamment celle des tyrosines kinases *via* Syk [275], perpétuant le remodelage d'actine, allant même jusqu'à la formation de lamellipodes [276].

L'activation des plaquettes lors de leur association à l'endothélium entraine également l'exposition à la membrane et/ou la libération du contenu des granules α et denses. Ces marqueurs d'activation plaquettaire, membranaires ou solubles ont une activité biologique. Parmi eux, un arsenal de facteurs vasoactifs, mitogéniques, pro-agrégants, pro-coagulants mais aussi pro-inflammatoire [258]. C'est ce dernier aspect qui sera détaillé dans la partie suivante.

C. Amplification par les plaquettes du phénotype inflammatoire endothélial

Plusieurs facteurs plaquettaires sont décrits pour amplifier le signal inflammatoire au niveau de l'endothélium (**figure 22**). Parmi eux, l'IL-1β qui a été identifié comme le facteur majoritaire dans l'activation des cellules endothéliales de façon dépendante des plaquettes. La mise en contact de plaquettes stimulées par de la thrombine sur des cultures de cellules endothéliales humaines de cordon ombilical et de veines saphènes induit, au niveau de la cellule endothéliale, la surexpression de molécules d'adhésion telles que ICAM-1. La pré-incubation des plaquettes avec un anticorps anti-IL-1β inhibe cette réponse endothéliale ce qui suggère que cette molécule plaquettaire peut initier et réguler les phases précoces de la réponse l'inflammatoire endothéliale [277]. L'expression d'ICAM-1 sur des cellules endothéliales cultivées, après contact avec des plaquettes activées, a été confirmée par Gawaz *et al.*[278] ; cette équipe montre également que l'IL-1β plaquettaire augmente l'expression fonctionnelle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ capable de se lier aux sous-unités de la fibronectine.

Concernant l'induction de l'expression d'E sélectine, les résultats divergent en fonction de l'origine des cellules car seules les cellules endothéliales de veines saphènes expriment cette protéine d'adhésion après contact avec les plaquettes [277].

L'IL-1β plaquettaire joue également un rôle dans le relarguage de facteurs chimioattractants. La co-incubation de plaquettes stimulées par de la thrombine avec des cellules endothéliales induit de la libération d'IL-6, d'IL-8 [279], de « granulocyte macrophage colony stimulating factor » (GMCSF) [277] et de « monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1) [278]. La préincubation des cellules endothéliales avec un antagoniste du récepteur de l'IL-1β récepteur, avant la mise en contact avec les plaquettes entraine une diminution de 59% de l'expression de l'IL-8 [277]. Ces résultats illustrent bien l'implication de l'IL-1β plaquettaire dans l'induction de la réponse endothéliale

Outre l'IL-1β, le CD40L plaquettaire a été identifié comme un facteur capable de moduler le phénotype endothélial. Le CD40L exprimé à la surface des plaquettes activées a la capacité de se lier au CD40 de cellules endothéliales. De cette liaison, en résulte la libération d'IL-8 et de MCP-1 [280], deux principaux chimioattractants des neutrophiles et des monocytes. De la même manière, l'engagement du CD40 endothélial par le CD40L plaquettaire induit l'expression de molécules d'adhésion, incluant l'E-sélectine, la « vascular cell adhesion protein 1 » (VCAM-1) et ICAM-1, permettant la fixation des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes à l'endothélium [280].

Slupsky *et al.* ont également rapporté que cette même liaison induit, chez des cellules HUVEC, l'expression du facteur tissulaire et une diminution de l'expression de la thrombomoduline [281] montrant un rôle supplémentaire des plaquettes dans la réponse thrombo-inflammatoire.

La fixation de plaquettes activées sur des cellules endothéliales initie aussi l'expression et la libération d'un autre type de molécules, les MMP qui sont des enzymes dégradant les protéines de la matrice extracellulaire. Leur activité contribue grandement à la destruction et au remodelage des tissus inflammatoires. Les cellules endothéliales ayant fixé des plaquettes activées en culture, libèrent des MMP-2 et des MMP-9. Elles expriment également à leur surface un récepteur aux protéases le « urokinase-type plasminogen activator receptor » (uPAR) [259]. La libération de MMP-9 est aussi bien dépendante de l'engagement de la GPIIb-IIIa que du relarguage du CD40L par les plaquettes car l'inhibition de ces deux

mécanismes réduit significativement l'activité de dégradation de la matrice conférée aux cellules endothéliales [282]. Il s'avère que l'engagement de la GPIIb-IIIa est suffisant pour induire la libération de CD40L, qui ensuite provoque la libération de MMP.

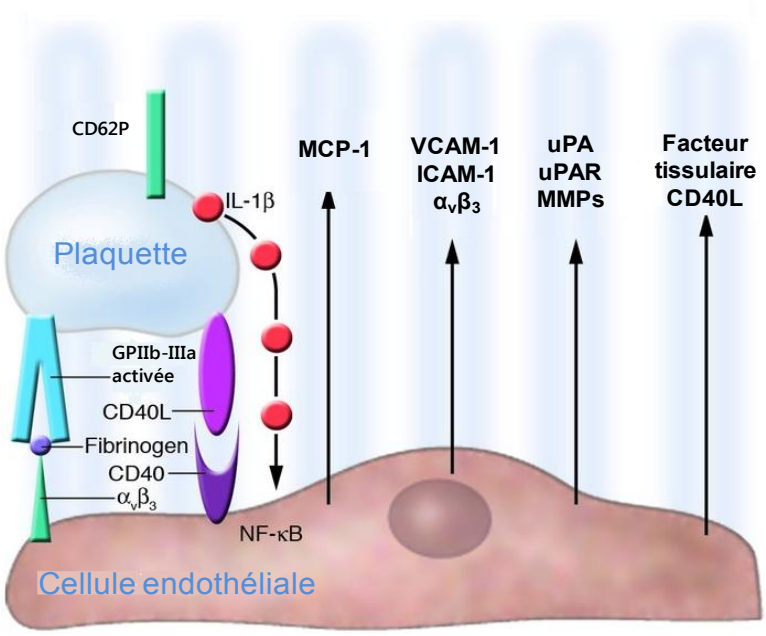


Figure 22 - Conséquence d'une adhésion ferme des plaquettes à la surface de l'endothélium

D'après Gawaz *et al.* [247]

L'adhésion des plaquettes à la surface de l'endothélium entraine, selon plusieurs mécanismes, une augmentation de son phénotype inflammatoire. i) L'adhésion définitive des plaquettes engage ICAM-1 et $\alpha_v\beta_3$. ii) Après adhésion, les plaquettes libèrent de l'IL-1β et du sCD40L, capables d'activer les cellules endothéliales via leur récepteurs spécifiques. L'activation endothéliale se traduit par une libération de cytokines/chimiokines (MCP-1, CD40L), l'expression de facteur d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) et le relarguage de protéases (uPA, MMP)

Ces résultats suggèrent que la libération de médiateurs proinflammatoires plaquettaires, comme le CD40L, peut être induite par l'engagement de la GPIIb-IIIa lors de l'adhésion aux cellules endothéliales, indépendamment de la présence d'un autre agoniste. Ce mécanisme est important dans la compréhension de la physiopathologie de l'inflammation car les plaquettes ayant fermement adhéré à l'endothélium peuvent amplifier localement l'inflammation.

Toutefois, le roulement des leucocytes semble être quant à lui dépendant de l'expression du CD62P par les plaquettes et donc de l'activation. En effet, il a été montré *in vivo* chez la souris que la perfusion de plaquettes activées induisait la libération du contenu des corps de Weibel-Palade au niveau des veines mésentériques aboutissant à l'expression de

CD62P par les cellules endothéliales. L'expression de cette intégrine favoriserait alors le roulement des leucocytes via leur récepteur PSGL-1 (leucocytes) [283].
En outre, la perfusion de plaquettes CD62P$^{-/-}$ ou de plaquettes non activées n'induisaient pas le roulement leucocytaire démontrant ainsi l'importance de l'activation plaquettaire, et l'expression de cette sélectine en particulier, dans ce phénomène.

La communication entre les plaquettes et l'endothélium n'est pas forcément directe ou juxtacrine. Au-delà de leur activité pro-coagulante, on évoque de plus en plus une fonction pro-inflammatoire des MPP [68], [284].

L'IL-1β contenu dans les MPP, libérées sous l'effet du LPS, est capable d'activer les cellules endothéliales de type HUVEC. Ces dernières, après 6h de contact avec des MPP purifiées, surexpriment à leur surface l'integrine VCAM-1. L'utilisation d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1β est capable d'inhiber cette surexpression de VCAM-1, démontrant à nouveau l'importance de l'IL-1β plaquettaire dans l'orchestration de la réponse inflammatoire [64].

Les plaquettes sont également capables d'assurer le transfert de matériel génétique vers l'endothélium. Ceci a dans un premier temps été montré *in vitro*, avec des particules mimant les plaquettes issues de la lignée Meg-01 stimulée par de la thrombopoïétine. Dans cette étude, les particules contiennent des ARNm codant pour la « green fluorescent protein » (GFP). Vingt-quatre heures après avoir été mises en contact avec ces microparticules, les cellules HUVEC expriment la GFP [285]. Cette expression est diminuée de moitié dans le cas où les microparticules avaient été préalablement traitées par de la RNase ; montrant ainsi qu'il ne s'agit pas d'un simple transfert de protéines mais aussi d'un échange d'ARNm capable d'être traduit par les cellules endothéliales.

Ce type de mécanisme a été confirmé *ex vivo* à partir de MPP humaines. Les MPP contiennent des microARN. Ces acides nucléiques non codants sont générés par la ribonucléase III Dicer et deviennent fonctionnels après s'être complexés avec la protéine Ago2. Leur rôle biologique est d'assurer la régulation de l'expression, principalement la répression, de gènes ; et près de 60% des gènes sont régulés de cette manière. Les microARN agissent spécifiquement, sur une séquence située dans la partie 3' non traduite de l'ARNm. Laffont *et al.* ont montré que ce complexe Ago2/miR-223 était contenu dans les MPP. Ces dernières sont capables d'être internalisées dans des cellules HUVEC, chez lesquelles la

présence de microparticules contenant les microARN permet de diminuer de 47% et 31%, au niveau ARNm et protéique, l'expression de deux gènes candidats (FBXW7 et EFNA1) [286].

Le rôle inflammatoire des microparticules intègre donc leur capacité à participer à l'interconnexion avec les cellules endothéliales. Le transfert de matériel génétique *via* les microparticules est quelque chose de plutôt récent. Il est donc fortement possible que des fonctions plaquettaires encore non reconnues puissent impacter sur la fonction inflammatoire de l'endothélium.

II - Participation des plaquettes au recrutement des leucocytes vers l'endothélium

La capacité des plaquettes à venir adhérer à l'endothélium peut être considérée comme une composante supplémentaire de la réponse inflammatoire, principalement grâce à l'augmentation du recrutement leucocytaire qui en découle.

De plus, les plaquettes ayant adhéré stablement à l'endothélium sont activées et expriment de nouveaux ligands pour les leucocytes, notamment les monocytes et les neutrophiles, leur permettant de les retenir au niveau de l'endothélium.

A. Les chimiokines plaquettaires

Au moment de la dégranulation, les plaquettes sont capables de relarguer de nombreuses chimiokines initialement contenues dans les granules α. L'évolution des techniques de protéomique a permi à l'équipe de von Hundelshausen de faire une mise à jour, relativement exhaustive, des chimiokines plaquettaires ; référencées dans le **tableau 3** [4].

Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études plus approfondies dont le RANTES. *In vitro*, en condition de circulation laminaire, les plaquettes activées déposent du RANTES à la surface de cellules endothéliales humaines issues de la microcirculation, ce qui favorise le recrutement des monocytes, mis en évidence par une augmentation de l'activité monocytaire au niveau des cellules endothéliales. L'utilisation préalable d'un antagoniste du récepteur du RANTES sur les monocytes empêche leur recrutement sur l'endothélium. De plus, la perfusion de plaquettes CD62P$^{-/-}$ activées *in vivo* chez la souris sur ne permet pas d'observer de recrutement monocytaire [287]. Ces résultats montrent l'importance du CD62P plaquettaire dans ce mécanisme de chimioattraction associé au RANTES plaquettaire. Ce processus peut même être amplifié après que le RANTES ait formé une liaison hétérophylique avec le PF4, lui-même d'origine plaquettaire [288].

Tableau 3 - Chimiokines plaquettaires
D'après Karshovska et al. [4]

Chimiokine	Gène	Nombre de copies / plaquette (technique protéomique : abondance spectrale)	Nombre de molécules / plaquettes (technique biochimique : ELISA)	Récepteur apparenté	Pathologie associée implicant les plaquettes
CXCL4 ("Platelet factor 4")	PF4	563 000	132 756	CXCR3	rôle angiostatique, cancer, mégacaryopoïèse, thrombocytopénie induite par l'héparine, "Acute Lung Injury", malaria, HIV, activité antimicrobienne,
CXCL7 ("Platelet basic protein")	PPBP	479 000	NR	CXCR2, DARC	néoplasie, mégacaryopoïèse, activité antimicrobienne
CXCL4L1 (PF4alt)	PF4V1	352 000	NR	CXCR3	rôle angiostatique, cancer
Macrophage Migration Inhibitory (MIF)	MIF	22 500	NR	CXCR2, CXCR4, CXCR7, CD74	inflammation
CXCL3 (MIP-2β, Gro-γ)	CXCL3	6 900	NR	CXCR2, DARC	ND
CXCL2 (Gro-β, MIP-2α)	CXCL2	6 700	NR	CXCR2, DARC	ND
CCL5 (RANTES)	CCL5	4 500	21.754	CCR1, CCR5, CCR3, CCR4	"Acute Lung Injury", HIV, athérosclérose, infarctus du myocarde
CXCL12 (SDF-1α)	CXCL12	3 900	3.202	CXCR4, CXCR7	remodellage vasculaire, regénération, angiogénèse, mégacaryo- et thrombo-poïèse, athérosclérose
CXCL5 (ENA-78)	CXCL5	3 500	NR	CXCR2, DARC	pneumonie
CXCL16	CXCL16	ND	NR	CXCR6	activation plaquettaire
CXCL8 (IL-8)	IL8	ND	134	CXCR1, CXCR2, DARC	prolifération et différenciation des progéniteurs hématopoïétiques
CCL4 (MIP-1β)	CCL4	ND	NR	CCR5, CCR10	NR
CCL3 (MIP-1α)	CCL3	ND	201	CCR1, CCR5, CCR10 (CCBP2, D6)	NR
CXCL6	CXCL6	ND	NR	CXCR1, CXCR2, DARC	NR
CCL21	CCL21	ND	NR	CCR7, CCR11 (CCRL1)	NR
CXCL14 (BRAK)	CXCL14	ND	NR	non décrit	NR
CCL20	CCL20	ND	NR	CCR6	NR
CXCL11 (I-TAC)	CXCL11	ND	NR	CXCR3, CXCR7, DARC	NR
CCL18 (PARC)	CCL18	ND	NR	DARC	NR
CXCL1 (Gro-α)	CXCL1	ND	388.082	CXCR2, DARC	athérosclérose
CCL17 (TARC)	CCL17	ND	1.029	CCR4, DARC, CCR10	eczema atopique
CCL7 (MCP-3)	CCL7	ND	696	CCR1,CCR2,CCR3,CCR5,DARC,CCR10	NR
CCL15	CCL15	ND	33	CCR1, CCR3, DARC	NR
CCL8 (MCP-2)	CCL8	ND	3	CCR2, CCR3	NR
Actine cytoplasmique 1	ACTB	795 000	NR		
Intégrine GPIIb (CD41)	ITGA2B	83 300	NR		
Intégrine GPIIIa (CD61)	ITGB3	64 200	NR		
CD62P	SELP	8 900	NR		
ND : Non Détectable	NR : Non Renseigné	Les molécules grisées sont mentionnées à titre de comparaison			

D'abord montré comme un facteur pro-coagulant, le PF4 possède des propriétés chimioattractantes (Deuel *et al.*, 1981). Ce facteur plaquettaire est retrouvé dans le sérum à une concentration capable d'assurer la chimioattraction des monocytes et des neutrophiles. Cette concentration peut être augmentée localement, à l'endroit de la lésion inflammatoire [289]. Il a été montré qu'en plus d'assurer la chimioattraction des leukocytes, le PF4 pouvait favoriser la différenciation des monocytes en empêchant leur apoptose et favorisant leur différenciation en macrophages, avec l'acquisition de marqueurs carboxypeptidase M/MAX1 et CD71 [290]. Les auteurs proposent ainsi un rôle supplémentaire du PF4 dans la réponse inflammatoire.

Plus récemment, le rôle de la sérotonine a été revisité. Cette molécule est un important neurotransmetteur ; la majorité de la sérotonine non neuronale est produite au niveau intestinal, dans les cellules chromaffines ; la sérotonine intervient dans la motilité intestinale. Lorsque la sérotonine passe dans le compartiment sanguin, elle est exclusivement prise en charge par les plaquettes, via les « serotonin transporters » (SERT) [291]. La lignée mégacaryocytaire ne semble pas produire de sérotonine ; la sérotonine plaquettaire est donc exclusivement captée à partir de la circulation. Elle intervient dans la première phase de l'hémostase en provoquant la vasoconstriction [292].

La sérotonine plaquettaire est également impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire. Quatre heures après l'induction de l'inflammation chez des souris Tph1$^{-/-}$, un modèle animal déficient en sérotonine non neuronale, l'extravasation des neutrophiles au niveau des poumons, du péritoine et des vaisseaux cutanés est significativement plus faible que chez les souris sauvages. Au niveau moléculaire, cela s'explique par le fait que les souris Tph1$^{-/-}$ présentent une diminution de 50% du roulement des neutrophiles. La sérotonine favoriserait donc l'activité des sélectines endothéliales impliquées dans le roulement des cellules à la surface de l'endothélium. La spécificité de ce facteur dans ce mécanisme a pu être confirmé par l'injection de sérotonine recombinante chez des souris Tph1$^{-/-}$ ou le blocage de l'absorption de la sérotonine par de la fluoxetine chez les souris sauvage [293]. La sérotonine représente donc un autre facteur plaquettaire pouvant être impliqué dans le recrutement des leucocytes. La fonction inflammatoire de cette molécule est également considérée dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Chapitre 2 – IV C), pathologie dans laquelle la molécule plaquettaire maintient un état inflammatoire délétère [294].

D'autres facteurs inflammatoires plaquettaires solubles peuvent être impliqués dans le recrutement des monocytes et des neutrophiles. Ils sont découverts au fur et à mesure de la considération des plaquettes dans les pathologies inflammatoires. C'est l'exemple du sCD40L impliqué dans le recrutement des neutrophiles dans le sepsis intestinal [221], mécanisme développé dans le Chapitre 1 – III B.

B. Les plaquettes en tant qu'effecteurs du recrutement secondaire des leucocytes

Les plaquettes activées expriment des protéines qui leur permettent d'interagir directement avec les leucocytes. L'expression de ces ligands à la surface plaquettaire est notamment favorisée par un environnement inflammatoire. C'est pour cela qu'il s'observe une augmentation du nombre d'agrégats plaquettes-leucocytes dans certaines pathologies inflammatoires [256].

Les plaquettes qui ont adhéré fermement à la surface de l'endothélium ont un phénotype activé ; leur surface peut alors retenir les leucocytes de la circulation et favoriser leur extravasation. Dans le cas où les plaquettes interviennent physiquement dans le recrutement des leucocytes, on parle de « recrutement secondaire des leucocytes ». Cela est principalement valable pour les cellules inflammatoires impliquées dans la transmigration endothéliale, c'est-à-dire les monocytes et les neutrophiles (ou polynucléaires neutrophiles = PMN) [295].

Ahn *et al.* rapportent qu'en condition dynamique, les plaquettes semblent se lier plus facilement aux monocytes qu'aux neutrophiles [296]. Cependant, il est important de ne pas négliger les neutrophiles car ces cellules sont prédominantes dans les infiltrats inflammatoires de plusieurs pathologies inflammatoires telles que l'ALI associé au sepsis [224], les infections bactériennes [232] ou encore les maladies inflammatoires intestinales (IBD) [297]. De plus, les neutrophiles sont capables de migrer dans les principaux organes (rate, foie, poumon) en moins de 15 min [298].

C. Adhésion des plaquettes aux leucocytes

D'un point de vue moléculaire, le contact entre les deux types cellulaires est initié par l'exposition du CD62P plaquettaire, reconnu par le PSGL-1 des leucocytes [299].

Une étude portant sur les plaquettes et les PMN montre qu'en condition dynamique et pour un ratio de 1 :10, les deux types cellulaires se lient dès la première minute. L'ajout de Ca^{2+}, de Mg^{2+} et de Mn^{2+} favorise cette interaction [300].
Le fait que le CD62P soit clivé de la surface des plaquettes quelques heures post-activation pose toutefois la question de la stabilité dans le temps des complexes plaquettes-leucocytes mais il s'avère que les deux phénomènes sont indépendants [301].

L'engagement du PSGL-1 amorce l'activation leucocytaire. En effet, un signal « inside-out » conduit à un changement conformationnel de l'intégrine CD11b/CD18, appelée également Mac-1 ou αMβ2 [300], [302]. La cascade moléculaire entrainant l'activation de cette intégrine implique les tyrosines kinases de la famille Src qui viennent phosphoryler Naf-1, le domaine intracytoplasmique de PSGL-1[303]. Les kinases de la voie PI3K, la PLC[304] et Rap-1, une GTPase [305] pourraient aussi être impliquées.

Du côté plaquettaire, la reconnaissance de Mac-1 peut se faire d'une manière directe ou indirecte. Dans le premier cas, Mac-1 a la possibilité de se lier à la GPIb [306], à la « junctional adhesion molecule 3 » (JAM-3) [307], ou bien encore à l'«intercellular adhesion molecule-2 » (ICAM-2) [308], qui sont trois protéines constitutives des plaquettes. Dans le cas où la liaison est indirecte, le fibrinogène ponte Mac-1 et son récepteur de surface plaquettaire, la GPIIb-IIIa [309].

En plus du fibrinogène, Mac-1 lie le kininogène de haut poids moléculaire. Comme décrit dans la voie intrinsèque de la coagulation, cette protéine sanguine est à son tour reconnue par la GPIb plaquettaire [310].

Diacovo *et al.* ont étudié les neutrophiles de patients atteints d'une déficience en β2 intégrine (patients LAD-I) [311]. Les neutrophiles isolés de ces patients sont capables d'assurer le roulement sur une surface plaquettaire activée mais aucune adhésion ferme n'est observée. Comme lors du roulement classique à la surface de l'endothélium, l'implication des intégrines permet de stabiliser l'adhésion des neutrophiles à la surface des plaquettes. Le signal « outside-in » par l'engagement de Mac-1, qui cible la « prolin-rich tyrosine kinase-2 » (Pyk2), est nécessaire pour stabiliser l'adhésion de l'intégrine aux plaquettes [312] (**figure 23**).

Bien que le couple PSGL-1 et CD62P ne soit que transitoire dans l'adhésion des plaquettes aux leucocytes myéloïdes, il n'en demeure pas moins important. Il a même été montré comme essentiel à l'adhésion et à la migration des leucocytes [313]. L'absence de ces

deux molécules semble même plus délétère que celle de Mac-1 pouvant surement être compensée par d'autres molécules peut être même encore inconnues.

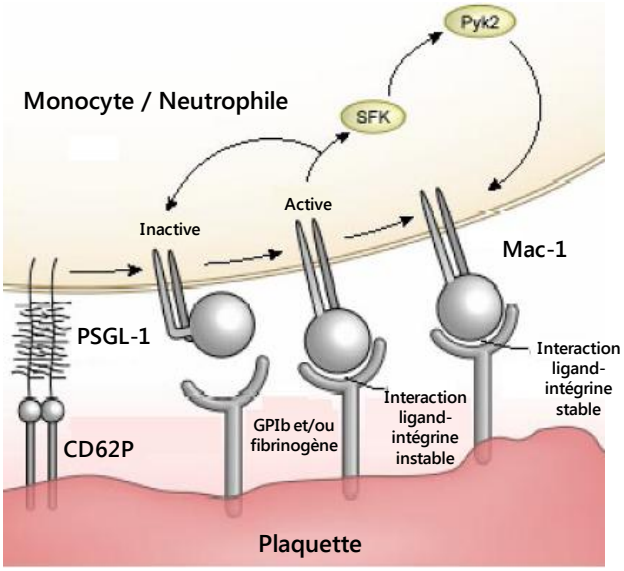


Figure 23 - Modélisation de l'activation de Mac-1 au cours de l'adhésion plaquette-neutrophile
D'après Evangelista *et al.* [303]

L'activation du Mac-1 fait intervenir 3 étapes: i) activation initiale induite par la liaison plaquette-leucocyte et liaison de son ligand; ii) génération d'un signal "outside-in" implicant SFK et Pyk2; iii) stabilisation de liaison de l'intégrine

D'une manière similaire, l'engagement du CD40 par le CD40L plaquettaire ainsi que la liaison de TREM-1 résultent en une stimulation de l'adhésion des neutrophiles aux plaquettes [8]. Ceci s'explique par deux mécanismes : i) la liaison directe entre ligands et récepteurs qui vient agrandir la surface de liaison ; ii) l'engagement du CD40 conduit à une augmentation de l'expression de l'intégrine β2 ce qui permet une meilleure adhésion des leucocytes [314].

Le couple CD40L-CD40 favorise également la migration des neutrophiles. Le sCD40L plaquettaire va aussi favoriser, *via* les voies PI3K et NFκB, la réponse oxydative des neutrophiles, caractéristique de l'inflammation [315].

D'autre part, la thrombospondine libérée par les plaquettes activées se lie la molécule CD36 (GPIV), répartie aussi bien sur les plaquettes que les leucocytes. La molécule sert ainsi de lien et représente un autre moyen d'assurer l'interconnexion des deux entités cellulaires [316] (**figure 24**).

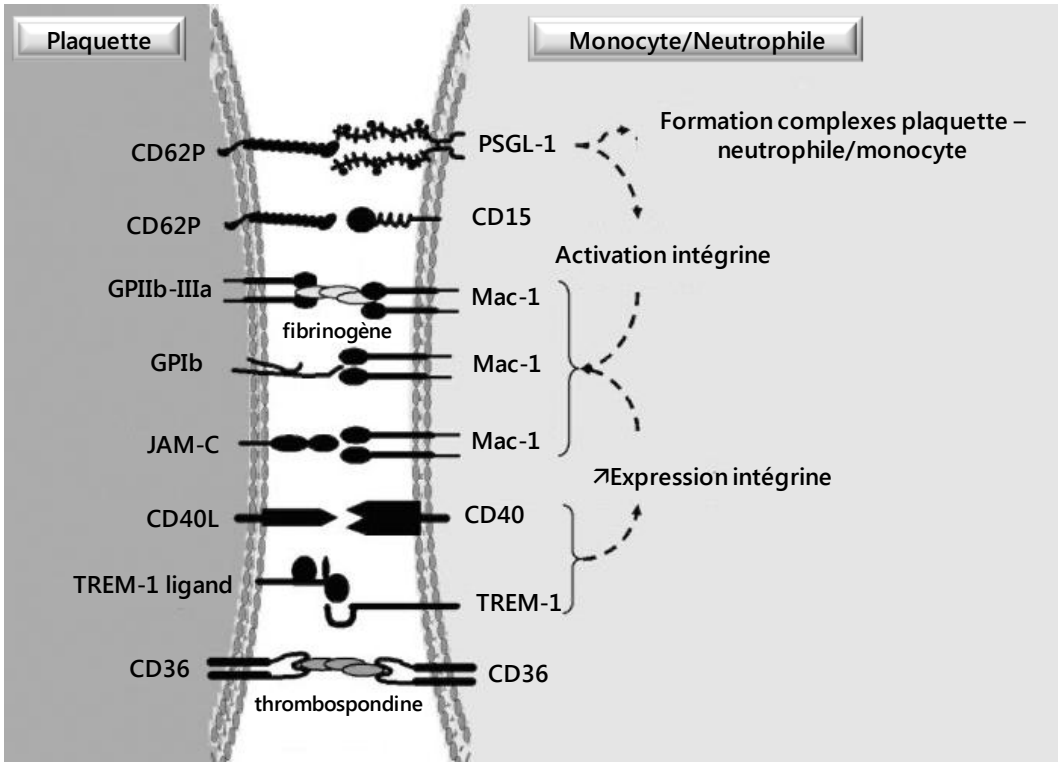


Figure 24 - Répertoire moléculaire de l'intéraction plaquette-monocyte/neutrophile

D'après van Gils *et al.* [8]

La liaison CD62P/PSGL-1 initie le contact entre les plaquettes et les leucocytes. Cette intéraction permet l'activation de Mac-1, qui vient consolider l'interaction en se liant à plusieurs récepteurs plaquettaires. D'autres couples ligand/récepteur sont eux impliqués dans l'augmentation de l'expression de Mac-1

D. Rôle des plaquettes dans l'activation tardive des leucocytes

L'activation des leucocytes par les plaquettes ne se limite pas à l'induction d'une surexpression des intégrines membranaires. Les plaquettes induisent également une activation plus tardive, conséquence de l'engagement de nombreux récepteurs (**figure 25**).

Dans un premier temps, les plaquettes induisent l'activation de la voie NFκB leucocytaire. C'est plus particulièrement le CD62P soluble, le RANTES et le PF4 libérés par les plaquettes qui agissent en concert afin d'activer le facteur de transcription. L'engagement de cette cascade de signalisation renforce alors le phénotype inflammatoire des leucocytes, ce qui se traduit par la synthèse de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8, le TNF-α le MCP-1, ou le MIP-1α aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique [317], [318][9].

Dixon *et al.* ont montré que l'adhésion prolongée des plaquettes à la surface des monocytes active le promoteur de COX-2 ce qui permet la synthèse d'eicosanoïdes,

molécules pro-inflammatoire [319]. Les ARNm de COX-2 sont rapidement dégradés mais l'IL-1β précédement synthétisé (sous l'action des plaquettes), vient stabiliser ces acides nucléiques. Dans cette étude, les signaux dérivés des plaquettes peuvent aussi bien agir au stade transcriptionel que post-transcriptionel au niveau des monocytes.

L'engagement de PSGL-1 favorise l'expression de protéines impliquées dans la protéolyse associée à l'inflammation : le couple urokinase (uPA)/uPAR et les MMP. Au-delà de ses activités de protéolyse péricellulaire, l'implication d'uPAR dans la migration des leucocytes a aussi été montrée. Ainsi, ce récepteur régulerait leur adhésion en modulant l'activité des intégrines [320]. De plus, il a été montré pour les cellules HEK293 et CHO que la liaison directe entre leur récepteur uPAR et la vitronectine entraine une modification morphologique des cellules, favorisant ainsi leur migration [321]. Il est tout à fait envisageable que ce mécanisme soit valable pour les leucocytes.

Les leucocytes activés par les plaquettes génèrent des ROS, libèrent des sérinoprotéases, de la myéloperoxidase et de la pentaxine-3 [322], ainsi que le facteur tissulaire [323]. Toutes ces molécules sont à leur tour capable de cibler l'activation plaquettaire ainsi que celle des cellules endothéliales.

Les ROS produits après une stimulation plaquettaire ont également un effet sur la perméabilité endothéliale. Ce mécanisme est détaillé dans la partie Chapitre 2 – II E.

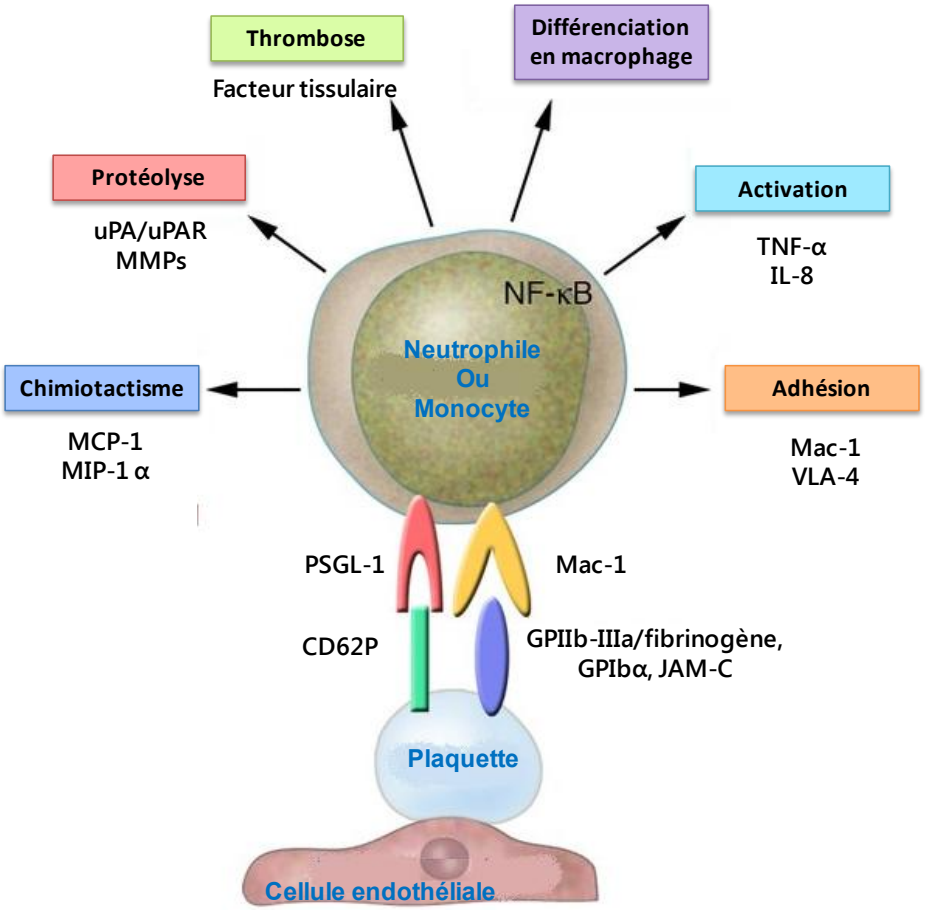


Figure 25 - Effet de l'adhésion des plaquettes sur l'activation tardive des monocytes/neutrophiles
D'après Gawaz *et al.* [249]

Les plaquettes qui ont adhéré à la surface des monocytes/neutrophiles (via le CD62P et des intégrines plaquettaires) amplifient leur phénotype inflammatoire d'une manière précoce (activation de facteurs d'adhésion, induction de la protéolyse) ou tardive, principalement dépendante de l'activation du NFκB (libération de cytokines/chimiokines, différenciation cellulaire,…)

E. Rôle des plaquettes dans la migration des leucocytes

Les plaquettes sont également impliquées dans le franchissement de la barrière endothéliale par les leucocytes. En effet, les neutrophiles complexés aux plaquettes présentent un meilleur recrutement vers l'intima que les neutrophiles seuls. Ces observations sont étayées par deux mécanismes :

i) L'engagement des récepteurs aux chimiokines, récepteurs couplés aux protéines G, par les chimiokines plaquettaires provoque une seconde vague d'activation chez les leucocytes ayant préalablement adhéré aux plaquettes.

Ceci peut conduire à une surexpression de Mac-1 et d'autres intégrines dont l'α4β1 (VLA-4) [8] et l' α L β 2 (LFA-1) [302].

Simultanément, les plaquettes continuent aussi d'activer l'endothélium et entrainent l'expression de contre-récepteurs pour les intégrines nouvelles exprimées par les leucocytes. Parmi ces ligands, ICAM-1 et VCAM-1 reconnaissent respectivement LFA-1 ou Mac-1 et VLA-4 [278], [280]. Ce mécanisme bidirectionnel mis en place par les plaquettes contribue à consolider l'adhésion des leucocytes à l'endothélium.

ii) En favorisant l'activation leucocytaire, les plaquettes induisent une surproduction de ROS par les leucocytes. Une étude portant chez le rat montre que les ROS produits par les neutrophiles déclenchent une augmentation de la concentration en Ca^{2+} au niveau de l'endothélium mésentérique. Cette modification de la concentration intracellulaire en calcium est corrélée à une augmentation de la perméabilité de l'endothélium ; ce phénomène est mesuré par une augmentation de la conductivité hydraulique (mesure physique proportionnelle à la perméabilité de la barrière endothéliale des animaux utilisés). L'utilisation d'agents antioxydants réduit cette conductivité, ce qui permet de conclure sur la spécificité des ROS dans ce phénomène de perméabilité [324].

Les plaquettes peuvent aussi être directement impliquées dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Cloutier *et al.* ont développé cette idée à partir d'un modèle murin d'arthrite autoimmune, pathologie inflammatoire présentant des oedèmes tissulaires associés à une augmentation de la perméabilité de la microvaisseaux synoviaux. Les espaces inter-endothéliaux sont visualisés en microscopie électronique, ainsi que par l'utilisation de micropshères de polystyrène injectées par voie intraveineuse et visualisées par microscopie intravitale à fluorescence au niveau des articulations des membres inférieurs. Lorsque ces souris arthritiques sont déplétées en plaquettes, *via* l'utilisation d'un anticorps anti-CD42, la perméabilité endothéliale au niveau des articulations inflammatoires est abolie (**figure 26**). Ce résultat est contraire au rôle primaire des plaquettes qui est de préserver l'intégrité de l'endothélium. C'est en fait la sérotonine plaquettaire, libérée après engagement de la GPVI qui est à l'origine de ces interstices. La sérotonine fraîchement libérée agit seule, indépendement des neutrophiles [294].

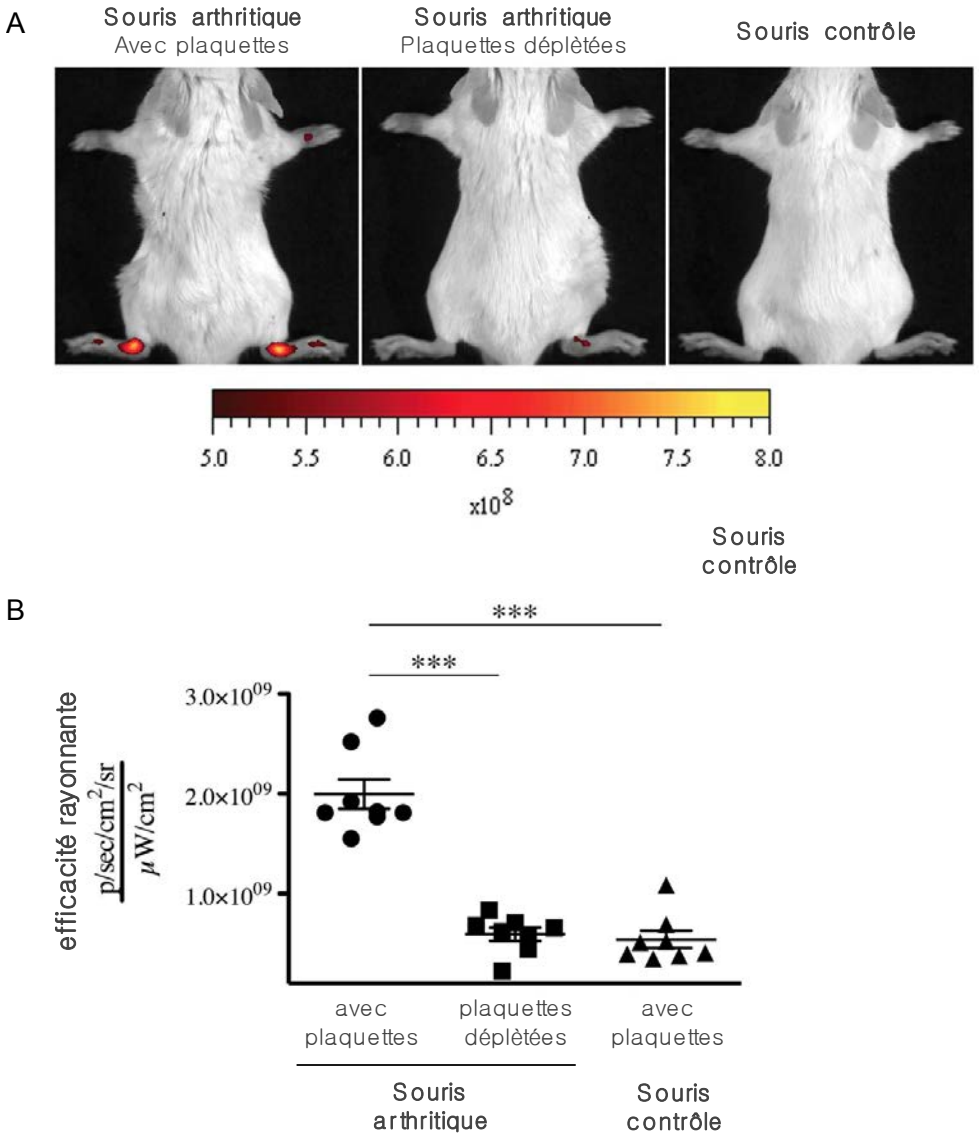


Figure 26 - Implication des plaquettes dans la perméabilité endothéliale associée à la polyarthrite rhumatoïde

D'après Cloutier *et al.* [285]

(A) *Souris observées sous microscopie intravitale à fluorescence. La dépletion plaquettaire est induite par un anticorps monoclonal dirigé contre la GPIb. L'arthrite est induite par l'injection de sérum K/BxN, décrit pour contenir des autoanticorps induisant le développement de la polyarthrite rhumatoïde. Les microsphères (0,45 µm) fluorescentes sont injectées par voie intraveineuse 4 jours après l'induction de la polyarthrite rhumatoïde et la fluorescence est déterminée 5 minutes plus tard au niveau de l'articulation de la cheville. Les souris non arthritiques sont utilisées comme contrôles.*

(B) *La mesure de l'efficacité rayonnante,valeur normalisée de l'émission de fluorescence donne un un aspect quantitatif de la perméabilité endothélial. Les valeurs correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour 8 souris ± SEM. La triple astérisque indique une réduction significative (p<0.001) de l'efficacité rayonnante comparativement aux souris arthritiques avec plaquettes*

III - Impact du microenvironnement inflammatoire sur l'interconnexion plaquette –leucocyte

Plusieurs études rapportent que la participation des plaquettes dans la migration des leucocytes est favorisée par un microenvironnement inflammatoire, comme la diminution du pH. En effet, Etulain *et al*. ont montré que l'expression du CD62P plaquettaire est favorisée par une acidose extracellulaire [325]. En plus de promouvoir la formation d'agrégats plaquettes-leucocytes, cette acidité facilite aussi la migration des neutrophiles.

Certaines caractéristiques associées au statut inflammatoire telles que les nombreuses cytokiniques libérées, la présence de produits bactériens comme le LPS, le faible pH retarde la mort des neutrophiles. Même si les mécanismes mis en jeu par les plaquettes pour assurer la survie leucocytaire ne sont pas élucidés, le contact direct entre les deux types cellulaires aussi bien que la libération de facteurs plaquettaires semble impliquée dans ce processus [326]. On note que les plaquettes et un pH faible peuvent être synergiques dans la prévention de l'apoptose des neutrophiles [325]. Cette observation renforce la notion que le milieu inflammatoire favorise l'activité des plaquettes dans l'entretien de l'inflammation.

D'une manière similaire, la température du microenvironnement apparait aussi comme un modulateur de l'activation plaquettaire. L'exposition des plaquettes à une forte température (à partir de 40°C) diminue significativement l'expression du CD62P à la surface des plaquettes, leur capacité d'agrégation ainsi que la libération de facteurs tels que l'ATP ou le thromboxane A2. Ces résultats suggèrent alors que l'hyperthermie limite l'activité hémostatique des plaquettes mais ne permet pas de conclure sur leur activité inflammatoire dans la mesure où peu de facteurs inflammatoires ont été évalués [327].

Il serait intéressant de considérer d'autres facteurs physiques associés à l'inflammation comme la tuméfaction locale entrainant une force de compression et d'autres formes de stress mécanique afin de comprendre comment un environnement inflammatoire peut influencer l'activation de ces nouvelles cellules inflammatoires.

L'ensemble des données synthétisées dans les deux précédentes sections insistent sur le fait, qu'au niveau du site inflammatoire, les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales sont en constante interconnexion et forment ainsi des boucles d'activation. Les plaquettes sont au centre de l'activation et de la communication des cellules inflammatoires en amorçant aussi bien l'activation de l'endothélium que celle des monocytes et neutrophiles.

La participation des plaquettes dans la migration des leucocytes ne fait plus de doute, ce qui tend à revoir le schéma classique de l'extravasation des leucocytes. Inversement, les leucocytes activés libèrent un certain nombre de molécules qui sont à leur tour capable de suractiver les plaquettes. C'est notamment le cas de du NO, des protéases, des facteurs tissulaires et de l'acide arachidonique (synthétisé *via* la synthèse de COX-2). Ces molécules vont également influencer la réponse hémostatique expliquant alors la pathogénèse des pathologies thromboinflammatoires comme l'athérosclérose, les endocardites ainsi que d'autres atteintes cardiovasculaires.

Au-delà de la réponse inflammatoire, il est également important de considérer la participation des plaquettes, relativement ubiquitaire, dans la réponse immunitaire adaptative *via* l'activation d'autres leucocytes. Il a été montré une forte collaboration entre les lymphocytes et les plaquettes, grâce à laquelle ces dernières viennent renforcer leur activité cellulaire et humorale des lymphocytes [328]. Comme le montre la **figure 27**, l'influence des plaquettes sur toutes les sous-populations lymphocytaires est multiple.

Les plaquettes peuvent influencer la fonction lymphocytaire *via* une interaction cellule-cellule et/ou par des médiateurs solubles. Le couple CD40-CD40L est classiquement décrit comme un signal de co-stimulation dans l'activation des lymphocytes [329], [330]. Un intérêt particulier a donc été porté au CD40L plaquettaire. Les études effectuées par l'équipe de Ratliff montrent que cette molécule a en fait un rôle majeur dans le lien entre immunité innée et adaptative.

L'utilisation de souris KO pour le CD40L a permis de montrer que le CD40L plaquettaire est capable d'augmenter l'activité cytolytique des lymphocytes T CD8+ en réponse à une stimulation par un adénovirus [331]. Cette réponse due au signal CD40L des plaquettes est brève et pourrait donc ne pas être effective à long terme. Cependant, les plaquettes sont très rapidement mobilisées et très riche en CD40L ; elles pourraient donc être utilisées comme un outil venant rapidement initier la réponse adaptative.

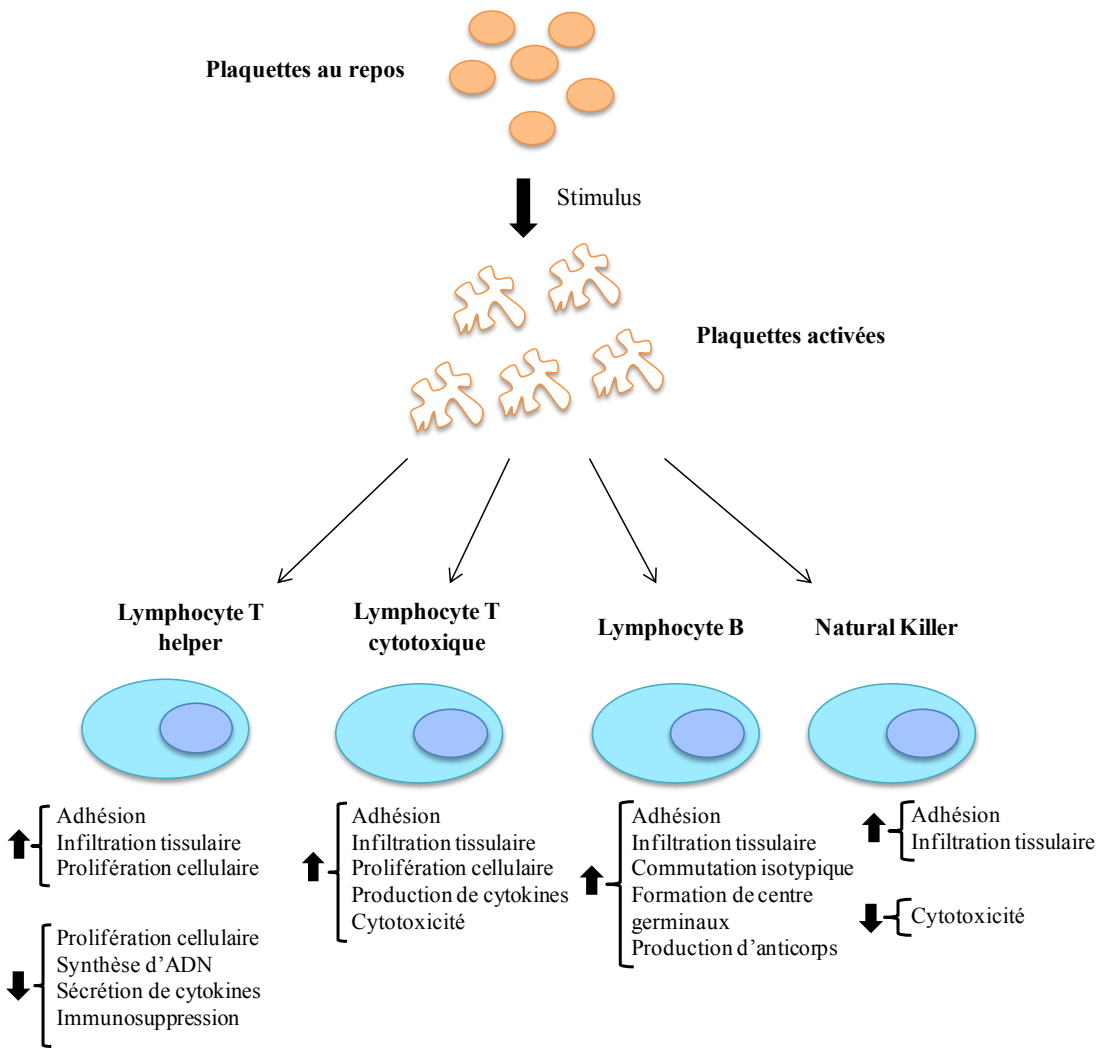


Figure 27 - Impact des plaquettes sur la physiologie lymphocytaire
D'après Li *et al.* [319]

Concernant l'activation des lymphocytes B, le CD40L plaquettaire est important. La co-culture de lymphocytes B avec des plaquettes conduit à une activation mutuelle des deux types cellulaire, avec notamment une surproduction de sCD40L. Au niveau des lymphocytes B, cette activation s'accompagne d'une maturation cellulaire, manifestée par la production d'Ig. Les Ig produites sont principalement de type G, il est donc possible d'en déduire qu'en plus de favoriser la synthèse d'immunoglobulines les plaquettes favorisent la commutation isotypique [332]. Cette notion est confirmée par une étude menée chez la souris montrant une inhibition de la production d'IgG chez les souris CD154$^{-/-}$, phénomène restauré par l'injection de plaquettes isolées de souris sauvages [333].

Le CD40L plaquettaire est également impliqué dans l'interaction avec d'autres cellules de l'immunité. Les interconnexions possibles *via* le CD40L plaquettaire sont représentées dans la **figure 28**.

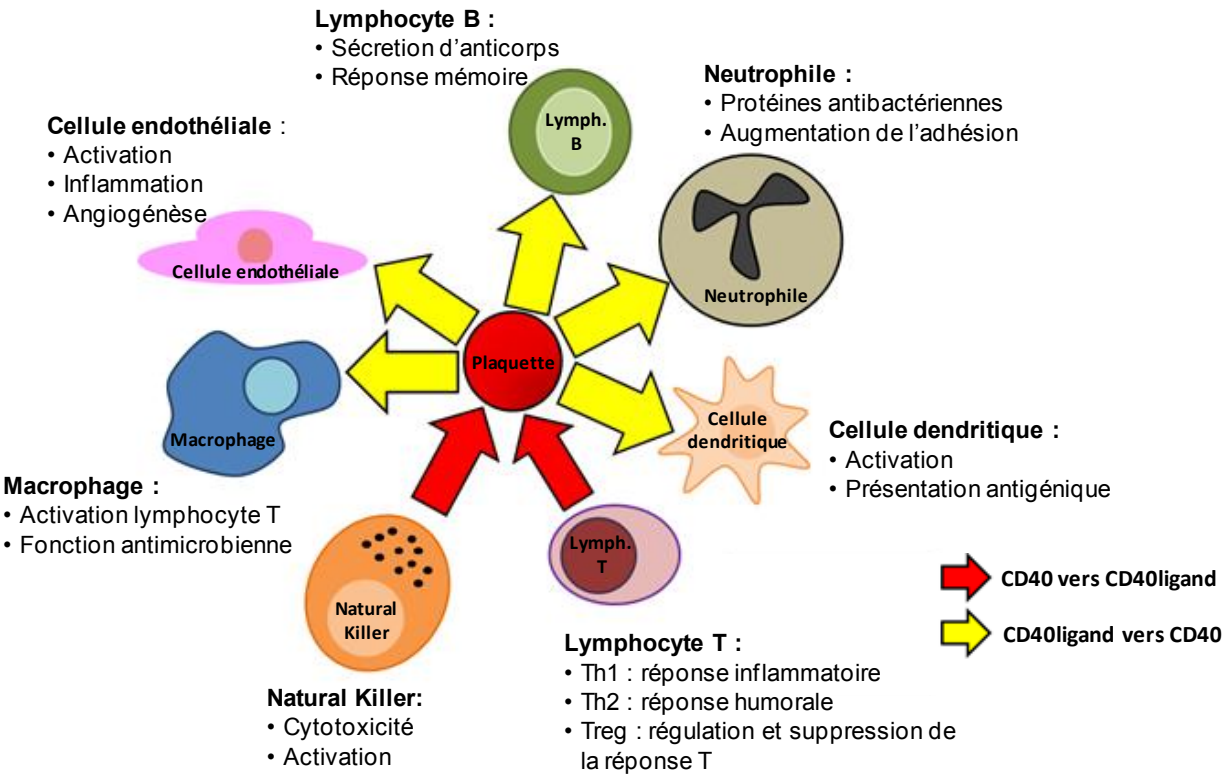


Figure 28 - Le CD40L dans les interconnexions plaquette-leucocyte

D'après Garraud *et al*. [325]

Le CD40L délivré sous forme de MPP est capable d'induire une production d'ARNm (codant MCP-1) par les lymphocytes B ainsi qu'une augmentation de la production d'IgG alors que l'ajout de CD40L soluble « classique » ne l'est pas. Le CD40L contenu dans les microparticules est alors conservé sous une forme très active pouvant être bénéfique dans le cadre de la réponse immunitaire [334].

Au-delà des protéines membranaires et du CD40L il reste encore de nombreux facteurs plaquettaires à découvrir ou redécouvrir comme ayant un effet biologique sur les cellules de l'immunité. Un des exemples illustrant cette perspective concerne les nucléotides. Très bien décrits dans l'activation secondaire de l'hémostase, les nucléotides plaquettaires semblent aussi être impliqués dans la maturation des cellules dendritiques, et ce d'une manière prédominante par rapport au CD40L et au CD62P [335].

Comme déjà mentionné dans la partie traitant de l'activation des cellules endothéliales par les plaquettes, les microARN plaquettaires forment actuellement un sujet en vogue. Ils sont d'autant plus intéressants dans la fonction inflammatoire des plaquettes car ils sont décrits pour réguler la fonction des cellules immunitaires dans l'athérosclérogénèse [336]. Les microARN plaquettaires semblent donc constituer un element de plus dans leur capacité de commucation avec les leucocytes.

IV - Coopération plaquettes- autres cellules de l'inflammation : application aux pathologies inflammatoires

L'interconnexion qu'il existe entre les plaquettes et les autres cellules de l'inflammation favorise la défense de l'organisme contre les agressions. Cependant un dérèglement des fonctions cellulaires peut conduire à une inflammation exacerbée. Dans ce cas là, les plaquettes contribuent donc à la physiopathologie de plusieurs maladies inflammatoires comme l'athérosclérose, l'inflammation pulmonaire, la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou bien encore les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI).

A. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie du réseau vasculaire, restreinte aux moyennes et grandes artères, caractérisée par l'accumulation de lipides, de lipoprotéines, ainsi que d'éléments cellulaires et fibreux au niveau de l'*intima* endothéliale. Tous ces compasants s'associent avec les protéines matricielles et forment alors la plaque d'athérome.

Au début des années 2000, l'athérosclérose représentait déjà 50% des causes de décès dans les sociétés occidentales. Ce fort taux de mortalité est en fait associé aux effets secondaires de l'athérosclérose. En effet, l'instabilité de la plaque d'athérome peut conduire à sa rupture, provoquant ainsi la dénudation de l'endothélium. Il s'en suit alors, selon les mécanismes classiques de l'hémostase, une thrombose du vaisseau pouvant conduire jusqu'à une obstruction complète de ce dernier [337].

Pendant très longtemps, les dépôts de cholestérol, sous forme de lipoprotéines, ont été considérés comme les responsables uniques de la formation de la plaque d'athérome.

Aujourd'hui, il est évidement que le développement de cette pathologie résulte d'un mécanisme plus complexe, associé à une inflammation chronique. En effet, les cellules spumeuses (macrophages ayant internalisé des lipoprotéines) retrouvées dans la plaque d'athérome ne résultent pas seulement d'une différenciation des cellules musculaires lisses en « macrophage-like cells » [338] mais bien d'un recrutement actif des monocytes circulants.

Une fois recrutés, les monocytes différenciés en macrophages continuent d'exercer leur fonction inflammatoire, ce qui favorise l'athérosclérogénèse : i) libération de cytokines (IL-1, TNF-α) et de facteurs de croissance (M-CSF) favorisant la migration et la prolifération des éléments cellulaires dans la plaque d'athérome ; ii) libération de protéases (collagénases, gélatinases, stromolysine et cathepsines) qui participent à l'instabilité de la plaque [337].

L'augmentation croissante du nombre d'études concernant la composante inflammatoire de l'athérosclérose a aussi montré l'implication d'autres cellules de l'inflammation. L'intervention des neutrophiles était considéré comme négligeable, mais quelques publications récentes montrent que ce type cellulaire participe aussi à la formation des lésions athérosclérotiques telles que la formation de cellules spumeuses, la déstabilisation de la plaquette d'athérome, l'érosion endothéliale et le recrutement d'autres types cellulaires au niveau de plaque d'athérome [339]. Quelques études portent également sur les lymphocytes T et des mastocytes [340].

Outre leur participation aux évènements thrombotiques, les plaquettes semblent également participer à la formation des lésions athérosclérotiques **(figure 29).** Cette hypothèse est soutenue par les résultats encourageants d'études cliniques testant des molécules anti-plaquettaires dans la prévention de l'athérosclérogénèse. En effet, au-delà de l'aspirine qui à plus son rôle dans la phase secondaire de la pathologie (l'instabilité de la plaque) [341], l'utilisation d'anti-plaquettaires semblent réduire les signes inflammatoires associés à la formation de la lésion arthérosclérotique. La prescription de clopidogrel, inhibiteur du récepteur du P_2Y_{12}, chez des patients athérosclérotiques entraine une diminution des biomarqueurs inflammatoires plaquettaires comme le sCD40L, la CRP et les complexes plaquettes/leucocytes, ce qui se traduit par un effet bénéfique sur les pathologies athérothrombotiques [342].

D'autre part, les statines sont devenues des molécules largement utilisées dans la prévention de l'athérosclérose car en favorisant les efflux de cholestérol, elles limitent l'hypercholestérolémie. Leur efficacité a été prouvée par une étude mondiale, menée par le « Heart protection group », qui montre que un traitement par les statines (simvastatin) diminue significativement le taux d'infarctus pour plus de 20 000 patients à haut risque [343]. En 2009, une étude montre que ces statines inhibent aussi l'activation plaquettaire, en jouant sur la PKC [344]. La prévention athérosclérotique liée à la prise de stastines peut donc être aussi la conséquence d'une inhibition de l'activation plaquettaire.

L'utilisation de souris ApoE$^{-/-}$ (modèle murin développant spontanément des lésions athérosclérotiques) montre, contrairement aux souris sauvages servant de contrôle, une adhésion ferme des plaquettes au niveau de l'endothélium carotidien. Ce phénomène est indépendant de la rupture de plaque car il s'opère dès 8 semaines de vie de l'animal. Cette interaction implique la GPIIb-IIIa plaquettaire et le blocage de cette intégrine permet de limiter, chez les souris ApoE$^{-/-}$, l'extension des stries lipidiques et l'aire de la plaque d'athérome [345]. Ces résultats montrent donc un rôle majeur des plaquettes dans l'athérosclérogénèse.

La présence des plaquettes à la surface des lésions athérosclérotiques favorise le recrutement des monocytes au niveau de l'intima *via* l'expression du CD62P et la libération de RANTES et de PF4 [346]. De plus, l'expression de la molécule CX(3)CR1, récepteur de la fractalkine, est particulièrement élevée pour les plaquettes de souris hyperlipidémiques et favorise la formation des complexes plaquettes-monocytes [347]. L'enzyme plaquettaire COX-1 semble également participer à l'adhésion des plaquettes à l'endothélium [348].

Toutefois, le rôle des plaquettes dans l'athérogénèse ne semble pas se limiter à l'accroissement de la migration des monocytes. En effet, les plaquettes pourraient participer à la différenciation des progéniteurs CD34^{+} en cellules spumeuses, processus qui semble dépendant d'un contact direct entre les deux types cellulaires (*via* le couple CD62P/PSGL-1) et la libération de MMP-9 plaquettaire [349].

Le couple CD40-CD40L participe également à l'athérogénèse dans la mesure où le blocage de cette interaction chez la souris permet de diminuer les événements précoces de la pathologie ainsi que leur progression [350], [351]. Toutefois, son inhibition ne suffit pas à stopper l'inflammation systémique associée à l'athéroslérose [343].

L'observation de NET au niveau des lésions athérosclérotiques pourrait aussi résulter d'une suractivation plaquettaire [353].

Bien que la plupart des études évaluant l'implication des plaquettes dans l'athérogénèse soient effectuées chez la souris, de plus en plus d'éléments tendent à extrapoler à l'homme les mécanismes décrits : activation plaquettaire systémique chez les patients athérosclérotiques [354], présence de facteurs plaquettaire [355], ou de NET [353] dans les plaques d'athérome.

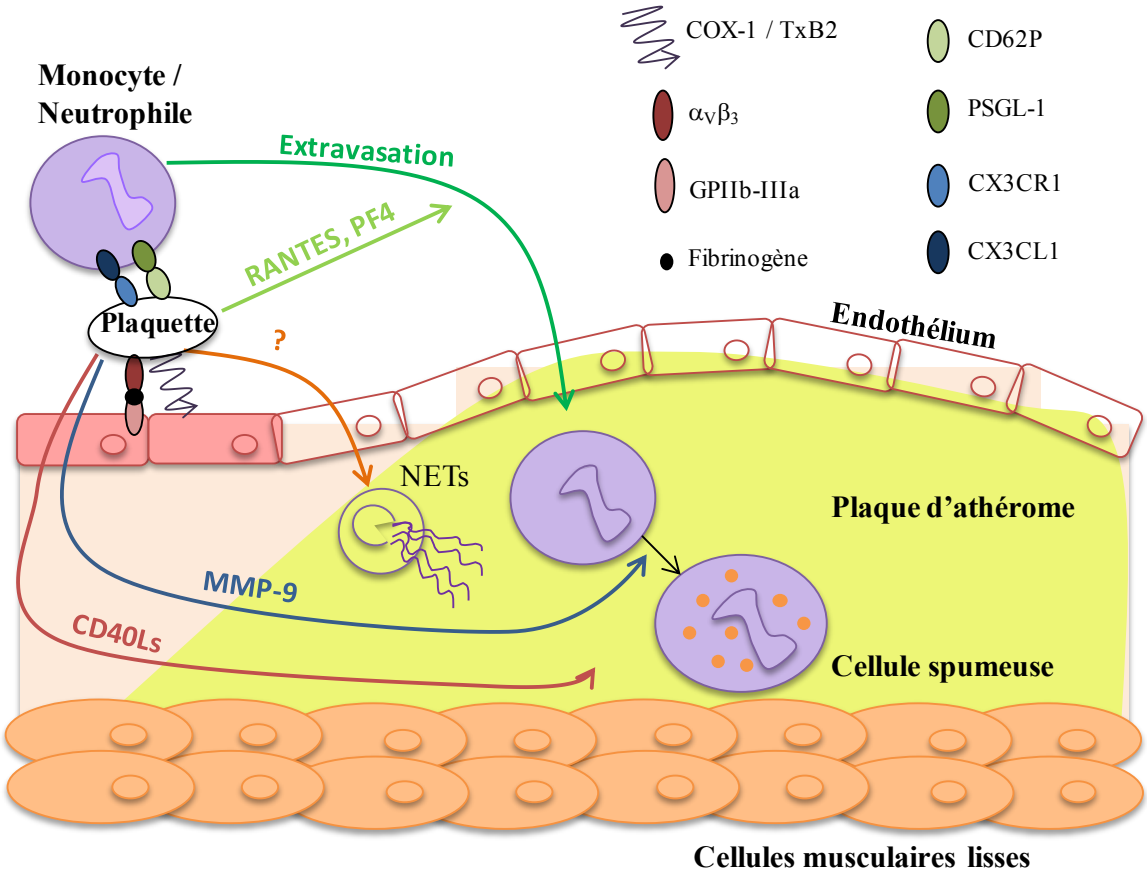


Figure 29 - Représentation schématique de l'implication des plaquettes dans le processus inflammatoire associé au développement de l'athérosclérose

Le RANTES et le PF4 plaquettaires participent à la chimioattraction qui précède l'extravasion des leucocytes, déjà activés grâce à l'adhésion des plaquettes à leur surface.
Grâce à la GPIIb-IIIa et Cox-1, les plaquettes favorisent le phénotype inflammatoire de l'endothélium athérosclérotique. Les MMP-9 plaquettaires participent à la différenciation des monocytes chimioattractés au niveau du sub-endothélium en cellules spumeuses.Le sCD40L mis en évidence dans la plaque d'athérome peut être issu des plaquettes. Il en est de même pour les NET présents dans la plaque d'athérome.

B. Pathologies pulmonaires

Dans la plupart des pathologies pulmonaires, l'altération des tissus est la conséquence d'une accumulation des neutrophiles au niveau alvéolaire. D'autre part, la fonction inflammatoire des plaquettes à la capacité de favoriser ce mécanisme de recrutement des neutrophiles. Afin d'évaluer l'implication des plaquettes dans les atteitntes pulmonaires, deux pathologies pulmonaires inflammatoires ont fait l'objet d'études plus approfondies : l'ALI et les allergies pulmonaires.

1) Acute Lung Injury (ALI)

L'atteinte pulmonaire aiguë ou« Acute Lung Ingury » (ALI) est une insuffisance respiratoire hypoxique dont une forme plus grave est le syndrome de détresse respiratoire aiguë ou « Acute Respiratory Distress Syndrome » (ARDS) est une complication remplissant les caractères présentés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 - Critères cliniques d'identification d'un Acute Lung Injury (ALI)
d'après Ware *et al.*[356]

Radiographie aux rayons X : Infiltration pulmonnaire bilatérale (indépendante d'une insuffisance cardiaque)
Pression artérielle pulmonaire : ≤ 18 mm Hg
PaO2 :FiO2 : ≤ 300

La réévaluation permanente des définitions tend à abandonner le terme ALI et de le remplacer par « ARDS modéré ». Ceci a été suggéré, en 2012, par la classification de Berlin [357] ; mais ce terme n'est pas encore communément reconnu.

Des données de 2010 montrent une incidence d'ALI de 86,2 personnes pour 100 000, par an. Bien que la mortalité ait diminué au cours des vingt dernières années, un taux de 29 à 42 % (variable selon la cause invoquée) fait que cette affection reste une préoccupation des services de soins intensifs [358].

Il est communément admis que la pathogénèse des ALI est associée à une réaction inflammatoire, qui résulte du dysfonctionnement de plusieurs types cellulaires. Ainsi, on observe, au niveau alvéolaire, une augmentation de la perméabilité de l'endothélium et de l'épithélium qui conduit à la formation d'un œdème. Ce phénomène favorise un influx de protéines en direction de la lumière alvéolaire menant à des dépôts de fibrine et à une à inactivation des surfactants. Les neutrophiles inflitrent également l'œdème, principalement sous l'effet de l'IL-8. Une fois recrutés au niveau alvéolaire les neutrophiles continuent d'exercer leur activité inflammatoire en libérant des cytokines, des protéases et des ROS [356]. L'implication des plaquettes dans les mécanismes décrits ci-dessus reste à éclaircir ; mais plusieurs observations sont en faveur de la participation des plaquettes dans le développement de l'ALI :

- En 1986, il avait déjà été montré par *George et al.* que les plaquettes circulent sous forme activée chez les patients présentant une détresse respiratoire. Ceci était caractérisé par l'expression membranaire de CD62P par les plaquettes mais également par la libération de thrombospondine [359]. La dégranulation plaquettaire associée à l'ALI peut donc également être à l'origine de la libération de thromboxane, de ROS et de PAF et de cytokines/chimiokine qui sont des facteurs plaquettaires capables d'amplifier l'inflammation en jouant sur les fonctions leucocytaires.

- L'augmentation des complexes plaquettes-leucocytes circulants est observée dans un modèle murin d'ALI induit par acidose [360]. Le blocage de l'interaction entre les plaquettes et neutrophiles améliore les échanges gazeux, diminue le recrutement pulmonaire des neutrophiles ainsi que la perméabilité de améliorant la survie des souris.

- Le CD62P plaquettaire, responsable de la liaison plaquettes-leucocytes, est au cœur du développement de l'ALI, et des phénomènes inflammatoires associés. L'engagement de son ligand est aussi bien impliqué dans l'activation pro-inflammatoire de l'endothélium *via* l'induction de l'expression d'ICAM-1 [360] que dans celle des leucocytes au travers d'une surexpression du CD11b et de VLA-4 [361].

- Les cytokines désécretées par les plaquettes, et notamment RANTES et PF4, ont une place importante dans l'orchestration de l'inflammation pulmonaire car l'utilisation d'anticorps bloquant ces deux molécules est capable de diminuer l'œdème pulmonaire et les dommages tissulaires associés en réduisant l'influx de neutrophiles et sur la perméabilité de l'endothélium [362].

- Les microparticules plaquettaires, au même titre que celles dérivées d'autres types cellulaires, sont considérées comme des biomarqueurs de l'ALI. A plus petite échelle que les plaquettes, elles sont capables de jouer directement sur la perméabilité de l'endothélium via leur contenu en TxA_2 [363]. Les MPP sont aussi riches en IL-1β, et, vont *via* cette molécule, pouvoir jouer un rôle pro-inflammatoire sur les cellules endothéliales [364]. Parallèlement, l'adhésion des microparticules à la surface des leucocytes induit l'activation de ces derniers et favorisent ainsi la libération d'IL-8, le «burst oxydatif », leur dégranulation et leur roulement [365], [366] .

Il semble donc que le CD62P et les cytokines plaquettaires, agissent comme un « starter » dans l'initiation de l'inflammation pulmonaire médiée par les neutrophile ; à laquelle peut s'ajouter les complications hémostatiques telles que les embolies pour lesquels la contribution des plaquettes évidente.

2) *Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI)*

Les causes d'ALI sont multiples : sepsis, pneumonie bactérienne, aspiration de contenu gastrique, virus épidémiques respiratoires comme ceux de la grippe ou SARS. Il existe aussi le TRALI pour «Transfusion Related Acute Lung Injury ». Afin des remplir les critètres du TRALI, l'atteinte pulmonaire aiguë doivent apparaitre, au maximum, dans les 72h qui suivent la transfusion sanguine [368].

Concernant la pathogénèse du TRALI, il a été proposé une hypothèse dite « two-hit » ou double frappe **(figure 30).** C'est-à-dire que l'atteinte pulmonaire se développerait en deux temps, avec l'intervention de deux types de médiateurs. i) Premièrement, une intervention de facteurs liés au receveur, capables de sensibiliser les cellules de l'inflammation, notamment en mobilisant les neutrophiles au niveau pulmonaire. ii) L'amplification de l'inflammation

pulmonaire par les facteurs contenus dans les produits sanguins labiles transfusés. La seconde frappe ne serait possible qu'après l'étape i) qui sensibilise le receveur [369].

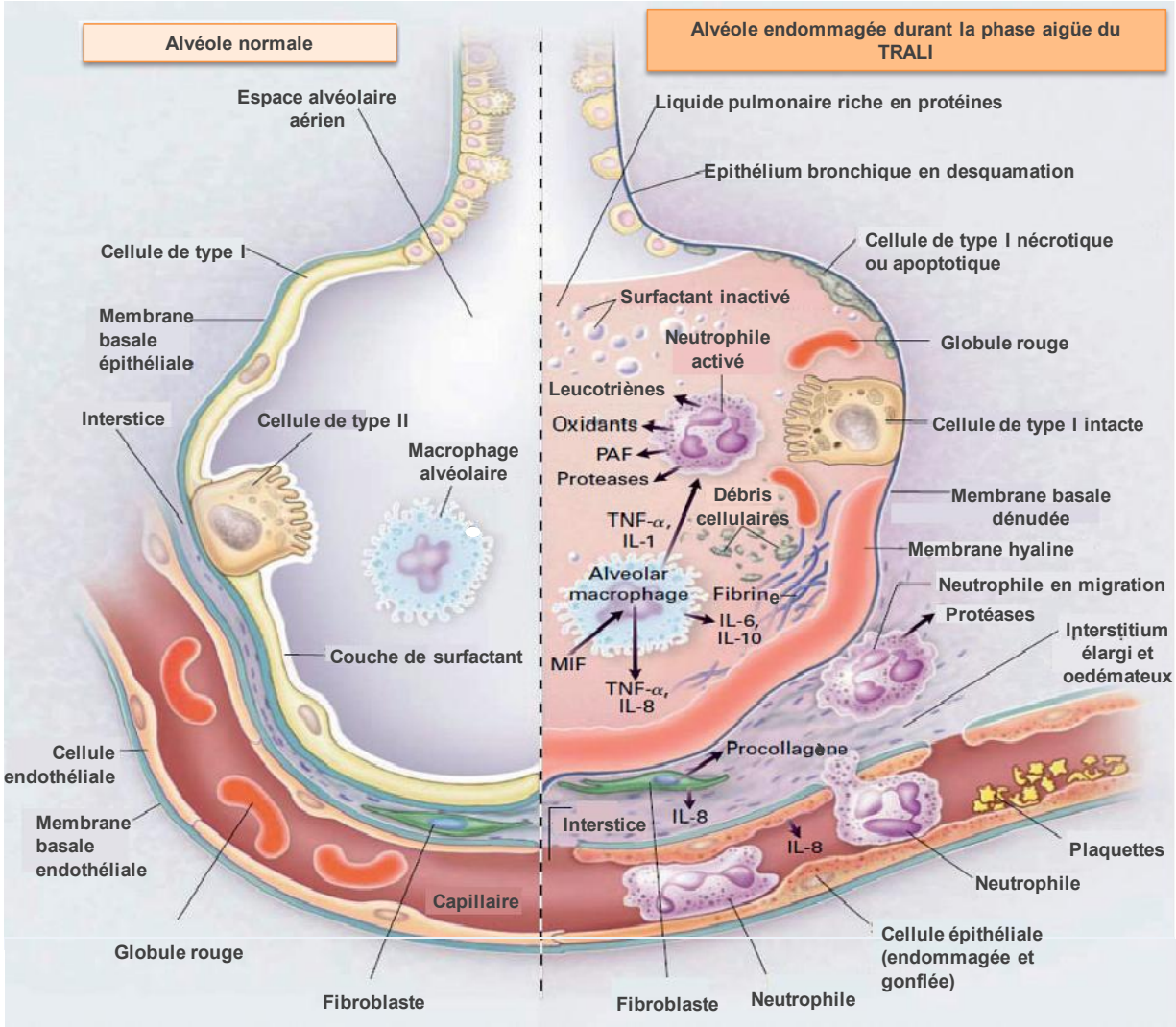


Figure 30 - Physiopathologie du TRALI selon le modèle double frappe
D'après Vlaar *et al.* [360]

*La **partie gauche de l'alvéole** correspond à une alvéole saine, sans trace d'inflammation. Pour l'induction du TRALI, la première frappe du syndrome, correspond à une pré-activation et à un recrutement des cellules immunitaires, principalement les neutrophiles, au niveau de la microvasculature pulmonaire,. Cette première frappe souligne, dans la plupart des cas, un désorde pulmonaire systémique du patient (sepsis, pneumonie). La seconde frappe, dont la plupart des mécanismes sont représentés dans **l'alvéole droite,** est causée par des médiateurs contenus dans le produit sanguin transfusé. Les neutrophiles pré-actvivés et recrutés au niveau de l'endothélium lors de la première frappe, migrent alors au niveau des alvéoles où ils continuent d'exercer leur fonction inflammatoire et empirent les conditions respiratoires, notamment à cause de l'oedème qu'ils forment.*

Le risque de développer un TRALI est plus élevé avec la transfusion de produits riches en plasma (concentrés plaquettaires, plasma) qu'avec des concentrés de globules rouge. Ceci s'explique par le fait que les facteurs du donneur impliqués dans le développement du TRALI proviennent principalement de cette fraction du sang. En effet, le développement du TRALI peut être imputé, par ordre d'incidence, à la transfusion passive d'anticorps anti-HLA (Human Leucocyte Antigen) I, anti-HLA II ou anti-HNA (Human Neutrophil Antigen) dirigés contre les antigènes du receveur. La liaison de ces anticorps à la surface des neutrophiles (anticorps HNA), des cellules endothéliales (anticorps HLA de classe I) ou bien des monocytes (anticorps HLA de classe II) exacerbe la réponse inflammatoire déjà pré-activée.

Bien que le rôle de ces anticorps soit bien décrit dans le développement du TRALI, il existe des cas de TRALI où ces anticorps ne sont pas détectables. Une hypothèse alternative a alors été émise quant à l'induction de cette pathologie. Le TRALI peut être induit par une accumulation de médiateurs proinflammatoires (lipides bioactifs ou cytokines/chimiokines) libérés par les cellules elles-mêmes lors du stockage de la poche [368].

Aussi, il est possible que les plaquettes transfusées participent à la pathogénèse du TRALI par leurs fonctions inflammatoires déjà citées pour l'ALI (Chapitre 2 – IV B). Au cours de leur conservation, les plaquettes s'activent et relarguent un certain nombre de facteurs pro-inflammatoires pouvant être l'origine d'un TRALI [227]. L'induction d'un TRALI suite à une transfusion plaquettaire a pu être confirmée dans un modèle murin (rat). Dans cette étude, le TRALI peut être induit aussi bien par du plasma riche en plaquettes que par des concentrés plaquettaires d'aphérèse ; en revanche seules les plaquettes qui ont été conservées cinq jours sont à l'origine du TRALI alors que la transfusion de plaquettes fraîches n'a aucune incidence sur la fonction respiratoire des rats [370]. Ces résultats démontrent alors l'incrimination de facteurs plaquettaires libérés au cours du stockage des produits plaquettaires.

Le sCD40L, dont la concentration augmente au cours du stockage des concentrés plaquettaires [371], [372], a été montré comme délétère dans cette pathologie. En effet, cette molécule a été retrouvée à une concentration significativement plus élevée dans les concentrés plaquettaires ayant entrainé un TRALI par rapport aux transfusions n'ayant pas induit d'incident/accident **(Tableau 5)**.

Tableau 5 - Concentration en sCD40L contenue dans les produits plaquettaires transfusés et associés à survenue d'un TRALI
D'après Khan *et al.*[371]

Type de produit sanguin	[CD40Ls] ng/ml	
	Non impliqués dans le TRALI	Impliqués dans le TRALI
Plasma frais	0,01 ± 0,003	non applicable
Plasma frais congelé	1,3 ± 0,013*	non applicable
Mélange de plasmas riches en plaquettes	7,9 ± 1,1*	14,0 ± 3,0*¥
Concentré plaquettaire d'aphérèse	11,8 ± 0,82*	44,7 ± 4,5*¥

Plasma frais n=5 ; plasma frais congelé n= 10 ; mélange de PRP sans TRALI n= 59 ; mélange de PRP sans TRALI n= 62 ; aphérèse sans TRALI n= 5 ; aphérèse avec TRALI n= 29
** p < 0,05 vs. plasma frais; ¥ p < 0,05 vs. produits plaquettaires n'ayant pas induit de réaction*

Il est important de préciser que les résultats reportés dans ce tableau sont valables pour les Etats-Unis. Les concentrés plaquettaires (et tous les produits sanguins labiles) trasfusés en France, à la différence des Etats-Unis subissent une leucoréduction drastique, dès les premières étapes de leur préparation et au non au lit du malade c'est-à-dire après conservation (et activité métabolique des leucocytes dans la poche) ; de plus, malgré l'existence de critères spécifiques déterminés lors de conférences de consensus, la politique de déclaration n'est pas toujours appliquée de la même manière.

Le sCD40L recombinant, utilisé à la concentration retrouvée dans les poches de plaquettes ayant induit un TRALI, est capable d'activer les polynucléaires *via* le CD40. Cette activation est caractérisée par une activité oxydase qui a un effet cytotoxique sur la lignée de cellules endothéliales HMVEC [371]. De plus, Kaufman *et al.* ont testé sur des fibroblastes de poumon, un surnageant de concentré plaquettaire déplété en sCD40L et l'ont comparé à un surnageant contrôle. Le surnageant dépourvu de sCD40L n'induit ni la libération d'IL-6, ni l'expression de cyclooxygenase-2 ni la production de prostaglandine E2 [373]. Le CD40L dérivé des plaquettes est donc capable d'instaurer une réponse inflammatoire sur des cellules pulmonaires.

Cependant, l'implication majeure du CD40L a été remise en cause par l'équipe de Juffermans qui ne parvient pas à démontrer l'implication du sCD40L sur un modèle de TRALI murin. Leur étude montre que l'utilisation de ciglitazone, inhibiteur de l'expression du CD40L plaquettaire, ou d'un anticorps antagoniste de la liaison CD40-CD40L n'a aucun effet sur l'inflammation et l'aboutissement du TRALI [374]. L'étude cas-cotrôles menées par

Toy *et al.* sur 89 cas de TRALI, répartis sur deux centres médicaux, ne permet d'associer les substances bio-actives telles que le sCD40L à un facteur de risque mais confirme l'implication majeure des anticorps anti-HLA dans le développement des TRALI [375].

Ce point reste donc débattu car il est possible que pour certains modèles animaux d'induction de TRALI n'impliquent peu ou pas le CD40L. De plus, Toy *et al.* reconnaissent l'absence de données (data non retournées) concernant ces facteurs d'intérêt. Du côté opposé, les études *in vitro* menées avec des molécules recombinantes sont à considérer avec précaution. Il est également envisageable que d'autres molécules plaquettaires, pas encore identifiées, soit impliquées dans la physiopathologie du TRALI ; comme c'est actuellement le cas pour les réactions transfusionnelles fébriles non hémolytiques et/ou les allergies avec l'OX40L soluble et l'IL-27 [376]. Par conséquent, des études cliniques humaines, associées aux travaux expérimentaux chez l'animal, demeurent indispensables afin de préciser les molécules plaquettaires mises en jeu au cours du TRALI.

La formation de NET a également été mise en évidence dans les poumons de souris après induction d'un TRALI [377]. Dans cette pathologie, c'est n'est pas leur rôle antibactérien qui est évalué, mais plus leurs conséquences délétères car ils augmentent la perméabilité de l'endothélium pulmonaire. Le ciblage des NET par un anticorps anti-histone diminue significativement le développement du TRALI en diminuant cette perméabilité endothéliale ainsi qu'en abaissant le flux liquidien conduisant à l'œdème. Cette étude montre que ce sont les plaquettes activées qui sont à l'origine de la formation des NET **(figure 31)** et qu'il est possible de prévenir leur formation en inhibant l'activation plaquettaire par de l'aspirine ou du tirofiban (inhibiteur de la GPIIb-IIIa) ; confirmant ainsi l'implication spécifique des plaquettes dans ce mécanisme. .

L'ensemble des observations synthétisées ci-dessus montrent que les plaquettes possèdent un répertoire inflammatoire assez diversifié pour être essentielles au développement des TRALI. Bien que leur participation soit indéniable, elles ne constituent qu' « une pièce du puzzle » au milieu de la triade donneur-produit-receveur [378].

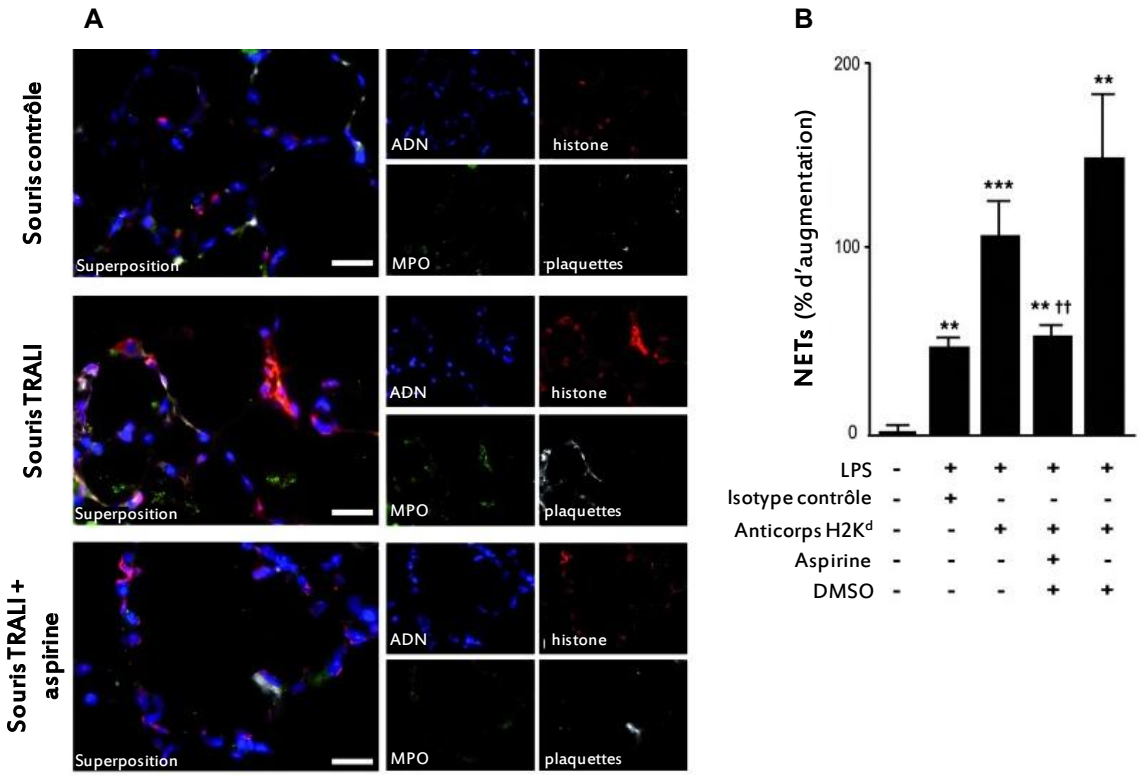


Figure 31 - Présence de NET dans les poumons de souris TRALI , Implication des plaquettes
D'après Caudrillier *et al.*[368]

(A) ***P**hotos de microscopie à immunofluorescnece représentatives de la formation de NET dans la microvasculature pulmonaire d'un modèle TRALI. Le TRALI est induit par l'injection de LPS (première frappe) et de l'anticorps H2K^d, anti-HLA (seconde frappe). L'ADN, les histones et la myéloperoxide (MPO) sont des constituants des NET retrouvés dans le milieu extracellulaire lors de la NETose. Les NET associés au TRALI colocalisent avec des plaquettes, suggérant l'implication des plaquettes dans ce processus. L'utuilisation d'asoirine inhibe la formation des NET observés dans les cas de TRALI. Barre d'échelle = 5 µm.*
(B) *La formation de NET est quantifiée (ELISA MPO-ADN) dans le plasma des différentes souris. Le TRALI est induit de la manière que décrite ci-dessus. Les résultats sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type (n<4). **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. les plaquettes qui ne reçoivent aucun traitement; ††P < 0.01 vs. le groupe TRALI plus DMSO.*

3) Les allergies respiratoires – Asthme

L'allergie respiratoire est une autre déclinaison de l'inflammation pulmonaire, qui contrairement à l'ALI, alterne entre phase aiguë (crise d'asthme) et forme chronique. Cette inflammation des bronches empêche le passage de l'air et provoque les symptômes de la crise d'asthme.

D'un point de vue mécanistique cette réaction est provoquée par des immunoglobulines, le plus souvent de type E, qui reconnaissent des allergènes le plus souvent environnementaux. La réaction allergène/immunoglobuline déclenche l'activation de plusieurs types cellulaires tels que les éosinophiles, les neutrophiles, les mastocytes et les lymphocytes T, mais aussi des plaquettes car ces dernières expriment également le FcεR, récepeteur aux Ig de type E. L'activation de ces différentes cellules inflammatoires provoque une infiltration leucocytaire au sein de la muqueuse pulmonaire ainsi que dommages de l'épithélium [379].

En 1985, Morley *et al.,* montraient un recrutement rapide des plaquettes au niveau des vaisseaux pulmonaires suite à l'exposition de l'antigène [380]. Cette mobilisation localisée laissait à penser qu'elle n'est pas anodine et que les plaquettes pouvaient participer à la physiopathologie des allergies respiratoires. Cette hypothèse a seulement été confirmée dans les années 2000. Les évolutions techniques ont permis de mettre au point un modèle murin d'allergie respiratoire. Pour ce faire, les souris sont sensibilisées à l'ovalbumine d'une manière intrapéritonéale. Quinze jours plus tard, ces mêmes souris sont soumises 3 fois à de l'ovalbumine en aérosol ce qui permet d'induire une inflammation localisée au niveau de niveau des poumons, caractérisée par un épaississement de l'épithélium et des muscles lisses ainsi que par un dépôt de fibres de collagène au niveau subendothélial. Lorsque ce modèle murin est rendu thrombopénique par l'utilisation d'un antisérum ou l'administration de busulfan, il y se produit une diminution significative de l'altération de l'architecture des voies aériennes [381]. Ces données confirment ainsi l'implication des plaquettes dans ce type d'inflammation pulmonaire.

D'un point de vue mécanistique, l'intervention des plaquettes passe par la formation de complexes plaquettes-leucocytes, dépendante du CD62P plaquettaire. L'adhésion des plaquettes à la surface des leucocytes entraine une augmentation de l'expression des intégrines CD11b et VLA-4 [361], ce qui favorise leur attachement à l'endothélium et donc leur migration. Ce phénomène est bien décrit pour les éosinophiles qui sont les principales cellules d'allergie **(figure 32).** Les mêmes observations sont faites pour les neutrophiles, qui en l'absence de plaquettes n'expriment pas le CD11b aussi fortement [382]. Le blocage du CD62P inhibe l'infiltration des leucocytes dans la muqueuse pulmonaire.

L'implication de cette molécule plaquettaire est une fois de plus confirmée suite à la transfusion de plaquettes issues de souris sauvages à des souris mutées pour l'expression de cette intégrine qui permet de restaurer le recrutement des leucocytes [382]. Les plaquettes sont donc bien responsables de l'activation des leucocytes impliquées dans inflammation pulmonnaire, ce qui facilite leur recrutement. L'application d'un modèle mathématique de corrélation a même permis de montrer une corrélation entre l'activation des plaquettes et celle des éosinophiles [383].

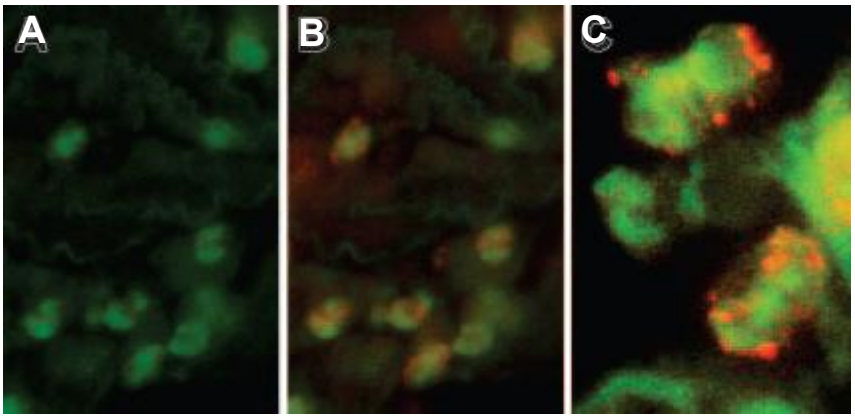


Figure 32 - Identification des complexes plaquette-éosinophile dans les vaisseaux de poumons de souris exposées à un allergène aérosolisé
D'après Pitchford *et al.* [353]

Les modèles murins sont sacrifiés 30 heures après la première exposition de l'allergène. Les poumons sont recupérés et les coupes de ceux-ci sont analysées en microscopie à immunofluorescence. La protéine MBP, spécifique des éosinophiles est marquée en vert et le CD41 plauquettaire en rouge. ***(A)*** *champ microscopique observé à travers le filtre laissant seulement passer la fluorescence vert (protéine MBP). Grossissement X 40.* ***(B)*** *Superposition d'images obtenues avec le filtre vert (MBP) et rouge (CD41). Grossissement X 40. Les éosinophiles sont complexés avec les plaquettes. (C) Grossissement X 100; permet de montrer l'attachement de plaquettes individualisées à la surface des éosinophiles.*

L'utilisation du même modèle murin montre que l'inactivation des plaquettes a des plus fortes conséquences sur le développement de la pathologique que le blocage du recrutement des leucocytes [381]. Ce résultat suggère que les plaquettes peuvent intervenir dans la pathogène de l'allergie pulmonaire par d'autres mécanismes que l'initiation du recrutement leucocytaire. Parmi ces mécanismes alternatifs, un rôle est imputé aux deux récepteurs du fragment Fc des IgE présent à la surface des plaquettes, le FcεRI et le FcεRII. Les FcεR sont initialement exprimés à hauteur de 20% sur les plaquettes et atteignent 50% pour les plaquettes isolées de patients présentant des IgE circulantes [384]. Leur

fonctionnalité dans les allergies respiratoires a été démontrée et son activation permet, d'une manière spécifique, la libération de RANTES et de sérotonine [385], deux molécules déjà décrites dans le processus allergique.

C. Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un rhumatisme inflammatoire chronique, qui affecte approximativement 1% de la population adulte mondiale. Elle se caractérise par une inflammation de la synoviale (tissu qui tapisse l'intérieur de la cavité articulaire), au niveau des petites et moyennes articulations des bras (coudes, mains) et des jambes (genoux, pieds) [386]. La destruction progressive de l'articulation provoque un handicap qui diminue la qualité de vie. La PR influencerait également l'espérance de vie par des épisodes inflammatoires aigus plus complexes et par une accélération du processus athérosclérotique [387].

Comme plusieurs pathologies inflammatoires, l'étiologie exacte de la PR n'est pas encore totalement élucidée. Des facteurs génétiques et environnementaux sont clairement mis en cause [386]. L'implication d'autoanticorps est également très possible [388].

Certains facteurs solubles libérés par les cellules mises en jeux dans la PR sont également responsables de la destruction osseuse. Un exemple bien décrit est la libération de MMP par les lymphocytes B et par les « fibroblast-like synovocytes » (FLS) stimulés par de l'IL-1 et du TNF-α. De plus, l'IL-17 libéré par les lymphocytes T, présente un effet potentialisateur sur la réponse des FLS stimulées par de l'IL-1 [389]. D'autres protéases comme les cathepsines et les aggrecanases semblent impliquées dans la destruction osseuse [386]. L'activation du système RANK/RANK Ligand (RANKL) par les lymphocytes T est également impliqué dans l'érosion osseuse associée à la PR [390].

Le phénomène érosif observé dans la PR ne se limite pas au tissu osseux car des interstices sont aussi présents au niveau de l'endothélium associé à la membrane synoviale ; phénomène favorisant ainsi la formation de l'œdème caractéristique de la PR [391]. Dans cette étude de 1975, la présence de plaquettes à proximité de ces espaces avait déjà été observée.

C'est seulement en 2012 que Cloutier *et al.* confirment ces résultats **(figure 33)** et montrent que c'est la sérotonine dérivée des plaquettes qui est à l'origine de la formation de ces interstices [294], d'où leur localisation. Le mécanisme décrit dans cette étude représente une façon par laquelle les plaquettes peuvent prendre part à l'inflammation des articulations.

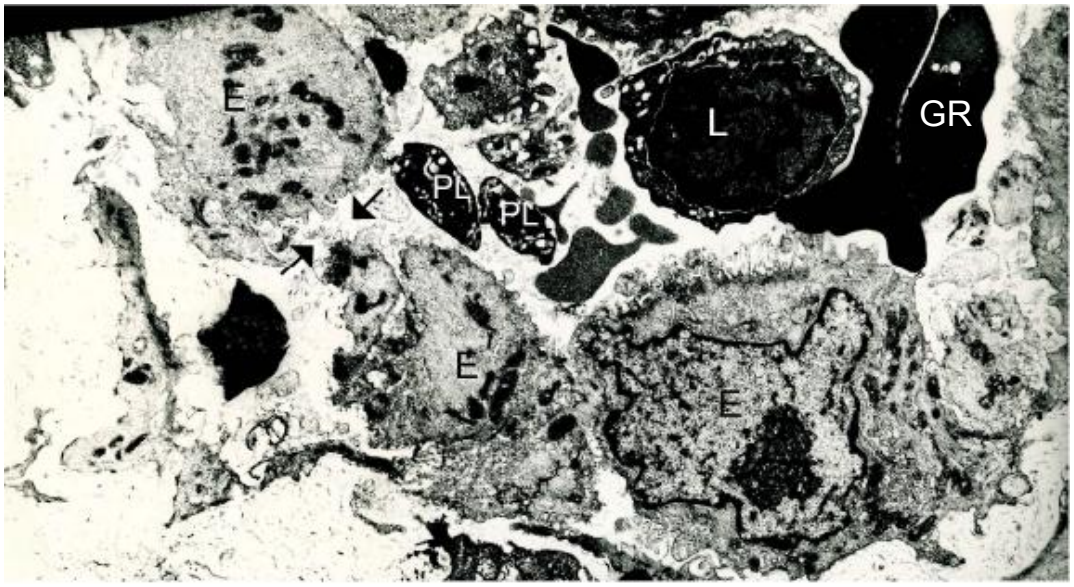


Figure 33 - Présence des plaquettes à proximité des fenestrations endothéliales observées dans la polyarthrite rhumatoïde
D'après Cloutier *et al.* [285]

Le synovium de patient atteint de polyarthrite rhumatoïde a été analysé par microscopie électronique. Les flèches noires indiquent un interstice entre les cellules endothéliales. E indique cellules endothéliales; PL, plaquettes; L, lymphocytes; RBC, globules rouges. Grossissement X 48 400

D'autres constatations témoignent de l'activation des plaquettes dans la PR. En effet, l'observation, au microscope électronique, de biopsies de synovie révèle la présence de thrombi qui obturent la lumière des vaisseaux synoviaux [391].

Dans la PR, l'activation plaquettaire ne concerne pas seulement leur fonction hémostatique ni la libération du contenu des granules denses, et notamment de sérotonine, car leur versant inflammatoire est également mis jeu. L'expression de CD62P sur les plaquettes est plus élevée pour les patients en PR aiguë que pour les patients en rémission ou les sujets non atteints de PR [392]. Ces patients présentent également un taux plus élevée de sCD40L sérique [393].

L'expression de ces deux molécules par les plaquettes favorise leur adhésion aux autres cellules de l'inflammation ; c'est pour cela que les analyses de cytométrie en flux portant sur du sang circulant de patients PR révèlent la présence de complexes plaquettes-neutrophiles et plaquettes-monocytes [393], [394]. La formation des ces complexes cellulaires est également favorisé par une augmentation de l'expression du CD11b à la surface des monocytes et neutrophiles de patients PR [395]. Comme décrit au début du chapitre 2, la formation de ces complexes favorise le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium

Outre le recrutement des neutrophiles, les plaquettes peuvent participer à l'inflammation de la PR par leur activité de COX-1 qui favorise la libération de prostaglandine H_2 (PGH_2). Il est possible que l'excès de PGH_2 plaquettaire puisse, par diffusion, atteindre les FLS. Ces derniers contiennent une prostacycline synthase qui métabolise le PGH_2 en prostacycline, protéine hautement pro-inflammatoire [396]. Ceci expliquerait alors pourquoi la prostacycline est retrouvée en plus forte concentration chez les patients PR [397].

Enfin, la participation la plus originale des plaquettes dans la PR se fait *via* leurs microparticules. L'équipe de Boilard a mis en évidence ce mécanisme, dans lequel les MPP exercent un rôle inflammatoire direct au-delà du compartiment sanguin. Il avait déjà été montré que les patients PR présentaient un taux sanguin de microparticules significativement plus élevé que les sujets non atteints de PR [398]. L'altération endothéliale observée au niveau de la synovie dans les cas de PR fait que les plaquettes rentrent en contact avec le collagène de la matrice extracellulaire soutenant la membrane synoviale. Il s'ensuit alors l'activation de la GPVI plaquettaire, conduisant à la formation de microparticules (**figure 34**). Ces microparticules ont la possibilité de quitter le compartiment sanguin selon deux voies : i) passage passif à travers les fenestrations endothéliales dont la taille concorde avec celles des MPP. ii) transport par les leucocytes en cours d'extravasation. La présence des MPP dans le liquide synovial a pu être confirmée par cytométrie en flux et en microscopie à immunofluorescence. Les images de microscopie montrent que les neutrophiles contenus dans le liquide synovial présentent un signal $CD41^+$, mais dont la taille ne correspond pas à des plaquettes entières mais à des microparticules. Ces résultats favoriseraient ainsi la seconde hypothèse pour le recrutement des microparticules.

Les MPP sont riches en IL-1β et sont alors capables d'induire l'activation des FLS se traduisant par une réponse cytokinique incluant la libération d'IL-8 [75].

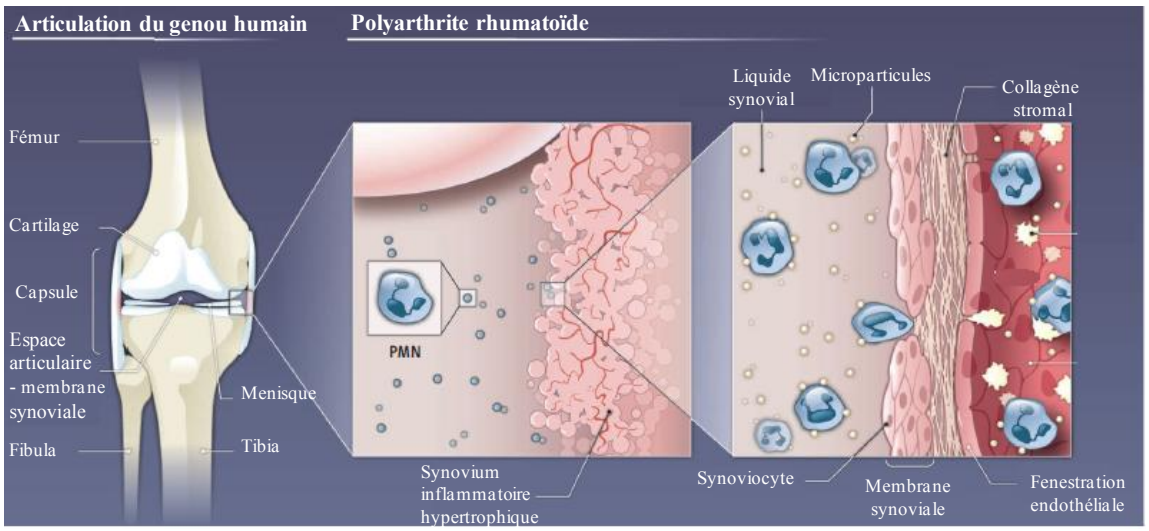


Figure 34 - Libération de microparticules plaquettaires dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde
D'après Zimmermann *et al.* [390]

Durant la polyarthrite rhumatoïde, les articulations deviennent inflammatoires; avec une dilation de l'endothelium de la sinovie et une accumulation de neutrophiles, de cytokines/chimiokines et d'autres médiateurs de l'inflammation dans le liquide synovial. Une activation locale des plaquettes par le collagène induit la libération de microparticules plaquettaires. Ces microparticules peuvent alors s'insérer dans le synovium et amplifier sur place l'inflammation en produisant de l'IL-1β. Cette molécule peut activer les synovocytes et supporter ainsi un cycle de l'inflammation.

L'ensemble de données rapportées ci-dessus montrent bien que les plaquettes sont impliquées dans la physiopathologie de la PR, d'autant plus qu'une déplétion plaquettaire attenue fortement le développement de la PR chez un modèle murin [75]. Ces études sont les premières à montrer que les MPP sont capables d'exercer leur activité inflammatoire en dehors de leur lieu de production.

D. Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI)

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation sévère du tube digestif qui conduit à des diarrhées et des douleurs abdominales. Elles sont très invalidantes en raison de la fatigue associée aux symptômes inflammatoires et de l'état de douleur chronique dans lequel se trouvent les patients.

Les MICI affectent la qualité de vie mais pas sa durée : le taux de mortalité des patients n'est pas différent de celui de la population normale [399].

Les deux principales formes de MICI sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). La MC et la RCH diffèrent par la localisation de l'inflammation dans le tractus gastro- intestinal et par la nature des atteintes immunologiques et histologiques **(figure 35)**.

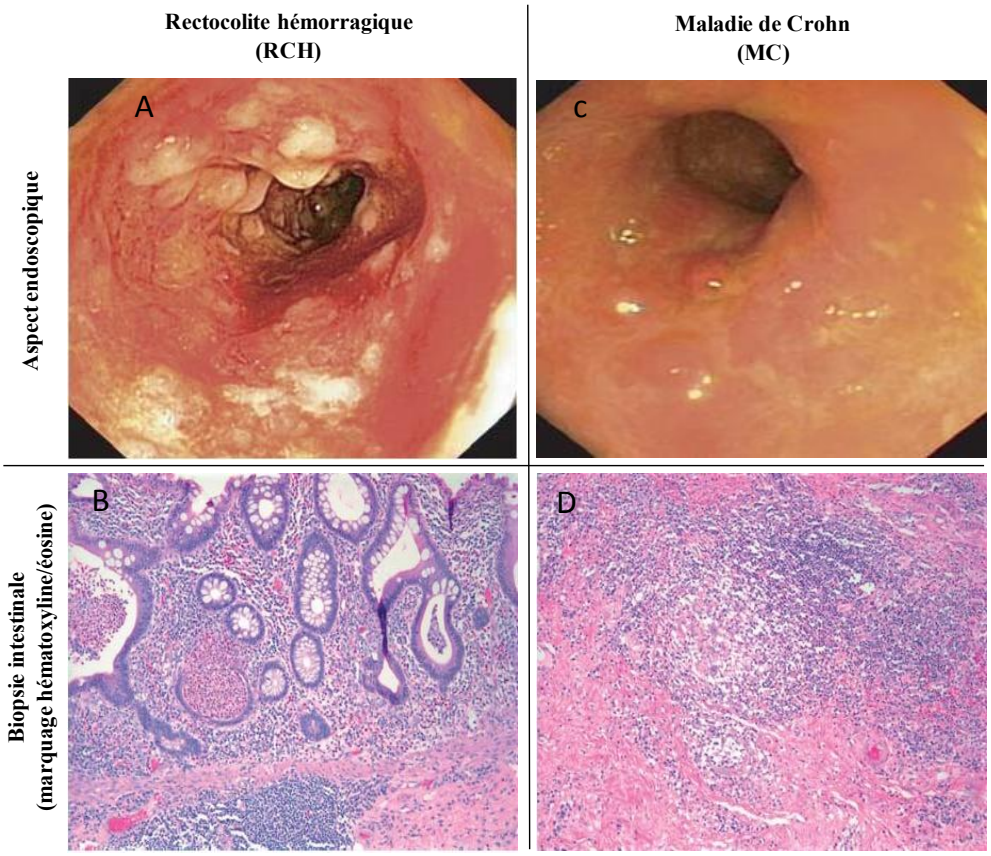


Figure 35 - Caractéristiques de différenciation entre la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie Crohn (MC)
D'après Baumgart *et al.* **[392]**

*Endoscopie : RCH surface irrégulière due à des ulcérations et des pseudopolypes **(A)** .MC surface diffusément inflammatoire avec perte de ramification **(C)** ; Biopsie, marquage hématoxyline et éosine. RCH avec déformation glandulaire importante avec infiltration cellulaire du chorion intestinal **(B)**. MC : présence de granulomes composés de cellule épithélioIdes et de leucocytes **(D)**.*

L'étiologie des MICI est encore discutée mais les données épidémiologiques sont en faveur d'une sensibilité génétique (hétérogénéité géographique et existence de formes familiales), d'une contribution environnementale (incidence qui reflète des différences dans l'hygiène et l'alimentation) ainsi que d'une dysbiose [399].

Concernant l'immunobiologie de ces pathologies, les défaillances s'observent à deux niveaux : une déstabilisation de la barrière épithéliale combinée à une altération de la réponse immunitaire.

√ Déstabilisation de la barrière épithéliale

Dans les MICI, on observe une diminution de l'expression des mucines, protéines constituant le mucus protecteur de l'épithélium intestinal [400]. Parallèlement, les protéines formant les jonctions serrées des entérocytes (occludine, cadhérines et caténines) se retrouvent en quantité réduite dans les MICI [401].

L'altération du rôle protecteur de l'épithélium s'observe également au niveau moléculaire car, pour la MC, il existe un défaut de synthèse pour plusieurs défensines. Ceci pourrait résulter d'un défaut du fonctionnement des cellules de Paneth causé par une mutation de *NOD2,* gène suspecté pour l'étiologie génétique des MICI (détection d'un variant pour 17% des cas de MC) [402].

√ Dérégulation de la réponse immunitaire innée

La perméabilisation de l'épithélium intestinal a pour conséquence l'augmentation des contacts entre les bactéries de la flore commensale et le système immunitaire muqueux [403].

L'excès de telles interactions est à l'origine d'une perte de tolérance à la flore commensale ; cela entraine une augmentation de l'activation des cellules dendritiques qui se traduit par une inflammation locale persistante [404].

Les autres cellules sentinelles de la muqueuse sont aussi affectées. Les macrophages de souris MC présentent une suractivation de la voie NFκB et une augmentation de la production d'IL-1β [405].

En 1997, *Natsui et al.*, montraient qu'une déplétion en neutrophiles suffit pour supprimer l'induction d'une RCH murine [406].

En plus d'amplifier l'inflammation par la biration de chimiokies, les neutrophiles libèrent des ROS qui sont, en partie, responsables de la lésion tissulaire intestinale [407].

Les plaquettes forment un autre type cellulaire qui pourrait également intervenir dans la physiopathologie des MICI. En effet, le développement de la pathologie est associé à un état d'hypercoagulation.

En effet, on observe dans les MICI une augmentation de l'expression des facteurs procoagulants comme les facteurs V, VII, VIII, les lipoprotéines et le fibrinogène et une diminution des anticoagulants naturels tels que l'antithrombine III, la protéine C, la protéine S et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) [408]. De plus, les MPP pouvant aussi intervenir dans la coagulation, sont retrouvées en quantité significativement plus élevée dans le sérum de patients atteints de MICI [409].

Cette élévation de la formation de microparticules circulantes représente aussi un moyen pour les plaquettes d'exercer leur fonction inflammatoire. Cependant, Pamuk *et al.* montrent que pour les MICI, les microparticules ne sont finalement pas les meilleurs marqueurs plaquettaires de l'inflammation, car ce n'est la variante le plus significative entre les patient de RCH *versus* les sujets sains. En revanche, les plaquettes de patients RCH expriment plus fortement le marqueur CD62P, et présentent unr volume plaquettaire moyen plus élevé [410]. De plus, dans cette même étude, les auteurs montrent que le taux plasmatique de sCD40L est plus élevé chez les patients en colite ulcéreuse active. Ainsi, dans les MICI (2 types de pathologies confondues), les plaquettes seraient la principale source de sCD40L et les quantités libérées seraient suffisante pour induire, *in vitro*, l'activation d'une lignée de cellules endothéliales de la microcirculation intestinale (cellules HIMEC : « Human Intestinal Microvasculature Endothelial Cells) [411]. Comme dans le sepsis, l'obtention de la forme soluble du sCD40L plaquettaire dans la MC serait aussi soumise à l'activité des MMP [412]. Concernant le sCD62P, sa détection dans les RCH est corrélée à celle de L'IL-6 et pourrait constituer un biomarqueur fiable de la pathologie [410].

L'expression des ces molécules, et notamment du CD62P à la surface des plaquettes activées, favorise la formation des complexes plaquettes-monocytes et plaquettes-neutrophiles observés chez les patients atteints de MICI [413] et les conséquences inflammatoires qui en découlent. Ceci se confirme par le fait que les souris MICI (type RCH) rendues thrombocytopéniques présentent un phénomène de roulement des leucocytes considérablement reduit.

Le CD62P plaquettaire est impliqué dans ce mécanisme et son interaction est même favorisée dans la RCH par une augmentation de l'expression du PSGL-1 leucocytaire [414]. Le CD40L prend également part à ce phénomène car des souris CD40L$^{-/-}$ ne présentent pas tous les dommages histologiques liés à la pathologie, notamment grâce à la prévention d'un recrutement excessif de leucocytes [415].

Dans l'inflammation intestinale, la surexpression de CD40L permet aussi aux plaquettes d'assurer une interconnexion avec l'endothelium. La co-culture de plaquettes exprimant fortement le CD40L avec une lignée de cellules endothéliales de la microvascularisation intestinale (HIMEC) entraine chez ces dernières une augmentation de l'expression d'ICAM-1 et de la synthèse d'IL-8 [416].
Cette interaction a aussi avoir un effet sur les plaquettes car elle va entrainer une surexpression du CD40L membranaire [411] ainsi que la libération de RANTES [416].

L'intervention des plaquettes favorise aussi d'autres processus inflammatoires. L'interaction entre les plaquettes et les cellules endothéliales entraine, de la part des plaquettes, la libération de VEGF et CD40L, deux facteurs qui favorisent l'angiogenèse, une caractéristique inflammatoire. La formation de « nouveaux vaisseaux » dans ces conditions a pu être confirmée *in vitro* sur un modèle de matrigel [417].

D'autre part, les plaquettes isolées de patients RCH sont capables de potentialiser la production de ROS par les neutrophiles alors qu'aucun effet est observé pour des plaquettes de donneurs volontaires non malades [418]. Les plaquettes participent donc aussi à l'activation secondaire des neutrophiles observée dans l'entretien de l'inflammation intestinale.

Dans les cas de MICI, la coopération entre les plaquettes et les neutrophiles ne semble pas s'arrêter à la barrière endothéliale. Un modèle *in vitro* construit à partir d'une lignée de cellules épithéliales intestinales (T84) montre que la chimioattraction des PMNs à travers cette couche cellulaire favorise le recrutement des plaquettes au niveau de la muqueuse. L'extravasation des plaquettes dans les cas de MICI a pu être confirmée *ex vivo* à partir de quelques coupes intestinales de patients présentant une MICI, pour lesquelles il est possible d'observer un marquage spécifique des plaquettes au niveau des cryptes intestinales. Une fois recrutées au niveau de la lumière épithéliale, les plaquettes libèrent de l'ATP en forte quantité qui est alors métabolisé en adénosine par des enzymes exclusivement présentes au niveau de la lumières intestinales.

En favorisant la sécrétion d'ions chlorure, l'adénosine altère les échanges fluidiques **(figure 37)**, ce qui peut induire les épisodes de diarrhée observés dans les MICI [419].

Cette étude originale propose, dans le même esprit que les travaux de l'équipe de Boilard, qu'en condition inflammatoire, le rôle des plaquettes ne s'arrête pas à la barrière endothéliale.

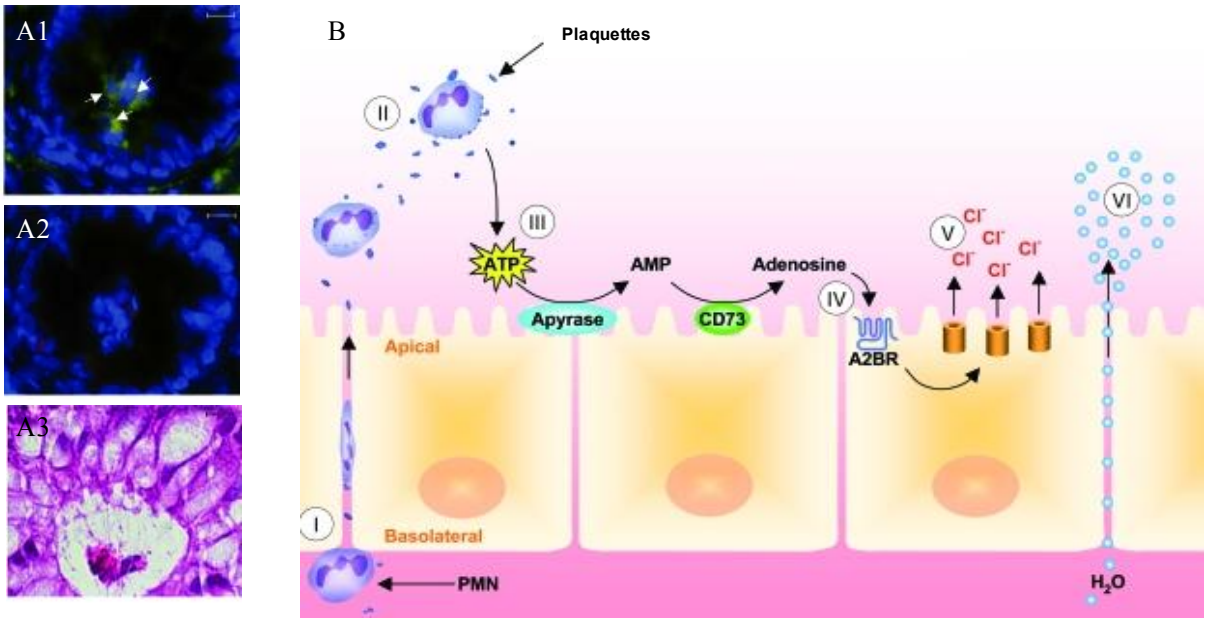


Figure 36 - Modèle de recrutement des plaquettes dans la muqueuse intestinale des MICI : activation et sécrétion électrogénique
D'après Weissmüller *et al*. [412]

Présence de complexes plaquettes/neutrophiles après cotransmigration au niveau des cryptes intestinales de patients atteints de MICI. La microscopie à immunofluorescence permet de montrer une colocalisation (flèche blanche) des neutrophiles en vert (anti-MPO) et des plaquettes en rouge (anti-CD41). Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) ***(A1).*** *La photo* ***(A2)*** *représente un contrôle testant la specificité de l'anticorps secondaire. Une section adjacente colorée à l'hématoxyline et à l'éosine confirmant que les coupes se localisent au niveau d'une crypte intestinale* ***(A3).*** *Barre d'échelle = 10 µm.* ***(B)*** *Représentation schématique des différentes étapes menant à l'extravasation des plaquettes au niveau intestinal. Durant le phase aiguë de l'inflammation, les plaquettes restent accrochées à la surface des neutrophiles ce qui menè à la translocation des plaquettes en direction de la face apicale des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale* ***(GI).*** *Au niveau muqueux, l'ATP dérivé des plaquettes et des neutrophiles* ***(II)*** *est métabolisé en AMP puis en adénosine sous l'action succesive de l'apirase et de l'ecto-nucleotidase (CD73)* ***(III).*** *L'adénosine nouvellement formée se lie au récepteur A2B (A2BR)* ***(IV)*** *ce qui résulte à une activation des sécretions électrogéniques de Cl-* ***(V)*** *et en un movement paracellulaire de l'eau* ***(VI)****.*

Résumé chapitre 2

Plusieurs mécanismes décrivent une forte coopération entre les plaquettes et les neutrophiles, qu'elle soit directe ou indirecte (via l'endothélium). En favorisant l'expression d'intégrines, les plaquettes contribuent à des caractéristiques principales de la réponse inflammatoire : le recrutement des leucocytes (en l'occurence au niveau de la muqueuse). L'implication des plaquettes dans ce processus semble très importante car plusieurs études montrent que l'induction d'une thrombopénie est suffisante pour prévenir l'extravasation des neutrophiles et des monocytes. Le CD62P plaquettaire est la molécule phare dans les interactions plaquettes-leucocytes.

L'interconnexion entre les plaquettes et les leucocytes s'avère essentielle au développement de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques : l'athérosclérose, les inflammations pulmonaires (ALI/TRALI ou allergie), la polyarthrite rhumatoïde ou bien les MICI. Bien qu'étant étroitement lié à l'ALI, le sepsis fait également partie de ces pathologies inflammatoires où les plaquettes accroissent l'inflammation en favorisant l'activité des neutrophiles. Des données récentes montrent aussi l'implication des plaquettes dans l'inflammation cérébrale [413].

Depuis 2-3 ans, s'observe un nouveau concept, dans lequel la coopération entre les neutrophiles et les plaquettes/microparticules plaquettaires ne s'arrêterait pas à la barrière endothéliale ; les élements plaquettaires se serviraient même de cette intéraction pour quitter le compartiment sanguin. Ceci à dans un premier temps été décrit dans la polyarthride rhumatoïde dans laquelle à la migration des neutrophiles favorise le passage des microparticules plaquettaires dans la synovie où elles continuent d'exercer leur activité po-inflammatoire (libération d'IL-1β). La migration des plaquettes, au sens propre, a été mise en évidence au niveau de la muqueuse intestinale, où les plaquettes sont capables d'augmenter les sécrétions fluidiques. Ceci permet d'éliminer certains pathogène de la muqueuse intestinale, mais rien n'est connu quant à l'éventuelle libération *in situ* de facteurs plaquettaires immunomodulateurs. Concernant le rôle inflammatoire des plaquettes dans les alvéoles pulmonaires, aucune publication ne traite du sujet à ce jour.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

A ce jour, il existe un nombre conséquent d'études permettant de témoigner du rôle des plaquettes dans l'inflammation ; cependant leur implication exacte n'est pas encore totalement décrite. Bien qu'essentielle dans la défense de l'organisme contre les agressions, la réponse inflammatoire peut lorsqu'elle est disproportionnée, être à l'origine de pathologies chroniques. Il est donc important de mieux comprendre l'implication des plaquettes dans la physiopathologie inflammatoire afin de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le but d'analyser le rôle inflammatoire des plaquettes dans différents contextes cellulaires, nous nous sommes intéressés aux plaquettes aussi bien dans le compartiment vasculaire que tissulaire.

Concernant le compartiment vasculaire, nous nous sommes focalisés sur la réponse plaquettaire en termes de libération de cytokines/chimiokines après une stimulation inflammatoire aiguë, de nature pathogène. Ces travaux ont pour but de montrer comment les plaquettes sont capables de participer à la réponse inflammatoire liée à une invasion virale ou bactérienne du compartiment sanguin.

Ainsi, nos travaux visent à évaluer, dans une cohorte de patients HIV+, la contribution des plaquettes à l'inflammation systémique associée à l'infection et au traitement anti-rétroviral.

Dans un second temps, nous avons analysé la réponse inflammatoire plaquettaire à différents composés bactériens (peptides antigéniques, toxines) et bactéries entières afin de déterminer si les plaquettes pouvaient potentiellement participer à l'inflammation observée dans la phase précoce du sepsis.

Enfin, la littérature décrit une forte coopération entre les plaquettes et les neutrophiles, allant jusqu'à faciliter l'extravasion de ces derniers en conditions inflammatoires. Nous avons émis l'hypothèse que cette coopération ne s'arrête pas à la barrière endothéliale et que les plaquettes, au même titre que les leucocytes, peuvent participer à la réponse inflammatoire au niveau des tissus. Nous avons donc cherché à « modéliser » l'activation des plaquettes au-delà du compartiment sanguin : dans la muqueuse pulmonaire, car dans le cadre de l'« Acute Lung Injury » les plaquettes sont retrouvées dans le tissu inflammatoire, et dans la muqueuse intestinale pour laquelle très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les plaquettes.

RESULTATS

MANUSCRIT I

HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY ALTERS INFLAMMATION LINKED TO PLATELET CYTOKINES IN HIV-1–INFECTED PATIENTS

Highly Active Antiretroviral Therapy Alters Inflammation Linked to Platelet Cytokines in HIV-1–Infected Patients

Pauline Damien, Fabrice Cognasse, Frédéric Lucht, Florence Suy, Bruno Pozzetto, Olivier Garraud and Hind Hamzeh-Cognasse

Article publié dans **The Journal of Infectious Diseases**
Juin 2013

A ce jour, les traitements antirétroviraux ont fait leur preuve dans la maitrise de la réplication d'HIV. Cependant, les patients HIV+ présentent une inflammation récurrente dont l'origine n'est pas encore totalement expliquée. De plus en plus de données de la littérature montrent, qu'au délà de leur fonction hémostatique, les plaquettes ont une réelle composante inflammatoire, ainsi qu'une senbilité aux pathogènes. Le but de cette étude est d'évaluer la participation des plaquettes à la réponse inflammatoire liée à l'infection par HIV.

La validation du projet par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé a permis de disposer de prélèvements sanguins de patients HIV+ traités par HAART (n=41) et de patients HIV+ non traités (n=30). Des donneurs sains (n=40) ont été inclus comme contrôles. L'activation inflammatoire des plaquettes a été évaluée par la détection de RANTES, GRO-α, sCD62P et de sCD40L dans le plasma.

Les résultats de cette étude montrent une augmentation significative des cytokines plaquettaires dans le plasma de patients HIV+ (traités ou non) une cours de l'infection à HIV ce qui traduit l'implacation de ces cellules dans l'infection à HIV. D'une manière suprenante, la mise en place d'un traitement antirétroviral impacte la capacité des plaquettes à répondre à une stimulation de type thrombine (TRAP). En effet, lorsques que les plaquettes isolées de patients traités sont soumises à une stimulation par TRAP elles libèrent une quantité de cytokines significativement plus faible que les plaquettes de patient non traités. Pour ces même patients, il même possible d'observer aucune activation plaquettaire (sCD62P) pour ces patients là, comme si leurs plaquettes étaient déjà épuisées de leur contenu inflammatoire.

Cette étude positionne donc les plaquettes dans l'infection à HIV, et leur capacité maintenir l'inflammation soulignant l'infection. La mise place d'un traitement anti-rétroviral ne permet pas de diminuer l'inflammation liée aux plaquettes, voire même un effet un contraire. Ces résultats ouvrent donc une discussion concernant la considération d'anti-plaquettaires en complément de la thérapie antirétrovirale.

Journal of Infectious Diseases Advance Access published June 28, 2013

0 MONTH

Correspondence

Highly Active Antiretroviral Therapy Alters Inflammation Linked to Platelet Cytokines in HIV-1–Infected Patients

To The Editor—Chronic immune activation and persistent inflammation are critical features of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection [1, 2]. For example, CD40 and its soluble ligand (sCD40L) are upregulated upon human immunodeficiency virus (HIV) infection, and their enhanced interaction inhibits production of interferon α by plasmacytoid dendritic cells [3]. Recently, Naranbhai et al reported that innate immune activation drives HIV acquisition, despite the use of a tenofovir microbicide gel [4]. They suggested that dampening inflammation may reduce primary infection.

Among the numerous actors involved in immune activation and inflammation during HIV infection, activated platelets are usually underconsidered. However, platelets are the major source of circulating sCD40L, a master immune activator [5]. Platelets are activated by infectious pathogens, including HIV, because they sense infectious danger and secrete adapted panels of cytokines [6]. Levels of inflammatory platelet-derived products are elevated in the plasma of HIV-1 infected patients [7]. We assessed, in an in vitro model, platelet participation in inflammation in HIV-1–infected patients who were or were not receiving highly active antiretroviral therapy (HAART).

A total of 41 HIV-positive patients without coinfection who had been receiving stable HAART for at least 1 year and 30 HIV-positive patients who, in accordance with World Health Organization recommendations (ie, their $CD4^+$ T-cell count was >350 cells/μL), were not receiving HAART were recruited at our hospital. Written informed consent was obtained for inclusion into the study, which was approved by the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (study B111011-40). Forty healthy blood donors were recruited as negative controls after signing the donation form, which states that donation of blood does not preclude use of the donation for nontherapeutic purposes (in accordance with the French Public Health Code). Clinical data on patients of different groups are presented in Table 1.

Platelet-free and platelet-rich plasma (PRP) samples were prepared as described previously [6, 8]. Freshly isolated platelets were stimulated with thrombin receptor–activating peptide (TRAP)–SFLLRN peptide (50 μg/mL for 30 minutes; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Supernatants were cryopreserved at −80°C until later assay. Levels of soluble CD40L (sCD40L), growth-regulated oncogene (GRO)–α, regulated and normal T-cell expressed and secreted (RANTES), and soluble CD62P (sCD62P) were quantitated in plasma samples and PRP supernatants by Luminex technology (Merck-Millipore, Molsheim, France). Concentrations are expressed as mean values ± SD, and each sample was assayed in triplicate. The values were compared by the t test or χ^2 test for proportions. $P < .05$ was considered statistically significant.

HAART recipients and untreated HIV-1–infected patients had comparable platelet counts, which were significantly lower than those in healthy controls (Table 1). Therefore, concentrations of factors released by platelets were normalized for 3×10^8 platelets. Consistent with other studies [7, 9], we observed that plasma levels of several platelet-associated inflammatory molecules were significantly increased in HIV-positive patients, which supports the participation of platelets in systemic immune activation during HIV infection. Moreover, we found that platelets displayed different responses to TRAP according to the HIV status of patients and whether HAART was implemented. Platelets from HAART-treated patients, and even more platelets from untreated patients, released significantly more sCD40L and GRO-α, spontaneously and upon TRAP-stimulation, than platelets from controls (Table 1). This suggests a hyperresponsive status of platelets during HIV infection, which may be dampened during HAART.

The same observations were made for the release of RANTES and sCD62P by platelets from untreated subjects but not HAART recipients. Indeed, upon TRAP-stimulation, platelets from HAART recipients released significantly less RANTES and sCD62P than platelets from controls, reinforcing the notion that HAART limits the inflammatory response of platelets. However, platelets from HAART recipients, unlike those from other patients, were not able to release sCD62P in response to TRAP, suggesting platelet "exhaustion" for this factor. This possibility is supported by the fact that plasma sCD62P levels in HIV-infected HAART recipients are 2-fold and 3-fold higher than those in untreated HIV-infected patients and healthy controls, respectively. Therefore, the dramatic increase in sCD62P levels in HIV-infected patients likely resulted from the shedding of CD62P from the membrane of activated platelets, which is consistent with preserved platelet activity [10]. This finding suggests that, although hyperresponsive, stimulated platelets from HAART-treated HIV-infected patients

Downloaded from http://jid.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 16, 2013

Table 1. Baseline Demographic Characteristics, Human Immunodeficiency Virus (HIV) Data, and Levels of Inflammatory Factors in Plasma and Released by Platelets

Variable	HIV-Negative Healthy Blood Donors (n = 40)	HIV-Positive Patients: Receiving HAART (n = 41)	HIV-Positive Patients: Not Receiving HAART (n = 30)
Age, y	43 (36–51)	50 (43–57)[a]	41 (35–50)
Male sex, subjects, no. (%)	21 (53)	34 (82)[a]	25 (83)[a]
Platelet count, $\times 10^9$ platelets/L	245 (201–276)	208 (166–245)[a]	214 (180–253)[a]
White blood cell count, $\times 10^9$ cells/L	6.02 (5.12–6.52)	5.82 (4.64–6.85)	5.61 (4.92–6.81)
$CD4^+$ T-cell count, cells/μL	678 (575–749)	587 (412–722)	523 (410–630)[a]
HIV-specific data			
HIV RNA load, copies/mL			
Overall	. . .	<50	200 970 (3430–31 525)
<50, subjects, no. (%)	. . .	41 (100)	0 (0)
Treatment, subjects, no. (%)			
NNRTI	. . .	19 (46)	. . .
PI	. . .	22 (54)	. . .
Plasma level of inflammatory cytokines, ng/mL			
sCD40L	2.3 (1.5–3.1)	5.4 (2.7–6.1)[a]	5.6 (2.6–6.9)[a]
GRO-α	0.7 (0.4–0.8)	1.2 (0.8–1.4)[a]	1.3 (0.9–1.5)[a]
RANTES	19.7 (14.7–23.7)	44.1 (39.8–47.0)[a]	42.9 (6.8–13.4)[a]
sCD62P	28.0 (19.6–29.7)	82.3 (64.0–99.3)[a]	43.3 (38.3–47.1)[a,b]
Level of inflammatory molecules released by platelets, ng/mL, mean ± SD[c]			
sCD40L			
Unstimulated platelets	0.3 ± 0.005	1.7 ± 0.01[a]	1.9 ± 0.01[a]
TRAP-stimulated platelets	2.0 ± 0.008[d]	3.3 ± 0.01[a,d]	5.2 ± 0.02[a,b,d]
GRO-α			
Unstimulated platelets	0.1 ± 0.003	0.4 ± 0.006[a]	0.9 ± 0.01[a,b]
TRAP-stimulated platelets	1.0 ± 0.005[d]	1.6 ± 0.006[a,d]	2.3 ± 0.01[a,b,d]
RANTES			
Unstimulated platelets	5.3 ± 0.02	1.7 ± 0.01[a]	22.3 ± 0.04[a,b]
TRAP-stimulated platelets	47.5 ± 0.02[d]	7.9 ± 0.01[a,d]	62.1 ± 0.04[a,b,d]
sCD62P			
Unstimulated platelets	23.7 ± 0.02	22.8 ± 0.02	44.6 ± 0.04[a,b]
TRAP-stimulated platelets	36.8 ± 0.03[d]	25.7 ± 0.02[a]	54.1 ± 0.04[a,b,d]

Data are mean (interquartile range), unless otherwise indicated. *P* values were calculated by the *t* test or the χ^2 test for proportions.

Abbreviations: GRO-α, growth-regulated oncogene–α; HAART, highly active antiretroviral therapy; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; RANTES, regulated and normal T-cell expressed and secreted; sCD40L, soluble CD40 ligand; sCD62P, soluble CD62P; TRAP, thrombin receptor–activating peptide.

[a] $P < .05$ vs HIV-negative healthy blood donors.

[b] $P < .05$ vs HIV-positive patients with HAART.

[c] Normalized for 3×10^8 platelets.

[d] $P < .05$ vs unstimulated platelets of the same patient group.

release moderate amounts of RANTES and no additional sCD62P, they retain their capacity to release additional sCD40L and GRO-α, which could participate in activation of the immune system.

Naranbhai et al suggested the use of strategies that combine antiretroviral and innate immune activation suppressants. Our present data support their proposal, using molecules targeting a platelet-inflammatory role in combination with antiretroviral molecules.

Notes

Acknowledgments. We thank the staff and patients of the Infectious Diseases Department of the University Hospital of Saint-Etienne; anonymous, voluntary blood donors at the EFS Auvergne-Loire; and C. A. Arthaud and M. A. Eyraud, for invaluable technical assistance.

Financial support. This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (SF/CP/N°160).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Downloaded from http://jid.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 16, 2013

Pauline Damien,[1] Fabrice Cognasse,[1,2] Frédéric Lucht,[1,3] Florence Suy,[3] Bruno Pozzetto,[1] Olivier Garraud,[1,2] and Hind Hamzeh-Cognasse[1]

[1]GIMAP-EA3064, Université de Lyon, [2]Etablissement Français du Sang Auvergne-Loire, Saint-Etienne; and [3]Department of Infectious Diseases, University Hospital of Saint Etienne, Saint Priest-en-Jarez, France

References

1. Hatano H, Jain V, Hunt PW, et al. Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)–expressing CD4+ T cells. J Infect Dis **2013**; 208:50–6.
2. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. Trends Microbiol **2012**; 21:6–13.
3. Donhauser N, Pritschet K, Helm M, et al. Chronic immune activation in HIV-1 infection contributes to reduced interferon alpha production via enhanced CD40:CD40 ligand interaction. PLoS One **2012**; 7:e33925.
4. Naranbhai V, Abdool Karim SS, Altfeld M, et al. Innate immune activation enhances HIV acquisition in women, diminishing the effectiveness of tenofovir microbicide gel. J Infect Dis **2012**; 206:993–1001.
5. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. Circulation **2002**; 106:896–9.
6. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Berthet J, et al. Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides. AIDS **2009**; 23:2057–9.
7. Landro L, Ueland T, Otterdal K, Froland SS, Aukrust P. Persistently raised plasma levels of platelet-derived inflammatory mediators in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy. J Thromb Haemost **2011**; 9:1075–7.
8. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. Nat Rev Immunol **2011**; 11:264–74.
9. Aukrust P, Muller F, Lien E, et al. Tumor necrosis factor (TNF) system levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy: persistent TNF activation is associated with virologic and immunologic treatment failure. J Infect Dis **1999**; 179:74–82.
10. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. Proc Natl Acad Sci U S A **1996**; 93: 11877–82.

Received 30 January 2013; accepted 14 March 2013.

Correspondence: O. Garraud, MD, PhD, EFS Auvergne-Loire and GIMAP-EA 3064, Université de Saint-Etienne, Faculté de Médecine, 15 Rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne Cedex 2, France (olivier.garraud@efs.sante.fr).

The Journal of Infectious Diseases

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jit260

Downloaded from http://jid.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 16, 2013

MANUSCRIT II

INHIBITION OF PLASMA-ABSORBED, MEMBRANE-BOUND CD14 ABOLISHES SOLUBLE CD40L SECRETION BY LPS-STIMULATED HUMAN PLATELETS

Inhibition of plasma-absorbed, membrane-bound CD14 abolishes soluble CD40L secretion by LPS-stimulated human platelets

Pauline Damien, Fabrice Cognasse, Marie-Ange Eyraud, Charles-Antoine Arthaud, Bruno Pozzetto, Olivier Garraud and Hind Hamzeh-Cognasse

Article accepté avec modifications dans **Immunology and Cell biology**
Septembre 2013

La mise en évidence de Toll-like Receptor fonctionnels à la surface des plaquettes confirme l'implication de ces cellules dans la détection du danger infectieux. Ces récepteurs sont très bien décrits pour les cellules inflammatoires ; cependant l'absence dans les plaquettes d'éléments nécessaires à la transduction du signal faitt que les mécanismes d'action mis en jeu après l'engagement des TLR plaquettaires ne sont pas encore totalement identifiés. C'est notamment le cas du CD14, molécules venant stabiliser l'adhésion du LPS au TLR4, qui est absent de la lignée mégacaryocytaire.

L'environnement inflammatoire favorise le clivage du CD14 et sa forme soluble peut alors être considérée comme un biomarqueur de l'inflammation notamment dans le sepsis [420]. Ainsi, au cours du sepsis, le sCD14 augmente la réponse inflammatoire en potentialisant l'action du LPS sur les cellules épithéliales qui n'expriment pas le CD14 [421]. Nous avons donc posé l'hypothèse que le sCD14 plasmatique pouvait être capturé de la circulation par les plaquettes assurant ainsi une fonctionnalité optimale du TLR4. Cette hypothèse expliquerait par ailleurs l'expression inattendue de CD14 à la surface des plaquettes, décrite précédemment dans l'étude de Zhang *et al.* [422].

Dans le but d'évaluer l'implication du CD14 soluble plasmatique dans la réponse plaquettaire dépendante de l'engagement du TLR4 nous avons travaillé sur du plasma riche en plaquettes *versus* des plaquettes lavées, dépourvues de molécules plasmatiques absorbées.

L'absence de molécules plasmatiques ne permet pas d'observer une réponse plaquettaire (expression du CD63) après stimulation par du LPS d'*E. coli*. Cette première observation concorde alors avec notre hypothèse du CD14 soluble plasmatique. Afin de prouver que c'est l'absence du CD14 qui empêche l'activation plaquettaire, nous avons testé, dans ces mêmes conditions l'ajout de CD14 recombinant. Ce dernier permet de restaurer, de manière dose-dépendante, la réponse au LPS ; cela prouve que le CD14 contenu dans le plasma est nécessaire à l'activation plaquettaire. En condition plasmatique, le blocage du

CD14 par un anticorps permet de montrer qu'il participe également est dans le relarguage du CD40L induit après stimulation du TLR4 plaquettaire.

Ces résultats témoignent de la capacité des plaquettes à capter le sCD14 plasmatique afin d'assurer leur fonction inflammatoire. Cette étude permet donc de considérer le sCD14 comme une éventuelle cible thérapeutique liée à une activation inflammatoire des plaquettes, notamment dans les cas de sepsis.

Short Communication

Inhibition of plasma-absorbed, membrane-bound CD14 abolishes soluble CD40L secretion by LPS-stimulated human platelets

Pauline Damien[1], Fabrice Cognasse[1,2], Marie-Ange Eyraud[2], Charles-Antoine Arthaud[2], Bruno Pozzetto[1], Olivier Garraud[1,2], Hind Hamzeh-Cognasse[1*]

[1]Université de Lyon, GIMAP, EA3064, Saint-Etienne, France

[2]EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France

[*] Address for correspondence and reprint requests : Dr Hind Hamzeh-Cognasse (PhD), Faculté de Médecine, Université de Lyon, GIMAP, EA3064, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France. Tel: +33 4 77 42 14 67; Fax: +33 4 77 42 14 86; E-mail address: hind.hamzeh@univ-st-etienne.fr

Running head: Platelet LPS::TLR4 activation

KeyWords: Platelet, Inflammation, TLR/TLR4, Cytokine, soluble CD14, lipopolysaccharide

Word count: 1499, Abstract: 95, References: 14, Figures: 2, Tables: 0

Summary

Beyond haemostasis, platelets are helpful/active cells in innate immunity and inflammation. Platelets express TLRs to sense microbial infection and initiate inflammatory responses. Previous data demonstrate that platelets have the capacity to sense external signals differentially through a single type of pathogen recognition receptor and to adjust the innate immune response appropriately for pathogens exhibiting different types of 'danger' signals. Here, we show that human platelets absorb soluble CD14 from the plasma to complete LPS/TLR4 functional binding. This work places platelets as important mediators of innate immune responses and in the first-line defence against invading microorganisms.

Platelets are primarily devoted to primary haemostasis. Physiologically, they patrol along the large vascular system, detect endothelium insults and repair vascular damage to prevent leaking.[1] To this end, platelets are equipped with molecular sensors that can sense molecules that are abnormally exposed in the vessels, indicating alterations, i.e., danger.[2] Platelets have been shown for many decades to be able to engulf infectious pathogens, though the nature of this binding and endocytosis as well as the outcome of the pathogen within the platelet were largely unknown.

There was an increasing body of evidence showing that platelets are linked with infection in many ways, as evidenced in clinical observations in bacteraemia and sepsis, and as demonstrated in animal models. Numerous factors have been considered, outlining the complexity of this physiopathology. The first regain of interest came with the report that despite being non-nucleated, platelets are capable of secreting enormous amounts of cytokines and biological response modifiers,[1, 2] depending on the nature of the stimuli applied to the cells.[3] A call for a complete revisit of the interrelations between platelets and bacteria resulted from reports that platelets exhibit several types of pathogen recognition receptors, including Toll-like receptors (TLRs), both in human and mouse systems.[2, 4, 5] Furthermore, a signalosome was described in platelets, with distinct signalling pathways, through using a prevailing NF-κB activation.[6] However, there may be phenotypic and fundamental functional differences between the expression of TLRs in mouse versus human platelets. In humans, platelets bind different types of Gram-negative bacteria LPS via membrane-expressed TLR4, and can sense them differentially and secrete discrete profiles of cytokines.[3, 7] In mice, although there is clear evidence of LPS/TLR4 binding, subsequent platelet activation and cytokine secretion is debated. In a recent editorial, S. Panzer questioned whether LPS/TLR4 binding can lead to ubiquitous responses regarding one of the leading secretion factors,

sCD40L, which is the master secreted cytokine of platelets, and suggested different possibilities such as genetics and polymorphism, pertaining variations in affinity or colligation with physiologically relevant molecules.[8] Contrary to monocytes, which are also extremely responsive to LPS in both mouse and human systems, platelets do not express CD14,[9] which is known to strongly stabilize LPS (along with LPB). Here, we tested the hypothesis that human platelets could "borrow" soluble CD14 from the plasma environment to activate the signalling of membrane TLR4 when exposed to LPS.

RESULTS AND DISCUSSION

The level of CD63 on the surface of non-activated platelets increased by 7-fold upon addition of TRAP (50 µg/ml; 30 min), which was used as an activation control (Fig. 1A), and by 5.5-fold upon exposure to *E. coli* LPS for 30 min (3 µg/ml and above; Fig. 1B; $P < 0.05$). This activation was observed in the presence of an autologous plasma rich medium (sCD14 concentration 24.90 ± 7.2 ng/ml), and was lost after platelet washing (sCD14 concentration 2.79 ± 1.47 ng/ml). The activation was restored, though only partially, upon addition of exogenous recombinant CD14 (1 µg/ml; Fig. 1B), suggesting that CD14 is required on platelet membranes to achieve activation by LPS (and TLR4).

Exposure to TRAP (50 µg/ml; 30 min) increased the sCD40L secretion level measured in the supernatant by 2.7-fold (Fig. 2A). Stimulation of platelets in their plasma environment with 2, 3 or 10 µg/ml LPS caused an increase in sCD40L secretion of 1.62, 1.82 and 2.63-fold, respectively (Fig. 2B; $P < 0.05$). To test the hypothesis that plasma originating, membrane-bound CD14 is involved in the LPS/TLR4-induced signalling, leading to cytokine secretion, we used anti-CD14 neutralizing antibody to block CD14 on platelet membranes. Anti-CD14 antibody (20 µg/ml) significantly inhibited the augmentation of platelet sCD40L

secretion upon LPS stimulation (Fig. 2B). As additional controls and to confirm the role of plasma sCD14, we attempted to deplete the plasma from sCD14 before reusing it with autologous platelets for LPS stimulation. To this end, we used anti-CD14-coated plates (R&D systems Europe, Lille, France) or immunomagnetic anti-CD14 beads (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France). However, none of these techniques yielded sufficient depletion of sCD14 in the plasma to inhibit LPS activation of platelets.

In a previous study, we proposed that to achieve activation by LPS, CD14 is necessary on platelet membranes, associated with platelet TLR4, in relation to CD63 expression.[3] The present work completes that study by showing that sCD14 is necessary for platelet responses to LPS, particularly for CD40L release. Platelets sense infections and metabolic danger and respond by secreting biological response modifier molecules, chiefly cytokines, chemokines and receptors to bioactive factors, in a manner that parallels their sensing of lesion-associated danger on vessel endothelium and the discerned secretion of repairing molecules along with haemostatic or prothrombotic factors.[1, 2] Both actions, *i.e.*, intervention in primary haemostasis and in innate immunity, have a strong link, which is inflammation. Platelets are the main purveyors of sCD40L in the body,[10] which is a master inflammatory cytokine in many systems, in particular in the constitution of the atheroma plaque and the inflammatory part of cardiovascular disease.[1]

Sensing danger of infections, in particular bacterial, by platelets is linked with vessel physiology and pathology. There are several lines of evidence that platelets activated by bacterial products increase local inflammation at the sites of infection, as well as systemic inflammation, best evidenced in sepsis,[11] with cardiovascular consequences (*i.e.*, thrombosis

via the accelerated release of prothrombotic factors and microparticles, and via interrelations with neutrophils, prone to emit NETs,[12] which contribute to the endothelium insult).

Dissecting the pathways of platelet physiology (primary haemostasis), but also of physiopathology (sepsis, cardiovascular diseases, systemic inflammation, autoimmunity, transfusion and transplantation pathology) [1, 2, 13] is valuable for developing new drugs or treatment lines, taking advantage of the benefits of platelets while getting rid of their deleterious effects, especially in patients with severe conditions. This indication of the contribution of absorbed CD14 on platelets to complement the LPS/TLR4 signalling and the subsequent production of proinflammatory products closes a gap in the understanding of platelet activation by bacterial products, and may provide a new direction for handling patients with bacteraemia/sepsis. Controlling LPS-induced responses by circulating platelets, as well as leukocytes, could thus decline systemic LPS toxicity and inflammation related to microbial invasion.

METHODS

Platelet Preparation and Stimulation

Peripheral blood was collected from healthy donors in endotoxin-free tubes with 3.2% sodium citrate (Vacutainer®, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation at 150×*g* for 12 min at 22°C. It was almost platelet pure as no contamination of CD3-T cells, CD19-B cells or CD14-monocytes was detected by flow cytometry.[3]

Flow Cytometry

CD63 expression, characterising activated platelets, was measured by flow cytometry gating of CD41-positive events (CD41 is strictly expressed by platelets). PE-conjugated monoclonal anti-human antibodies against CD63, and APC-conjugated monoclonal anti-human antibodies against CD41 were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Positive events were recorded on a FACSCalibur (BD Biosciences) and analysed with CELLQUEST PRO (BD Biosciences).[3]

Platelet stimulation

Platelets (3×10^8) were stimulated for 30 min at room temperature (RT) with ultrapure S-LPS from *Escherichia coli* 0111: B4 (1–10 µg/ml; Cayla-Invivogen, Toulouse, France) and recombinant CD14 (5 µg/ml; R&D Systems Europe Ltd, Lille, France). Thrombin receptor activator peptide (TRAP; 50 µg/ml; Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) was used as a positive control. Platelets were exposed to LPS for 30 min in the presence or absence of mouse anti-human CD14 [clone 18D11; F(ab′)2; 20 µg/ml; LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, WA, USA] or the isotype control F(ab′)2 (clone 15H6; 20 µg/ml; LifeSpan Biosciences).

Stimulation readout: platelet secretion of soluble CD40 ligand

The levels of sCD40L were measured in triplicate in aliquots of unstimulated (control), TRAP- or TLR4 ligand-stimulated platelet supernatants by ELISA (Abcys, Paris, France).[3, 14] Absorbance at 450 nm was measured on an ELISA reader (Multiskan EX; Labsystem, Helsinki, Finland).

Statistical analysis

The Wilcoxon paired test was used for comparison of percentages of activated cells and of sCD40L secretion in the different setups. Values are expressed as mean ± SD. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the blood donors, as well as the contribution of Drs P Chavarin, A Lefebvre and J Berthet, Ms M Lauhlé, Ms L Boiron. The study was supported by the “Etablissement Français du Sang” and the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR), reference ANR-12-JSV1-0012-01. The authors declare no conflicts of interest.

Figure legends

Figure 1.

Flow cytometry analysis of CD63 expression on $CD41^+$ platelets (CD41 characterises platelets, and CD63 is an early and sustainable marker of activated platelets). **(A)** Platelets were unstimulated or stimulated with TRAP (TRAP, 50 µg/ml, 30 min at RT). **(B)** Platelets from platelet-rich plasma (PRP; black bars), washed (PBS condition) platelet suspensions (grey bars) or washed (PBS condition) platelet suspensions with added recombinant, soluble CD14 (white bars) were tested. Platelets were unstimulated or stimulated with *E. coli* LPS (1–10 µg/ml; 30 min at RT). Data are expressed as fold increase in CD63 expression relative to unstimulated control (% of baseline; mean fold increase relative to unstimulated ± SD; n = 10 experiments). $*P < 0.05$ (Wilcoxon paired test; stimulated vs. non-stimulated).

Figure 2

Platelet sCD40L production/release. **(A)** Platelets were unstimulated or stimulated with TRAP (TRAP, 50 µg/ml, 30 min at RT). **(B)** Platelets from platelet-rich plasma (PRP; black bars), or from platelet suspensions with added anti-human CD14 (clone 18D11 20 µg/ml; grey bars) or the isotype control (clone 15H6; white bars) were tested. Platelets were unstimulated or stimulated with *E. coli* LPS (1–10 µg/ml; 30 min at RT). Data are expressed as fold increase in sCD40L production/release relative to unstimulated control (% of baseline; mean fold increase relative to unstimulated ± SD; n = 10 experiments). $*P < 0.05$ (Wilcoxon paired test; stimulated vs. non-stimulated).

References

1. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**(1)**:** 34-45.

2. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**(4)**:** 264-74.

3. Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, Arthaud CA, Eyraud MA, Zeni F *et al.* Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol* 2012; **145**(3)**:** 189-200.

4. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y *et al.* Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res* 2004; **113**(6)**:** 379-85.

5. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 2005; **83**(2)**:** 196-8.

6. Spinelli SL, Casey AE, Pollock SJ, Gertz JM, McMillan DH, Narasipura SD *et al.* Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-{kappa}B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30**(3)**:** 591-8.

7. Kappelmayer J, Beke Debreceni I, Vida A, Antal-Szalmas P, Clemetson KJ, Nagy B, Jr. Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation. *J Thromb Haemost* 2013.

8. Panzer S. Differential response to LPS isotypes induced platelet activation mediated by Toll-like receptor (TLR)-4. *Clin Immunol* 2013; **146**(1)**:** 13-4.

9. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol* 2008; **181**(5)**:** 3495-502.

10. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002; **106**(8)**:** 896-9.

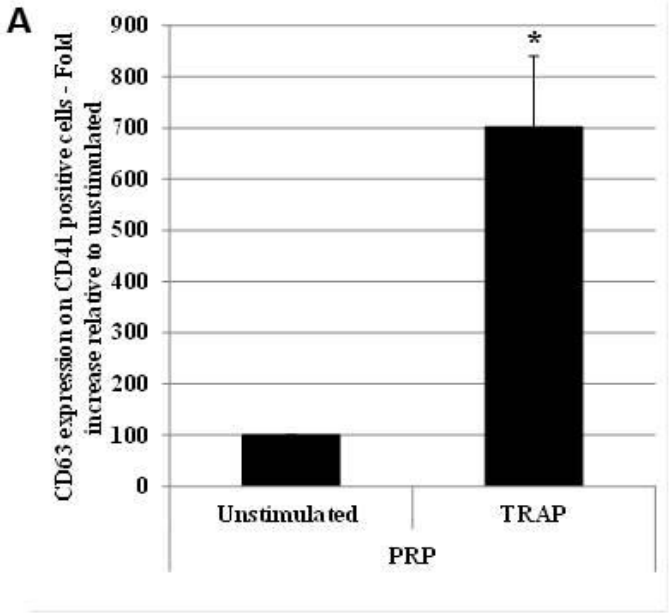
11. Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004; **2**(12)**:** 2096-102.

12. Ma AC, Kubes P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost* 2008; **6**(3)**:** 415-20.

13. Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ Res* 2013; **112**(11)**:** 1506-19.

14. Damien P, Cognasse F, Lucht F, Suy F, Pozzetto B, Garraud O *et al.* Highly Active Antiretroviral Therapy Alters Inflammation Linked to Platelet Cytokines in HIV-1-Infected Patients. *J Infect Dis* 2013.

Figure 1


A
CD63 expression on CD41 positive cells - Fold increase relative to unstimulated
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
Unstimulated
TRAP
PRP

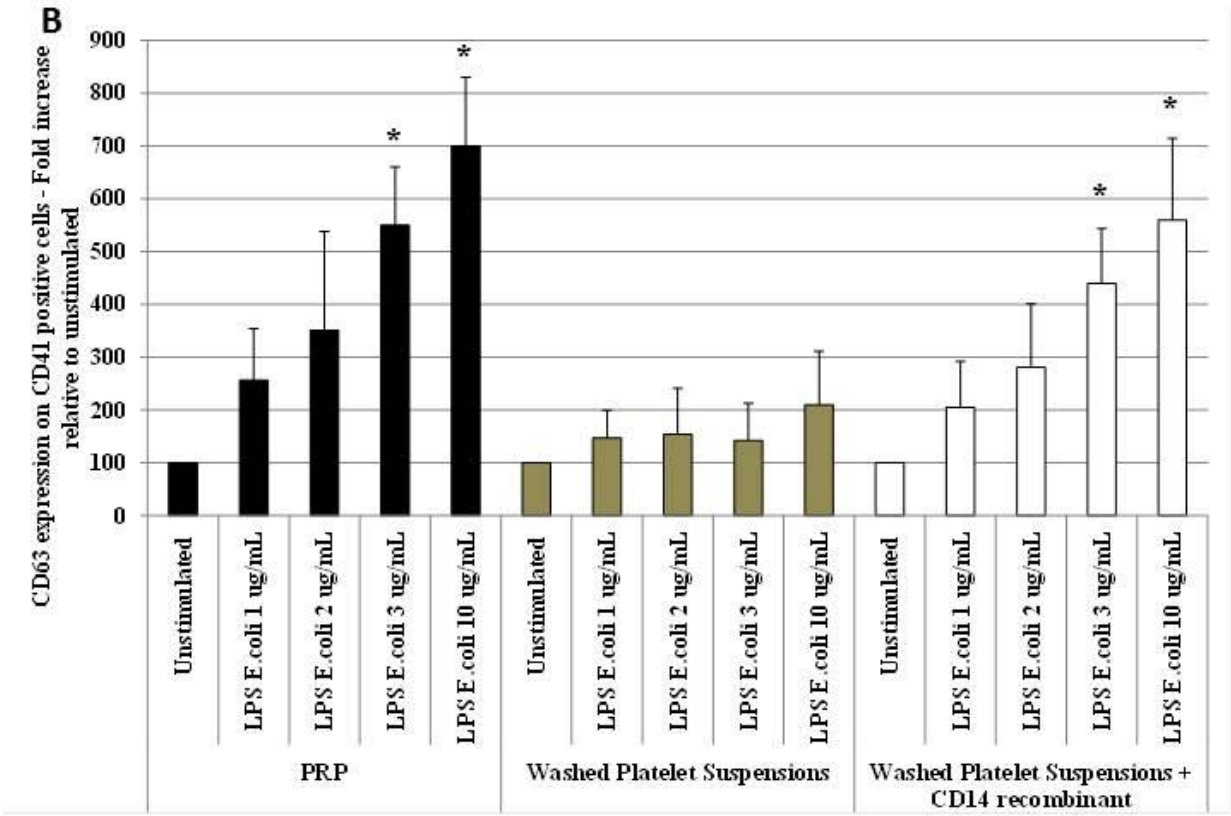
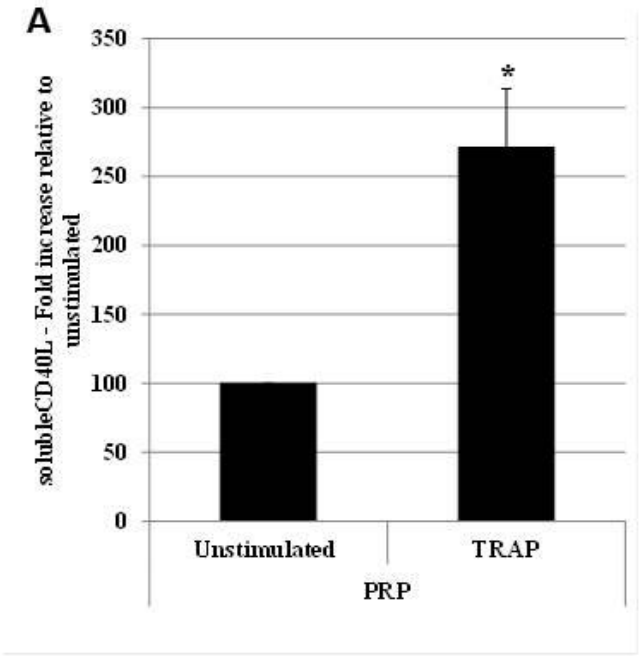
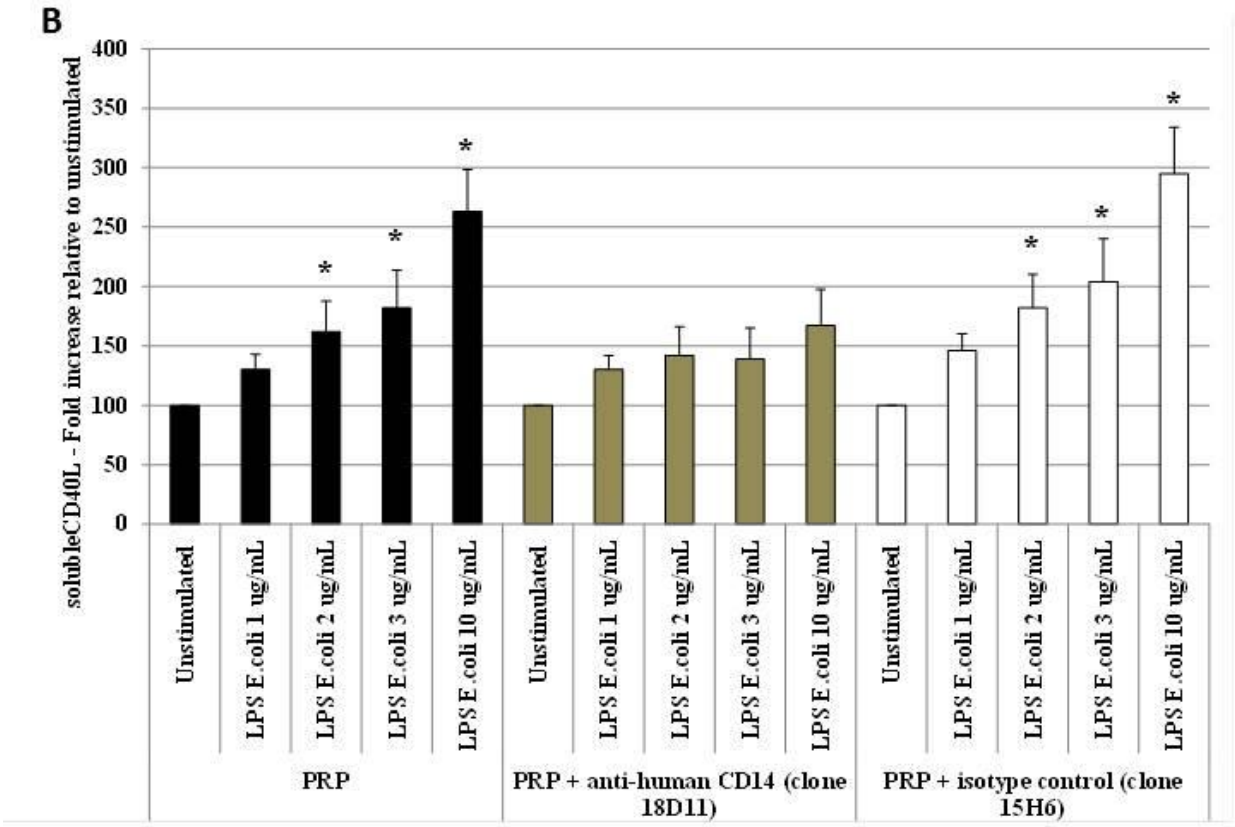

B
CD63 expression on CD41 positive cells - Fold increase relative to unstimulated
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
Unstimulated
LPS E.coli 1 ug/mL
LPS E.coli 2 ug/mL
LPS E.coli 3 ug/mL
LPS E.coli 10 ug/mL
PRP
Washed Platelet Suspensions
Washed Platelet Suspensions + CD14 recombinant

Figure 2


A
solubleCD40L - Fold increase relative to unstimulated
350
300
250
200
150
100
50
0
*
Unstimulated
TRAP
PRP


B
solubleCD40L - Fold increase relative to unstimulated
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Unstimulated
LPS E.coli 1 ug/mL
LPS E.coli 2 ug/mL
LPS E.coli 3 ug/mL
LPS E.coli 10 ug/mL
PRP
PRP + anti-human CD14 (clone 18D11)
PRP + isotype control (clone 15H6)

MANUSCRIT III

NF-KAPPAB LINKS TLR2 AND PAR1 TO CYTOKINE SECRETION IN HUMAN PLATELETS

NF-kappaB links TLR2 and PAR1 to cytokine secretion in human platelets

Pauline Damien, Fabrice Cognasse, Bernard Payrastre, Sherry L. Spinelli, Neil Blumberg, Richard P. Phipps, Archibald McNicol, Bruno Pozzetto, Olivier Garraud and Hind Hamzeh-Cognasse

Article en cours de finalisation pour soumission

Le fonction sentinelle des plaquettes a largement été étudié *via* la fonctionnalité de leur TLR4. Concernant le TLR2 plaquettaire, son engagement provoque une réponse hémostatique et permet, en partie, d'expliquer les évènements thrombotiques observés au cours des infections bactériennes. Le but de cette étude, est d'évaluer l'implication du TLR2 plaquettaire dans la modulation de la réponse inflammatoire *via* la libération de facteurs plaquettaires immunomodulateurs.

Les plasmas riches en plaquettes ont été stimulés avec un ligand du TLR2, le Pam3CSK4 et les résultats obtenus ont été comparés à une stimulation par un analogue de la thrombine, le TRAP.

Les résultats concernant la libration de facteurs solubles montrent que le TRAP entraine aussi bien une libération des facteurs contenus dans les granules denses (sérotonine) que dans les granules α (sCD62P, RANTES, PF4 et sCD40L). L'engagement du TLR2 a la particularité de restreindre l'activation des plaquettes à la libération de facteurs inflammatoires, initialement contenus dans les granules α. Cette discrimination suggère que l'engagement du TLR2 met en place un mécanisme d'activation plaquettaire finement régulé.

Le NFκB, facteur terminal de la transduction du signal TLR2 dans les cellules eucaryotes, est également mis en évidence dans l'activation des plaquettes bien qu'elles soient anucléées. Nous montrons que le NFκB plaquettaire est modulé lors de l'activation par du TLR2. Cependant, ce facteur- là est également activé en réponse au TRAP. L'analyse de sa cinétique de phosphorylation suggère cependant que son mode d'activation diffère en fonction de la stimulation ; montrant une fois de plus la spécificité de la réponse plaquettaire dépendante du TLR2.

Ces résultats montrent que les plaquettes sont capables de libérer des cytokines d'une manière dépendante de l'activation du TLR2 et du NFκB. De part la finesse des mécanismes mis en jeu, cette réponse semble adaptée à la stimulation infectieuse. Les plaquettes possèdent un répertoire moléculaire suffisant pour participer à la reconnaissance du danger à l'éviction de celui-ci. Ces travaux sont les premiers à montrer la voie TLR2- NFκB-cytokines dans les plaquettes, et posent alors la question du rôle non-canonique du NFκB permettant la libération des cytokines plaquettaires.

NF-kappaB links TLR2 and PAR1 to cytokine secretion in human platelets

Running Title: Platelet TLR2 activation and signaling pathway

Pauline Damien[1]; Fabrice Cognasse[1, 2]; Bernard Payrastre[3]; Sherry L. Spinelli[4]; Neil Blumberg[4]; Richard P. Phipps[4]; Archibald McNicol[5]; Bruno Pozzetto[1]; Olivier Garraud[1, 2] and Hind Hamzeh-Cognasse[1]

[1] GIMAP-EA3064, Université de Lyon, 42023 Saint-Étienne, France;

[2] EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France;

[3] Inserm, U1048 and Université Toulouse 3, I2MC, CHU de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, Toulouse, France;

[4] Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY 14642, USA.

[5] Department of Oral Biology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

Address for correspondence and reprint requests to Dr. H. Hamzeh-Cognasse (PhD), GIMAP-EA 3064, Université de Saint-Etienne, Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France. Tel.: +33 4 77 42 14 67; Fax: +33 4 77 42 14 86; E-mail address: hind.hamzeh@univ-st-etienne.fr

What is known about this topic?

- Platelets are currently acknowledged as cells of innate immunity and inflammation and play a complex role during an active infection.
- Platelets express a plethora of membrane and cytoplasmic molecules with immunomodulatory or inflammatory activity (e.g. TLR).

What does this paper add?

- We examine whether TLR2 ligand effects on platelet release of soluble signalling/effective molecules.
- Our results indicate that platelets express functional TLR2 surface molecules and provide evidence that platelets release a number of cytokines/chemokines after engagement of TLR2 by its ligand Pam3CSK4.
- Our observations support the concept that NF-κB proteins are important both in the pro- thrombotic and immune-modulatory functions of platelets.

Summary

In immune cells the engagement of TLR2 initiates signaling through the transcription factor nuclear factor kappa B (NF-κB) after its release from an inhibitor kappa B (I-κB) and translocation into the nucleus. Although platelets are anucleate, they express the NF-κB machinery, whose role remains poorly understood in platelets. Here, we investigated the contribution of NF-κB in the release of cytokines and serotonin by human platelets following selective stimulation of TLR2 and PAR1.

Using a specific ELISA test we demonstrated that platelet PAR1 activation drives oscillations of NF-κB phosphorylation, in contrast to TLR2 activation which induces a slower phosphorylation process. Moreover, we found that engagement of the platelet TLR2 with its ligand, Pam3CSK4, significantly increases the release of sCD62P, RANTES and sCD40L, an effect attenuated by pre-incubation with a blocking anti-TLR2 MoAb. This effect appeared selective since no modulation of serotonin secretion was observed following platelet TLR2 activation. Platelet release of sCD62P, RANTES and sCD40L following TLR2 or PAR1 triggering was no longer observed in the presence of the NF-κB inhibitor Bay11-7082, while serotonin release following PAR1 activation was significantly dampened.

These data support the concept that, in addition to its reported role in platelet aggregation, NF-κB is an important player in platelet inflammatory functions.

Keywords: Platelets, NF-κB, TLR2, cytokine/chemokine, inflammation

Introduction

Besides their central role in haemostasis, blood platelets also play important roles in the regulation of several aspects of both the innate immune system (including inflammation) and the adaptive immune system (1-5). Thus, these anucleate cells participate in inflammation and produce and/or release numerous factors with known immunomodulatory functions (3, 6-8). First series of studies reported the first evidence of the presence of several toll-like receptors (TLRs) on human platelets and showed that their level significantly increases following activation (9, 10). We also found that stored platelets contain molecules with known immunomodulatory roles and differentially secrete them upon storage in blood banking conditions (11-14). Several independent studies have described a functional role for TLR4 in platelets (15-18). TLR2 is also expressed in platelets and recognizes components of Gram positive bacteria. In cooperation with TLR1 and TLR6, TLR2 recognizes bacterial lipoproteins and contributes to the formation of thrombi (19). Several recent studies have shown that TLR2 is involved in platelet signal transduction, platelet aggregation, adherence to collagen, and formation of platelet–neutrophil heterotypic aggregates (19-23). Moreover, a procoagulant phenotype of extracellular histone-activated platelets driving plasma thrombin generation has been recently reported by Semeraro *et al* who suggested potential roles for TLR2 and TLR4 (24).

Recent studies by our group (Berthet *et al*, in press Clinical Immunology) and others (25, 26) strongly suggest that platelets are able to distinguish between membrane signaling molecules and can for instance, adapt their secretion to specific signals sensed via TLR4. As platelets are anucleated, the role of transcription factors downstream of their surface receptors remains unclear. The NF-κB signaling machinery is present in platelets (27-29) but its role downstream of TLR2 and TLR4 remains poorly characterized. Recent data suggest that NF-κB has unexpected roles in regulating non-genomic processes involved in platelet functions

(25-28, 30). A NF-κB/ IκB/PKA complex has been described to play a negative feedback pathway that limits platelet activation (29). Indeed, once in complex with NF-κB and IκB, PKA activity is blocked, independently of cAMP, and activation of NF-κB following IκB phosphorylation results in the releases of an active PKA. However, other groups have shown that NF-κB inhibitors affect platelet functions suggesting different effects of the NF-κB machinery in platelets (28, 30).

The aim of this study was to compare the effects of a stimulation of TLR2 and PAR1, a known inducer of platelet secretion and aggregation, on NF-κB phosphorylation and to link these effects to platelet cytokines and serotonin release.

Materials and Methods

Platelet Preparation and Stimulation

Peripheral blood was collected from healthy donors in endotoxin-free 3.2% sodium citrate tubes (Vacutainer®, Becton Dickinson, San Jose, California) within the French National Blood Establishment fulfilling the national principles of ethics and the regulatory requirements. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifuging the blood at 150×g for 10 minutes at 22°C. Residual mononuclear cell counts were determined by flow cytometry. Contamination of platelets with mononuclear cells (CD3-T cells, CD19-B cells, and CD14-monocytes) was undetectable (Supplemental Figure 1 - available online at www.thrombosis-online.com). Platelets ($3x10^8$) were incubated for 30 minutes at room temperature (RT) with the anti-human FcγRII monoclonal antibody (MoAb) IV.3 (100 µg/ml; StemCell Technologies, Grenoble, France) in order to saturate free FcγRII sites and block any FcγRII engagement (18, 31). Next, platelets were stimulated with the TLR2 ligand Pam3CSK4 (Cayla-Invivogen, Toulouse, France; 1-100 µg/ml, 120 minutes, RT) in the absence or presence of either one or two anti-human TLR2 blocking MoAbs, clone TL2.1 (8 µg/ml, 30

minutes, RT; Imgenex, San Diego, CA, USA), clone B4H2 (8 µg/ml, 30 minutes, RT; Cayla-Invivogen) or irrelevant specificity MoAbs IgG2a (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) (19). Thrombin receptor activator peptide (TRAP; 50 µg/ml - (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), and agonist of PAR1, was used as a positive control.

Nuclear factor kappa B transcription ELISA

pNF-κB (phosphorylated NF-κB at S536 and S468 on p65 subunit) and total p65 subunit levels in extracts from stimulated *versus* non-stimulated platelets were determined by ELISA. pNF-κB (assay sensitivity = 0.5 µg nuclear extract/well) was detected using a transcription factor ELISA kit (Active Motif) as described previously (32). Briefly, 2.5 µg of each platelet extract was incubated in 96-well plates containing a consensus (5'-GGGACTTTCC-3') binding site for the p65 subunit of pNF-κB. pNF-κB binding to the target oligonucleotide was detected by incubation with a primary antibody specific for the activated form of p65, and then visualized by incubation with anti-IgG horseradish peroxidase conjugate at optimal concentrations and a developing solution as described by the manufacturer, and quantified at 450 nm with a reference wavelength of 655 nm (Multiskan EX, Labsystem, VWR International, Strasbourg, France).

Flow cytometry and western blot

Expression of TLR2 on the platelet surface was determined by flow cytometry analysis of all events positive for CD41, a characteristic platelet surface marker. Platelets were labeled with a PE-conjugated anti-human TLR2 MoAb (Imgenex) or CD62P MoAb (BD Biosciences). Positive events were recorded with a FACSCalibur (BD Biosciences) flow cytometer and analyzed with CELL QUEST PRO software from BD Biosciences.

Platelet extracts (1 µg per well) were separated on a 10% acrylamide gel (Sigma-Aldrich) and transferred to a 0.45 µm nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia, Orsay, France) by electroblotting using transfer buffer supplemented with 20% methanol (Sigma-Aldrich). Blots were blocked overnight at 4°C in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% BSA (I.D. Bio, Limoges, France). The blots were then incubated with a primary antibody for TLR2 (3 µg/ml; Imgenex), NFκB p65 (1 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology), or α-tubulin (200 ng/ml; Santa Cruz Biotechnology) for 60 minutes at RT. A histone H3 antibody (diluted 1/1,000; Abcam) was used as the negative control for the platelet protein extract. The blots were washed three times for 10 minutes with blocking buffer and incubated for another 60 minutes with the secondary horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit or anti-mouse antibody diluted 1:100,000 (Santa Cruz Biotechnology). Next, the blots were incubated with a chemiluminescent substrate according to the manufacturer's instructions (ECL; Amersham Pharmacia) and exposed to radiographic film (Sigma-Aldrich).

Enzyme-linked immunosorbent assay for soluble factors in platelet supernatants

The levels of soluble cytokines sCD62P, RANTES, PF4, and sCD40L were measured in triplicate from aliquots of unstimulated (control) and TLR2 ligand-stimulated platelets using specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (R&D Systems Europe Ltd., Lille, France or Abcyss, Paris, France). The serotonin levels were measured by competitive ELISA according to the manufacturer's instructions (IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Germany) as described (33).

Analysis of signaling pathway activation

Platelets were pre-incubated with various concentrations of the non-reversible inhibitor of NF-κB, Bay 11-7082 (2 µM) (Sigma-Aldrich), for 60 minutes at 37°C (28).

Platelets were then stimulated with Pam3CSK4 or thrombin receptor-activating peptide (TRAP) in the presence or absence of an anti-human TLR2 blocking MoAb to detect NF-κB signal modulation. Platelet supernatants were collected to determine soluble factors levels using specific ELISAs.

Statistical analysis

All values are reported as mean ± SD. Since almost all measurements were non-normally distributed, the Wilcoxon rank sum test was used with the null hypothesis that there was no difference compared for group comparisons. Inter-experiment comparisons of cytokine/serotonin concentrations for the different culture conditions were analyzed using Wilcoxon's paired test. In all cases, $P<0.05$ was considered significant.

Results

Platelets express components of the TLR2 signaling complex

We first tested the expression of TLR2 on the surface of human blood platelets and the presence of its potential downstream signaling machinery in these cells (Figure 1). As shown by flow cytometry, TLR2 was indeed expressed on the surface of human platelets (Figure 1A, B). Consistent with the relatively low fluorescence intensity, the percentage of resting platelets expressing detectable TLR2 was 30.1 ± 3.76%. Western-blotting analysis (Figure 1C) confirmed not only the expression of TLR2 but also of both MyD88 and NF-κB in human platelets, as previously shown by our group and others (16, 19, 22, 27, 28, 30). The mononuclear cell level in platelet preparations was consistently undetectable as determined by flow cytometry (Supplemental Figure 1). Consistent with the absence of nuclear factors originating from potential contaminating nucleated cells, the nuclear marker histone H3 was undetectable in our platelet preparation. These data support that a significant population of

resting platelets express TLR2 on their surface and have the potential downstream effectors to mediate a TLR2 signaling.

Effect of TLR2 and PAR1 stimulation on NF-κB phosphorylation

In addition to nuclear translocation, the phosphorylation of the p65 subunit of NF-κB on specific serine residues impacts its activity. Particularly, the phosphorylation of serine 468 (S468) and serine 536 (S536) are important for p65-dependent cellular responses (34). We first tested whether platelet activation by TRAP, the PAR1 activator, would induce the phosphorylation of the p65 subunit on S468 and S536 (over time 0-120 minutes) using a specific ELISA test. As shown in figure 2, while the amount of the p65 subunit of NF-κB remained stable, a rapid and significant increase in S468 and S536 phosphorylation was observed following the addition of TRAP. The phosphorylation was dose dependent, becoming detectable between between 50 to 250 ng/mL of TRAP (data not shown). The maximal phosphorylation of both S536 (Figure 2A) and S468 (Figure 2B) was observed at 45 minutes of stimulation. Thereafter, the phosphorylation decreased to almost basal levels at 90 minutes after the addition of TRAP and increased again suggesting the existence of a second wave of phosphorylation (Figure 2A, B). Oscillatory dynamics of NF-κB nuclear translocation and phosphorylation has been described in nucleated eukaryotic cells (35), but, to our knowledge, never before in anucleate cells such as platelets. Interestingly, when human platelets were stimulated with the TLR2 agonist Pam3CSK4, the level of S536 (Figure 2C) and S468 phosphorylation (Figure 2D) remained low during 60 minutes and then increased significantly until the end of the time course (120 minutes). Overall, these results indicate a highly regulated NF-κB phosphorylation/dephosphorylation process in human platelets stimulated by TRAP or Pam3CSK4.

Platelet soluble immunomodulatory factors release after TLR2 or PAR1 engagement

Previous studies have shown that, following the addition of conventional platelet agonists such as thrombin or collagen, cytokines/chemokines release occurs between 5 to 30 minutes (36). A titration and time course was first required to achieve maximal performed in platelets from 10 controls to determine the optimal concentration of Pam3CSK4 platelet activation, using sCD62P and RANTES release as an end point (Supplemental Figure 2 - available online at www.thrombosis-online.com). In further experiments, we monitored platelet cytokines/chemokines secretion for 2 hours during TLR2 stimulation by Pam3CSK4 at the concentration of 100 µg/ml. TRAP (50 µg/ml) was also used as it is known to induce a significant platelet release of cytokines/chemokines. In contrast to stimulation by TRAP, TLR2 engagement had no significant effect on serotonin release (Figure 3A). Moreover, incubation of platelets with Pam3CSK4 had no significant effect on PF4 release (Figure 3 B). Conversely, Pam3CSK4 stimulation significantly increased the production of sCD62P (Figure 3C).

As shown in Supplemental Figure 2, the optimal secretion of sCD62P was observed after 2 hours of TLR2 stimulation with 100 µg/ml Pam3CSK4. RANTES, and sCD40L were also significantly secreted following Pam3CSK4 stimulation (Figure 3 D and E). Reciprocally, the production of each of these mediators was significantly attenuated when platelets were pre-incubated for 30 minutes at room temperature with an anti-TLR2 MoAb (Figure 3 C, D and E).

Importantly, to avoid any potential effect of the Fc portion of the anti-TLR2 antibody on FcγRIIA, the IV.3 blocking antibody was used in our experiments. As shown in supplemental the Figure 3 - available online at www.thrombosis-online.com, the addition of IV.3 antibody had no effect on platelet secretion. Moreover, there was no significant modification of sCD62P, sCD40L, RANTES and serotonin release after stimulation in the

presence of isotype-matched, irrelevant specificity MoAbs IgG2a (Supplemental figure 4 - available online at www.thrombosis-online.com). Overall, these results demonstrate that TLR2 triggering results in the secretion of a set of platelets cytokines/chemokines independently of FcγRIIA.

Relationship between specific TLR2 stimulation and NF-κB transducer molecules

In nucleated cells NF-κB p65 is an important downstream effector of TLR2 that, through the adapter protein MyD88 and then NF-κB, triggers the production of inflammatory cytokines. To determine whether NF-κB is involved in the effects of TLR2 in platelets, we used an inhibitor of NF-κB suitable for *in vitro* studies (Figure 4). The BAY-11-7082 compound is a highly selective and widely used irreversible inhibitor of NF-κB that impairs IκBα phosphorylation (28, 37). Interestingly, the release of sCD62p, RANTES, and sCD40L following TLR2 engagement by Pam3CSK4 was decreased to almost background levels in the presence of the NF-κB inhibitor (Figure 4 A, C, E and G). Similar results were obtained following stimulation with TRAP (Figure 4 B, D, F and H), suggesting that NF-κB is not exclusively required downstream of TLR2 to mediate cytokine secretion, but is also important downstream of PAR1. In contrast to TRAP, which induced platelet serotonin release, as expected, Pam3CSK4 stimulation did not (Figure 4 G). Although NF-κB inhibition by BAY-11-7082 decreased both the basal level of serotonin and the amount of serotonin secreted upon TRAP activation, it did not significantly affect the ability of TRAP to stimulate serotonin secretion (4.45 fold increase in the absence of BAY-11-7082 *versus* 5.35 fold increase in the presence of BAY-11-7082) (Figure 4 H).

Discussion

TLR molecules expressed by various cell types are now well recognized as sentinels of the innate immune system, keeping vigilance against invading pathogens (38). We and others have described the presence of certain TLRs on human platelets. The role of the platelet TLR4 has recently started to be characterized (15-18, 23, 39-41). We proposed that, after TLR4 engagement with LPS, platelets can secrete differential cytokine patterns based on the nature of the stimulus (18). Although the presence of TLR2 in mouse and human platelets has been suggested, this receptor has received significantly less attention than TLR4 (9, 19, 23). However, some data suggest a possible role for this receptor in platelet activation by bacteria. A recent report (19) has shown that a live bacterium, *Porphyromonas gingivalis*, induces a pro-inflammatory TLR2-dependent response in mouse platelets. This work substantiates the functional nature of platelet TLRs and highlights the importance of platelets in immune and inflammatory responses. Further studies are needed to fully characterize the platelet TLR/microorganism interactions and determine their roles in the human response to infection, particularly with respect to microorganisms.

In the present study, we have confirmed the presence of TLR2 on the surface of human platelets and initiated new studies to further characterize the role of NF-κB proteins in platelets. In particular, we have demonstrated the differential mobilization of a NF-κB pathway following exposure of platelets to ligands of innate immunity receptors (Pam3CSK4 for TLR2) compared to ligands of the thrombotic stimulation (TRAP for PAR1). Interestingly, oscillations in platelet NF-κB phosphorylation following TRAP stimulation were observed. In eukaryotic cells, NF-κB regulation of IκBα transcription represents a delayed negative feedback loop that drives oscillations in NF-κB translocation. Transcription of target genes depends on oscillation persistence, involving cycles of RelA (p65) phosphorylation and dephosphorylation (35). Recent reports demonstrate that, despite being

anucleate, platelets express transcription factors, including retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARγ and β/δ) (42, 43).

In platelets, NF-κB /I-κB proteins have been described to function independently of gene regulation; and after activation, IκB is phosphorylated and degraded (27). Recent new evidence suggests a potential novel pathway of platelet regulation by NF-κB, linked to key platelet responses (*e.g* platelet spreading, aggregation, clot retraction) (28, 30).

Our data confirm that platelets express functional TLR surface molecules and provide evidence that platelets release a number of cytokines/chemokines after engagement of TLR2 by its ligand Pam3CSK4. The incompletely attenuation with anti-TLR2 blocking antibodies suggests that the ligand may not be specific for TLR2 and may bind other TLR receptors, moreover most TLR ligands are promiscuous (44). Our work further expands upon an interesting study by Blair *et al*. (19) in which platelets were incubated in the presence of high concentrations (25 µg/ml) of a TLR2-blocking antibody. The low-affinity Fc IgG receptor (FcγRII; CD32) is a single-chain sialoglycoprotein which interacts with the Fc domain of IgG antibodies; when cross-linked, CD32 fully activates platelets for secretion and aggregation. Here, to avoid any implication of FcγRII, we blocked it with the specific MoAb IV.3 and used a minimal concentration of TLR2-blocking by specific antibody (8 µg/ml). The partial inhibitory effect observed upon TLR2 blocking in platelets stimulated with Pam3CSK4 suggests a potential direct or indirect synergistic role of other TLRs. Indeed, a potential synergistic role of platelet danger receptors other than TLR2 cannot be excluded. Further studies are required to fully elucidate the systems by which platelets sense external dangers.

Here, we also investigated pathways considered essential for inflammatory cytokine production downstream of TLR2 stimulation (45) and found an important contribution of NF-κB in human platelets. During haemostasis, thrombin generated at the site of injury, via interactions with the proteinase-activated receptors (PAR1 and PAR4) (46), along with locally

expressed or produced mediators such as collagen, vWF, ADP, thromboxane A2, activate platelets leading to their aggregation (47). In addition, thrombin cleaves fibrinogen to form fibrin that further stabilizes clot adhesion at the site of injury. This process is followed by the release of mediators of inflammation such as sCD40L that contributes to chronic inflammation (as shown pathologically in atherosclerosis disease (48)). Our observations support the concept that NF-κB proteins are important both in the pro- thrombotic and immune-modulatory functions of platelets. Indeed, NF-κB inhibition significantly decreased the secretion of serotonin, cytokines and chemokines from platelets stimulated either by Pam3CSK4 or by TRAP, a PAR1 agonist. This is consistent with studies by Malaver *et al* (37) who showed that BAY-11-7082 inhibited platelet aggregation and by Spinelli *et al* (28) who demonstrated that inhibition of I-κB-α phosphorylation by BAY-11-7082 caused reversal of fully spread platelets to their original spheroid morphology (28).

In eukaryotic cells, NF-κB is an ubiquitous transcription factor and an essential mediator of gene expression during activation of immune and inflammatory responses (35). Our work and other recent studies (28, 30) propose an emerging non-genomic function of NF-κB machinery in platelets. As for nucleated cells, our results suggest that phosphorylation of the p65 subunit is regulated by cell surface receptors in anucleated platelets. Depending on the source of platelet stimulation different multicomplexes may associate with NF-κB subunits and further impact on platelet signaling and responses, including the secretion of certain soluble factors.

Our data also highlight the functional role of the TLR signaling pathway. This is important as platelets interact primarily with the vessel endothelium, a tissue that can be inflamed and is reactive to pro-inflammatory products originating from platelet (49). We recently proposed (18, 50) that platelets employ adaptive responses to danger signals, which

involves a polarized secretion for soluble immunomodulatory factors; NF-κB could orientate this polarisation.

Acknowledgements

We would like to thank Christine Aubrège, Patricia Chavarin, Sophie Acquart and Françoise Boussoulade (EFS Auvergne-Loire, France) for their help in obtaining and preparing the human blood cells. The authors deeply thank Marie Ange Eyraud, Charles Antoine Arthaud, Drs. Sandrine Lafarge and Julien Berthet for kindly participating for this study.

Sources of Funding

Financial support was received through grants from the 'Cluster 10 Infectiologie, région Rhône-Alpes, France', Regional Blood Bank – EFS Auvergne-Loire, France, HL095467 (NIH) and UL 1RR024160 (National Center For Research Resources, NIH).

Authorship Contributions and Disclosure of Conflicts of Interest

The authors declare no competing financial interests.

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

F.C. designed the research, analyzed data, wrote the paper

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

S.L.S. analyzed data, and contributed to writing the paper

N.B. analyzed data, and contributed to writing the paper

R.P.P. analyzed data, and contributed to writing the paper

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

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

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

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

References

1. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. The emerging role of platelets in adaptive immunity. Cell Immunol 2005; 238:1-9.
2. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest 2005; 115:3378-84.
3. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. Circ Res 2007; 100:27-40.
4. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. Trends Immunol 2004; 25:489-95.
5. Cognasse F, Semple JW, Garraud O. Platelets as potential immunomodulators: is there a role for platelet toll-like receptors? Current Immunology Reviews 2007; 3:109-15.
6. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. Nat Rev Immunol 2011; 11:264-74.
7. Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, et al. The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. Immunol Res 2009.
8. Garraud O, Cognasse F. Platelet Toll-like receptor expression: the link between "danger" ligands and inflammation. Inflamm Allergy Drug Targets 2010; 9:322-33.
9. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, et al. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. Immunol Cell Biol 2005; 83:196-8.
10. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. Thromb Res 2004; 113:379-85.
11. Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, et al. Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. Transfusion 2006; 46:1184-9.
12. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, et al. Donor platelets stored for at least 3 days can elicit activation marker expression by the recipient's blood mononuclear cells: an in vitro study. Transfusion 2009; 49:91-8.
13. Cognasse F, Osselaer JC, Payrat JM, et al. Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment. Transfusion 2008; 48:809-13.
14. Cognasse F, Payrat JM, Corash L, et al. Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand. Blood 2008; 112:4779-80.
15. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4. Blood 2005; 106:2417-23.
16. Cognasse F, Lafarge S, Chavarin P, et al. Lipopolysaccharide induces sCD40L release through human platelets TLR4, but not TLR2 and TLR9. Intensive Care Med 2007; 33:382-4.
17. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat Med 2007; 13:463-9.
18. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, et al. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. Br J Haematol 2008; 141:84-91.
19. Blair P, Rex S, Vitseva O, et al. Stimulation of Toll-Like Receptor 2 in Human Platelets Induces a Thromboinflammatory Response Through Activation of Phosphoinositide 3-Kinase. Circ Res 2008; 104:346-54.
20. Assinger A, Laky M, Schabbauer G, et al. Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2. J Thromb Haemost 2011; 9:799-809.
21. Kalvegren H, Skoglund C, Helldahl C, et al. Toll-like receptor 2 stimulation of platelets is mediated by purinergic P2X1-dependent Ca2+ mobilisation, cyclooxygenase and purinergic P2Y1 and P2Y12 receptor activation. Thromb Haemost 2010; 103:398-407.
22. Rex S, Beaulieu LM, Perlman DH, et al. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. Thromb Haemost 2009; 102:97-110.
23. Aslam R, Speck ER, Kim M, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. Blood 2006; 107:637-41.

24. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and 4. Blood 2011.
25. Zhang G, Han J, Welch EJ, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. J Immunol 2009; 182:7997-8004.
26. Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1beta-rich microparticles. J Immunol 2011; 186:5489-96.
27. Liu F, Morris S, Epps J, et al. Demonstration of an activation regulated NF-kappaB/I-kappaBalpha complex in human platelets. Thromb Res 2002; 106:199-203.
28. Spinelli SL, Casey AE, Pollock SJ, et al. Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-{kappa}B. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010; 30:591-8.
29. Gambaryan S, Kobsar A, Rukoyatkina N, et al. Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex. J Biol Chem 2010; 285:18352-63.
30. Spinelli SL, Maggirwar SB, Blumberg N, et al. Nuclear emancipation: a platelet tour de force. Sci Signal 2010; 3:pe37.
31. Tomiyama Y, Kunicki TJ, Zipf TF, et al. Response of human platelets to activating monoclonal antibodies: importance of Fc gamma RII (CD32) phenotype and level of expression. Blood 1992; 80:2261-8.
32. Lafarge S, Hamzeh-Cognasse H, Chavarin P, et al. A flow cytometry technique to study intracellular signals NF-kappaB and STAT3 in peripheral blood mononuclear cells. BMC Mol Biol 2007; 8:64-73.
33. Koch CA, Lasho TL, Tefferi A. Platelet-rich plasma serotonin levels in chronic myeloproliferative disorders: evaluation of diagnostic use and comparison with the neutrophil PRV-1 assay. Br J Haematol 2004; 127:34-9.
34. Moreno R, Sobotzik JM, Schultz C, et al. Specification of the NF-kappaB transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK epsilon. Nucleic Acids Res 2010; 38:6029-44.
35. Nelson DE, Ihekwaba AE, Elliott M, et al. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. Science 2004; 306:704-8.
36. Henn V, Steinbach S, Buchner K, et al. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. Blood 2001; 98:1047-54.
37. Malaver E, Romaniuk MA, D'Atri LP, et al. NF-kappaB inhibitors impair platelet activation responses. J Thromb Haemost 2009; 7:1333-43.
38. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. Nat Immunol 2004; 5:975-9.
39. Stahl AL, Svensson M, Morgelin M, et al. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic Escherichia coli binds to platelets via TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. Blood 2006; 108:167-76.
40. Damas JK, Jensenius M, Ueland T, et al. Increased levels of soluble CD40L in African tick bite fever: possible involvement of TLRs in the pathogenic interaction between Rickettsia africae, endothelial cells, and platelets. J Immunol 2006; 177:2699-706.
41. Semple JW, Aslam R, Kim M, et al. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. Blood 2007; 109:4803-5.
42. Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, et al. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. Blood 2004; 104:1361-8.
43. Ali FY, Davidson SJ, Moraes LA, et al. Role of nuclear receptor signaling in platelets: antithrombotic effects of PPARbeta. FASEB J 2006; 20:326-8.
44. Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. The Journal of biological chemistry 2006; 281:31002-11.

45. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. J Immunol 2000; 165:5392-6.
46. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. J Clin Invest 1999; 103:879-87.
47. Brass LF, Zhu L, Stalker TJ. Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. J Clin Invest 2005; 115:3385-92.
48. Engel D, Seijkens T, Poggi M, et al. The immunobiology of CD154-CD40-TRAF interactions in atherosclerosis. Semin Immunol 2009; 21:308-12.
49. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature 1998; 391:591-4.
50. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Berthet J, et al. Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides. Aids 2009; 23:2057-9.

Legends:

Figure 1. TLR2 expression in human platelets **(A)** . The surface expression of TLR2 was detected by antibody labeling and flow cytometry analysis after gating for $CD41^+$. One representative experiment out of 10 is shown **(B)**. Summary of the flow cytometry analysis of TLR2 expression on $CD41^+$ platelets. The mean percentage of $CD41^+$ platelets positive for TLR2 expression is shown (mean ± SD from ten independent experiments). **(C)** Western Blot analysis showing the expression of TLR2, MyD88, NF-κB, Histone H3 and α-tubulin proteins in human platelets. One representative experiment out of five is shown. α-tubulin was used as the loading control.

Figure 2. ELISA analysis of total p65 subunit of NF-κB and phosphorylated S536 **(A, C)** and S468 **(B, D)** of p65 subunit in platelet extracts from TRAP or Pam3CSK4 stimulated *versus* non-stimulated platelets. The analysis was performed at different times from 0 to 120 minutes of stimulation by TRAP (50 µg/mL) **(A, B)** or Pam3CSK4 (100 µg/mL) **(C, B)**. Data are mean (± SD) of five independent experiments (measured in triplicate). Statistical significance (Wilcoxon paired test; $P<0.05$) was represented by an asterisk (* - Total NF-κB *versus* phospho NF-κB S536 or S468).

Figure 3. Platelet serotonin**,** sCD62P, RANTES and sCD40L released by platelets stimulated by TRAP or Pam3CSK4 with (w) or without (w/o) anti-human TLR2 blocking MoAb. Platelets were pre-treated (20 minutes, RT) with anti-human FcγRII MoAb IV.3 and incubated with TRAP or Pam3CSK4 during 120 minutes. The levels of serotonin (**A**), PF4 (**B**), sCD62P **(C)**, RANTES **(D),** and sCD40L **(E)** were quantified by ELISA (measured in triplicate). Background levels were subtracted from the values shown. Data are mean ± SD (n

= 5 experiments, measured in triplicate) and are expressed as pg/ml ($3x10^8$ unit - sCD62P, RANTES and sCD40L) or as µg/ml ($3x10^8$ unit – serotonin). The soluble factors values shown are deduced from background levels. *P<0.05 (Wilcoxon paired test; stimuli *versus* unstimulated). Anti-human TLR2 blocking MoAb (α-TLR2) was used at a concentration of 8 µg/ml. #P<0.05 (Wilcoxon paired test; stimuli w anti-TLR2 block *versus* stimuli w/o anti-TLR2 block).

Figure 4. Serotonin, sCD62P, RANTES and sCD40L secretion levels from platelets stimulated by Pam3CSK4 **(A, C, E and G)** or TRAP **(B, D, F and H)** with (w) or without (w/o) the inhibitor of NF-κB (BAY 11-7082). Platelets were pre-treated (20 minutes, RT) with anti-human FcγRII MoAb IV.3 and incubated with inhibitor and stimulators as described in Materials and Methods. Levels of sCD62P **(A, B)**, RANTES **(C, D),** sCD40L **(E, F)** and serotonin **(G, H)** were quantified by ELISA (measured in triplicate). Background levels have been subtracted and the data (mean ± SD; n = 10 experiments, measured in triplicate) are expressed in pg/ml. *P<0.05; Wilcoxon paired test, stimulated *versus* unstimulated without inhibitor (BAY 11-7082) or stimulated *versus* unstimulated in the presence of inhibitor (BAY 11-7082, 2 µM). BAY 11-7082 was used at a concentration of 2 µM.

Figure 1

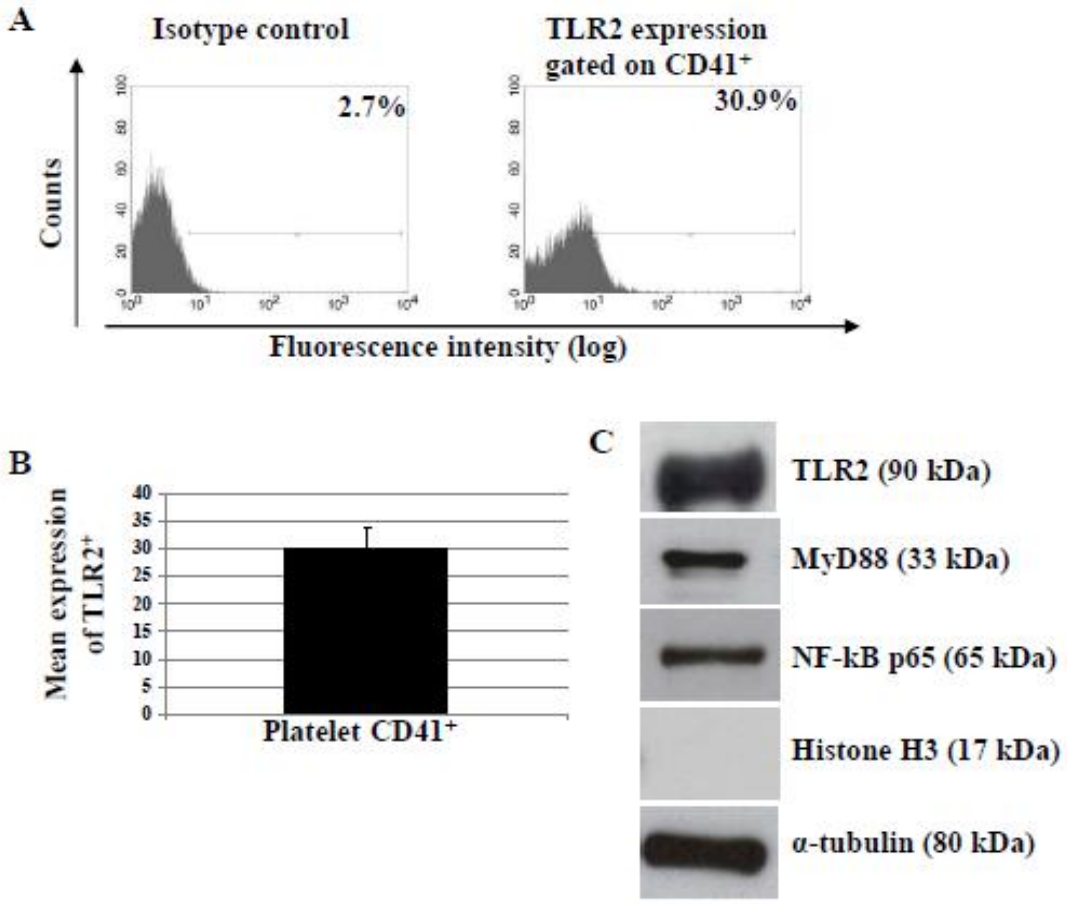
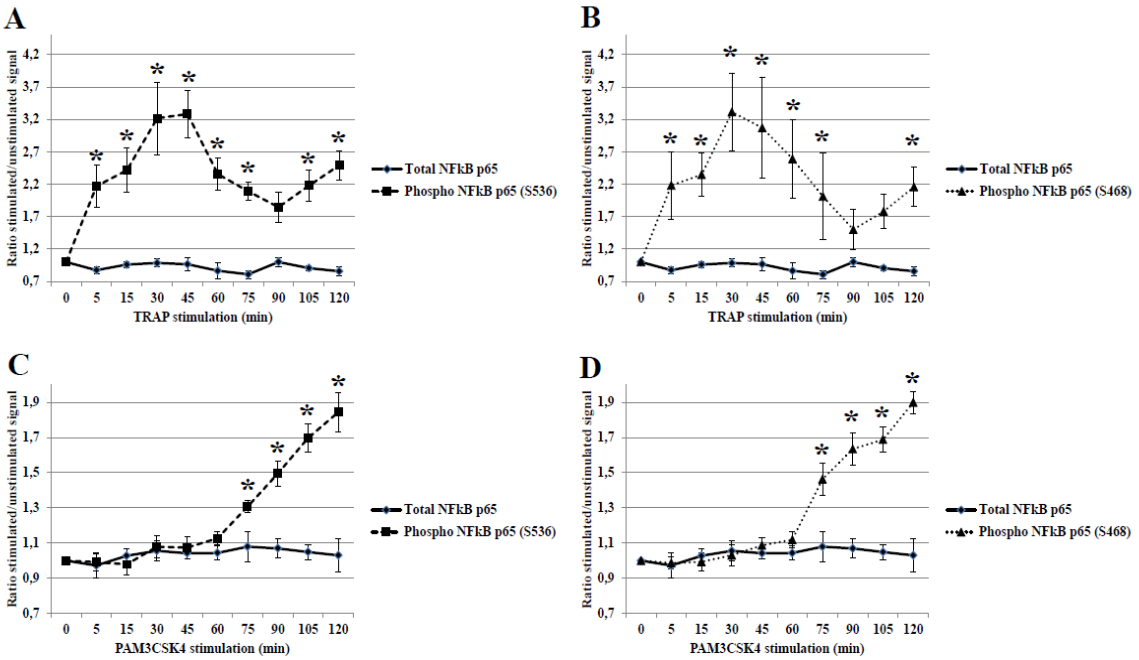

A
Isotype control
TLR2 expression gated on CD41+
2.7%
30.9%
Counts
Fluorescence intensity (log)
B
Mean expression of TLR2+
Platelet CD41+
C
TLR2 (90 kDa)
MyD88 (33 kDa)
NF-kB p65 (65 kDa)
Histone H3 (17 kDa)
α-tubulin (80 kDa)

Figure 2


A
Ratio stimulated/unstimulated signal
4,2
3,7
3,2
2,7
2,2
1,7
1,2
0,7
0 5 15 30 45 60 75 90 105 120
TRAP stimulation (min)
Total NFkB p65
Phospho NFkB p65 (S536)
B
Ratio stimulated/unstimulated signal
4,2
3,7
3,2
2,7
2,2
1,7
1,2
0,7
0 5 15 30 45 60 75 90 105 120
TRAP stimulation (min)
Total NFkB p65
Phospho NFkB p65 (S468)
C
Ratio stimulated/unstimulated signal
1,9
1,7
1,5
1,3
1,1
0,9
0,7
0 5 15 30 45 60 75 90 105 120
PAM3CSK4 stimulation (min)
Total NFkB p65
Phospho NFkB p65 (S536)
D
Ratio stimulated/unstimulated signal
1,9
1,7
1,5
1,3
1,1
0,9
0,7
0 5 15 30 45 60 75 90 105 120
PAM3CSK4 stimulation (min)
Total NFkB p65
Phospho NFkB p65 (S468)

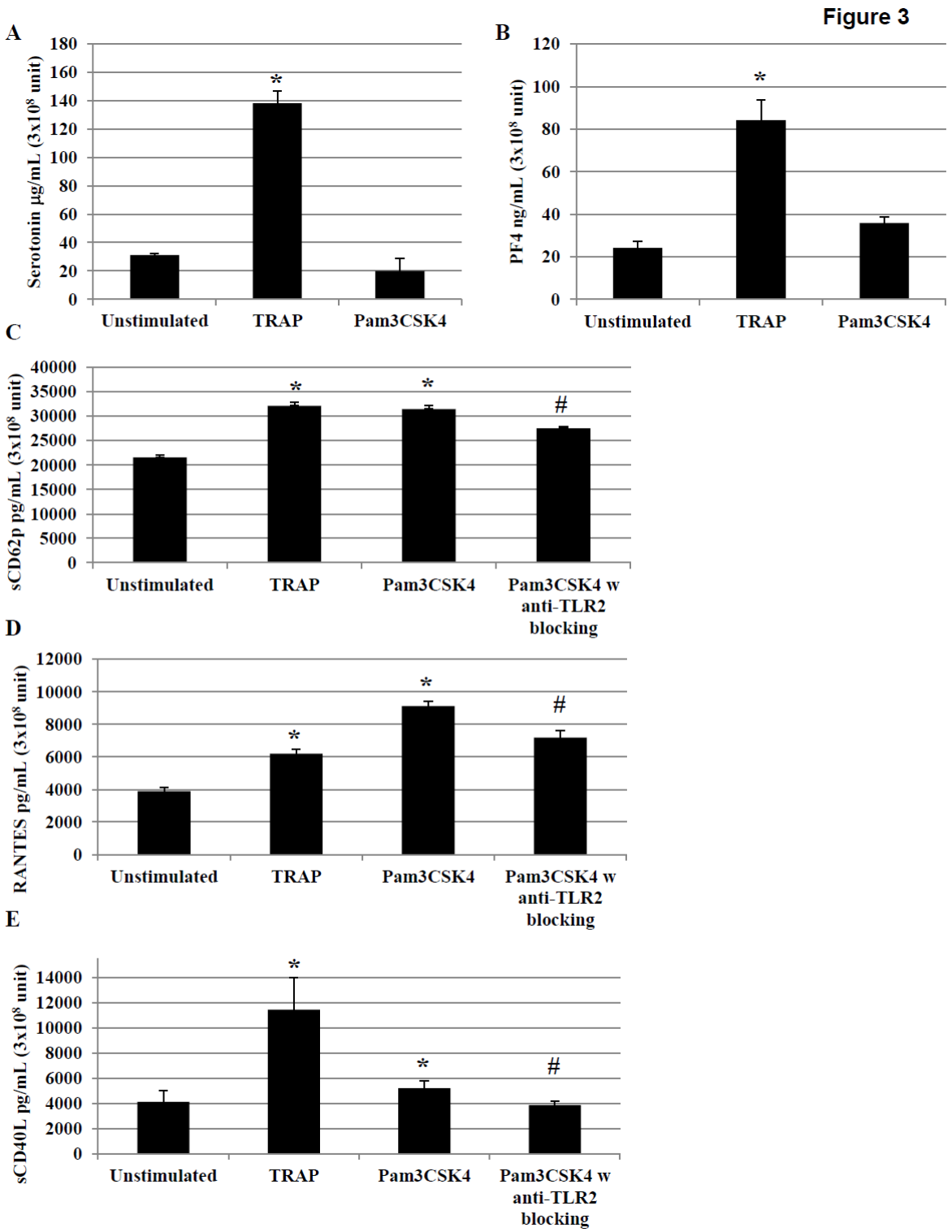


Figure 3
A
Serotonin µg/mL (3x10⁸ unit)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
Unstimulated
TRAP
Pam3CSK4
B
PF4 ng/mL (3x10⁸ unit)
120
100
80
60
40
20
0
*
Unstimulated
TRAP
Pam3CSK4
C
sCD62p pg/mL (3x10⁸ unit)
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
*
*
#
Unstimulated
TRAP
Pam3CSK4
Pam3CSK4 w anti-TLR2 blocking
D
RANTES pg/mL (3x10⁸ unit)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
*
#
Unstimulated
TRAP
Pam3CSK4
Pam3CSK4 w anti-TLR2 blocking
E
sCD40L pg/mL (3x10⁸ unit)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
*
#
Unstimulated
TRAP
Pam3CSK4
Pam3CSK4 w anti-TLR2 blocking

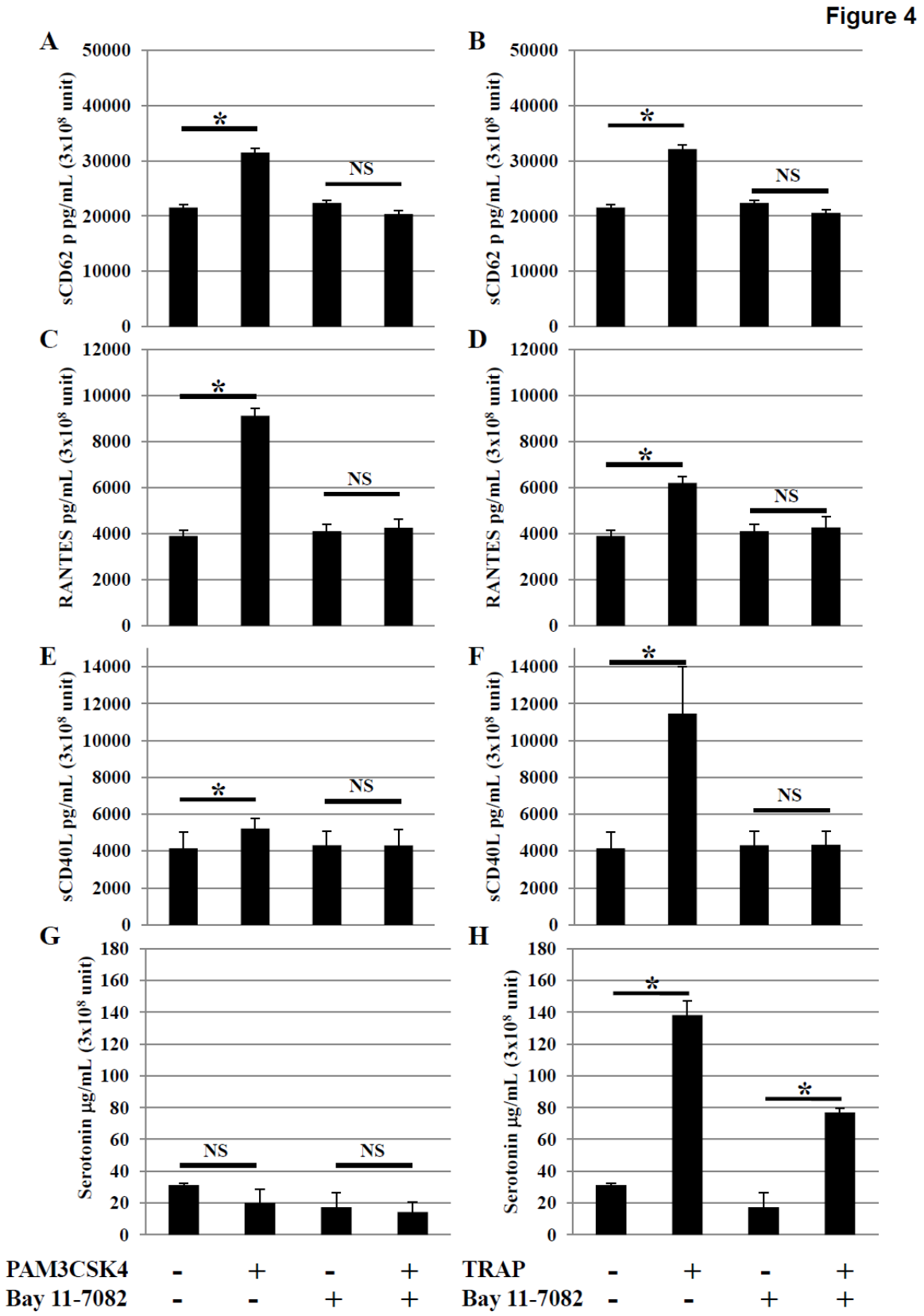
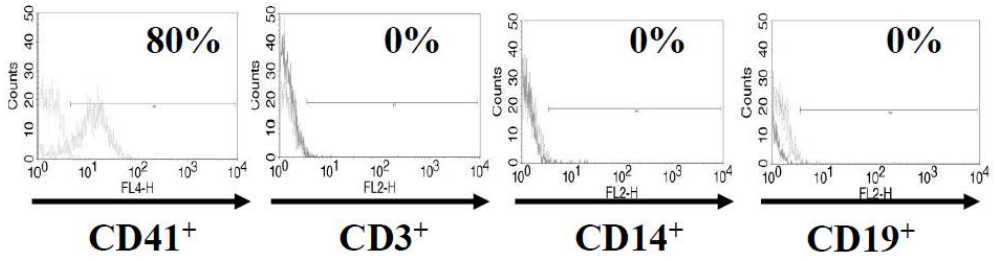


Figure 4
A
B
C
D
E
F
G
H
sCD62 p pg/mL (3x10⁸ unit)
RANTES pg/mL (3x10⁸ unit)
sCD40L pg/mL (3x10⁸ unit)
Serotonin µg/mL (3x10⁸ unit)
*
NS
PAM3CSK4 - + - +
Bay 11-7082 - - + +
TRAP - + - +
Bay 11-7082 - - + +

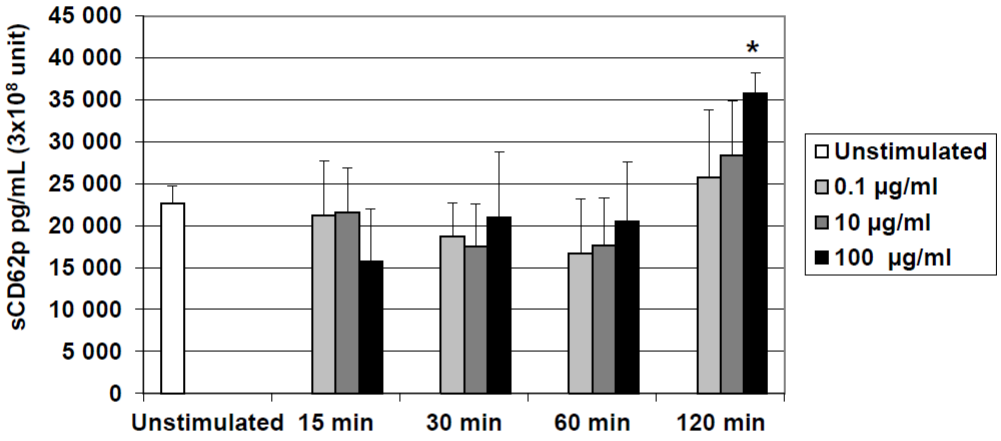
Supplemental Figure 1:

Peripheral blood was collected from healthy donors in endotoxin-free tubes with 3.2% sodium citrate. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifuging the blood at 190 *g* for 10 min at 22°C. Residual mononuclear cells were counted by flow cytometry. There was no detectable contamination of platelets by mononuclear cells (CD3-T cells, CD19-B cells, or CD14-monocytes). One representative experiment is shown (n=10)

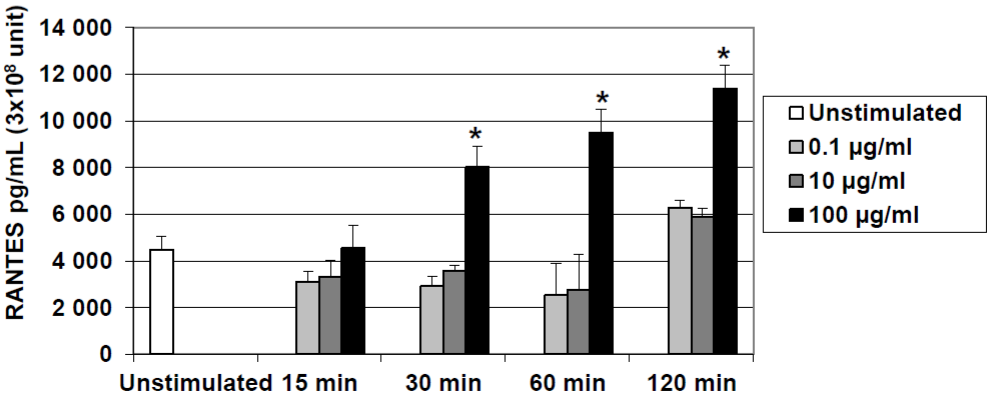


Supplemental Figure 2: Platelet sCD62P (A) and RANTES (B) released by platelets stimulated by Pam3CSK4. A titration and time course was performed in platelets from 5 controls (measured in triplicate) to determine the optimal concentration of Pam3CSK4 for platelet activation, using sCD62P and RANTES release as an end point. The optimal concentration of Pam3CSK4 required to achieve maximal activation (sCD62P and RANTES release) was demonstrated at 2 hours of TLR2 stimulation by its ligand Pam3CSK4 at 100 µg/ml. *P < 0.05 (Wilcoxon paired test; stimuli versus unstimulated).

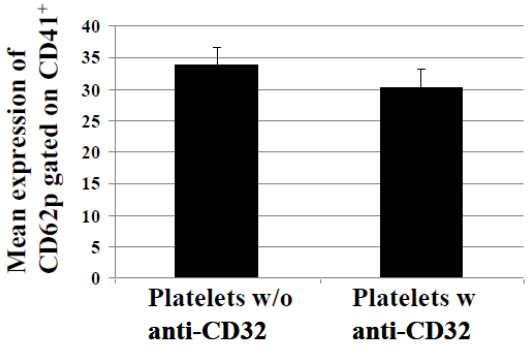
A)



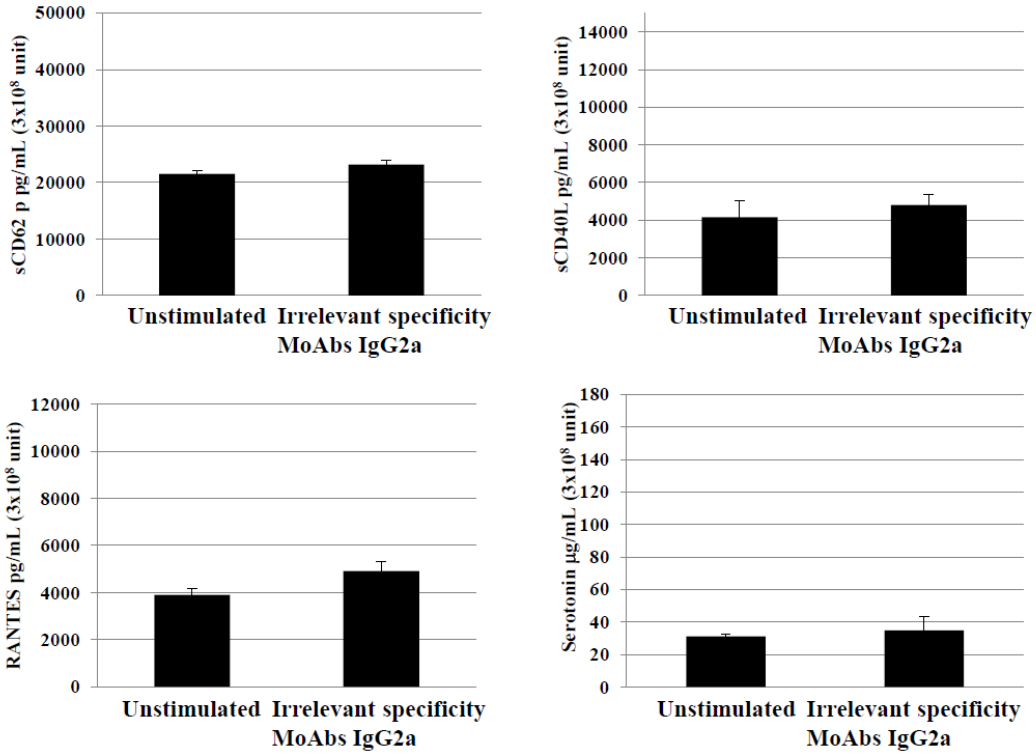
B)



Supplemental Figure 3: CD62P expression on platelets. CD62P was detected by antibody labeling and flow cytometric analysis after gating for $CD41^+$. Summary of flow cytometric analyses of CD62P expression by $CD41^+$ platelets with (w) or without (w/o) anti-CD32. The mean percentage of $CD41^+$ platelets positive for CD62P expression is shown (mean ± SD from five independent experiments).



Supplemental Figure 4: Serotonin, sCD62P, RANTES and sCD40L released by unstimulated platelets or platelets incubated with an irrelevant MoAbs IgG2a (isotype-matched irrelevant antibody serves as a control for anti-human TLR2 blocking MoAb). The levels of serotonin, sCD62P, RANTES, and sCD40L were quantified by ELISA. Background levels were subtracted and the data are mean ± SD (n = 4 experiments, measured in triplicate) and are expressed as pg/ml ($3x10^8$ unit - sCD62P, RANTES and sCD40L) or as µg/ml ($3x10^8$ unit – serotonin).



MANUSCRIT IV

HUMAN PLATELETS SENSE DIFFERENTIALLY VARIOUS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EXOTOXINS AND ADAPT SUBSEQUENT IMMUNOMODULATORY MOLECULE SECRETION PROFILES

Human platelets sense differentially various *Staphylococcus aureus* exotoxins and adapt subsequent immunomodulatory molecule secretion profiles

Pauline Damien, Fabrice Cognasse, Cédric Badiou, Fabrice Zeni, Marie Ange Eyraud, Charles Antoine Arthaud, Bruno Pozzetto, Olivier Dauwalder, Francois Vandenesch, Olivier Garraud, Gérard Lina and Hind Hamzeh-Cognasse

Article soumis pour publication
Octobre 2013

Les bactériémies à *S. aureus* sont de plus en plus fréquentes et représentent le premier facteur de risque d'infection nosocomiale. De par une fonction détournée de certaines intégrines plaquettaires (GPIIb-IIIa, GPIb) et la présence d'immunorécepteurs (TLR, FcR) les plaquettes sont impliquées dans la reconnaissance bactérienne. Les toxines bactériennes sont aussi décrites pour avoir un rôle sur les plaquettes. La majorité des études portant sur ce sujet concernent la fonction hémostatique des plaquettes. Dans le but de nous placer dans un cadre inflammatoire, qui peut être associé à l'orage cytokinique du sepsis, nous avons testé la capacité de toxines purifiées de *S. aureus* à induire la libération de facteurs immunomodulateurs plaquettaires.

Nous avons testé, sur des plaquettes de type PRP, la capacité de l'α toxine, de l'hémolysine γ, de la PVL et de TSST-1 à induire la libération de sCD62P, de sCD40L, de RANTES et SDF-1.

Le profil de sécrétion des facteurs solubles s'est avéré différent selon le type d'exotoxine. Aucune toxine n'a la capacité d'induire la libération de SDF-1, suggérant que les toxines ne fonctionnent pas forcément par une lyse de la cellule cible mais *via* des mécanismes plus complexes. D'autre part, certaines toxines n'ont aucune action à elles seules mais elles agissent en synergie lorsqu'elles sont combinées.

Cette étude suggère que les plaquettes sont capables d'adapter leur réponse inflammatoire en fonction des différents signaux de danger provenant pourtant d'un même genre bactérien. L'action synergique des toxines sur les plaquettes replace cette étude dans le contexte physiopathologique du sepsis, dans lequel les bactéries vivantes libèrent un ensemble de facteur de virulence.

Human platelets sense differentially various *Staphylococcus aureus* exotoxins and adapt subsequent immunomodulatory molecule secretion profiles

Running title: *S. aureus* exotoxins and platelet activation

Pauline Damien[*], Fabrice Cognasse[*, †], Cédric Badiou[‡], Fabrice Zeni[*, §], Marie Ange Eyraud[†], Charles Antoine Arthaud[†], Bruno Pozzetto[*, ¶], Olivier Dauwalder[‡, **], Francois Vandenesch[‡, **], Olivier Garraud[*, †], Gérard Lina[‡, **], Hind Hamzeh-Cognasse[*]

[*] Université de Lyon, GIMAP-EA3064, F42023, Saint Etienne, France.

[†] EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France.

[‡] CIRI, International Center for Infectiology Research, LabEx Ecofect, Université Lyon1, Inserm U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR5308, 69008 Lyon, France.

[§] Service de Réanimation médicale, CHU de Saint-Etienne 42270, France.

[¶] Laboratoire de Bactériologie-Virologie- Hygiène, Centre Hospitalo-Universitaire de Saint-Étienne, Saint-Etienne, France.

[**] Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.

Corresponding author

Prof. Olivier GARRAUD

Université de Lyon, GIMAP-EA3064, Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France.

Tel.: +33 4 77 42 14 67.

Fax: +33 4 77 42 14 86.

E-mail: olivier.garraud@univ-st-etienne.fr

Summary

***Background**:* Sepsis is accompanied by several biological phenomena including acute generalized inflammation. Platelets are involved in the pathophysiology of sepsis, as deduced from the frequent occurrence of thrombocytopenia in sepsis, although the mechanisms for platelet depletion are not completely elucidated. Platelets react to bacterial components and secrete copious amounts of proinflammatory molecules. *Staphylococcus aureus* is one of the most frequent bacteria causing sepsis in Europe. *S. aureus* and its components can bind to and activate platelets, leading to their aggregation.

Objectives: To investigate the effects of *S. aureus* exotoxins on the capacity of platelets to release inflammatory cytokines/chemokines.

Methods: Platelets were exposed to prolonged contact with staphylococcal exotoxins α-and γ-hemolysin, Panton-Valentine leukocidin and toxic shock syndrome toxin-1 to investigate whether exposure induces the release of soluble immunomodulator factors, such as soluble CD62P, soluble CD40L, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and stromal cell-derived factor-1α (SDF-1α).

Results: Profiles of secreted immunomodulators appeared dependent on the staphylococcal exotoxin used for stimulation, with differential release of sCD62P, sCD40L and RANTES by platelets. SDF-1α release was not elicited by staphylococcal toxins. Stimulation of platelets with combinations of exotoxins used at suboptimal concentrations resulted in contrasting releases of sCD40L and RANTES compared with each exotoxin alone.

***Conclusions*:** The results suggest that platelets discriminate between staphylococcal toxins and adapt their inflammatory response to perceived specific “danger” signals. This is of particular importance in the context the inflammatory phase of sepsis.

Keywords: Cytokines, Exotoxins, Inflammation, Platelet, *Staphylococcus aureus*.

Introduction

Staphylococcus aureus is not only a major cause of mucosal and skin infections but also a prominent contributor to bloodstream, respiratory and other invasive diseases [1, 2]. Along with *Pseudomonas* species, *S. aureus* is the most frequent agent causing sepsis in European intensive care units [3]. *S. aureus* strains express a variety of exotoxins, including cytotoxins such as Panton–Valentine leukocidin (PVL) and α-toxin which induce leukocyte activation [4, 5] and cell death [1, 6], and super antigens such as toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) which induces T cell polyclonal proliferation and a burst of cytokine release [7]. This is of particular importance in sepsis since recent studies suggest that antibodies for *S. aureus* exotoxins might protect against *S. aureus*-related sepsis [8].

S. aureus interacts with platelets and alters their hemostatic function, and interactions between platelets and bacteria have been extensively reviewed [9-11]. *S. aureus* activates platelets indirectly by mechanisms that depend on IgG and its associated platelet receptor FcγRIIA, fibrinogen and its receptor αIIbß3, von Willebrand factor and its receptor GPIb/IX/V, and complement and its receptors [12]. Staphylococcal super antigen-like 5 activates and aggregates platelets in a GPIb alpha-dependent manner, which has been hypothesized as the mechanism by which *S. aureus* is able to colonize the vascular bed and evade the immune system [13]. Mutants defective in IsdB, but in not IsdA or IsdH, were found unable to adhere to or aggregate platelets [14]. Other *S. aureus* components, such as fibrinogen binding proteins, clumping factor A, staphylothrombin, protein A, serine-aspartate repeat protein SdrE and extracellular adherence protein, have also been reported to activate platelets either directly or indirectly and to promote aggregation [15-19]. Recent studies on the effects of *S. aureus* α-hemolysin on platelets have reported that this toxin induces platelet aggregation and Bcl3 synthesis [20], and alters platelet viability [21], but also activates platelets and prompts them to aggregate with neutrophils [22].

Some *S. aureus* components inhibit the hemostatic functions of platelets, for example, lipoteichoic acid [23], extracellular fibrinogen binding protein [24], staphylokinase [25], and enterotoxin B [26].

Increasing evidence suggests that platelets, besides having a key role in primary haemostasis, mediate inflammation during infection by various mechanisms that are not yet completely understood [27]. During HIV infection, platelets have been reported to release inflammatory molecules, including neutrophil activating peptide 2, soluble CD62P (sCD62P), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), and soluble CD40-ligand (sCD40L) [28, 29]. In the same way, bacterial stimulation of platelets results in the release of many immunomodulatory molecules, particularly sCD40L [30, 31], in associations that depend on the stimulus and receptors involved [32-35].

As most studies investigating the effects of toxins on platelets focused on their hemostatic function and not the immunoregulatory role of platelets, in particular, the potential of the secreted inflammatory molecules [9, 36], it is essential to consider the other side of the platelet response. In the current study, we examined the *in vitro* response of platelets to several *S. aureus* exotoxins to investigate the capacity of platelets to release inflammatory molecules in response to different danger signals harbored by these exotoxins.

Materials and Methods

Exotoxin production and purification

PVL, α-hemolysin, γ-hemolysin and TSST-1 were produced in *Escherichia coli* M15 as His-tagged recombinant toxins and purified by affinity chromatography on a nickel affinity column according to the supplier's instructions (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) as previously described [37, 38]. Protein purity was verified by SDS-PAGE. Lipopolysaccharides were removed from toxin solutions by affinity chromatography (Detoxi-

GEL endotoxin Gel®, Pierce, Rockford, IL, USA). The QCL-1000 *Limulus* amebocyte lysate assay® (Cambrex-BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) showed that the endotoxin content of the recombinant SAg solutions was less than 0.005 units/mL.

Platelet preparation and stimulation

Platelet-rich plasma was prepared as previously described [39]. Briefly, peripheral blood was collected from healthy donors in endotoxin-free tubes with 3.2% sodium citrate (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and centrifuged at 150 × *g* for 12 min at 22°C. There was no detectable contamination of platelets by residual mononuclear cells as assessed by flow cytometry (CD3-T cells, CD19-B cells, or CD14-monocytes) [33]. Platelets (1.5×10^9/mL) were stimulated for 30 min at room temperature with 50 µg/mL thrombin receptor activator peptide (TRAP, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) as a positive control, or with staphylococcal exotoxins: α- and γ-hemolysin, PVL or TSST-1, either alone in a concentration ranging between 0.01 and 100 µg/mL, or in a two-exotoxin combination.

Enzyme-linked immunosorbent and Luminex® assay for cytokine assessment in platelet supernatants

Release of sCD62P, RANTES, stromal cell-derived factor-1α (SDF-1α) and sCD40L from platelets was measured in duplicate in supernatants of unstimulated (negative control) or TRAP-stimulated (positive control) platelets and in supernatants of platelets stimulated by staphylococcal exotoxins used alone or in combination. Soluble cytokine ELISA kits (sCD62P) were obtained from R&D Systems Europe Ltd. (Lille, France). Absorbance at 450 nm was measured on an ELISA reader (Magellan software, Sunrise™, Tecan Group Ltd., Lyon, France) as described previously [33, 40]. sCD40L, RANTES and SDF-1α were quantified using a Multiplexed Detection Technique (Merck Millipore, Guyancourt, France)

according to the manufacturer's instructions. Results were read on a Bioplex 200 system (Bioplex Manager™ software, Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

Measurement of endotoxin levels in platelet-rich plasma

To ensure that no bacterial contamination could influence any *in vitro* observation, platelet-rich plasma were examined for bacterial growth by inoculation of 1 mL of platelet-rich plasma in conventional blood culture medium and incubated in a BD Bactec™ automated system (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Absence of endotoxins was confirmed by QCL-1000 *Limulus* amebocyte lysate assay® (Lonza/Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France).

Statistical analysis

The student's *t* test was used for inter-experimental comparisons of cytokine/chemokine concentrations under various culture conditions. All values are reported as mean ± SD. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

S. aureus *exotoxins influence the release of cytokines/chemokines from platelets*

Stimulation of platelets by a thrombin agonist, i.e. TRAP, validated their ability to respond to specific triggering by releasing large amounts of several cytokines including sCD62P, sCD40L, RANTES and SDF-1α (Figure 1). In contrast, none of the *S. aureus* exotoxins tested were able to induce the release of SDF-1α from platelets, regardless of the concentration used (Figures 1, 2, 3 and 4). Release of the other three inflammatory molecules assayed was observed upon stimulation with all tested exotoxins, though with differing profiles. Stimulation of platelets with TSST-1, α-hemolysin or PVL did not cause a significant release

of sCD62P compared with the control (Figures 1, 2 and 4, respectively); however, γ-hemolysin induced the release of significant (P<0.05) amounts of sCD62P ranging from 10807 ± 3420 pg/mL for the weakest concentration (0.01 µg/mL) to 18747 ± 5088 pg/mL for the highest concentration (100 µg/mL) (Figure 3).

Stimulation of platelets with all *S. aureus* exotoxins tested caused significant releases of RANTES (Figures 1, 2, 3 and 4) when used at 10 µg/mL and higher concentrations; except for PVL, which required a concentration of 100 µg/mL to induce a significant RANTES release (Figure 4). Stimulation of platelets with TSST-1, α-hemolysin, γ-hemolysin and PVL resulted in the significant (P<0.05) release of 8076 ± 2122 pg/mL, 20636 ± 8354 pg/mL, 23734 ± 7393 pg/mL and 10461 ± 3544 pg/mL of RANTES, respectively, compared with unstimulated platelets (4598 ± 3882 pg/mL).

The minimal concentrations of exotoxins inducing significant releases of sCD40L were 100 µg/mL for TSST-1, 1 µg/mL for α-hemolysin, and 10 µg/mL for γ-hemolysin (Figures 1, 2 and 3). PVL failed to induce sCD40L release at all concentrations tested (Figure 4). sCD40L levels rose significantly from 40 ± 27 pg/mL (in the absence of stimulation) to 90 ± 28 pg/mL with TSST-1 at 100 µg/mL (P<0.05) (Figure 1), to 147 ± 75 pg/mL with α-hemolysin at 1 µg/mL (P<0.05) (Figure 2), and to 169 ± 88 pg/mL with γ-hemolysin at 10 µg/mL (P<0.05) (Figure 3) exposure.

Platelet cytokine/chemokine release after combined staphylococcal exotoxin activation

The apparent low sensitivity of platelets to the *S. aureus* toxins tested prompted us to test for the effects of pairwise combinations of TSST-1, α-hemolysin, γ-hemolysin and PVL at concentrations for which they showed no effect when used alone. For this purpose, we assessed the release of sCD62P, RANTES, sCD40L and SDF-1α after having defined the combination of suboptimal *S. aureus* exotoxin concentrations which were the maximal

concentrations of exotoxin that did not induce a significant release of cytokines/chemokines, i.e. 1, 0.001, 1 and 10 µg/mL for TSST-1, α- and γ-hemolysin, and PVL, respectively. No significant modulation of sCD62P and SDF-1α release (Figure 5) was observed when platelets were stimulated with any combination of suboptimal concentrations of *S. aureus* exotoxin. Interestingly, all combinations of toxins were able to induce platelets to differentially release significant amounts of RANTES and sCD40L (Figure 5). The levels of RANTES and sCD40L were lower but comparable with the levels observed with exotoxins used alone at higher levels. For instance, RANTES levels ranged between 15926 ± 2628 and 20973 ± 4038 pg/mL, and sCD40L levels ranged between 115 ± 28 and 215 ± 40 pg/mL for combinations of exotoxins at suboptimal concentrations, while the maximum release upon individual exotoxin stimulation was 31158 ± 2222 pg/mL for RANTES and 330 ± 110 pg/mL for sCD40L, respectively (Figure 3).

Discussion

In this study, we investigated whether exposure of normal platelets to various staphylococcal exotoxins, such as TSST-1, α- and γ-hemolysin, and PVL, could signal platelets to release soluble immunomodulator factors. We were particularly interested in molecules that have been reported as playing a role in the inflammatory phase of sepsis and which platelets can potentially secrete, i.e. sCD62P, sCD40L, RANTES and SDF-1α [31, 41-46]. We observed differential production levels of sCD62P, sCD40L and RANTES, but not SDF-1α, after staphylococcal exotoxin stimulation; and a combination of exotoxins at suboptimal concentrations resulted in a significant release sCD40L and RANTES, but not sCD62P or SDF-1α, compared with each exotoxin alone.

Innate immune cells display shared characteristics in response to pathogens; for example, release of a large range of soluble immunomodulatory factors. Platelets secrete a plethora of cytokines, chemokines, and biological response modifiers, and express Toll-like receptor (TLR) and other pattern recognition receptors [32, 47]. Recently, interest in platelets has increased because of their rapid accumulation, aggregation, and activation in response to infectious pathogens [48]. This has caused researchers to consider whether they might function as sentinels and transfer information to peripheral immune cells in the early stages of infection. For example, platelet TLR4 was reported to be important in the induction of neutrophils in contact with bacteria to release a sticky "net" of DNA and histones, which traps and kills pathogens even after the neutrophil no longer exists [49]. As platelets may recognize danger-associated molecular patterns to further perpetuate the inflammatory response [27, 50-53], it has been proposed that a complex network of inflammatory cytokines/chemokines, some derived from platelets and others derived from platelet partners (i.e. leukocytes), play a major part in facilitating, augmenting, and propagating inflammation [54, 55].

S. aureus is a significant human pathogen that causes multiple illnesses [56], and its exotoxins stimulate massive cytokine production by several types of immune cells [1, 6, 57-61]. However, very few studies have examined the effects of staphylococcal components on platelet inflammatory responses. The vast majority of studies examining platelets and sepsis have researched the molecular mechanisms by which *S. aureus* and platelets interact, either directly or indirectly, and analyzed the influences of these interactions on platelet aggregation [12-17, 19, 20, 62, 63]. Few have examined the inflammatory components of the platelet response.

In model used in the current study, all exotoxins tested strongly stimulated platelet cytokine/chemokine production, not in a binary way but rather with different patterns of production. This reinforces the notion that platelets discriminate among triggering signals and

adapt their inflammatory response to the specific trigger, as previously reported for *S. sanguinis* strains [35] and lipopolysaccharide isoforms [33]. It appears that α- and γ-hemolysin induce a higher and wider platelet inflammatory response than TSST-1 and PVL, suggesting that these toxins, by stimulating platelets, could further contribute to the inflammatory response associated with infection. This observation is of particular importance for sepsis, and especially for its early proinflammatory phase.

Because some strains of *S. aureus* display several exotoxins, it was important to assess whether the exotoxins that do not strongly activate platelets were more effective in combination, even at suboptimal concentrations. The results show that combined staphylococcal exotoxins at suboptimal concentrations induced significant platelet cytokine/chemokine production, close to that of exotoxins alone, suggesting a cumulative effect.

In cases of severe sepsis, considering the results of the present and recent studies [8], it may be possible to promote a humoral response simultaneously targeting several exotoxins since their combination induces, even at suboptimal concentrations, a significant inflammatory response in platelets. The platelet inflammatory response could be targeted and reduced through anti-platelet drugs.

In conclusion, it appears to be of particular importance not to underestimate the participation of platelet inflammatory responses to staphylococcal infection, especially in sepsis where the inflammatory phase has to be controlled.

Author contributions

PD, FC and HHC designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. CB, MAE, CAA and OD performed the experiments. FZ, BP, FV and GL designed the study. OG, GL, FC and HHC coordinated the study.

Acknowledgements

The authors thank the excellent scientific and technical participation of present and former collaborators: M. Lauhlé, A. Mondière and O. Decreuse. The authors are grateful to Dr. P. Chavarin and Dr. A. Lefebvre at the EFS Auvergne-Loire, and to the generous blood donors. This work was supported by EFS Auvergne-Loire, the French "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-12-JSV1-0012-01) and the Academic Research Community-1 of the Rhône-Alpes Region.

Competing interests

The authors declare that they have no competing financial interests.

References

1 Fournier B, Philpott DJ. Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 521-40.

2 Petti CA, Fowler VG, Jr. Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis. *Cardiol Clin* 2003; 21: 219-33, vii.

3 Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34: 344-53.

4 Gjertsson I, Foster S, Tarkowski A. Polarization of cytokine responses in B- and T-lymphocytes during Staphylococcus aureus infection. *Microb pathogen* 2003; 35: 119-24.

5 Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR, Chambers HF. Polymorphonuclear leukocytes mediate Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 5587-92.

6 Tseng CW, Kyme P, Low J, Rocha MA, Alsabeh R, Miller LG, Otto M, Arditi M, Diep BA, Nizet V, Doherty TM, Beenhouwer DO, Liu GY. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin contributes to inflammation and muscle tissue injury. *PLoS ONE* 2009; 4: e6387.

7 Verkaik NJ, Dauwalder O, Antri K, Boubekri I, de Vogel CP, Badiou C, Bes M, Vandenesch F, Tazir M, Hooijkaas H, Verbrugh HA, van Belkum A, Etienne J, Lina G, Ramdani-Bouguessa N, van Wamel WJ. Immunogenicity of toxins during Staphylococcus aureus infection. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 61-8.

8 Adhikari RP, Ajao AO, Aman MJ, Karauzum H, Sarwar J, Lydecker AD, Johnson JK, Nguyen C, Chen WH, Roghmann MC. Lower antibody levels to Staphylococcus aureus exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive S. aureus infections. *J Infect Dis* 2012; 206: 915-23.

9 Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1097-107.

10 Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 445-57.

11 Yeaman MR. Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense. *Future Microbiol* 2010; 5: 471-506.

12 Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ. Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcgammaRIIa receptor. *Mol Microbiol* 2006; 59: 212-30.

13 de Haas CJ, Weeterings C, Vughs MM, de Groot PG, Van Strijp JA, Lisman T. Staphylococcal superantigen-like 5 activates platelets and supports platelet adhesion under flow conditions, which involves glycoprotein Ibalpha and alpha IIb beta 3. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1867-74.

14 Miajlovic H, Zapotoczna M, Geoghegan JA, Kerrigan SW, Speziale P, Foster TJ. Direct interaction of iron-regulated surface determinant IsdB of Staphylococcus aureus with the GPIIb/IIIa receptor on platelets. *Microbiology* 2010; 156: 920-8.

15 Bertling A, Niemann S, Hussain M, Holbrook L, Stanley RG, Brodde MF, Pohl S, Schifferdecker T, Roth J, Jurk K, Muller A, Lahav J, Peters G, Heilmann C, Gibbins JM, Kehrel BE. Staphylococcal extracellular adherence protein induces platelet activation by stimulation of thiol isomerases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1979-90.

16 Vanassche T, Kauskot A, Verhaegen J, Peetermans WE, van Ryn J, Schneewind O, Hoylaerts MF, Verhamme P. Fibrin formation by staphylothrombin facilitates Staphylococcus aureus-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2012; 107: 1107-21.

17 Kerrigan SW, Clarke N, Loughman A, Meade G, Foster TJ, Cox D. Molecular basis for Staphylococcus aureus-mediated platelet aggregate formation under arterial shear in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 335-40.

18 Veloso TR, Chaouch A, Roger T, Giddey M, Vouillamoz J, Majcherczyk P, Que YA, Rousson V, Moreillon P, Entenza JM. Use of a human-like low-grade bacteremia model of experimental endocarditis to study the role of Staphylococcus aureus adhesins and platelet aggregation in early endocarditis. *Infect Immun* 2013; 81: 697-703.

19 O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, Hogan M, Penades J, Litt D, Fitzgerald DJ, Foster TJ, Cox D. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol* 2002; 44: 1033-44.

20 Schubert S, Schwertz H, Weyrich AS, Franks ZG, Lindemann S, Otto M, Behr H, Loppnow H, Schlitt A, Russ M, Presek P, Werdan K, Buerke M. Staphylococcus aureus alpha-Toxin Triggers the Synthesis of B-Cell Lymphoma 3 by Human Platelets. *Toxins (Basel)* 2011; 3: 120-33.

21 Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Franks ZG, Vieira de Abreu A, Grundler K, Kile BT, Dhakal BK, Rondina MT, Kahr WH, Mulvey MA, Blaylock RC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein, by human platelets. *Blood* 2012; 120: 5014-20.

22 Parimon T, Li Z, Bolz DD, McIndoo ER, Bayer CR, Stevens DL, Bryant AE. Staphylococcus aureus alpha-Hemolysin Promotes Platelet-Neutrophil Aggregate Formation. *J Infect Dis* 2013; 208: 761-70.

23 Waller AK, Sage T, Kumar C, Carr T, Gibbins JM, Clarke SR. Staphylococcus aureus lipoteichoic acid inhibits platelet activation and thrombus formation via the Paf receptor. *J Infect Dis* 2013.

24 Shannon O, Uekotter A, Flock JI. Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from Staphylococcus aureus as an antiplatelet agent in vivo. *Thromb Haemost* 2005; 93: 927-31.

25 Suehiro A, Oura Y, Ueda M, Kakishita E. Inhibitory effect of staphylokinase on platelet aggregation. *Thrombosis and haemostasis* 1993; 70: 834-7.

26 Tran U, Boyle T, Shupp JW, Hammamieh R, Jett M. Staphylococcal enterotoxin B initiates protein kinase C translocation and eicosanoid metabolism while inhibiting thrombin-induced aggregation in human platelets. *Mol Cell Bioch* 2006; 288: 171-8.

27 Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 264-74.

28 Damien P, Cognasse F, Lucht F, Suy F, Pozzetto B, Garraud O, Hamzeh-Cognasse H. Highly Active Antiretroviral Therapy Alters Inflammation Linked to Platelet Cytokines in HIV-1-Infected Patients. *J Infect Dis* 2013; 208: 868-70.

29 Landro L, Ueland T, Otterdal K, Froland SS, Aukrust P. Persistently raised plasma levels of platelet-derived inflammatory mediators in HIV-infected patients during highly active anti-retroviral therapy. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1075-7.

30 Assinger A, Laky M, Badrnya S, Esfandeyari A, Volf I. Periodontopathogens induce expression of CD40L on human platelets via TLR2 and TLR4. *Thromb Res* 2012; 130: e73-8.

31 Zhang S, Rahman M, Qi Z, Thorlacius H. Simvastatin antagonizes CD40L secretion, CXC chemokine formation, and pulmonary infiltration of neutrophils in abdominal sepsis. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 735-42.

32 Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 196-8.

33 Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, Arthaud CA, Eyraud MA, Zeni F, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O, Cognasse F. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol* 2012; 145: 189-200.

34 Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Berthet J, Damien P, Lucht F, Pozzetto B, Garraud O. Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides. *AIDS* 2009; 23: 2057-9.

35 McNicol A, Agpalza A, Jackson EC, Hamzeh-Cognasse H, Garraud O, Cognasse F. Streptococcus sanguinis-induced cytokine release from platelets. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 2038-49.

36 Martin E, Cevik C, Nugent K. The role of hypervirulent Staphylococcus aureus infections in the development of deep vein thrombosis. *Thromb Res* 2012; 130: 302-8.

37 Thomas D, Dauwalder O, Brun V, Badiou C, Ferry T, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Staphylococcus aureus superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. *Infect Immun* 2009; 77: 2043-50.

38 Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, Cottin V, Couzon F, Juruj C, Dauwalder O, Goutagny N, Diep BA, Vandenesch F, Henry T. Cross-talk between Staphylococcus aureus leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol* 2012; 14: 1019-36.

39 Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol* 2008; 141: 84-91.

40 Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F, Palle S, Chavarin P, Olivier T, Delezay O, Pozzetto B, Garraud O. Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC Immunol* 2008; 9: 54.

41 Figueras-Aloy J, Gomez-Lopez L, Rodriguez-Miguelez JM, Salvia-Roiges MD, Jordan-Garcia I, Ferrer-Codina I, Carbonell-Estrany X, Jimenez-Gonzalez R. Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 2007; 24: 331-8.

42 Inwald DP, Faust SN, Lister P, Peters MJ, Levin M, Heyderman R, Klein NJ. Platelet and soluble CD40L in meningococcal sepsis. *Intensive Care Med* 2006; 32: 1432-7.

43 Rahman M, Zhang S, Chew M, Ersson A, Jeppsson B, Thorlacius H. Platelet-derived CD40L (CD154) mediates neutrophil upregulation of Mac-1 and recruitment in septic lung injury. *Ann Surg* 2009; 250: 783-90.

44 Sakamaki F, Ishizaka A, Handa M, Fujishima S, Urano T, Sayama K, Nakamura H, Kanazawa M, Kawashiro T, Katayama M, et al. Soluble form of P-selectin in plasma is elevated in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1821-6.

45 Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Thayer TC, Winfield RD, Scumpia PO, Cuenca AG, Harrington PB, O'Malley KA, Warner E, Gabrilovich S, Mathews CE, Laface D, Heyworth PG, Ramphal R, Strieter RM, Moldawer LL, Efron PA. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. *J Immunol* 2011; 187: 911-8.

46 Grommes J, Alard JE, Drechsler M, Wantha S, Morgelin M, Kuebler WM, Jacobs M, von Hundelshausen P, Markart P, Wygrecka M, Preissner KT, Hackeng TM, Koenen RR, Weber C, Soehnlein O. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 628-36.

47 Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H, Devine MT, Fuchs TA, Weyrich AS, Semple JW, Flaumenhaft R, Italiano JE, Jr. T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol* 2012; 198: 561-74.

48 Wong CH, Jenne CN, Petri B, Chrobok NL, Kubes P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol* 2013; 14: 785-92.

49 Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13: 463-9.

50 Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Rev Immunol* 2013; 13: 34-45.

51 Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol* 2012; 92: 1167-75.

52 Smith TL, Weyrich AS. Platelets as central mediators of systemic inflammatory responses. *Thromb Res* 2011; 127: 391-4.

53 Garraud O, Cognasse F. Platelet Toll-like receptor expression: the link between "danger" ligands and inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010; 9: 322-33.

54 Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 26-39.

55 von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007; 100: 27-40.

56 Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *New Engl J Med* 1998; 339: 520-32.

57 McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Ann Rev Microbiol* 2001; 55: 77-104.

58 Llewelyn M, Cohen J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 156-62.

59 Malachowa N, Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Parnell MJ, Gardner DJ, Deleo FR. Staphylococcus aureus leukotoxin GH promotes inflammation. *J Infect Dis* 2012; 206: 1185-93.

60 Kapetanovic R, Jouvion G, Fitting C, Parlato M, Blanchet C, Huerre M, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Contribution of NOD2 to lung inflammation during Staphylococcus aureus-induced pneumonia. *Microbes Infect* 2010; 12: 759-67.

61 Casas C, Ginisty H, Alvarez-Georges S, Viode C, Lejeune O, Rouvrais C, Schmitt AM, Redoules D. Molecular characterization of inflammation and Staphylococcus aureus colonization of involved skin of atopic dermatitis patients. A non-invasive approach. *Skin Pharmacol Physiol* 2008; 21: 260-8.

62 Heptinstall S. Platelet activation by an extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus acting via modulation of sulfhydryl groups on platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1751-2.

63 Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D, Foster TJ. Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by Staphylococcus aureus clumping factor A. *Mol Microbiol* 2005; 57: 804-18.

Figure legends

Figure 1. sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α release by platelets upon *S. aureus* TSST-1 stimulation

The levels of sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α were quantified by ELISA or Luminex® assays. Platelets were stimulated with TRAP as a positive control. Background levels have been subtracted from the values shown. Data (mean ± SD; n = 12 experiments) are expressed in pg/mL. * P<0.05 (student's *t* test; stimuli vs. unstimulated, NS).

Figure 2. sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α release by platelets upon *S. aureus* α-hemolysin stimulation

The levels of sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α were quantified by ELISA or Luminex® assays. Platelets were stimulated with TRAP as a positive control. Background levels have been subtracted from the values shown. Data (mean ± SD; n = 12 experiments) are expressed in pg/mL. * P<0.05 (student's *t* test; stimuli vs. unstimulated, NS).

Figure 3. sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α release by platelets upon *S. aureus* γ-hemolysin stimulation

The levels of sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α were quantified by ELISA or Luminex® assays. Platelets were stimulated with TRAP as a positive control. Background levels have been subtracted from values shown. Data (mean ± SD; n = 12 experiments) are expressed in pg/mL. * P<0.05 (student's *t* test; stimuli vs. unstimulated, NS).

Figure 4. sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α release by platelets upon *S. aureus* PVL stimulation

The levels of sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α were quantified by ELISA or Luminex® assays. Platelets were stimulated with TRAP as a positive control. Background levels have been subtracted from the values shown. Data (mean ± SD; n = 12 experiments) are expressed in pg/mL. * P<0.05 (student's *t* test; stimuli vs. unstimulated, NS).

Figure 5. sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α release by platelets upon stimulation with a combination of two *S. aureus* exotoxins

Platelets were stimulated simultaneously with two exotoxins at suboptimal concentrations defined in the previous single toxin stimulation assays (i.e. 1, 0.001, 1 and 10 µg/mL for TSST-1, α- and γ-hemolysin, and PVL, respectively). The levels of sCD62P, RANTES, sCD40L, and SDF-1α were quantified by ELISA or Luminex® assays. Platelets were stimulated with TRAP as a positive control. Background levels have been subtracted from the values shown. Data (mean ± SD; n = 5 experiments) are expressed in pg/mL. * P<0.05 (student's *t* test; stimuli vs. unstimulated, NS).

Figure 1

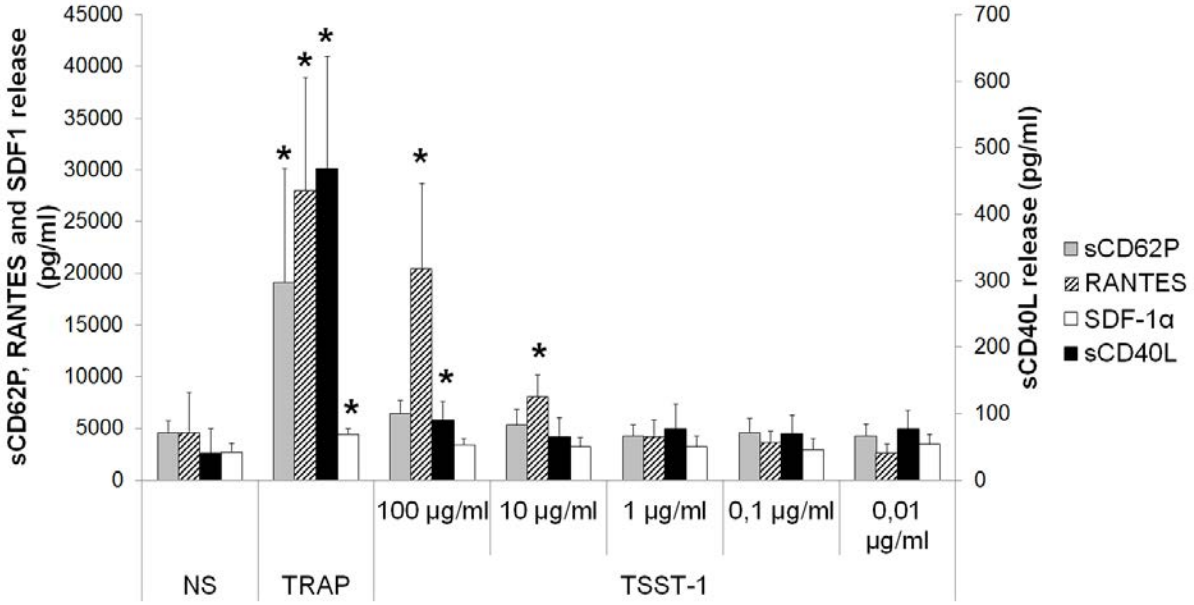

sCD62P, RANTES and SDF1 release (pg/ml)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
sCD40L release (pg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
sCD62P
RANTES
SDF-1α
sCD40L
100 µg/ml
10 µg/ml
1 µg/ml
0,1 µg/ml
0,01 µg/ml
NS
TRAP
TSST-1

Figure 2

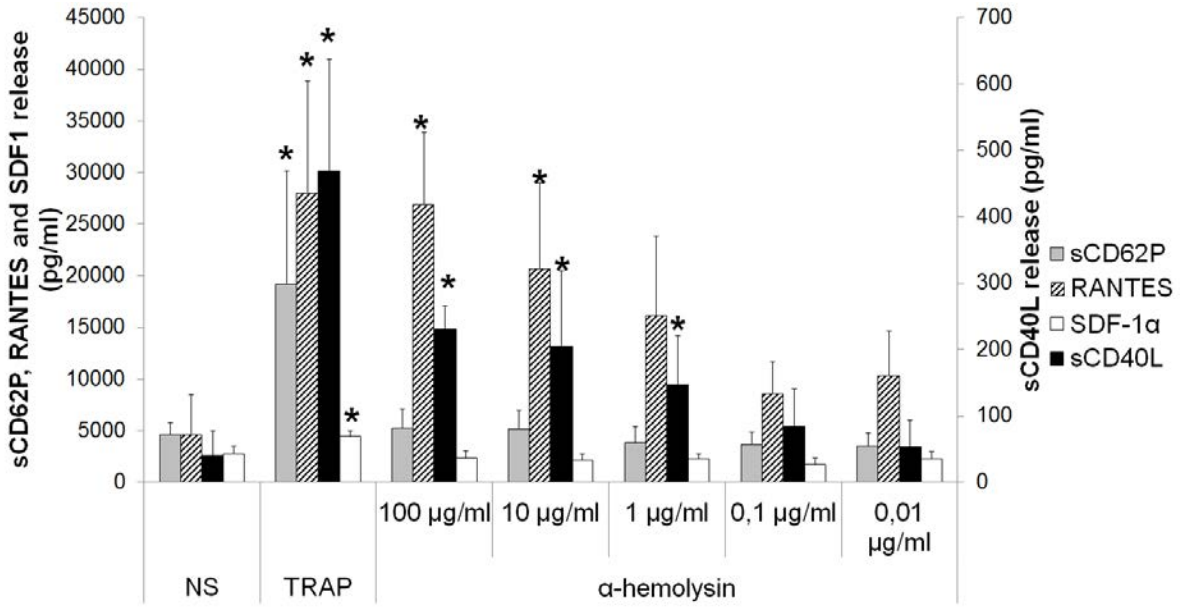

sCD62P, RANTES and SDF1 release (pg/ml)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
sCD40L release (pg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
sCD62P
RANTES
SDF-1α
sCD40L
NS
TRAP
100 µg/ml
10 µg/ml
1 µg/ml
0,1 µg/ml
0,01 µg/ml
α-hemolysin

Figure 3

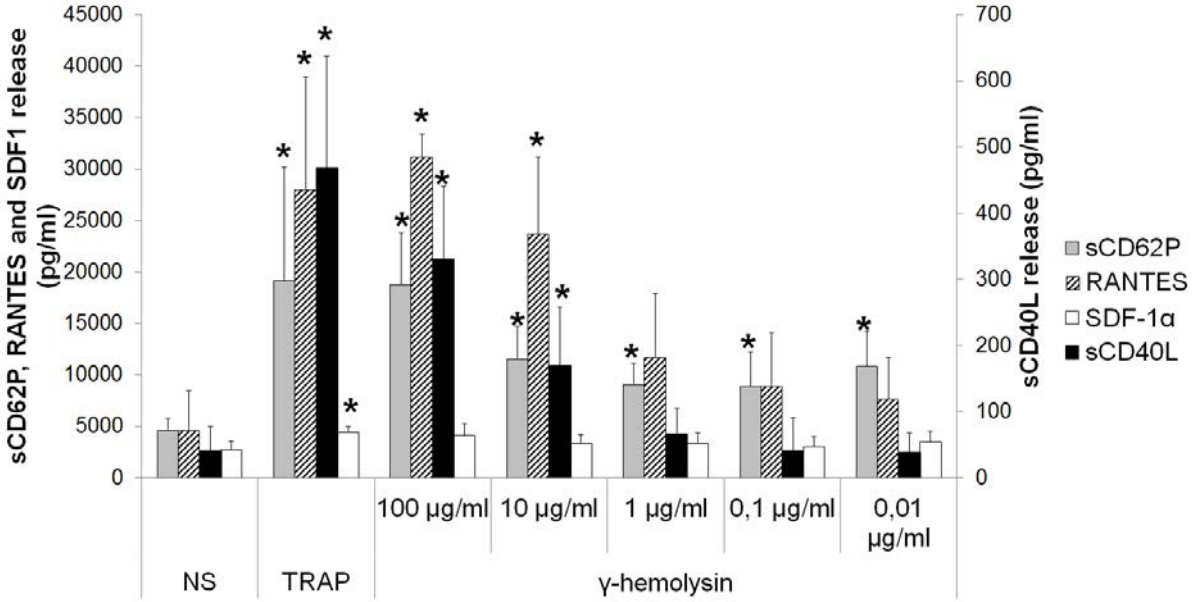

sCD62P, RANTES and SDF1 release (pg/ml)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
sCD40L release (pg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
sCD62P
RANTES
SDF-1α
sCD40L
NS
TRAP
100 µg/ml
10 µg/ml
1 µg/ml
0,1 µg/ml
0,01 µg/ml
γ-hemolysin

Figure 4

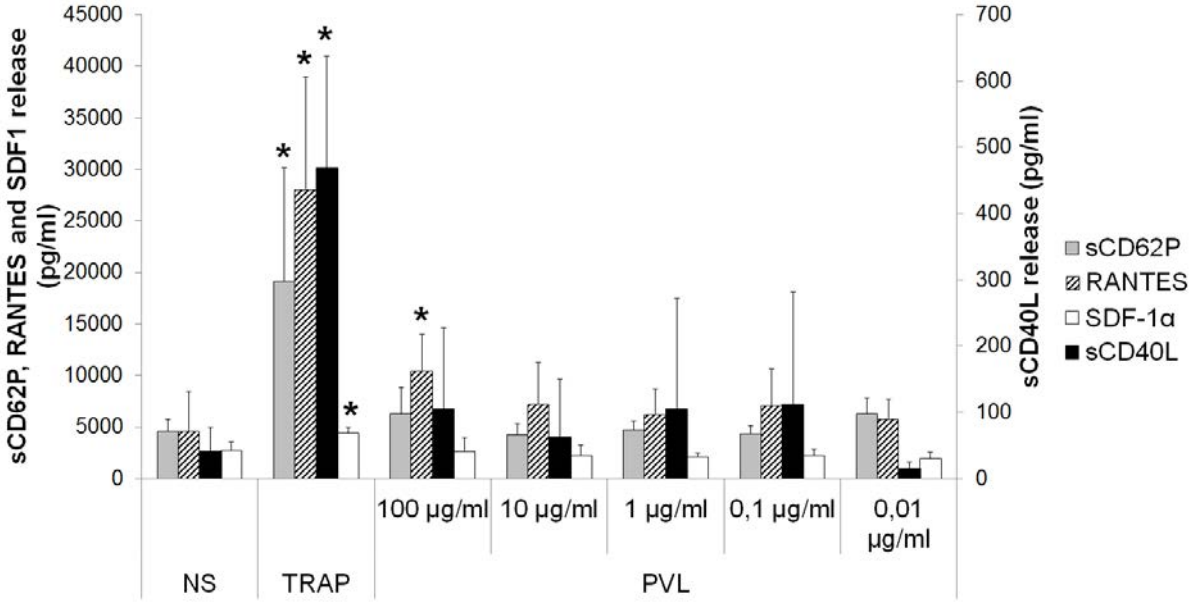
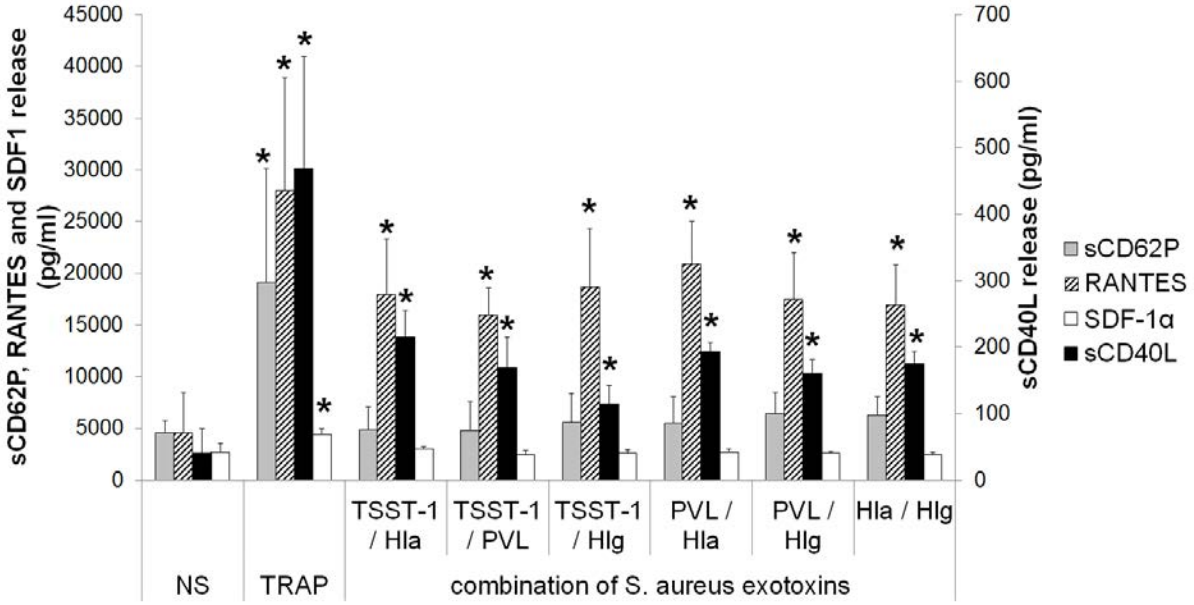

sCD62P, RANTES and SDF1 release (pg/ml)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
sCD40L release (pg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
sCD62P
RANTES
SDF-1α
sCD40L
100 µg/ml
10 µg/ml
1 µg/ml
0,1 µg/ml
0,01 µg/ml
NS
TRAP
PVL

Figure 5


sCD62P, RANTES and SDF1 release (pg/ml)
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
sCD40L release (pg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
sCD62P
RANTES
SDF-1α
sCD40L
NS
TRAP
TSST-1 / Hla
TSST-1 / PVL
TSST-1 / Hlg
PVL / Hla
PVL / Hlg
Hla / Hlg
combination of S. aureus exotoxins

MANUSCRIT V

NEUTROPHIL CHEMOATTRACTION PROMOTES PLATELET EXTRAVASATION AND INFLAMMATORY FACTOR RELEASE

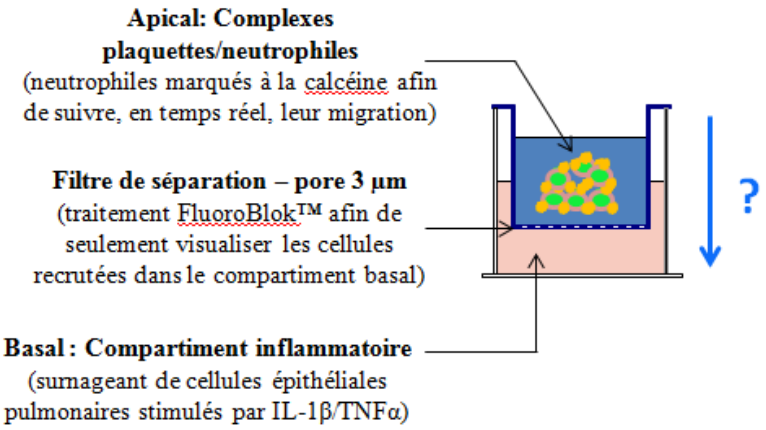
Neutrophil chemoattraction promotes platelet extravasation and inflammatory factor release

Pauline Damien, Fabrice Cognasse, Marie Ange Eyraud, Charles Antoine Arthaud, Bruno Pozzetto, Olivier Garraud, and Hind Hamzeh-Cognasse

Article soumis pour publication
Novembre 2013

La littérature décrit de plus en plus l'implication des plaquettes dans les pathologies inflammatoires pulmonaires telles que les allergies respiratoires de type asthmatique ou d'ateintes de type ALI au cours d'un sepsis ou d'un TRALI. Le rôle des plaquettes dans ces manifestations cliniques découle principalement de leur interconnexion avec les neutrophiles, favorisant leur recrutement au niveau de l'œdème pulmonaire. Zarbock *et al.* [360] s'intéressent particulièrement à l'importance de la coopération plaquettes/neutrophiles dans la physiopathologie de l'ALI, allant même jusqu'à montrer que l'inhibition de cette interaction a la capacité de prévenir l'apparition des signes cliniques associé à un ALI expérimental. Boilard *et al.* [75] et Weissmüller *et al* [419] ont, quant à eux, montré que grâce à cette coopération avec les neutrophiles les plaquettes(ou microparticules plaquettaires) sont capables de quitter le compartiment sanguin et de migrer en direction du site inflammatoire. Nous avons donc émis l'hypothèse que les plaquettes pouvaient, grâce aux neutrophiles, migrer en direction des alvéoles où elles pourraient continuer d'exercer leur fonction pro-inflammatoire.

Le but de cette étude a été de développer un modèle *in vitro* permettant de visualiser la chimioattraction des complexes plaquettes-neutrophiles dans un contexte d'inflammation pulmonaire. La chambre de migration présentée ci-dessous a permis de modéliser *in vitro* la chimioattraction des cellules inflammatoires.



Nous avons choisi de former des complexes neutrophiles-plaquettes au ratio 1:30, proche du ratio physiologique ce ratio permet de tenir compte d'une éventuelle hyperleucocytose associée à la réaction inflammatoire et des limites techniques du modèle. La seconde étape du travail avait pour but de détecter (après 120 min) la présence des plaquettes dans le compartiment basal et de les caractériser.

Le surnageant de cellules inflammatoires utilisé a pu être validé par ses capacités de chimioattraction des neutrophiles, comparable à celles d'un cocktail de chimiokines. Les neutrophiles recrutés par cet environnement inflammatoire possèdent toujours les plaquettes à leur surface, qui sont davantage activées que lorsqu'elles se situaient dans le compartiment apical avant leur migration. Cette activation se traduit par une augmentation de sC62P à la surface mais aussi par la libération, au niveau du compartiment basal, de facteurs immunomodulateurs plaquettaires.

Grâce au développement de ce modèle, il possible de montrer que les neutrophiles recrutés par un environnement pulmonaire inflammatoire transportent des plaquettes à leur surface. Les plaquettes recrutées semblent encore activables, ce qui leur permettrait, *via* la libération de facteur solubles, de participer à l'entretien de l'inflammation alvéolaire.

Neutrophil chemoattraction promotes platelet extravasation and inflammatory factor release

Pauline Damien[1], Fabrice Cognasse[1,2] , Marie Ange Eyraud[2], Charles Antoine Arthaud[2], Bruno Pozzetto[1,3], Olivier Garraud[1,2], and Hind Hamzeh-Cognasse[1]

[1] Université de Lyon, GIMAP-EA3064, Saint Etienne, France

[2] EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France

[3] Laboratoire de Bactériologie-Virologie- Hygiène, Centre Hospitalo-Universitaire de Saint-Étienne, Saint-Etienne, France

Address for correspondence and reprint requests to Pr. O. Garraud, Université de Lyon, GIMAP-EA3064, Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France. Tel.: +33 4 77 42 14 67; Fax: +33 4 77 42 14 86; E-mail address: olivier.garraud@efs.sante.fr

The authors declare no competing financial interests and no conflict of interest regarding this study.

Running title: Modeling and monitoring platelet-neutrophil interactions

Key Words: Platelet, Inflammation, Neutrophil Chemotaxis, A549

Word count: 3814 Abstract: 226, References: 53, Figures: 5, Supplemental data: 4, Tables: 0

Abstract

Platelets are instrumental in hemostasis-and thus, beneficial. Besides, they play deleterious roles in several serious pathological states such as sepsis and acute lung injury (ALI), etc. Platelets have been acknowledged to engage partnerships with neutrophils in those pathological states; however, their mutual interaction and capacity of co-migration deserved to be investigated in further detail.

The aim of the present work was thus to examine the conditions under which platelets bind to neutrophils, tether them under migration conditions, and how the platelet-neutrophil cell complexes obey chemoattraction signals in a transwell assay. Because our main interest resides in the lung pathology in two aspects, the infection-associated ALI and the transfusion related ALI (TRALI), we sought to create a conditioned medium for neutrophil attraction based on the induction of inflammation in a lung cancer cell line, A549. We examined the cell surface and secretion parameters of either cell in real time during migration, and observed that the platelet-neutrophil tethering was independent of platelet activation, but that the migration of the platelet-neutrophil cell complex induced platelet activation, that created an inflammatory state additional to the chemoattractive medium. In addition, this data strongly suggest that neutrophils cargo platelets to inflammatory sites in the lung and that their mutual interaction exacerbates the inflammation: the dissection of the cellular interaction engaged may allow preventive (transfusion) or curative (infection) measures.

Introduction

Both neutrophils and platelets are revisited in terms of their functions in physiology and pathology, beyond their primary functions, i.e. pathogen phagocytosis ad primary hemostasis, respectively, that-because of the strength of their main role-obscured their integrated behavior in blood and other tissues. It then appeared that those two cell types-if one accepts that platelets deserve the naming of "cells" despite they are anucleate, on the basis of their amazing functioning upon signaling, are frequently linked in physiology and in pathology. In physiology, it is now clear that, if primary hemostasis is initiated by the adherence of platelets on the injured vascular endothelium, the consecutive clot made up of platelets, fibrin and other clotting factors, is covered by a shell of neutrophils that play an instrumental role in the stability of this clot (1). In pathology, close interactions between neutrophils and platelets have been evidenced in sepsis (2), in arthritis (3), and also in certain Acute Lung Injuries (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndromes (ARDS), among which the Transfusion Associated ALI (TRALI), which is infrequent because transfusion has become extremely safe, but represents one of the major causes of transfusion severe hazards (0.01%), especially after platelet component transfusion according to the French Hemovigilance (AFSSAPS) 2011 report. In TRALI, the precise role of platelets remains poorly understood among the intricate causes of the lesions, besides toxic antibodies (Abs) directed at neutrophil (HLA class I, II, HNA) and/or platelet (HLA class I) antigens, Biological Response Modifiers (BRMs)-among which cytokines and chemokines and the like, reactive oxygen species and oxygenated membrane lipid moieties, the possible intervention of bacterial LPS etc. Besides, there are some contradictions between *ex vivo* observations and experimental models that make this pathology still extremely complex. However, neutrophils are central in this ALI, as they accumulate in the lung, suffer stresses and in turn stress the lung epithelia, favoring leakage and leukocyte extravasation (4).

Infection or transfusion-associated ALI and ARDS are thus characterized by an increased permeability of the alveolar-capillary barrier resulting in lung edema with protein-rich fluid (5-7).

Lung edema, endothelial and epithelial injury are supplemented by a transmigration of neutrophils into the interstitium and bronchoalveolar compartment.

Neutrophils play indeed a central role in the development of ALI, which may be further amplified by platelets. It has been shown that platelet-derived sCD40L, CCL5 and CXCL4 support neutrophil extravasation to the lung and participate to the induction of lung edema in ALI (8, 9). Targeting the secretion of these molecules by platelets reduces the damage to the pulmonary epithelium. Therefore, platelets can be considered as a major partner of neutrophils in the initiation of ALI. Platelets have been also detected in lungs in a model of allergic asthma in the mouse (10); platelets associate to neutrophils in Neutrophil Extracellular Traps, in the lungs of mice suffering from experimental TRALI (11). This demonstrates that, in addition to activating neutrophils, platelets can exert their inflammatory role *in situ*. Since most studies were conducted in mice, it is difficult to dissect precisely, step by step, the mechanisms of interaction between neutrophils and platelets in ALI and to assess the direct involvement of platelets.

In the current study, we aimed at developing a methodology, using *in vitro* human cell models, to study the concomitant recruitment of neutrophils and platelets and platelet capacity to play their inflammatory role during neutrophil accumulation and extravasation following a lung inflammation.

Materials and methods

Platelet Preparation and Stimulation

Blood donors are volunteer healthy adults presenting at the National Blood Service (EFS), the Auvergne-Loire Regional Blood Establishment, receiving information and giving authorization of the use of their blood for research purposes. Peripheral blood was collected in endotoxin-free tubes with 3.2% sodium citrate (12). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifuging the blood at 150 g for 12 min at 22°C. Residual mononuclear cells were counted by flow cytometry. There was no detectable contamination of platelet suspensions by mononuclear cells (CD3-T cells, CD19-B cells, or CD14-monocytes) (13). The level of CD62P on the surface of resting, non-deliberately activated platelets was 6.23 ± 2.31 % (**supplemental data 1A**), meaning that only 6.23% of platelets were apparently pre-activated.

Measurement of endotoxin levels in platelet concentrates

To ensure that no bacterial contamination could influence any *in vitro* observation, PRP were examined for bacterial growth by conventional hemoculture. In addition, endotoxin levels were measured with a limulus amoebocyte lysate kit (QCL-1000) according to the manufacturer's instructions. Briefly, PRP were incubated (70°C, 10 min), diluted in pyrogen-free water (1:20), and incubated with limulus amoebocyte lysate (37°C, 10 min); after adding chromogen, samples were incubated for 6 min, and absorbance was read at 405 nm. No endotoxin levels in PRP were observed.

Isolation of primary human neutrophil

Neutrophils were isolated from heparinized blood using EasySep™ human neutrophil enrichment kit (StemCell Technologies, Grenoble, France). The antibody cocktail (composed of Abs to CD2, CD3, CD9, CD19, CD36, CD56, glycophorin A, and dextran), enabled the removal of lymphocytes, monocytes, erythrocytes, platelets, NK cells, and dendritic cells. Purified fresh neutrophils were washed extensively to offload bound platelets. Purity of neutrophil fractions were >95% and devoid of any expression of CD41 platelet marker as assessed double staining with by allophycocyanin (APC)-conjugated monoclonal antibody (MoAb) against CD41 and fluorescein isothiocyanate (FITC) MoAb against CD15 and flow cytometry analysis (**Supplemental data 1B**). Purified neutrophils were cultured immediately in Iscove's Modified Dulbecco's Media (PAA, Velizy-Villacoublay, France), supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin (100 U/ml)/streptomycin (0.1 mg/ml)/amphotericin (25 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Cell line

The human lung cancer cell line A549 was cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Media supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin (100 U/ml)/streptomycin (0.1 mg/ml) (Sigma-Aldrich). Cells were maintained under the atmosphere of 5% CO_2 with humidity at 37 °C.

Preparation of Conditioned Medium

For Conditioned Media (CM) preparation, A549 cells were plated at 1.7×10^5 cells/ml and cultured until two days of post-confluence. Cells were then stimulated, or not, for 48h with IL-1β (100 ng/ml) and TNF-α (100 ng/ml). Culture supernatants were centrifuged at 300 g for 5 min to eliminate cell fragments and were stored in aliquots at −80 °C until use. Culture supernatant from un-stimulated A549 cells is referred to as CM-A and IL-1β +TNF-α stimulated A549 supernatant is referred to as CM-B. CM-A and B were characterized-although non-exhaustively-for their content in factors known to display chemoattraction capacity, by ELISA (according to the manufacturer's instructions, R&D System, Lille, France). The chemokines that were evaluated were: CCL20, RANTES, SDF-1α, ENA-78, IL-8; the cytokine IL-6 was also tested. CM-B proved to contain more elevated amounts of all molecules (except IL-8) than CM-A ($P<0.05$); of note, CM-A contained neither detectable levels of RANTES nor IL-6, and minimal content of CCL20 (**Supplemental data 2**).

Transmigration assay

Fluorescence Blocking (FluoroBlok™) transwell polyethylene terephthalate membrane inserts (6.5 mm diameter, 3 µm pore size; BD Biosciences) were placed in 24-well culture plates so that the insert separated the upper and lower compartments. Those inserts enable the assessment of the fluorescence independently in each of the two compartments. Purified neutrophil were labeled with 20µM calcein AM (Molecular probes, Life technologies, Saint-Aubin, France) for 60 minutes at room temperature, washed twice with PBS, and they were numbered; they were then re-suspended with (in a 1:30 ratio, as described (8)) or without platelets, for 60 min. To assess any migration, 1.10^7 neutrophils

with or w/o platelets under a final and total volume of 500 µl in IMDM were placed in the upper plate compartments, whereas either 1 ml of IMDM (negative control), or a chemottractant cocktail-under the same volume-was placed in the lower compartments. The chemottractant cocktails comprised of either of three media: -i) a chemokine/cytokine mixture mimicking the content of activated A459 cells, including CCL20 (125 ng/ml), RANTES (300 ng/ml), SDF-1α (500 ng/ml), ENA-78 (20 ng/ml), IL-8 (250 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml); -ii) CM-A; or -iii) CM-B. The chemotaxis chambers were placed in a multi-well fluorescent plate reader (Fluoroskan Ascent - Lab Systems, Thermo Fisher Scientific, Saint Herblain, France). The fluorescent plate reader was configured so that the probe was in a bottom-read position, which allowed for the detection of fluorescence in the lower compartment of each chemotaxis chamber (excitation, 480 nm; emission, 510 nm). The cells that migrated to the lower compartment were detected in real-time by measuring the calcein Mean Fluorescence Intensity (MFI) in this compartment while the fluorescence of the upper compartment was blocked thanks to the Fluoroblock inserts. Migration kinetics was measured during 120 min. Non-migrating and migrating cell populations were separated by lifting the inserts (upper compartment) out of the well (lower compartment). Emigrated neutrophils and neutrophil-platelet complexes having migrated to the lower compartment of the migration chamber were collected. Cell populations and their respective supernatants were collected after a centrifugation of cell culture suspensions at 300 × *g* for 10 min. Neutrophils were numerated; platelet activation was assessed by flow cytometry to measure the level of expression of activation markers; the cytokines and other soluble immunomodulatory factors secreted by the platelets during their cocultures with neutrophils were measured by a Luminex® assay.

Flow cytometry

Platelet binding to leukocytes in whole blood from healthy volunteers was assessed by double labeling using a phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody (MoAb) against CD41 platelet marker and APC-conjugated MoAbs against CD14, CD3, CD19 and CD15 markers for monocytes, T cells, B cells and neutrophils, respectively (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Blood was

diluted 1/200 in PBS and cells were incubated with appropriate MoAbs for 30 minutes at 4°C in the dark.

Prior to the incubation with neutrophils, platelets were stained with an APC-conjugated MoAb against CD41 (BD Biosciences), which is consistently expressed by activated as well as non-activated platelets (14) and a PE-conjugated MoAb against the platelet activation marker CD62P (BD Biosciences). Platelet adhesion to calcein-labeled neutrophils was evaluated by gating on CD41-APC/calcein double positive populations. Flow cytometry analysis was performed on a FACSCalibur flow cytometer with its accompanying software (CellQuest-Pro, BD Biosciences).

Measurement of Cytokines in Supernatants of Emigrated Platelet

The levels of sCD62P, PF4 and sCD40L were measured in duplicate in the lower compartment of the Transwell corresponding to migrated neutrophils alone or associated to platelet in CM-A or CM-B conditions. Soluble (s)CD62P, PF4 and sCD40L were quantified by using Multiplexed Detection technique (Luminex®, Merck Millipore Guyancourt France) strictly according to the manufacturer's instructions. Results were read on Bioplex 200 system (Bioplex ManagerTM software – Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

Statistical Analysis

The Student t test was used for inter-experimental comparisons of neutrophils migration, membrane molecule expression, and cytokine/chemokine concentrations under various culture conditions. All values were reported as mean ± SEM and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Evaluation of platelet-leukocyte crosstalk ex vivo and in vitro

Platelets, monocytes, T cells, B cells and neutrophils were identified by specific CD41, CD14, CD3, CD19 and CD15 staining, respectively; platelet-leukocyte complexes were defined as double-

positive populations. In the circulation, platelet-T and B lymphocyte double positives were relatively few: 4.68 ± 1.9 % and 0.77 ± 1.04 % for CD3+/CD41+ and CD19+/CD41+ populations, respectively (**Fig 1**). Platelet-monocyte double positives were more frequent (17.14 ± 8.16 %), while and platelet-neutrophil double positives were the most abundant (54.75 ± 13.30 %): neutrophils stand for the preferred leukocyte partners of platelets (**Fig 1**).

We aimed at questioning the issue of whether neutrophils that are recruited vehicle, or are free, of bound platelets. Primary neutrophils were purified from peripheral blood and washed extensively to get rid of contaminating platelets. Purity was routinely more than 95% and no CD41+ positive cells were observed on the purified neutrophils population (**Supplemental data 1B**). Purified neutrophils were labeled with calcein, then washed and incubated with homologous platelets in order to reconstitute, *in vitro*, CD15+/CD41+ platelet-neutrophil complexes in a proportion comparable to that observed in whole blood (**Fig. 1**). We obtained experimentally a double positive population of 37.22 ± 2.21 % of neutrophils with bound platelets, not significantly different from physiological platelet-neutrophil complexes (**Fig 2**).

Platelet-neutrophil complexes are actively recruited by a chemokine/cytokine cocktail

In order to validate the *in vitro* model and to evaluate platelet-neutrophil complexes having transmigrated, platelet-neutrophil complexes were placed onto the apical surface of the transwell insert (the upper compartment), and the chemokine/cytokine cocktail was placed at the bottom of the well (the lower compartment). The appearance of calcein-fluorescence was measured in real-time in the lower compartment, for 120min (i.e the total duration of the migration kinetics). A significantly ($P<0.05$) positive fluorescent signal began to be detectable in the lower compartment from the 20th minute of migration (**Fig 3A**); this demonstrates an efficient neutrophil recruitment by the chemokine/cytokine cocktail (compared to the control medium: 2,037 ± 200 *vs.* 659 ± 62 calcein MFI, respectively). After 120 min of migration, the calcein MFI reached 7,018 ± 1,163 in the lower compartment containing the chemokine/cytokine cocktail whereas it remained stable in the compartment containing the control medium (1,016 ± 217, $P<0.05$) (**Fig 3A**). Migrated neutrophils

were then numerated and 10 times more neutrophils were found in the lower compartment that contained the chemokine/cytokine cocktail compared to the control condition, i.e. $57.51 \pm 6.53 \times 10^4$ *vs.* $5.53 \pm 0.95 \times 10^4$ neutrophils ($P<0.05$), respectively (**Fig 3B**). Fluorescent microscopy analysis of the transmigrated neutrophils confirmed that platelets were still bound to neutrophil membranes and that platelet-neutrophil complexes can be efficiently recruited by the chemokine/cytokine cocktail, with no dissociation (**Fig 3C**). The flow cytometry study confirmed this observation (**supplemental data 3A**); the issue that transmigration induced neutrophils to express CD41 was disregarded, since transmigrated neutrophils in the absence of platelets did not express CD41 after migration (**supplemental data 3B**).

Transmigration of platelet-neutrophil complexes upon the attractiveness of an inflammatory pulmonary conditioned medium

We then evaluated the capacity of platelet-neutrophil complexes to transmigrate towards the inflammatory CM-B *vs.* the control CM-A (**Fig 4**). We found that CM-B, unlike CM-A, induced a significant recruitment of platelet-neutrophil complexes after 40 min of exposure (with 5593.96 ± 233.67 vs 1229.64 ± 259.52 calcein MFI, respectively; $P<0.05$); the kinetics of migration exceeded 9,000 calcein MFI after one hour and remained stable thereafter (**Fig 4A**). Neutrophils associated to platelets were numerated after transmigration to the lower compartment of the migration chamber: 10 times more neutrophils transmigrated in response to the CM-B *vs.* the CM-A ($45.17 \pm 3.7 \times 10^4$ vs. $4.96 \pm 0.51 \times 10^4$ neutrophils with bound platelets, respectively; $P<0.05$, **Fig 4B**).

Characterization of platelets after migration

To investigate the platelet phenotype after migration, we analyzed by flow cytometry the CD62P expression on platelets bound to transmigrated neutrophils and present in the lower compartment of the migration chamber. The level of CD62P on the surface of platelets after binding to neutrophils but before transmigration (i.e in the upper compartment) was 34.19 ± 11.48 %; it moderately increased, though not significantly, to 49.08 ± 4.86% after 120 min of migration in

response to CM-A. In contrast, the platelet-neutrophil complex migration in response to CM-B induced a significant increase of platelet activation with 76.40 ± 4.49% expression of CD62P ($P<0.05$; **Fig 5A**).

CD62P is a major component of the alpha granule membranes in non-activated platelets. It is mobilized onto the platelet surface in response to platelet activation (15), and it is subsequently cleaved into a soluble form (sCD62P). We sought to confirm the platelet activation data in focusing on products that are known to be secreted by platelets upon activation, whatever the stimulus is (16-18). We thus measured the release of sCD62P, sCD40L and PF4, as can be found in the lower compartment of the migration chamber after 120 min of migration in response to CM-A vs. CM-B. The level of sCD62P proved significantly higher in the lower compartment after migration of platelet-neutrophil complexes in response to CM-B than to CM-A: 13.37 ± 3.06 ng/ml vs 7.11 ± 1.13 ng/ml, respectively ($P< 0.05$, **Fig 5B**). Despite there were elevated levels of the master inflammatory product of platelets, i.e. sCD40L (1,026.61 ± 507.75 ng/ml vs. 438.09±105.32, **Fig 5C**), and of PF4 (137 ± 69.59 ng/ml vs. 31.11± 22, **Fig 5D**), in the lower compartments of the transwell, after migration in response to CM-B compared to CM-A, those levels were not significantly different. However, the amounts of sCD62P, sCD40L and PF4 could be totally credited to platelets since neither neutrophils nor A549 cells were able to significantly release or secrete these molecules (**Supplemental data 4**).

Discussion

Platelets are essential for hemostasis, thrombosis, and wound healing. Probably as a counterpart of their physiological roles in sensing danger (19), platelets exacerbate their secondary effects in certain circumstances and lead to inflammation and tissue injury (20-24). In this context, recent studies have described that platelets support a major role in the recruitment of leukocytes into inflamed tissue particularly in the lung (25, 26). Therefore, in certain disease states such as in ongoing infection, depletion of platelets has been shown to reduce (i) the number of circulating platelet-neutrophil complexes, (ii) lung vascular permeability (27) and (iii) neutrophil extravasation in inflammation tissue models (e.g lung and liver (28-31)). In addition, platelet-derived components and

molecules may also increase platelet-neutrophil recruitment to the lung under inflammatory conditions. For instance, platelet microparticles can activate neutrophils within the pulmonary circulation which then bind to endothelial cells and promote platelet-neutrophil adhesion that contributes to inflammatory diseases such as ALI (6). Platelet serotonin further enhances neutrophil extravasation by regulating endothelial selectin expression (32-34) and causes the formation of endothelial gaps in inflamed synovium, leading to an enhanced vascular permeability in a murine model of arthritis (35). Therefore, to figure out prevention and therapeutic measures, there is a real interest to investigate the involvement of platelets in neutrophil recruitment to the inflammatory site and to develop new and reproducible *in vitro* tools that reproduce as well as possible inflammatory conditions observed *in vivo.*

In the present study, we developed an original *in vitro* methodology to investigate in real-time that will be useful to examine the inflammatory role of platelets during neutrophils accumulation and extravasation following lung inflammation; to achieve this goal, we used a human lung cancer A549cell line. We confirm here (36-38) that leukocytes engage bilateral relationship with platelets and make complexes. This is weakly harbored by lymphocytes, in contrast to monocytes and noticeably neutrophils; neutrophils prove to be the preferential leukocyte partners of platelets in the circulation. Van Gils et al (39) showed that adhesion of platelet-monocyte complexes to the activated endothelium leads to the cell complex dissociation. The present work, along with observations made at other anatomical sites (22), confirms that concerning neutrophils, this tethering is sufficient to retain platelets on their surface throughout an experimental transmigration process; this is strongly suggestive that neutrophils cargo bound platelets to lungs.

Several reports (27, 29, 37, 38, 40-42) indicate that platelet binding to neutrophils is dependent on the functional expression of platelet CD62P and that platelet depletion significantly inhibits neutrophil recruitment to lungs (8, 24, 43). On the opposite, Kornerup et al (38) described that only the CD62P receptor i.e. the P-Selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), is essential for neutrophil recruitment in mouse models of zymosan-induced peritonitis and LPS-induced lung inflammation. These observations suggest that distinct mechanisms are involved in platelet-neutrophil binding and

subsequent recruitment of either neutrophils or platelet-neutrophil complexes upon a chemoattracting signal.

In our present model (using human cells and not mouse ones-which may explain some discrepancies), platelets did not display an activated phenotype or at least a significant CD62P expression, prior to being associated to neutrophils in complexes and before being induced to transmigration. This suggests that platelet-CD62P is indeed not essential for tethering firmly to neutrophils (at least *in vitro*), and that other adhesion molecule partners are involved. We monitored, in real-time, in a transwell migration assay, the recruitment of platelet-neutrophil complexes through a gradient of chemoattractant mediators mimicked by a conditioned medium. Because we addressed the issue of platelet-neutrophil complex migration to the lung, we sought to use a conditioned medium resulting from the creation of an inflammatory state on pulmonary epithelium cell line, referred to as CM-B. Platelet-neutrophil complex transmigration was successful as soon as 40min of migration, comparable to what is observed with control i.e. a recombinant chemokine/cytokine cocktail. There, platelets increased CD62P expression on their membrane when chemoattracted by the inflammatory CM-B, compared to control CM-A. This data suggests that an inflammatory microenvironment of platelets drives their activation. In aggregate, platelet activation is not needed to the formation of complexes with neutrophils, but occurs during their transmigration to inflammatory sites. After transmigration, platelets release sCD62P, PF4 and sCD40L (all three being noticeable inflammatory factors). This observation provides strong evidence that platelets accompanying neutrophil transmigration to the inflammatory site contribute effectively to the maintenance of inflammation. This is in line with our (and others') previous reports showing that stimulation of platelets with LPS either from *E. coli* O111 or *S. Minnesota* through the TLR4/MyD88/NFκB pathway led to the platelet of a large number of pro-inflammatory molecules which themselves induced PBMCs to secrete IL-6, TNFα and IL-8, that are either inflammatory or chemoattractant (13, 44). We propose that lung infection/inflammation may create an environment that attracts neutrophils and enables the formation of platelet-neutrophil complexes, and then activation of platelets which amplifies the local inflammation and favor the occurrence of ALI/ARDS.

Similarly, local recruitment of platelet-neutrophil complexes in non infectious lung pathology such as created by an Ab-mediated lesion of the neutrophils lining the lung epithelium may exacerbate the local inflammation and result, in certain circumstances, in ALI or TRALI, after an aged blood component transfusion (a condition which seems to elicit the alteration of lipid moieties, the emission of blood cell microparticles, and the increased overtime secretion of inflammatory BRMs). of note, we recently shown that stressed red blood cells could signal themselves as pro-inflammatory to leukocytes in an in vitro model and create an in inflammatory environment for lung epithelial cells (45-48).

To conclude, it is now admitted that platelets are elements of an integrated inflammatory response (49, 50). Platelets seem to drive some ways in the recruitment of neutrophils in response to various stimuli. Platelets promote neutrophil extravasation in atherosclerosis (51), kidney failure (21), arthritis (3, 52), ALI (23, 24) and TRALI (37, 46, 48, 53). However, the specific role of platelet in neutrophil recruitment to inflamed tissues, e.g. lung, is not fully understood and seems to be context-dependent. Hence, our in vitro model of monitoring platelet-neutrophil complex transmigration provides new tools to dissect the mechanisms of such recruitment and enables the testing of strategies to reduce it.

Acknowledgements: The authors would like to acknowledge the excellent scientific and technical skills of present and former collaborators, of whom M. Abrial, and B. Thollot. They are grateful to Drs P. Chavarin and A. Lefebvre, and to Ms F. Boussoulade for access to human blood samples; to Dr S. Laradi for discussions. This work was supported by grants from the “Etablissement Français du Sang”, the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-12-JSV1-0012-01) and the Jean-Monnet University (Lyon/Saint-Etienne). The authors declare no competing financial interests.

Legend

Figure 1: Platelet association to leukocytes in whole blood. Platelet adhesion to blood leukocyte was assessed by flow cytometry after staining for lineage markers: CD41 for platlets, CD14 for monocytes, CD3 for T Lymphocytes, CD19 for B lymphocytes and CD15 for neutrophils. Gating was performed on double-labeled CD41+/CD14+, CD41+/CD3+, CD41+/CD19+ and CD41+/CD15+ cells. Data are expressed as the mean +/- SEM of 5 experiments.

Figure 2: *In vitro* binding of platelets to primary neutrophils. Platelet adhesion to primary neutrophils, either in whole blood or after *in vitro* reconstitution of platelet-neutrophil complexes was assessed by flow cytometry after staining CD41+/CD15+. Gating was performed on double-labeled cells. Data are expressed as the mean +/- SEM of 5 experiments.

Figure 3: Migration kinetics of platelet-neutrophil complexes in response to a chemokine/cytokine cocktail. **(A)** Platelet-neutrophil complexes containing calcein-stained neutrophils were placed in the upper compartment of a migration chamber and a chemokine/cytokine cocktail or a control medium was placed in the lower compartment. Migration was monitored in real-time during a 2 hour kinetic by measuring the calcein fluorescence in the lower compartment. Data are expressed as the mean +/- SEM of 10 experiments. *$P < 0.05$ compared to control medium. **(B)** After migration, migrated neutrophils were recovered from the lower compartment and numerated. Data are expressed as the mean +/- SEM of 10 experiments. *$P < 0.05$ compared to medium. **(C)** Representative transmigrated platelet-neutrophil complexes were visualized by fluorescence microscopy after double staining with FITC-labeled anti-CD15 MoAb and PE labeled anti-CD41 MoAb.

Figure 4: Migration kinetics of neutrophils in response conditioned media from A549 cells. **(A)** Platelet-neutrophil complexes containing calcein-stained neutrophils were placed in the upper

compartment of a migration chamber and several media were placed in the lower compartment: control medium, conditioned media from unstimulated A549 cells (CM-A) or IL-1β and TNF-α stimulated A549 (CM-B) Migration was monitored in real-time during a 2 hour kinetic by measuring the calcein fluorescence in the lower compartment. Data are expressed as the mean +/- SEM of 5 experiments. *$P < 0.05$ compared to medium. **(B)** After migration, migrated neutrophils were recovered from the lower compartment and numerated. Data are expressed as the mean +/- SEM of 5 experiments. *$P < 0.05$ compared to medium.

Figure 5: Platelet activation after migration. **(A)** CD62p was detected by flow cytometry after gating CD41+/CD15+ double positive cells before and after migration towards CM-A and CM-B. Data shown are percentage of CD62P expression on CD41+/CD15+ cells for (mean ± SEM from 5 independent experiments). *P < 0.05 compared to CD62P expression before migration. (B-D) the release of sCD62P **(B)**, sCD40L **(C)**, and PF-4 **(D)** by platelets from transmigrated platelet-neutrophil complexes was assessed by Luminex ® technology Background has been subtracted from values shown. Data shown are mean ± SEM expressed in ng/mL; n = 5 experiments. *$P < 0.05$ compared to CM-A.

Supplemental data 1: Phenotype of freshly isolated platelets and neutrophils. (A) Activation of freshly prepared platelet was assessed by double staining with APC-labeled anti-CD41 MoAb for the lineage marker and PE-labeled anti-CD62P MoAb for the activation marker. **(B)** Adhesion of platelets on freshly isolated, washed neutrophils was assessed by double staining with APC-labeled anti-CD41 MoAb for platelet marker and FITC-labeled anti-CD15 MoAb for neutrophil marker. Data shown are representative of 5 experiments.

Supplemental data 2: Chemokine/cytokine content of A549 conditioned media. The levels of RANTES (A), ENA78 (B), IL-8 (C), IL-6 (D), CCL20 (E) in CM-A and CM-B were quantified by ELISA as described in Material and Methods section. Background has been subtracted from values shown. Data (mean ± SEM; n = 5 experiments) are expressed in pg/mL. *P < 0.05 compared to CM-A.

Supplemental data 3: Platelet binding to neutrophils during platelet-neutrophil aggregate transmigration. (A) APC-labeled anti-CD 41 MoAb was used to stain platelets throughout the different steps of the preparation of platelet-neutrophil complexes, before and after trans-migration towards CM-B. **(B)** APC-labeled anti-CD 41 MoAb was used to stain neutrophils alone or platelet-neutrophil complexes, before and after trans-migration towards CM-B. Data shown are representative of 10 experiments.

Supplemental data 4: Assessment of sCD62P, sCD40L and PF4 content in CM-A and CM-B. sCD62P, sCD40L and PF4 were measured by Luminex® technology in CM-A, CM-B and in the lower compartment of the migration chamber after the migration of neutrophils alone towards CM-B. Data (mean ± SEM; n = 5 experiments) are expressed in pg/mL.

References

1. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 1997;89:1270-1278.
2. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cavaillon JM, Cognasse F. Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions - new clues for immunopathology? *Crit Care* 2013;17:236.
3. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010;327:580-583.
4. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46:566-572.
5. Diaz JV, Brower R, Calfee CS, Matthay MA. Therapeutic strategies for severe acute lung injury. *Crit Care Med* 2010;38:1644-1650.
6. Dengler V, Downey GP, Tuder RM, Eltzschig HK, Schmidt EP. Neutrophil intercellular communication in acute lung injury. Emerging roles of microparticles and gap junctions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:1-5.
7. McVey M, Tabuchi A, Kuebler WM. Microparticles and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L364-381.
8. Grommes J, Alard JE, Drechsler M, Wantha S, Morgelin M, Kuebler WM, Jacobs M, von Hundelshausen P, Markart P, Wygrecka M, Preissner KT, Hackeng TM, Koenen RR, Weber C, Soehnlein O. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:628-636.
9. Zhang S, Rahman M, Qi Z, Thorlacius H. Simvastatin antagonizes cd40l secretion, cxc chemokine formation, and pulmonary infiltration of neutrophils in abdominal sepsis. *J Leukoc Biol* 2011;89:735-742.
10. Pitchford SC, Momi S, Baglioni S, Casali L, Giannini S, Rossi R, Page CP, Gresele P. Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:604-612.
11. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2012;122:2661-2671.
12. Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F, Palle S, Chavarin P, Olivier T, Delezay O, Pozzetto B, Garraud O. Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC Immunol* 2008;9:54-69.
13. Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, Arthaud CA, Eyraud MA, Zeni F, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O, Cognasse F. Human platelets can discriminate between various bacterial lps isoforms via tlr4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol* 2012;145:189-200.
14. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Acquart S, Chavarin P, Courbil R, Fabrigli P, Garraud O. Donor platelets stored for at least 3 days can elicit activation marker expression by the recipient's blood mononuclear cells: An in vitro study. *Transfusion* 2009;49:91-98.
15. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011;11:264-274.
16. Kowalska MA, Ratajczak MZ, Majka M, Jin J, Kunapuli S, Brass L, Poncz M. Stromal cell-derived factor-1 and macrophage-derived chemokine: 2 chemokines that activate platelets. *Blood* 2000;96:50-57.
17. Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein iib/iiia antagonists and aspirin on the release of soluble cd40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 2003;107:1123-1128.
18. Kariyazono H, Nakamura K, Shinkawa T, Yamaguchi T, Sakata R, Yamada K. Inhibition of platelet aggregation and the release of p-selectin from platelets by cilostazol. *Thromb Res* 2001;101:445-453.

19. Garraud O, Cognasse F. Platelet toll-like receptor expression: The link between "danger" ligands and inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010;9:322-333.
20. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011;105 Suppl 1:S13-33.
21. Singbartl K, Forlow SB, Ley K. Platelet, but not endothelial, p-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J* 2001;15:2337-2344.
22. Weissmuller T, Campbell EL, Rosenberger P, Scully M, Beck PL, Furuta GT, Colgan SP. Pmns facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-ntpdases. *J Clin Invest* 2008;118:3682-3692.
23. Looney MR, Nguyen JX, Hu Y, Van Ziffle JA, Lowell CA, Matthay MA. Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2009;119:3450-3461.
24. Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 2006;116:3211-3219.
25. Issekutz AC, Mu JY, Liu G, Melrose J, Berg EL. E-selectin, but not p-selectin, is required for development of adjuvant-induced arthritis in the rat. *Arthritis Rheum* 2001;44:1428-1437.
26. Itoh S, Susuki C, Takeshita K, Nagata K, Tsuji T. Redistribution of p-selectin glycoprotein ligand-1 (psgl-1) in chemokine-treated neutrophils: A role of lipid microdomains. *J Leukoc Biol* 2007;81:1414-1421.
27. Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA, Figler R, Gear AR, Linden J. P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2392-2399.
28. Kornerup KN, Page CP. The role of platelets in the pathophysiology of asthma. *Platelets* 2007;18:319-328.
29. Peters MJ, Heyderman RS, Hatch DJ, Klein NJ. Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1997;209:125-135.
30. Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, Hesselbacher SE, Czarnik AC, Manka D, Vestweber D, Ley K, Sarembock IJ. Single injection of p-selectin or p-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody blocks neointima formation after arterial injury in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* 2003;107:2244-2249.
31. Pitchford SC, Yano H, Lever R, Riffo-Vasquez Y, Ciferri S, Rose MJ, Giannini S, Momi S, Spina D, O'Connor B, Gresele P, Page CP. Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:109-118.
32. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, Cifuni SM, Mauler M, Cicko S, Bader M, Idzko M, Bode C, Wagner DD. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 2013;121:1008-1015.
33. Palmer DS, Aye MT, Ganz PR, Halpenny M, Hashemi S. Adenosine nucleotides and serotonin stimulate von willebrand factor release from cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost* 1994;72:132-139.
34. Schluter T, Bohnensack R. Serotonin-induced secretion of von willebrand factor from human umbilical vein endothelial cells via the cyclic amp-signaling systems independent of increased cytoplasmic calcium concentration. *Biochem Pharmacol* 1999;57:1191-1197.
35. Cloutier N, Pare A, Farndale RW, Schumacher HR, Nigrovic PA, Lacroix S, Boilard E. Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* 2012;120:1334-1343.
36. Li N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J Leukoc Biol* 2008;83:1069-1078.
37. Caudrillier A, Looney MR. Platelet-neutrophil interactions as a target for prevention and treatment of transfusion-related acute lung injury. *Curr Pharm Des* 2012;18:3260-3266.
38. Kornerup KN, Salmon GP, Pitchford SC, Liu WL, Page CP. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *J Appl Physiol* 2010;109:758-767.
39. van Gils JM, da Costa Martins PA, Mol A, Hordijk PL, Zwaginga JJ. Transendothelial migration drives dissociation of plateletmonocyte complexes. *Thromb Haemost* 2008;100:271-279.
40. Zhang X, Zhan D, Shin HY. Integrin subtype-dependent cd18 cleavage under shear and its influence on leukocyte-platelet binding. *J Leukoc Biol* 2013;93:251-258.

41. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet tlr4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007;13:463-469.
42. Ma AC, Kubes P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (nets) in sepsis. *J Thromb Haemost* 2008;6:415-420.
43. Asaduzzaman M, Lavasani S, Rahman M, Zhang S, Braun OO, Jeppsson B, Thorlacius H. Platelets support pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. *Crit Care Med* 2009;37:1389-1396.
44. Kappelmayer J, Beke Debreceni I, Vida A, Antal-Szalmas P, Clemetson KJ, Nagy B, Jr. Distinct effects of re- and s-forms of lps on modulating platelet activation. *J Thromb Haemost* 2013.
45. Cognasse F, Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Nguyen KA, Pozzetto B, Payrat JM. Investigative in vitro study about red blood cell concentrate processing and storage. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:216-217.
46. Bux J, Sachs UJ. The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (trali). *Br J Haematol* 2007;136:788-799.
47. Looney MR, Gilliss BM, Matthay MA. Pathophysiology of transfusion-related acute lung injury. *Curr Opin Hematol* 2010;17:418-423.
48. Shaz BH, Stowell SR, Hillyer CD. Transfusion-related acute lung injury: From bedside to bench and back. *Blood* 2011;117:1463-1471.
49. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007;21:99-111.
50. McGregor L, Martin J, McGregor JL. Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis. *Front Biosci* 2006;11:830-837.
51. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 2010;122:1837-1845.
52. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: Active players in the pathogenesis of arthritis and sle. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:534-542.
53. Tung JP, Fraser JF, Nataatmadja M, Colebourne KI, Barnett AG, Glenister KM, Zhou AY, Wood P, Silliman CC, Fung YL. Age of blood and recipient factors determine the severity of transfusion-related acute lung injury (trali). *Crit Care* 2012;16:R19.

Figure 1

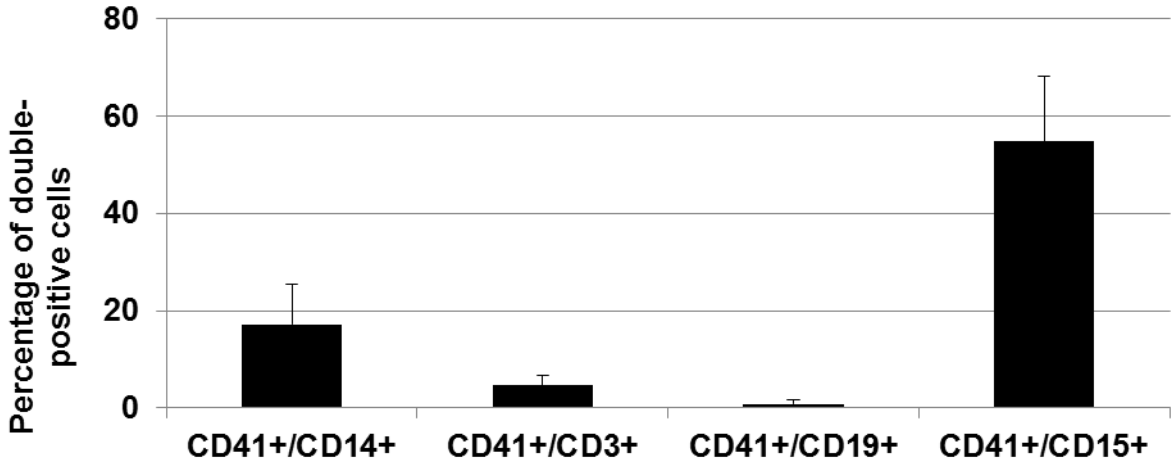

80
60
40
20
0
Percentage of double-positive cells
CD41+/CD14+
CD41+/CD3+
CD41+/CD19+
CD41+/CD15+

Figure 2

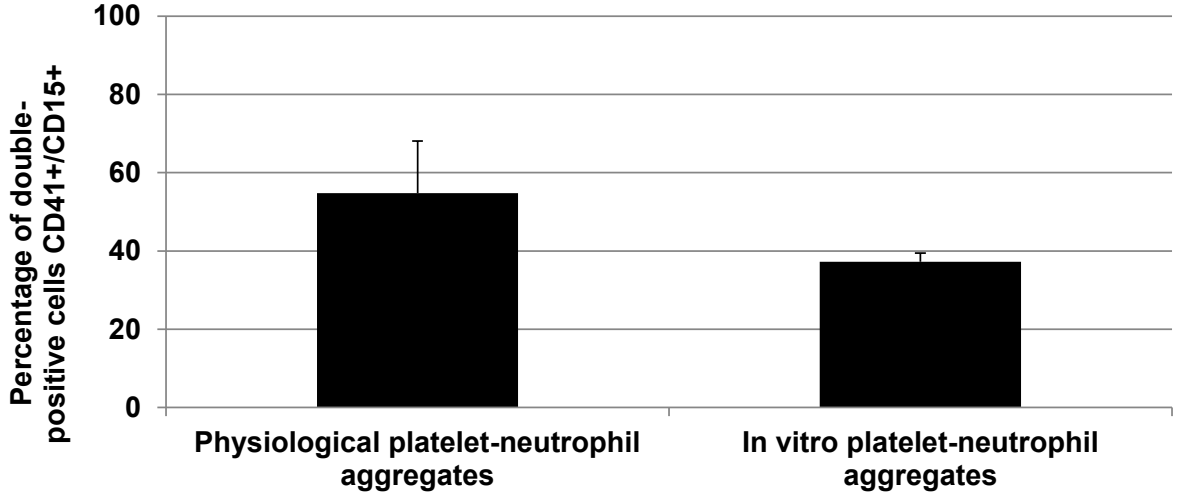
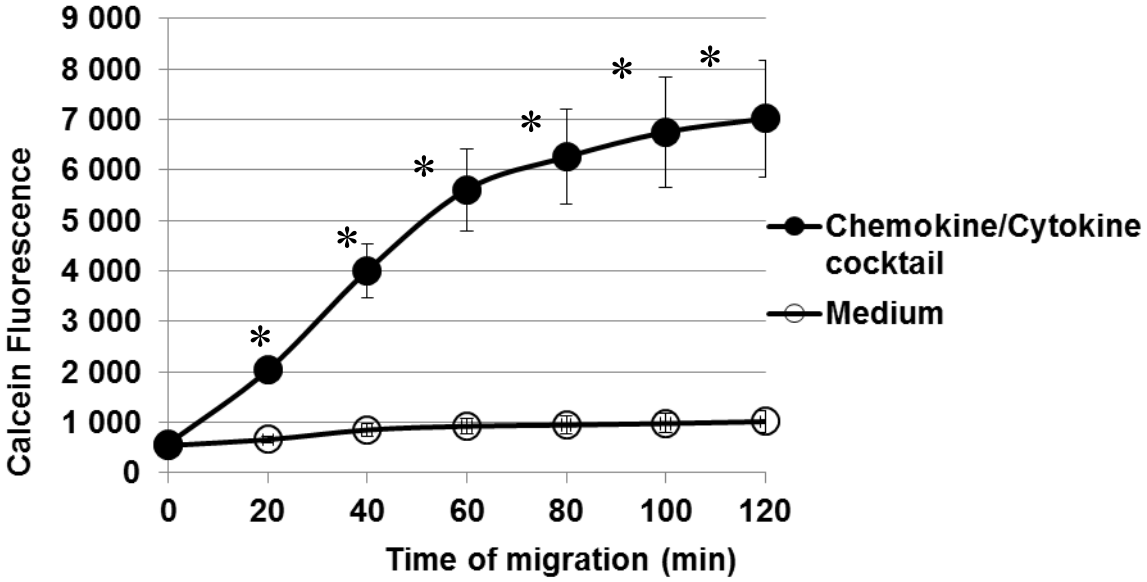
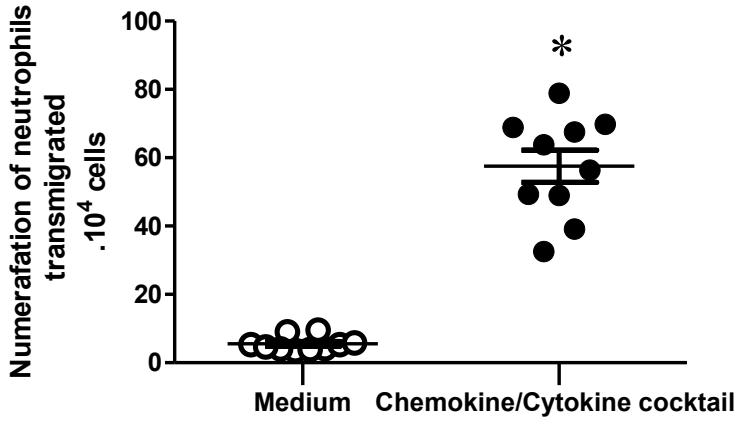

100
80
60
40
20
0
Percentage of double-positive cells CD41+/CD15+
Physiological platelet-neutrophil aggregates
In vitro platelet-neutrophil aggregates

Figure 3

A

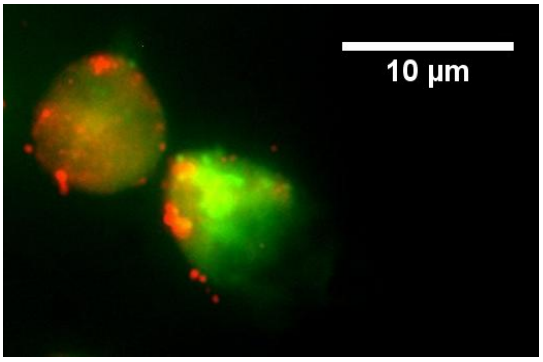


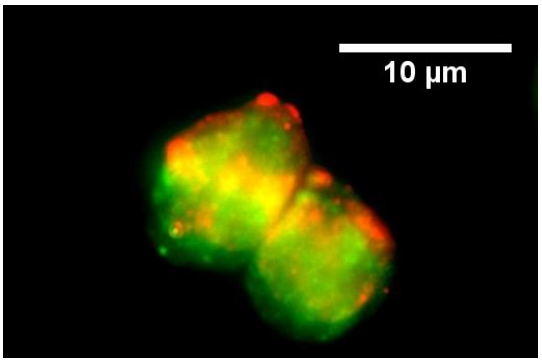
B



C

Platelet-neutrophil complexes

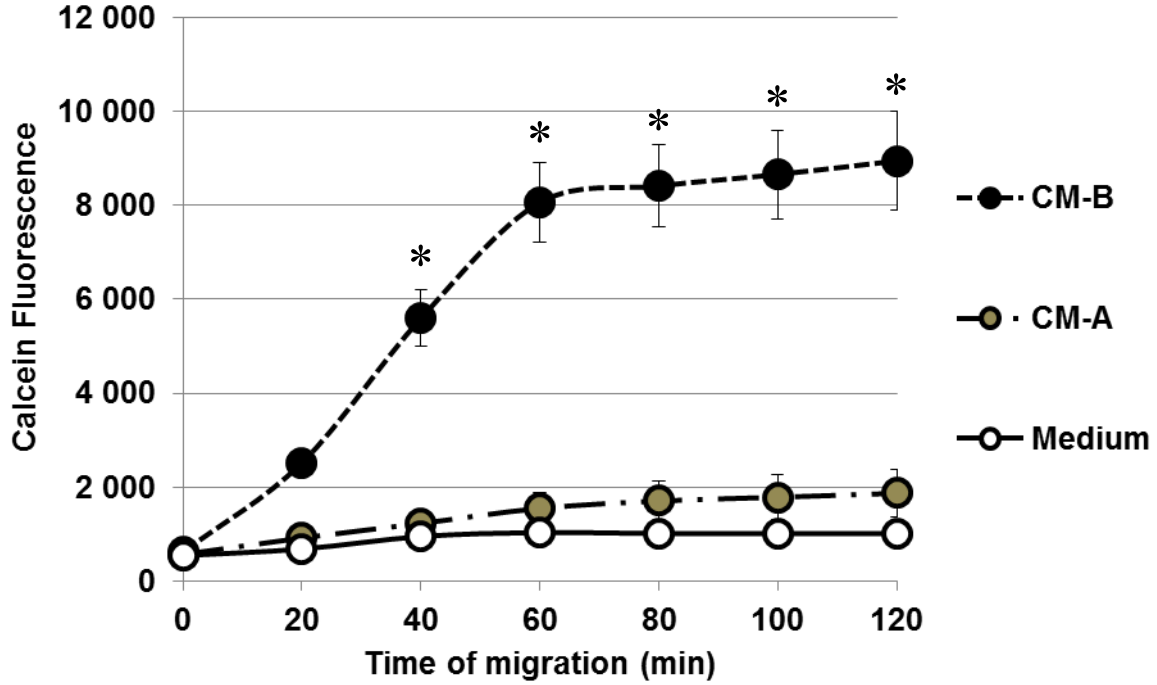




Before transmigration **After transmigration**

Figure 4

A


12 000
10 000
8 000
6 000
4 000
2 000
0
Calcein Fluorescence
0
20
40
60
80
100
120
Time of migration (min)
CM-B
CM-A
Medium
*

B

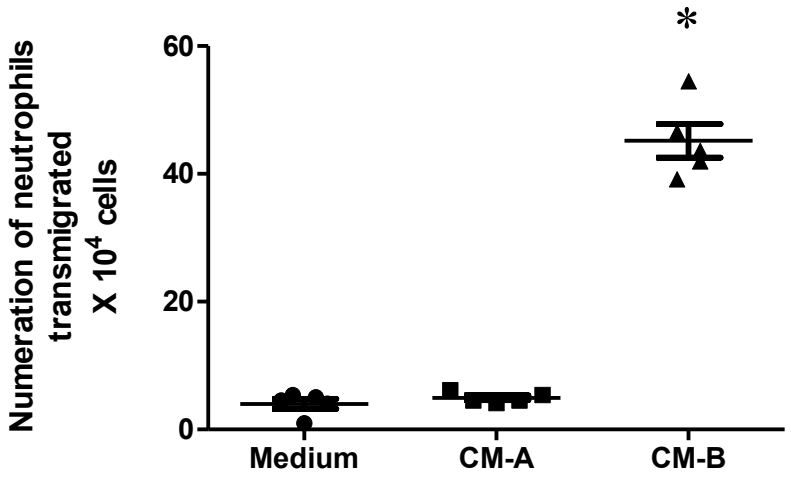
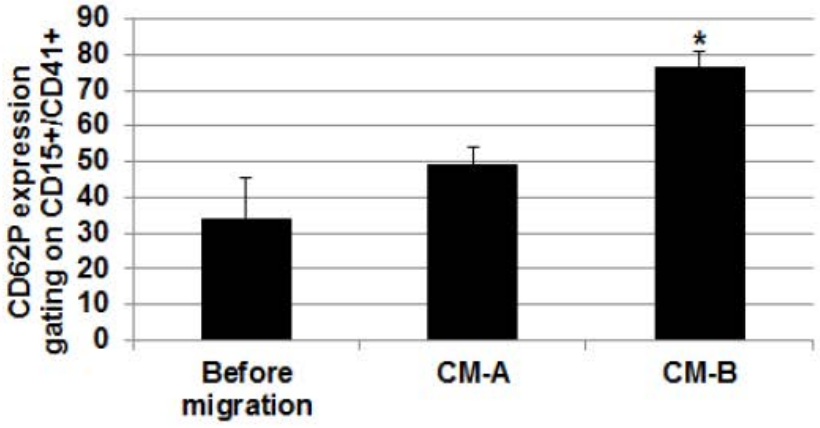
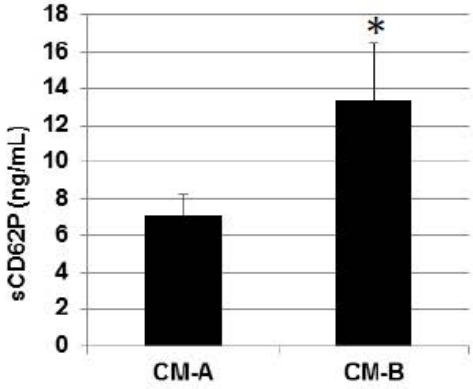

60
40
20
0
Numeration of neutrophils transmigrated X 10^4 cells
Medium
CM-A
CM-B
*

Figure 5

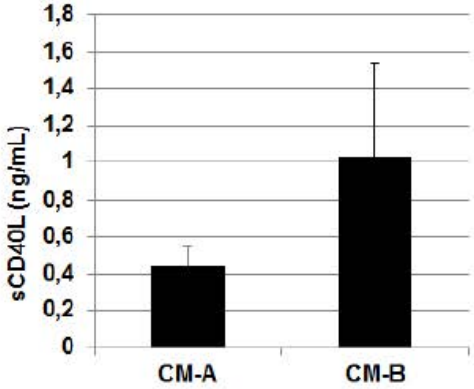
A



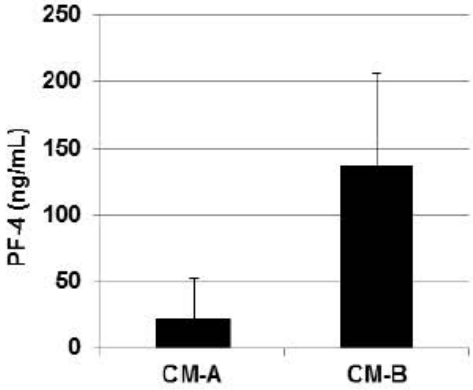
B



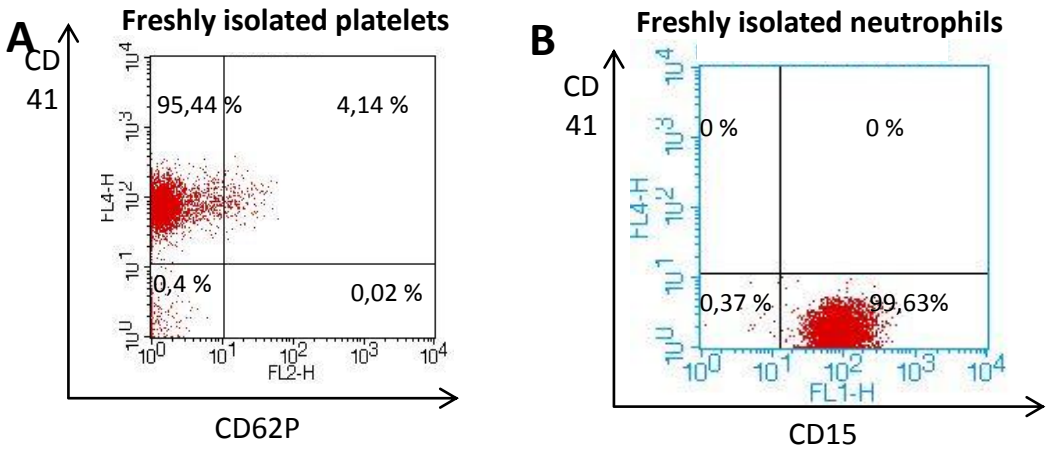
C



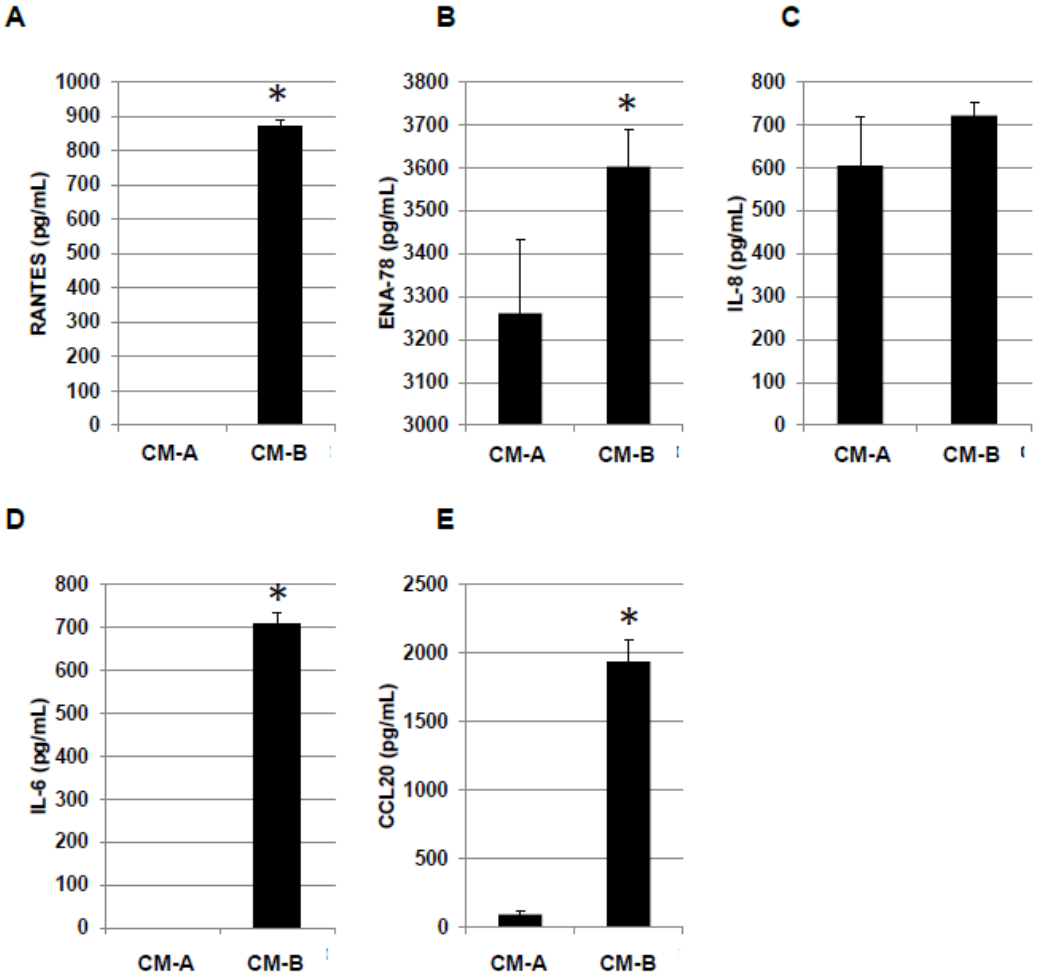
D



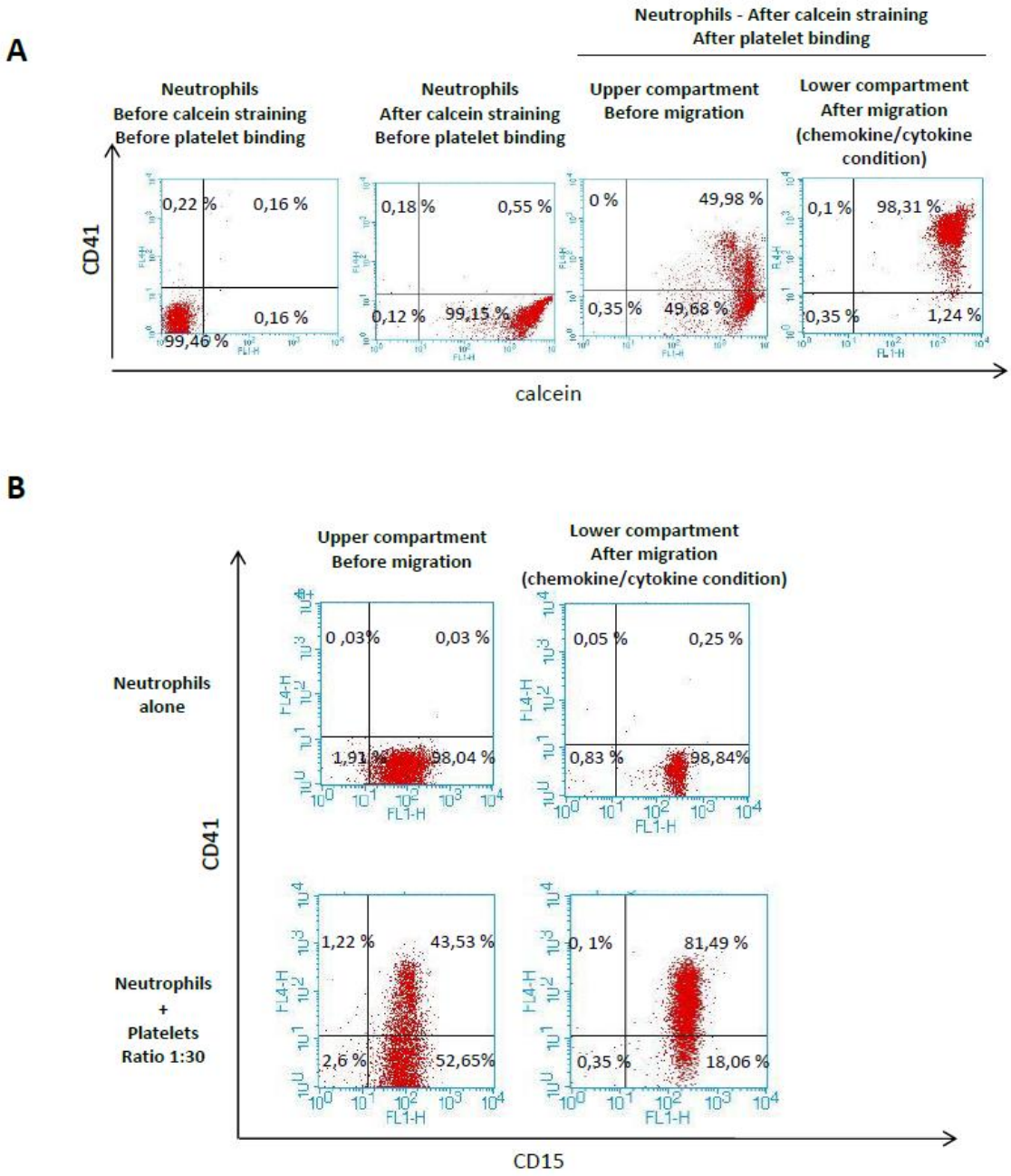
Supplemental data 1



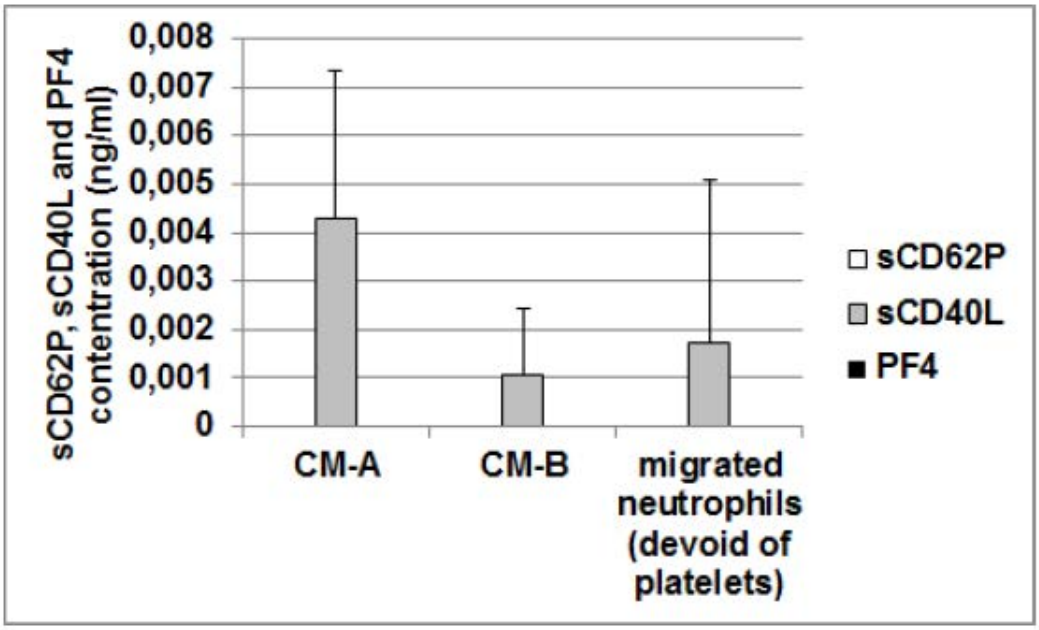
Supplemental data 2



Supplemental data 3



Supplemental data 4



TRAVAUX EN COURS

Link between platelet apoptosis and their inflammatory role in staphylococcal sepsis

En 2004, une étude française répartie sur 31 centres hospitaliers montre, qu'en étant à l'origine de 15% des bactériémies, *S. aureus* est le second type bactérien le plus impliqué (derrière *E. coli*) dans ce type d'atteinte vasculaire. Cette étude montre même que *S. aureus* arrive en première position si l'analyse se cantonne aux cas d'infections nosocomiales [1]. La forte implication de S. aureus dans les bactériémies se confirme avec des études plus récentes menées en Europe et aux Etats-Unis [2]. Dans les cas les plus sévères, la bactériémie entraine un sepsis ; le sepsis à S.aureus semble même présenter, après 30 jours d'hospitalisation, une mortalité supérieure à celle qui peut observée lors d'un sepsis à E. coli [3].

La thrombopénie est un phénomène fréquent dans les cas de bactériémies [4], mettant ainsi en avant la sensibilité des plaquettes au microenvironnement septique. Une étude a montré que celle-ci est corrélée au taux de mortalité du sepsis [5]. L'origine de cette diminution des plaquettes circulantes est notamment expliquée par le phénomène de coagulation intravasculaire disséminé (CIVD) associé à la physiopathologie du sepsis [6] . Cependant, le nombre croissant d'études montrant une certaine spécificité dans l'interaction entre les plaquettes et les bactéries, notamment S. aureus, suggère que la réponse plaquettaire au cours d'une bactériémie pourrait être plus complexe [7].

Les travaux présentés dans cette thèse ont déjà abordé l'induction d'une réponse inflammatoire plaquettaire en réponse à une stimulation par des composés de S. aureus (lipopeptide de synthèse Pam3CSK4, exotoxines de *S. aureus*). Dans le but de se rapprocher au maximum des conditions observées in vivo, il est important de prendre en compte l'ensemble des facteurs bactériens pouvant interagir avec les plaquettes et donc de considérer la bactérie dans son intégralité. Nous avons donc évalué la réponse inflammatoire plaquettaire à différentes souches vivantes de Staphylococci.

Ce travail a été initié en collaboration avec le service de bactériologie du CHU de Saint-Etienne (Pr. B. POZZETTO), qui a fourni 17 souches de staphylocoques :

- *Staphylococcus aureus* issus de bactériémie (souches isolées de façon primaire chez des patients hospitalisés au CHU de Saint-Etienne): SAB19, SAB24, SAB31, SAB32

- Souches de référence de *Staphylococcus aureus*: souche ATCC 43866, souche Géraldine
- Souche de *Staphylococcus aureus* issue de portage nasal intermittent: *Staphylococcus aureus* 28A1

- *Staphylococcus* autres que *aureus* :
  - *Staphylococcus condimenti*, espèce non pathogène pour l'homme principalement isolée dans l'industrie agro-alimentaire
  - 3 souches de *Staphylococcus epidermidis* : *S.epidermidis* ATCC 12228 (souche de référence), patient, patient 2 (les deux dernières étant des souches cliniques)
  - 3 souches de *Staphylococcus schleiferi* (3 souches d'origine clinique): *S. schleiferi*, screen staph, souche AR,
  - 3 souches de *Staphylococcus lugdunensis* (3 souches d'origine clinique): *S. lugdunensis*, screen staph, patient

Toujours dans le but de conserver les conditions les plus proches de la réalité, les plaquettes utilisées ont été isolées de PRP. Les bactéries sont cultivées en milieu Muller-Hinton, milieu plutôt pauvre, afin de stimuler la synthèse de facteurs de virulence et d'adhésion. Au moment de la stimulation, les bactéries se situent dans leur phase exponentielle de croissance, là aussi dans le but d'avoir un pouvoir d'infectiosité maximal. Pour chaque expérience le nombre de plaquettes et de bactéries est normalisé afin d'obtenir une multiplicité d'infection de 0,1 soit une bactérie pour dix plaquettes, proportion observée lors du sepsis.
La stimulation des plaquettes par les bactéries s'est faite sur 30 minutes et les facteurs plaquettes immunomodulateurs recherchés dans les surnageants plaquettaires sont l'IL-6, l'IL-8, l'éotaxine, le TNF-α, l'IL1-β, le vWF, le sCD40L, le PF4, le GRO et le RANTES.

Les premiers résultats de cette étude montrent que tous les staphylocoques n'induisent pas la même réponse plaquettaire, notamment en termes de libération de facteurs immunomodulateurs. Ainsi, des molécules comme l'IL-6, l'IL-8, l'éotaxine, le TNF-α, l'IL1-β et le vWF ne sont pas libérées par les plaquettes, quelle que soit la souche de staphylocoque employée. En revanche, des facteurs inflammatoires tels que le sCD40L, le PF4, le GRO et le RANTES, particulièrement importants dans la phase aiguë du sepsis, sont libérés de manière différentielle selon les différentes souches **(figure 1)**. La figure 1 présente

les profils de libération de facteurs inflammatoires observés pour une souche représentative de chaque espèce étudiée.

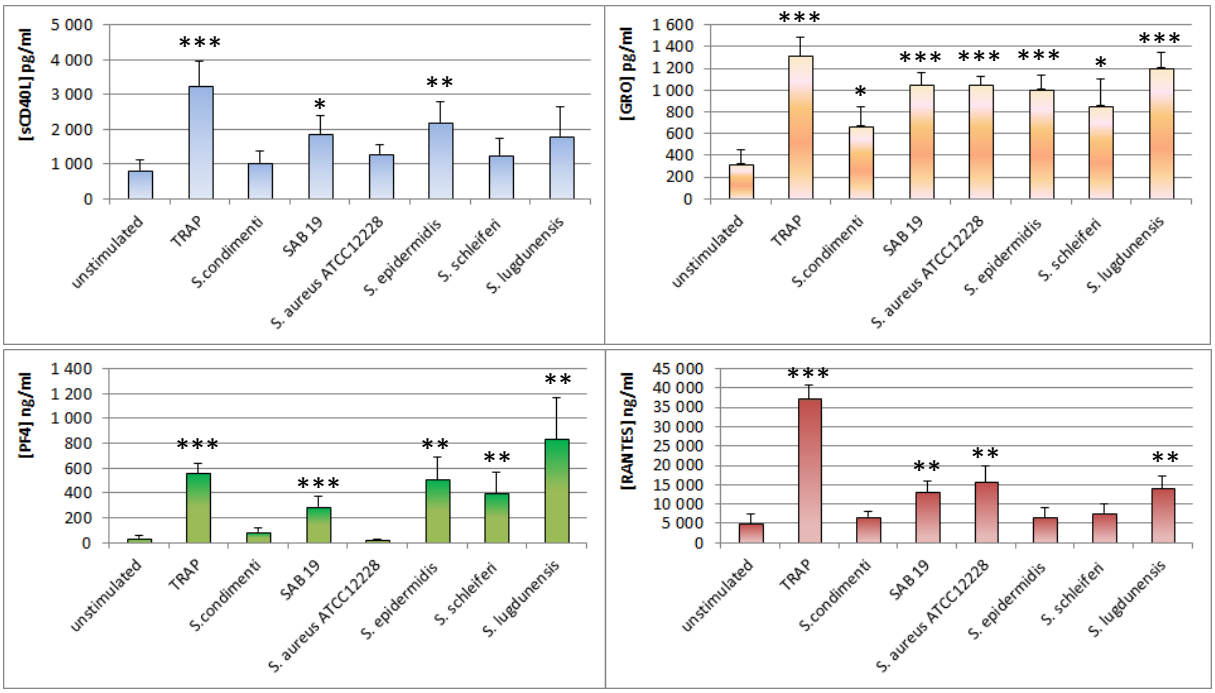


Figure 1 - Platelet inflammatory factor release after live *Staphylococcus* strain stimulation

*Assay performed by Luminex™ (GRO, PF4 and sCD40L) or ELISA (RANTES)technology for platelets supernatant ; n=8 ; platelet stimulation = 30 min ; MOI 0,1; * p < 0,05, ** p < 0,001, ***p < 0,0001 vs. unstimulated platelets*

Parmi toutes les souches testées, seul *S. condimenti* n'induit pas la libération de facteurs immunomodulateurs (sauf le GRO). Il apparaît donc que toutes les espèces de staphylocoques n'induisent pas la réponse inflammatoire des plaquettes et que ces dernières sont capables de faire une distinction relativement fine entre ces espèces. De plus, les facteurs plaquettaires significativement libérés en réponse à *S. aureus*, le sont en plus faible quantité qu'après une stimulation par l'analogue de la thrombine TRAP.

Cette observation confirme que les plaquettes sont capables de moduler leur réponse en fonction du type de stimulus. Il serait intéressant de voir au niveau bactérien d'éventuels facteurs d'adhérence ou de virulence pouvant être corrélés avec un relargage plaquettaire ciblé.

Contrairement à la libération des facteurs solubles, aucun staphylocoque n'a eu d'impact sur l'agrégation plaquettaire **(figure 2)**. Les plaquettes conservent cependant leur propriété d'agrégation car elles sont encore capables d'agréger à 100 % en réponse au TRAP, même après 1h de contact avec les bactéries.

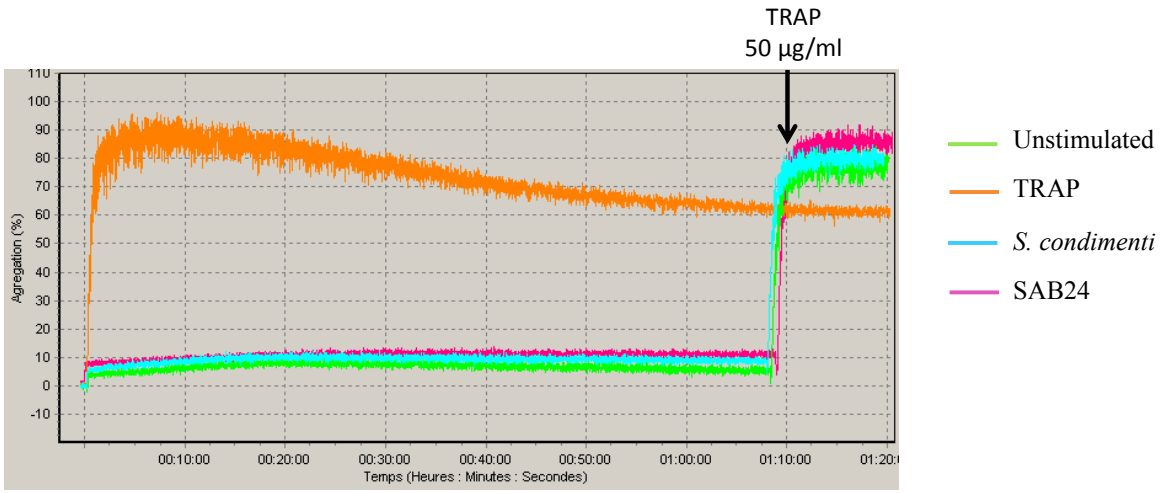


Figure 2- Platelet aggregation after live *Staphylococcus* strain stimulation

Aggregometer graphic representative of 5 independant experiments ; platelet stimulation = 30 min ; MOI 0,1

Cette constatation démontre que les fonctions inflammatoires et d'agrégation des plaquettes sont indépendantes, et que même si les deux types de réponses peuvent être liés dans certains cas, la stimulation par *S. aureus* cible plutôt une réponse inflammatoire. Ainsi la participation des plaquettes à l'orage cytokinique lié au sepsis ne doit pas être négligée.

Enfin, nous nous sommes intéressés au devenir des plaquettes après leur stimulation par les staphylocoques et nous avons pu observer une diminution significative du nombre de plaquettes détectable suite à la stimulation bactérienne **(figure 3)**. Cette diminution n'est cependant pas identique pour toutes les espèces de staphylocoques et, à nouveau, *S. condimenti* ne cause pas de diminution significative du nombre de plaquettes à la différence des autres souches.

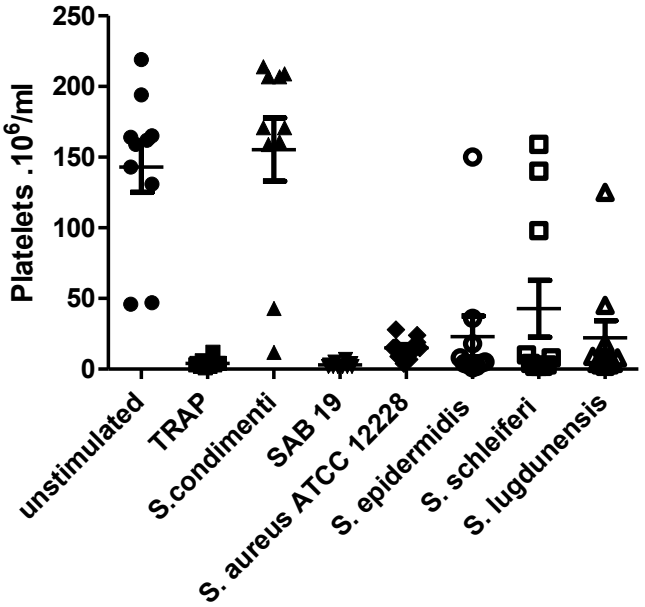


Figure 3 - Platelet count after live Staphylococcus strain stimulation

Platelet stimulation = 30 min ; MOI 0,1

Ces résultats pourraient potentiellement expliquer les thrombopénies associées aux bactériémies décrites dans la littérature. Cependant, du fait que nous n'observons pas d'agrégation, cette diminution du nombre des plaquettes semble faire intervenir un autre mécanisme que nous investiguons actuellement. Un des hypothèses envisagées est l'apoptose des plaquettes induite par les souches bactériennes testées.

Malgré l'absence de noyau, l'apoptose est un processus de mort cellulaire décrit pour les plaquettes, notamment en rapport avec le vieillissement cellulaire. En 2012, Kraemer *et al*., ont montré que ce mécanisme pouvait aussi être mis en jeu dans un contexte pathogène, dans lequel les exotoxines bactériennes entrainent la destruction de la protéine de survie plaquettaire, Bcl-x [8]. Dans cette étude, les auteurs utilisent des mutants d'*E. coli* transformés afin d'exprimer l'α toxine de *S. aureus.* Nous souhaitons donc développer cette observation dans la mesure où l'utilisation de *S. aureus* permet d'évaluer l'effet conjoint de plusieurs facteurs exprimés. En effet, comme nous l'avons montré pour l'étude sur les exotoxines de *S. aureus*, (i) l'α toxine n'est pas l'exotoxine la plus efficace dans l'induction de la réponse inflammatoire plaquettaire et (ii) les exotoxines peuvent avoir un effet synergique sur la libération de facteurs inflammatoires par les plaquettes.

Ainsi, en utilisant des souches de staphylocoques exprimant conjointement plusieurs facteurs de virulence et/ou d'adhésion, nous pourrons évaluer l'apoptose des plaquettes mais aussi investiguer la ou même les voies apoptotiques empruntées.

Ces résultats préliminaires sont encourageants car ils montrent que les plaquettes présentent une diminution du potentiel mitochondrial après contact avec *S. aureus*. Cet évènement précoce de la voie intrinsèque doit être confirmé avec l'expression d'autres molécules. Les évènements tardifs de l'apoptose et l'engagement de la voie extrinsèque demandent également à être approfondis. La formation de microparticules est également une conséquence de l'apoptose plaquettaire à prendre en compte car les microparticules peuvent avoir un réel impact dans la physiopathologie du sepsis [9].

En conclusion, l'apoptose plaquettaire pourrait avoir plusieurs types de conséquences : (i) la formation de microparticules contenant des facteurs immunomodulateurs participant à la phase inflammatoire du sepsis ; (ii) la thrombopénie constituant une complication du sepsis ; et (iii) la réduction de la formation des NET, impliqués dans le ralentissement de la progression de l'infection. Cette étude suggère ainsi que la dégranulation et/ou l'apoptose plaquettaire peuvent représenter deux nouvelles cibles éventuelles dans les approches thérapeutiques du sepsis, la première pour limiter l'inflammation précoce et la seconde pour favoriser la réponse anti-infectieuse.

Bibliographie

[1] N. van der Mee-Marquet, A.-S. Domelier, N. Girard, R. Quentin, et Bloodstream Infection Study Group of the Relais d'Hygiène du Centre, « Epidemiology and typing of Staphylococcus aureus strains isolated from bloodstream infections », J. Clin. Microbiol., vol. 42, no 12, p. 5650‑5657, déc. 2004.

[2] G. E. Thwaites, J. D. Edgeworth, E. Gkrania-Klotsas, A. Kirby, R. Tilley, M. E. Török, S. Walker, H. F. Wertheim, P. Wilson, et M. J. Llewelyn, « Clinical management of Staphylococcus aureus bacteraemia », Lancet Infect. Dis., vol. 11, no 3, p. 208‑222, mars 2011.

[3] M. Santini, M. Kutlesa, A. Pangercic, et B. Barsic, « The importance of pathogens in sepsis: Staphylococcus aureus story », Scand. J. Infect. Dis., vol. 42, no 3, p. 172‑176, mars 2010.

[4] D. M. Vandijck, S. I. Blot, J. J. De Waele, E. A. Hoste, K. H. Vandewoude, et J. M. Decruyenaere, « Thrombocytopenia and outcome in critically ill patients with bloodstream infection », Heart Lung J. Crit. Care, vol. 39, no 1, p. 21‑26, févr. 2010.

[5] A. Gafter-Gvili, N. Mansur, A. Bivas, N. Zemer-Wassercug, J. Bishara, L. Leibovici, et M. Paul, « Thrombocytopenia in Staphylococcus aureus bacteremia: risk factors and prognostic importance », Mayo Clin. Proc. Mayo Clin., vol. 86, no 5, p. 389‑396, mai 2011.

[6] M. Levi, M. Schultz, et T. van der Poll, « Sepsis and thrombosis », Semin. Thromb. Hemost., vol. 39, no 5, p. 559‑566, juill. 2013.

[7] D. Cox, S. W. Kerrigan, et S. P. Watson, « Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation », J. Thromb. Haemost. JTH, vol. 9, no 6, p. 1097‑1107, juin 2011.

[8] B. F. Kraemer, R. A. Campbell, H. Schwertz, M. J. Cody, Z. Franks, N. D. Tolley, W. H. A. Kahr, S. Lindemann, P. Seizer, C. C. Yost, G. A. Zimmerman, et A. S. Weyrich, « Novel Anti-bacterial Activities of β-defensin 1 in Human Platelets: Suppression of Pathogen Growth and Signaling of Neutrophil Extracellular Trap Formation », PLoS Pathog., vol. 7, no 11, p. e1002355, nov. 2011.

[9] V. L. Reid et N. R. Webster, « Role of microparticles in sepsis », Br. J. Anaesth., vol. 109, no 4, p. 503‑513, oct. 2012.

Platelet participation in intestinal mucosal inflammatory response

Les deux formes majeures de maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) sont la maladie de Cronh (MC) et la rectocolite hémorragique (RH). D'un point de vue clinique, anatomique et histologique il est tout à fait possible de distinguer ces deux pathologies [1]. Au niveau moléculaire, elles se rejoignent du fait que tous les patients présentent, au niveau muqueux, un important infiltrat inflammatoire composé majoritairement de neutrophiles et de monocytes [2].

L'extravasation des leucocytes en direction des tissus correspond à l'étape finale d'une succession d'évènements survenus dans le compartiment sanguin (activation des leucocytes, libération de chimiokines, chimioattraction des leucocytes) [3]. A ce jour, de plus en plus d'études confirment l'implication des plaquettes dans le recrutement des neutrophiles/monocytes au niveau de l'endothélium. En conditions inflammatoires, les plaquettes forment des complexes avec les leucocytes, activant ces derniers [4]. D'autre part, l'adhésion des plaquettes à l'endothélium créée un environnement chimiotactique pour les leucocytes [5]. Ces mécanismes observés in vitro, pourraient également se retrouver in vivo chez les patients atteints de MICI dans la mesure où ces derniers présentent (i) une augmentation des complexes circulant associant plaquettes et neutrophiles [6] et (ii) une forte interaction entre les plaquettes de ces patients et l'endothélium inflammatoire [7].

En 2008, Weissmüller *et al*. utilisent un modèle in vitro de MICI pour montrer que durant leur migration vers l'épithélium intestinal, les neutrophiles conservent les plaquettes à leur surface [8]. Il s'agit de la première étude traitant d'une activation plaquettaire au-delà du compartiment sanguin. En effet, les auteurs montrent que les plaquettes sont capables de libérer de l'ATP au niveau des cryptes intestinales, et participent alors à l'altération des échanges de fluides caractéristique des MICI. En se basant sur cette étude princeps et sur notre étude portant sur la migration et l'activation des plaquettes lors d'une inflammation pulmonaire (manuscrit V de la thèse), nous avons émis l'hypothèse que les plaquettes pouvaient, à l'aide des neutrophiles, exercer leur rôle inflammatoire au niveau de la muqueuse intestinale.

Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle de chambre de migration en insert décrit dans le manuscrit V. Le milieu conditionné permettant de mimer l'environnement d'une muqueuse inflammatoire intestinale est à présent un surnageant de cellules Caco2 (lignée de cellule épithéliales intestinales) stimulées par les cytokines pro-inflammatoires IL1-β, TNF-α.

Nous observons qu'après 120 minutes de migration, les neutrophiles retrouvés au niveau du compartiment basal de la chambre de migration expriment tous un signal CD41+, témoignant la présence de plaquettes à leur surface même après chimioattraction **(figure 1)**.

L'analyse de l'expression du marqueur CD62P sur les cellules CD15+/CD41+ recrutées montre que les plaquettes sont plus activées après recrutement par un environnement inflammatoire. Cette activation plaquettaire s'accompagne de la libération de facteurs solubles comme le PF4, le sCD62P et le sCD40L qui sont exclusivement plaquettaires. En effet, ces facteurs ne sont pas retrouvés dans le compartiment basal de la chambre de migration lors de la migration de neutrophiles seuls **(figure 2)**. Nous pouvons donc supposer que, dans un contexte d'inflammation intestinale, les neutrophiles transportent les plaquettes vers la muqueuse, au niveau de laquelle les plaquettes peuvent amplifier l'inflammation.

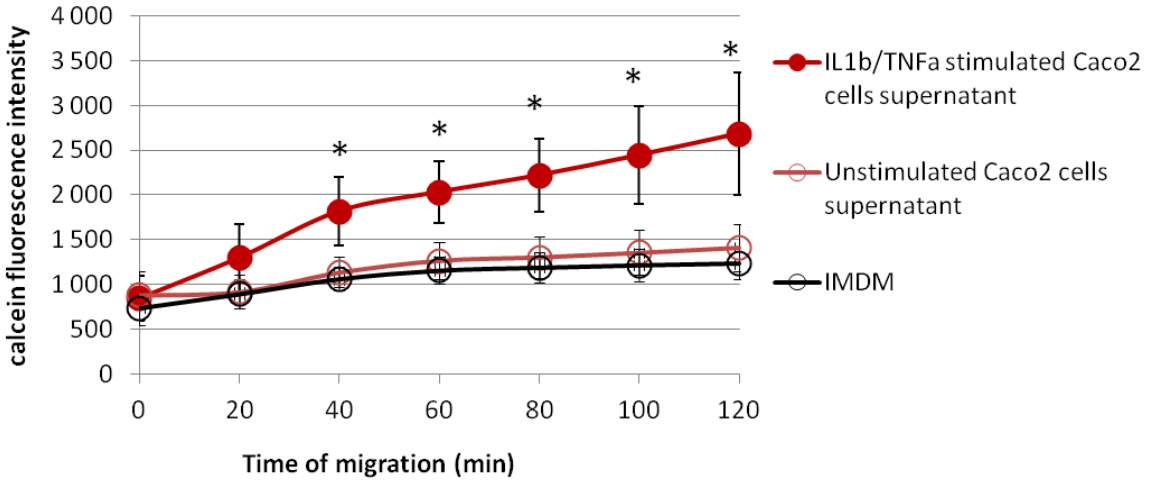


Figure 1 – Chemoattraction of Neutrophil/Platelet complexes chemoattraction in response to intestinal inflammatory conditioned media

Neutrophils/Platelets 1:30 ; calcein staining neutrophils ; n=5

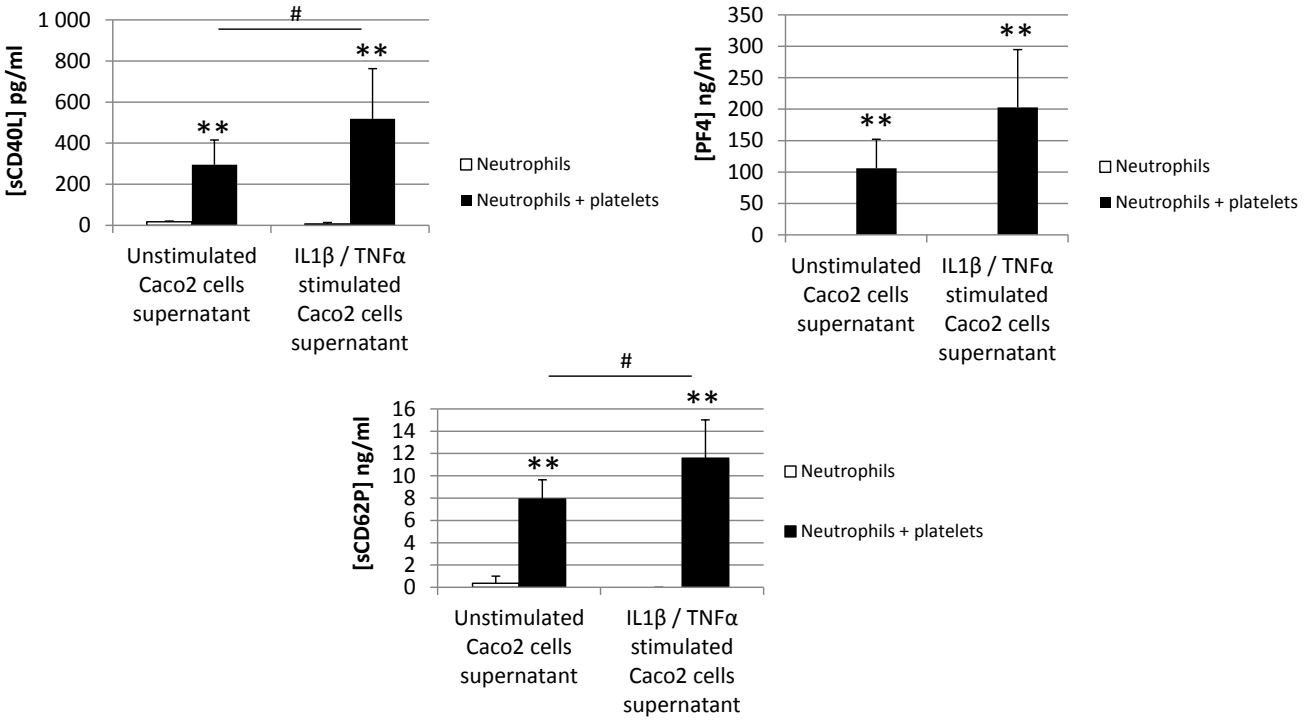


Figure 2 - Inflammatory platelet activation after extravasion

*Assay performed by Luminex™ technology for supernatant of cells present in lower compartment after migration (120 min); n=5; ** p <0,01 vs. neutrophils; # p < 0,05 vs. unstimulated Caco2 cells supernatant*

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé des biopsies intestinales (sur des zones inflammatoires et saines) de patients atteints de RH dans le cadre d'une collaboration avec les services de gastroentérologie et d'anatomopathologie et du CHU de Saint-Etienne (Prs X. ROBLIN et M. PEOCH'). Nous avons mis au point les marquages permettant de détecter un signal CD41 sur des coupes de muqueuses très inflammatoires **(figure 3)**.

Le marquage spécifique des plaquettes est localisé au niveau de la zone stromale. Le signal semble plus élevé dans une biopsie très inflammatoire, cependant il n'est pas exclu que quelques plaquettes soient déjà présentes, en plus faibles quantité et non activées, dans des zones non inflammatoires, de la même manière que des macrophages résidents de la muqueuse. D'autres marquages sur des zones non-inflammatoires sont actuellement en cours et il sera maintenant important de montrer l'état d'activation des plaquettes ainsi qu'une éventuelle colocalisation des plaquettes avec les neutrophiles, ce qui conforterait notre modèle.

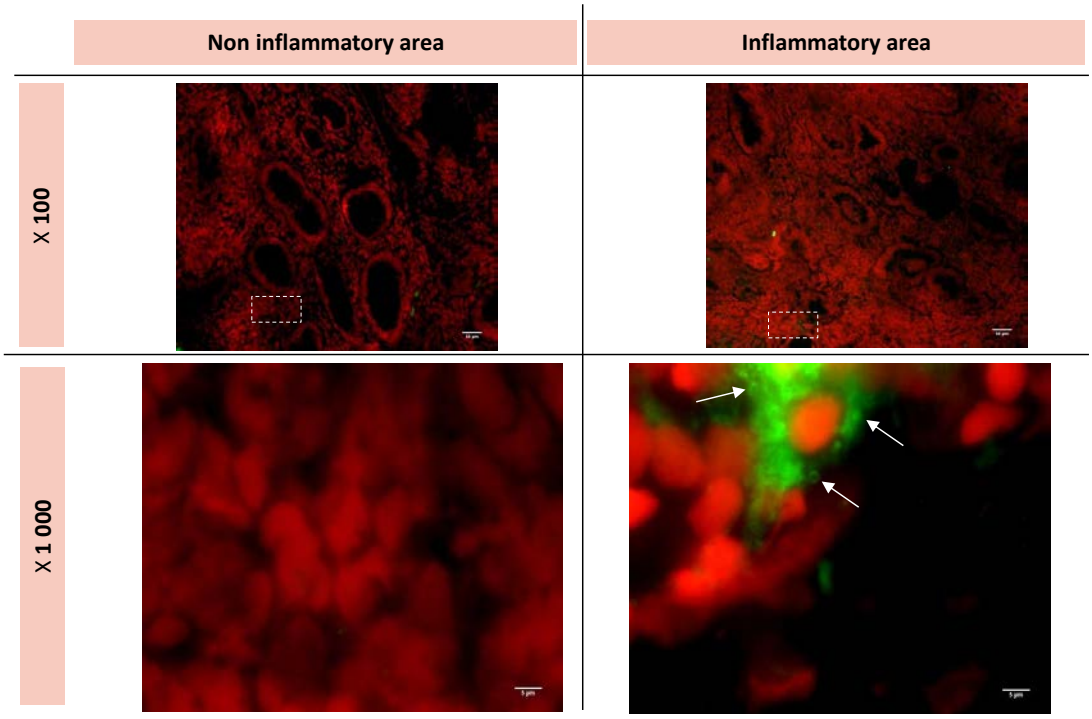


Figure 3 - Platelet detection in intestinal inflammatory mucosa of ulcerative colitis patients

n=3 ; red = IP (nucleus), green = CD41 (platelets)

Cette étude « modélise » donc le recrutement des plaquettes, associées aux neutrophiles, au sein de la muqueuse intestinale inflammatoire, dans laquelle elles peuvent participer à l'amplification de l'inflammation en libérant des cytokines/chimiokines. Le but initiale de cette étude était de montrer *ex vivo* et *in vitro* la présence des plaquettes dans la muqueuse intestinale.

Il faut à présent évaluer, en marge de leur rôle pro-inflammatoire, la reconnaissance bactérienne par les plaquettes au niveau muqueux, notamment par les TLR, ainsi que leur réponse antibactérienne, déjà abordée ici avec la libération de PF4.

Bibliographie

[1] J. Matricon, N. Barnich, et D. Ardid, « Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease », Self Nonself, vol. 1, no 4, p. 299-309, 2010.

[2] S. Nikolaus et S. Schreiber, « Diagnostics of inflammatory bowel disease », Gastroenterology, vol. 133, no 5, p. 1670-1689, nov. 2007.

[3] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, et S. Nourshargh, « Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated », Nat. Rev. Immunol., vol. 7, no 9, p. 678-689, sept. 2007.

[4] M. Gawaz, H. Langer, et A. E. May, « Platelets in inflammation and atherogenesis », J. Clin. Invest., vol. 115, no 12, p. 3378-3384, déc. 2005.

[5] A. Tabuchi et W. M. Kuebler, « Endothelium-platelet interactions in inflammatory lung disease », Vascul. Pharmacol., vol. 49, no 4-6, p. 141-150, déc. 2008.

[6] G. E. Pamuk, O. Vural, B. Turgut, M. Demir, H. Umit, et A. Tezel, « Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study », Am. J. Hematol., vol. 81, no 10, p. 753-759, oct. 2006.

[7] S. Rutella, S. Vetrano, C. Correale, C. Graziani, A. Sturm, A. Spinelli, R. De Cristofaro, A. Repici, A. Malesci, et S. Danese, « Enhanced platelet adhesion induces angiogenesis in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease microvasculature », J. Cell. Mol. Med., vol. 15, no 3, p. 625-634, mars 2011.

[8] T. Weissmüller, E. L. Campbell, P. Rosenberger, M. Scully, P. L. Beck, G. T. Furuta, et S. P. Colgan, « PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell–expressed ecto-NTPDases », J Clin Invest, vol. 118, no 11, p. 3682-3692, nov. 2008.

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

Les plaquettes sanguines sont essentielles à l'hémostase primaire. Cette fonction est étudiée depuis que de Giulio Bizzozero, « le père de la plaquette », a décrit, en 1862, un nouvel élément morphologique du sang, aussi bien impliqué dans l'hémorragie que la thrombose. Bien que très rapide, ce processus implique néanmoins de nombreux récepteurs et voies de signalisation, ce qui confère déjà une certaine complexité aux plaquettes [13].

Depuis une dizaine d'années le spectre d'action des plaquettes a été élargi et les différentes études menées à ce sujet ont permis de les placer dans le « continuum immunitaire ». En effet, ces éléments cellulaires anucléés expriment et libèrent après activation de nombreuses cytokines, chimiokines et facteurs de croissance initialement contenus dans les granules α. En plus de favoriser la réparation tissulaire, ces facteurs ont également la capacité de contribuer à l'orchestration de la réponse immunitaire [9], [13]. Les plaquettes ne sont pas « des éponges à cytokines » comme cela a été longtemps pensé et bien qu'anucléées, elles possèdent des mécanismes alternatifs capables de réguler et moduler la libération de ces facteurs solubles.
L'activation plaquettaire est très variable selon le type d'agoniste, sa concentration, le temps de stimulation, la température ainsi que les forces de cisaillement. De plus, les plaquettes expriment plusieurs molécules de surface leur permettant d'interagir avec les microorganismes, toutefois, la plupart des études se cantonnent principalement à l'agrégation plaquettaire [85]. Une partie de ce travail de thèse vise à évaluer l'implication des plaquettes à la réponse anti-infectieuse *via* des facteurs immunomodulateurs d'origine plaquettaire.

Les données épidémiologiques rapportent un état inflammatoire chronique au cours de l'infection à HIV-1, même chez les patients sous trithérapie antirétrovirale [35], lesquelles peuvent accroître le risque de complications notamment cardiovasculaires. Il est donc important de limiter l'inflammation autant que possible en ciblant les cellules qui participent à ce phénomène. Nous montrons dans le premier article présenté dans ce manuscrit, que les cytokines plaquettaires jouent un rôle dans l'entretien de l'inflammation au cours de l'infection à HIV-1. Cette étude porte sur 71 patients infectés par HIV-1, suivis au CHU de Saint-Etienne.

Les données cliniques montrant une thrombopénie chez ces patients sont en accord avec ce qui a déjà été observé dans la littérature. Cette thrombopénie peut directement être liée à l'infection par HIV, deux scénarios sont évoquées [423] : i) une accélération de la destruction des plaquettes en conséquence de leur contact avec HIV et/ou de sont internalisation d'HIV [36] ; ii) une déficience numéraire qui résulte d'un défaut de production au niveau des mégacaryocytes car l'infection virale (exemple avec HCV) impacte sur la production de thrombopiétine [22]. De manière cohérente avec ces suppositions Hyms *et al.*, ont montré que l'administration d'azidothymidine (AZT), agent antirétroviral, permet de restaurer la numération plaquettaire dans un délai de deux semaines [424]. L'utilisation de thérapies combinées de type HAART présente des résultats similaires, avec réaugmentation des plaquettes dès trois mois d'HAART [425].

Cependant ces constations n'expliquent pas tout et sont discutables car les patients sous HAART inclus dans notre étude, demeurent thrombopéniques. Le traitement anti-rétroviral peut aussi avoir un effet myélosuppresseur ; la thrombopénie serait alors secondaire à un effet iatrogène [423]. Dans notre étude, bien que significativement diminué, le taux de plaquettes est légèrement plus élevé chez les patients traités. Il est possible que, sous HAART, le taux de plaquettes ne soit pas restauré d'une manière optimale de par l'effet de certaines molécules contenues dans les trithérapies, comme les inhibiteurs de la transcriptase inverse qui ont tendance à activer les plaquettes.

Outre la thrombopénie, notre étude montre que l'infection par HIV est associée à une augmentation de la concentration plasmatique des cytokines plaquettaires, notamment du sCD40L et du sCD62P. Ces résultats s'inscrivent alors dans la même lignée que d'autres études qui ont déjà montré une augmentation du sCD40L chez les patients HIV^+. D'après Wang *et al.*, la libération de ce facteur s'explique notamment par l'engagement du CCR3 plaquettaire et de l'intégrine β3 par la protéine virale Tat [14]. Le mécanisme mis en jeu pourrait être comparable à celui observé pour les cellules dendritiques infectées par HIV-1 à savoir une activation de la kinase Raf-1, qui à son tour acétyle la sous-unité p65 du NFκB ce qui entraine sa translocation dans le noyau [15]. En effet, l'ensemble des molécules mises en jeu sont présentes dans les plaquettes ; de plus, l'inhibition du NFκB prévient l'activation plaquettaire [179]. L'infection à HIV-1 activerait donc les plaquettes et favoriserait la libération de facteurs inflammatoires tels que le RANTES, le GRO-α, le sCD40L et le sCD62P, ce qui est en faveur de l'implication des plaquettes dans l'inflammation chronique

associée à l'infection par HIV [35]. La surproduction de RANTES suggère aussi que les plaquettes prennent part dans la défense anti-virale (HIV) [23].

Par ailleurs, la mise en place d'une thérapie anti-rétrovirale semble amplifier l'activation plaquettaire qui se traduit par la libération de facteurs inflammatoires [47]. Certaines molécules antivirales comme l'abacavir, favoriseraient la libération de sCD40L plaquettaire *via* un effet sur l'oxide nitrique [48].

Nos travaux complètent les études précédentes dans la mesure où nous montrons que l'infection à HIV-1 et la thérapie anti-rétrovirale altèrent la capacité des plaquettes à répondre à une stimulation par un analogue de la thrombine (TRAP). En effet, les plaquettes de patients infectés et non traités par HAART, mais surtout celles de patients infectés et sous traitement HAART, libèrent moins de facteurs inflammatoires après stimulation. Deux mécanismes peuvent alors être proposés quand à l'effet de l'HAART sur la libération des cytokines plaquettaires :

i) La capacité des molécules anti-rétrovirales à empêcher, ou du moins limiter, la réponse des plaquettes à TRAP en inhibant le récepteur PAR, qui n'est fonctionnel qu'après clivage de sa partie N-terminale par une protéase. Or, les anti-rétroviraux de la famille des inhibiteurs de protéase pourraient empêcher le récepteur PAR (« protease activated receptor ») d'être fonctionnel et donc les plaquettes de répondre au TRAP. Toutefois, les taux plasmatiques significativement plus élevés pour ces facteurs chez les patients sous anti-rétroviraux, témoins que les plaquettes peuvent libérer leur contenu cytokinique, ne sont pas en faveur de cette hypothèse. Il serait donc intéressant de poursuivre notre étude en différenciant les patients qui reçoivent un inhibiteur de protéase de ceux qui n'en reçoivent pas mais également d'évaluer si d'autres agonistes des plaquettes, ne mettant pas en jeu le récepteur PAR, ont le même effet sur les plaquettes de patients HIV+ sous traitement.

ii) La propension des molécules antirétrovirales à activer les plaquettes, associée à la surproduction de thrombine au cours de l'infection par HIV [427]. Ces deux éléments induiraient la libération de facteurs inflammatoires de manière continue par les plaquettes au cours du traitement. Le contenu plaquettaire serait alors « épuisé » et les plaquettes ne seraient plus en mesure de répondre à une stimulation par TRAP. Toutefois, nous avons constaté que cet « épuisement » plaquettaire n'était pas comparable pour toutes les molécules analysées ce qui serait en faveur d'une hétérogénéité des granules α plaquettaires [428].

Ce travail permet de montrer que l'infection à HIV-1 mais également le traitement anti-rétroviral par HAART ont une incidence sur la réponse inflammatoire plaquettaire et que ces dernières participent à l'entretien de l'inflammation associée à cette pathologie .Il est donc important de ne pas négliger les plaquettes en tant que cibles dans des stratégies visant à réduire cette inflammation. Aussi, il serait intéressant d'évaluer l'action de molécules anti-plaquettaires en combinaison avec les combinaisons de HAART ; ciblant la dégranulation (aspirine, inhibiteurs de flux calcique, clopidogrel,…) plus que l'agrégation (inhibiteur de la GIIb-IIIa …).

Outre HIV-1, les plaquettes sont également capables d'interagir avec les bactéries. Ceci avait déjà été mis en évidence dans les années 1970 par Clawson [125]. Les bactéries peuvent utiliser les récepteurs de l'hémostase afin d'entrer en contact avec les plaquettes, cependant l'activation qui en résulte demeure controversée. Alors que certains réfutent l'activation des plaquettes (agrégation, expression du CD62P) par les bactéries, d'autres suggèrent que les bactéries induiraient exclusivement une réponse inflammatoire de la part des plaquettes [121]. L'hétérogénéité des données disponibles dans la littérature s'explique par plusieurs facteurs tels que la concentration bactérienne, la phase de croissance des bactéries utilisées, la présence de molécules plasmatiques, le temps de stimulation,… Aussi, dans le but de nous rapprocher au maximum les conditions physiologiques de la circulation sanguine que nos études portant sur les interactions plaquettes-bactéries sont réalisées en plasma riche en plaquettes (PRP).

En 2004-2005, notre équipe et celle de Yokoyama au Japon sont les premières à mettre en évidence les « Toll-like receptors » à la surface des plaquettes [116], [117]. Peu de temps après, les travaux de plusieurs équipes ont montré un caractère fonctionnel de ces récepteurs aussi bien pour les plaquettes humaines que murines [156], [157], [429]. Ces découvertes constituent un élément primordial dans la définition du rôle plaquettaire dans le « continuum immunitaire ». En exprimant des récepteurs de l'immunité innée, capables de détecter des motifs conservés à la surface des pathogènes, les plaquettes présentent un arsenal de détection remarquable, inattendu pour une cellule anucléée. Comme pour la sensibilité des plaquettes aux bactéries, la fonctionnalité des TLR plaquettaires ne fait pas l'unanimité, principalement du fait que l'expression du marqueur CD62P n'est pas augmentée lors l'engagement du TLR4 [430].

Nos observations précédentes concordent avec cette constatation, cependant, nous avons pu mettre en évidence la libération des protéines granulaires, incluant les facteurs immunomodulateurs, après engagement des TLR plaquettaires [163]. Ainsi l'activation des plaquettes par les bactéries est concrète mais ne se traduit pas par la surexpression du marqueur CD62P à la surface des plaquettes. Ces dernières semblent donc en mesure d'adapter leur réponse selon que le stimulus soit l'engagement des récepteurs de l'hémostase ou celui des PRR détectant des signaux délivrés par des agents infectieux. Il existe donc dans la plaquette, des mécanismes de régulation permettant une réponse adaptée et non pas binaire.

Notre équipe s'est particulièrement intéressée au rôle fonctionnel du TLR4 et nous avons montré que l'engagement de ce récepteur induit la libération de facteurs immunomudulateurs tels que le sCD40L, le PF4 et diminue la libération de molécules comme le RANTES et le PDGF-AB [162].

Dans ces travaux de thèse, nous avons cherché à préciser les mécanismes mis en jeu et nous nous sommes intéressés à la molécule CD14 qui, au même titre que le MD-2 et la LBP, est une molécule accessoire nécessaire à l'activation du TLR4 (second article). Concernant le TLR4 plaquettaire, l'implication du CD14 n'est pas claire. Zhang *et al.* montrent une expression membranaire du CD14 sur les plaquettes mais cette expression n'est pas retrouvée au stade mégacaryocytaire [422]. Nous avons donc émis l'hypothèse que pour les plaquettes, les molécules CD14 plasmatiques sont capturées par les plaquettes dans la mesure où les travaux de notre équipe montrent l'absence d'activation plaquettaire par un ligand du TLR4 lorsque la stimulation s'effectue avec des plaquettes lavées, dépourvues de leur environnement plasmatique [163]. Les résultats présentés dans le deuxième manuscrit de cette thèse confirment cette hypothèse. Nous avons pu voir que l'absence de plasma empêche l'activation des plaquettes par le LPS *via* le TLR4 mais pas celle qui s'opère via le récepteur PAR et son ligand TRAP. L'addition de CD14 soluble recombinant permet de restaurer de manière dose-dépendante l'activation des plaquettes par le LPS. De plus, il a été constaté que la présence massive de LPS dans le compartiment sanguin était associée à une augmentation du clivage du CD14 [431] ce qui favoriserait alors la réponse plaquettaire. Au cours de l'inflammation, l'interconnexion entre les leucocytes et les plaquettes serait donc amplifiée *via* le CD14 ; où ce dernier permettrait de former une boucle entre l'activation des leucocytes et celle des plaquettes.

En s'intéressant à la signalisation moléculaire faisant le lien entre la stimulation du TLR4 et la libération de molécules inflammatoires, Berthet *et al.* ont montré que les plaquettes expriment les molécules de la cascade TLR, classiquement décrites pour les cellules eucaryotes comme le MyD88, TRIF, IRAK1, TRAF3, TRAF6, IKK-i, IκB-α,… [176]. Le MyD88 qui intervient en premier est montré comme indispensable dans l'activation plaquettaire TLR-4 dépendante [422]. Dans la mesure où le TLR2 est également exprimé par les plaquettes nous avons investigué les voies de signalisations associées à ce récepteur.

Les études portant sur ce récepteur plaquettaire ont été initiées par Blair *et al.* qui ont montré une activation plaquettaire de type thrombo-inflammatoire avec l'implication de la voie PI3K [429]. Assinger *et al.* quant à eux montrent que la réponse plaquettaire inflammatoire TLR 2-dépendante s'accompagne aussi de la libération de sCD40L [140]. Les travaux présentés dans le troisième article, confirment la libération de sCD40L après engagement du TLR2 par le Pam3CSK, peptide de synthèse mimant le lipopeptide triacétylé des bactéries, identique à celui utilisé dans les travaux de Blair *et al*. Cette étude montre aussi la libération d'autres facteurs inflammatoires, RANTES, sCD62P et PF4, qui n'ont jusqu'à présent jamais été associés à la stimulation du TLR2 plaquettaire et qui peuvent contribuer à la formation des complexes plaquettes-neutrophiles observés après activation du TLR2 [429].

Nos observations, associées à celles de l'étude de Blair *et al*., montrent que suite à l'engagement du TLR2 les plaquettes peuvent agréger rapidement (6 min), ce qui représente une première réponse [429] ; et qu'elles peuvent libérer plus tardivement (deux heures) des facteurs immunomodulateurs, ce qui constitue une deuxième réponse anti-infectieuse, complétant la première.

Les informations apportées par cette étude montrent également une différence dans le profil cytokinique entre la stimulation du TLR2 et celle du TLR4, principalement pour le RANTES et le CD62P. Ces derniers, non détectés après stimulation des plaquettes par du LPS [163], sont bien présents sous forme membranaire et/ou soluble lorsqu'il s'agit de l'engagement du TLR2. *A contrario* l'engagement du TLR2 ne permet pas un épissage des ARNm de l'IL-1β aussi fort qu'après engagement du TLR4 [11]. Même si les TLR 2 et 4 se ressemblent dans leur fonction de reconnaissance des signaux de danger pathogènes, les différences observées au niveau de l'activation plaquettaire suggèrent pourtant des fonctionnalités bien distinctes entre ces deux récepteurs.

Nous montrons aussi que, contrairement à la stimulation de type hémostatique forte (TRAP), la stimulation des plaquettes *via* le TLR2 induit uniquement la libération du contenu des

granules α car nous n'observons pas de libération accrue de sérotonine. Ce résultat vient conforter l'hypothèse, émise au vu de nos observations concernant le TLR4, que la réponse plaquettaire s'adapte au type de stimulus.

Les études de Blair *et al.* et d'Assinger *et al*. montrent l'implication des voies PI3K et PLC [140], [429] dans la signalisation du TLR2 chez la plaquette. Déjà décrites pour d'autres fonctions plaquettaires comme le signal « inside-out », la mobilisation calcique ou le remodelage cellulaire, ces voies sont également mises en jeu pour des fonctions annexes. Nous montrons que c'est aussi le cas pour une signalisation plus atypique des plaquettes, la voie NFκB. L'utilisation d'un inhibiteur du NFκB empêche la libération du contenu granulaire autant lors de l'engagement du PAR-1 que celui du TLR2. Cependant, nous montrons que le « timing » de son implication semble différent si l'on se réfère à la cinétique de phosphorylation de deux sérines de la sous-unité p65 (Ser468 et Ser536). Ces résultats concordent avec ceux de Rex *et al.* qui montrent que même si les réponses plaquettaires à un agent infectieux ou à une stimulation hémostatique peuvent être similaires, les voies de signalisation cellulaire ne se superposent pas [167].

La réponse des plaquettes aux bactéries peut également se faire indépendamment de ses récepteurs spécialisés. Nous montrons ainsi dans le quatrième manuscrit que les plaquettes sont capables de libérer des cytokines selon un profil adapté en réponse à des exotoxines de *S. aureus.* Les exotoxines testées sont TSST-1, l'α-toxine, l'hémolysine γ et la PVL. Aucune n'induit la libération de SDF-1α, ce qui confirme le fait que les cytokines plaquettaires ne sont pas toutes libérées simultanément mais selon un mécanisme régulé.
Puisqu'en condition physiopathologique *S. aureus* exprime simultanément plusieurs exotoxines, elles ont également été testées selon différentes combinaisons. Ainsi, nous avons notamment observé que la PVL et la TSST-1, qui prises individuellement n'induisent peu ou pas de libération significative de sCD40L, sont capables lorsqu'elles sont combinées, même à des concentrations sub-optimales, de provoquer une libération de sCD40L à un taux comparable à celui observé pour les toxines les plus actives sur la libération de cette molécule. Cette observation ne résulte pas d'un effet « de masse » mais d'une libération ciblée car même combinées les concentrations sub-optimales de toxines ne parviennent pas toutes à induire la libération de sCD62P, ni de SDF-1α. Les exotoxines de *S. aureus* agiraient donc de manière synergique sur la réponse inflammatoire des plaquettes. Cette observation

incite à reconsidérer l'interprétation de certaines études où les toxines utilisées individuellement n'ont aucun effet sur les plaquettes, voire un effet inhibiteur [197], [200].

De par leurs propriétés chimiques, les toxines vont principalement désorganiser les membranes des cellules cibles. Au delà de cette lyse cellulaire, une réponse inflammatoire se met en place ; les mécanismes de déclenchement sont encore imprécis. Ce n'est que très récemment que l'équipe de Torres a montré que la toxine lukED de *S. aureus* se lie aux cellules cibles par le CCR5, le CXCR-1 ou le CXCR-2, en fonction des cellules incriminées [432], [433]. L'engagement simultané de ces récepteurs, également présents sur les plaquettes [18], pourrait expliquer comment les différentes toxines sont capables d'activer spécifiquement les cellules cibles et d'obtenir ainsi un relarguage de cytokines suffisant pour induire l'inflammation.

Dans le travail décrit dans le quatrième article nous avons poursuivi nos efforts pour nous rapprocher des conditions physiologiques de l'infection en évaluant la réponse inflammatoire des plaquettes à des souches bactériennes vivantes. En effet, outre les facteurs de virulence tels que les toxines, *S. aureus* possède des facteurs d'adhésion pouvant aussi agir sur les plaquettes et amplifier l'effet synergique observé pour les exotoxines.

Les résultats de nos travaux montrent, une fois de plus, la capacité des plaquettes à moduler leur réponse en fonction du stimulus. Ces résultats sont remarquables en ce sens qu'ils ne traitent pas seulement d'une distinction entre un stimulus hémostatique *vs*. un stimulus infectieux mais ils pointent également la capacité, très fine, des plaquettes à adapter leur réponse face à différentes souches de *Staphylococci.* Les plaquettes sont comme « éduquées » pour la réponse immunitaire ; elles ne répondent, par exemple, pas à *S. condimenti* qui est une souche non pathogène pour l'homme, alors qu'elles sont sensibles à des souches isolées à partir de bactériémie à *S. aureus*.

Dans cette étude nous nous sommes focalisés sur la réponse inflammatoire des plaquettes et parmi plusieurs facteurs testés, nous observons une libération de RANTES, PF4, GRO et de sCD40L. En traitant de la libération de cytokines, nos résultats apportent des éléments encore non explorés alors que la communauté scientifique s'oppose à l'effet pro-agrégeant de *S. aureus*. En effet, dans la littérature l'impact de *S. aureus* sur les plaquettes est controversé car certaines équipes mettent en avant son pouvoir pro-agrégant [191], [434] alors que d'autres n'observent aucune réponse, voire une inhibition de l'activation plaquettaire [197]–[199]. Dans ce genre d'étude, traitant de la physiologie plaquettaire en réponse à un nouveau type de

stimulus, il est important, avant de conclure, de bien prendre en compte plusieurs types de réponse allant de l'agrégation à libération du contenu des granules denses et α ; et de tenir compte aussi de l'aspect technique qui peut apporter un biais important (présence de molécules plasmatiques, concentration bactérienne).

Bien qu'en cours d'interprétation, les résultats de cette étude soulèvent également un mécanisme encore peu exploré pour les plaquettes, surtout en réponse à une stimulation bactérienne ; il s'agit de l'apoptose. Au-delà des observations, le but est aujourd'hui d'éclaircir la relation de cause à effet qui existe entre *S. aureus* et ce mécanisme plaquettaire, toujours en gardant à l'esprit l'implication des plaquettes dans la réponse aux pathogènes. Towhid *et al.* ont montré en 2012 que l'activation du TLR2 par une souche de S. a*ureus* provoque l'apoptose des plaquettes [435]. Ce mécanisme pourrait impliquer le NFκB car il a été montré qu'il interviendrait dans l'augmentation de la production des protéines proapoptotiques Bcl-x(S) et Bax et donc dans la libération du cytochrome c [436]. Le NFκB pourrait aussi être impliqué lors de la dégradation de la protéine de survie cellulaire Bcl-x(L) par l'α toxine de *S. aureus* [247]. Le processus d'apoptose plaquettaire ne serait donc pas nécessairement néfaste dans la réponse aux bactéries car les microparticules dérivées des plaquettes en apoptose sont décrites pour être pro-inflammatoires. En effet, elles sont impliquées dans la différenciation des macrophages [437], ainsi que dans le dialogue des plaquettes avec les neutrophiles. L'implication du NFκB dans ce mécanisme d'apoptose plaquettaire serait donc une manière d'élargir sa fonction pro-inflammatoire, en plus de l'initiation de la libération de cytokines pro-inflammatoires.

Les observations obtenues dans la première partie de thèse sont particulièrement intéressantes dans le cadre du sepsis car elles permettent d'envisager une participation des plaquettes à la physiopathologie du sepsis, en marge de leur rôle thrombotique. Les plaquettes semblent jouer un rôle dans la phase inflammatoire du sepsis. En effet, plusieurs études menées chez la souris ont montré que le sCD40L plaquettaire était à l'origine du recrutement des neutrophiles au niveau pulmonaire et donc des complications de type ALI observées au cours du sepsis [221]. L'utilisation d'une molécule anti-plaquettaire dans un modèle de sepsis murin permet même de limiter ce phénomène [438]. L'implication des plaquettes au cours du sepsis est aussi associée à la formation de NET par les neutrophiles, phénomène autant bénéfique (défense antibactérienne) que néfaste (toxicité des histones pour l'endothélium et altération de la circulation microvasculaire) [251]. De plus les plaquettes forment

essentiellement des complexes avec les neutrophiles au cours du sepsis murin [233]. Il apparait donc que l'interaction des plaquettes avec les neutrophiles soit de première importance dans l'inflammation et les complications associées au sepsis et particulièrement dans l'ALI. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en condition inflammatoire :

i) les complexes neutrophiles-plaquettes ne s'arrêtent pas à la barrière endothéliale et que, lors de l'extravasation, les leucocytes conservent les plaquettes à leur surface ;

ii) une fois recrutées au niveau de la muqueuse (pulmonaire en l'occurence) les plaquettes continuent d'exercer leur fonction pro-inflammatoire.

Dans le cinquième article, nous proposons un modèle *in vitro* d'inflammation pulmonaire. Cette dernière s'inscrit à la fois dans les complications du sepsis, l'ALI, et dans une forme extrême de réaction post-transfusionnelle, le TRALI.

Nos résultats montrent qu'une stimulation inflammatoire de cellules épithéliales pulmonaires induit le recrutement des complexes neutrophiles-plaquettes et que les plaquettes demeurent actives et capables de libérer leur contenu cytokinique après la migration. Ces résultats renforcent l'étude de Boilard *et al.* qui décrit un mécanisme similaire dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde. Au cours de leur migration en direction du synovium, les neutrophiles transporteraient à leur surface des microparticules plaquettaires. Les auteurs affirment que le signal CD41 observé dans le synovium (par microscopie à immunofluorescence et cytométrie) correspond seulement à la taille des microparticules [75]. Nos résultats de microscopie montrent aussi une hétérogénéité dans la taille des plaquettes, avec des éléments de taille comparable à celle des plaquettes. De plus, les plaquettes utilisées avant migration ne sont pas activées et ne produisent donc pas de microparticules ou peu (à cause des différentes étapes de manipulation). Toutefois il est également envisageable qu'une fois dans le compartiment inflammatoire, les plaquettes s'activent et produisent des microparticules qui viennent se fixer directement sur les neutrophiles qui ont déjà migré.

Nos résultats sont en revanche en désaccord avec les observations de van Gils *et al.* qui montrent que la polarisation des plaquettes à la surface des monocytes au cours de leur migration, associée au stress mécanique de la migration, entraine une dissociation des complexes plaquettes-monocytes avant le franchissement de la barrière endothéliale et que les plaquettes restent localisées au niveau de l'endothélium [439]. La comparaison de cette étude avec la nôtre a ses limites car elles n'impliquent pas les mêmes leucocytes, la détection des

complexes plaquettes-leucocytes après migration ne se fait pas avec les mêmes marqueurs et les plaquettes de l'étude de van Gils *et al.* sont lavées préalablement à leur association aux monocytes, ce qui peut avoir comme effet d'éliminer les molécules plasmatiques telles que le fibrinogène, pouvant renforcer la liaison des plaquettes aux neutrophiles.
Concernant la chimioattraction des plaquettes seules, la taille des pores des inserts (3 µm) utilisés dans notre modèle ne permet pas de distinguer une diffusion passive d'une chimioattraction. C'est pourquoi les travaux de Czapiga *et al*. montrant une chiomattraction des plaquettes par le « N-formyl peptide » peuvent être remis en cause [440], d'autant plus que leurs travaux, contrairement aux nôtres, utilisent des plaquettes pré-activées par de la thrombine.

Dans notre modèle, l'activation des plaquettes est croissante durant les différentes étapes du recrutement (plaquettes seules, adhésion aux neutrophiles, migration, activation par l'environnement inflammatoire après migration). L'augmentation du CD62P soluble ou membranaire pourrait, *in vivo*, faciliter les contacts avec l'endothélium. Les travaux de Boilard *et al.* montrent que les microparticules plaquettaires libèrent de l'IL-1β capable d'amplifier l'inflammation au niveau de la synovie [75]. La mise en évidence très récente du récepteur à l'IL-1β à la surface des plaquettes suggère une possible boucle d'autoactivation et par conséquent une autre manière d'amplifier l'inflammation associée aux plaquettes [441] L'activation plaquettaire au-delà des vaisseaux sanguins est aussi décrite par Weissmüler *et al.* qui montrent une migration des complexes plaquette-neutrophiles au niveau des cryptes intestinales et la libération d'ATP plaquettaire *in situ*, ce qui favorise les échanges de fluides [419]. Cependant, dans cette dernière étude, les auteurs ne s'intéressent pas à la composante inflammatoire des plaquettes au niveau de la muqueuse. Dans notre étude, les plaquettes qui ont migré dans un environnement inflammatoire libèrent des facteurs immunomodulateurs. Si nous transposons cette observation à la muqueuse, les plaquettes exerceraient alors leur activité pro-inflammatoire au niveau tissulaire. Le sCD40L et le sCD62P libérés pourraient continuer à activer *in situ* les cellules de l'inflammation. Il en est de même pour le PF4, qui de plus pourrait exercer son rôle antibactérien directement au niveau du site de l'infection [148]. Cette dégranulation observée après migration montre que les plaquettes sont encore fonctionnelles. Il serait donc important d'évaluer le rôle fonctionnel de leurs TLR afin de vérifier si leur activité sentinelle peut aussi être exercée au niveau muqueux. Enfin, les

muqueuses inflammatoires ont un pH acide, condition qui favorise le rôle inflammatoire des plaquettes, au détriment de leur fonction hémostatique [325].
Le modèle utilisé dans cette étude est en cours d'être complexifié notamment par l'addition de cellules endothéliales (type HUVEC) au niveau de l'insert afin d'observer l'action des complexes plaquettes-neutrophiles sur celles-ci. Cloutier *et al*. ont déjà montré l'effet de la sérotonine plaquettaire dans l'augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale [442]. Enfin, l'objectif à cours terme serait aussi d'évaluer le potentiel des surnageants de plaquettes ayant migré sur l'activation leucocytaire mais aussi sur la croissance bactérienne.

L'implication des plaquettes dans la réponse inflammatoire constituent un réel tournant dans la compréhension de la physiologie plaquettaire et ouvrent de nouveaux champs d'investigation qui sont encore quelque peu négligés. Pourtant, dans ce contexte les plaquettes peuvent représenter un véritable objet d'étude ; et permettraient notamment d'élucider certains évènements observés *in vitro* et/ou *in vivo* jusque là inexpliqués.
Un des exemples le plus représentatif, concerne la polyarthrite rhumatoïde. En 1996, Pelegri *et al*. montrent, dans un modèle murin, que le développement d'arthrite persiste en dépit de la déplétion des lymphocytes T γ/δ [443] ; ce qui suggère la participation d'autres acteurs qui pourraient être les plaquettes. Aujourd'hui, les travaux de l'équipe de Boilard confirment l'importance des plaquettes dans cette pathologie inflammatoire, notamment par les microparticules plaquettaires riches en IL-1β [75].
Cela semble aussi valable pour l'ensemble des pathologies impliquant le sCD40L, d'autant plus qu'il est maintenant prouvé que 95% du sCD40L plasmatique provient des plaquettes [5]

L'activation plaquettaire et les manifestations inflammatoires sont étroitement liées. Une étude réalisée chez des patients athérosclérotiques montre que l'utilisation d'aspirine ou de clopidogrel diminue l'expression des marqueurs inflammatoires comme le NFκB, la « C reactive-protein » (CRP), le sCD40L, le CD62P et les agrégats plaquettes-monocytes. Ces antiplaquettaires pourraient donc être utilisés à des fins anti-inflammatoires.
Cependant, ceci n'est pas valable pour les tous les inhibiteurs plaquettaire, dont l'exemple est l'inhibition de la GPIIb-IIIa, qui aurait même tendance à avoir l'effet inverse [444].

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'identifier d'autres mécanismes plaquettaires qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques de l'inflammation. Il serait intéressant de tester *in vivo,* dans des modèles murins distincts en fonction des pathologies

visées tels que ceux ciblant le CD14 soluble, le TLR2 ou le NFκB pour les infections bactériennes et le sepsis.
Il serait également intéressant d'évaluer la capacité des molécules anti-plaquettaires à limiter l'activation des plaquettes de manière à réduire l'expression du CD62P à leur surface et donc la formation de complexes plaquettes-leucocytes et particulièrement plaquettes-neutrophiles, notamment dans l'ALI. L'objectif serait d'arriver à maîtriser la balance entre l'effet bénéfique des plaquettes dans la réponse inflammatoire et l'exacerbation de celle-ci à l'origine des pathologies chroniques.

La mise en évidence des plaquettes dans les différents mécanismes inflammatoires les placent au cœur de l'immunité innée que ce soit dans la reconnaissance de pathogènes, la transduction de signal ou la libération de cytokines/chimiokines. Cette similitude de fonctionnalité avec les leucocytes sensibilise au fait que ces deux types cellulaires ne semblent pas être si différents/
Les plaquettes anucléées sont uniquement retrouvées chez les mammifères. Chez les vertébrés inférieurs comme les oiseaux, reptiles, amphibiens ou poissons la fonction hémostatique est assurée par des thrombocytes nucléés. Concernant les espèces invertébrées, elles ne possèdent pas de plaquettes *per se*, mais l'hémolymphe contient un type de cellule nucléée dite hémocyte, qui expriment les TLR, qui est capable de phagocyter les corps étranger ou encore sécréter des protéines antimicrobiennes mais c'est cette même cellule qui régule la coagulation et la cicatrisation. En compilant toutes ces caractéristiques il est possible de discuter d'une possible évolution commune entre les plaquettes et les leucocytes, avec une dissociation proportionnelle à l'évolution des espèces [13].

D'une manière générale, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse montre que les plaquettes sont capables de recouvrir la majorité des étapes de l'inflammation et confirme ainsi leur implication, à part entière, dans l'orchestration de cet état physiopathologique. En modulant aussi bien l'induction que la phase effectrice aiguë de l'inflammation ainsi que l'entretien de ce processus, les plaquettes peuvent devenir une cible thérapeutique permettant ; là où pendant des années elles n'étaient même pas soupçonnées d'intervenir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] K. R. Machlus et J. E. Italiano, « The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation », *J Cell Biol*, vol. 201, n° 6, p. 785‑796, oct. 2013.

[2] J. N. Thon et J. E. Italiano, « Platelets: production, morphology and ultrastructure », *Handb Exp Pharmacol*, n° 210, p. 3‑22, 2012.

[3] T. J. Stalker, D. K. Newman, P. Ma, K. M. Wannemacher, et L. F. Brass, « Platelet signaling », *Handb Exp Pharmacol*, n° 210, p. 59‑85, 2012.

[4] E. Karshovska, C. Weber, et P. von Hundelshausen, « Platelet chemokines in health and disease », *Thromb. Haemost.*, vol. 110, n° 3, juin 2013.

[5] P. André, L. Nannizzi-Alaimo, S. K. Prasad, et D. R. Phillips, « Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease », *Circulation*, vol. 106, n° 8, p. 896‑899, août 2002.

[6] B. D. Elzey, T. L. Ratliff, J. M. Sowa, et S. A. Crist, « Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity », *Thromb. Res.*, vol. 127, n° 3, p. 180‑183, mars 2011.

[7] O. Garraud, J. Berthet, H. Hamzeh-Cognasse, et F. Cognasse, « Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets », *Thrombosis Research*, vol. 127, n° 4, p. 283‑286, avr. 2011.

[8] J. M. van Gils, J. J. Zwaginga, et P. L. Hordijk, « Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 85, n° 2, p. 195‑204, févr. 2009.

[9] M. T. Rondina, A. S. Weyrich, et G. A. Zimmerman, « Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases », *Circ. Res.*, vol. 112, n° 11, p. 1506‑1519, mai 2013.

[10] R. K. Andrews et M. C. Berndt, « Microparticles facilitate neutrophil/platelet crosstalk », *Blood*, vol. 112, n° 6, p. 2174‑2175, sept. 2008.

[11] P. N. Shashkin, G. T. Brown, A. Ghosh, G. K. Marathe, et T. M. McIntyre, « Lipopolysaccharide is a Direct Agonist for Platelet RNA Splicing », *J Immunol*, vol. 181, n° 5, p. 3495‑3502, sept. 2008.

[12] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, et S. Nourshargh, « Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, n° 9, p. 678‑689, sept. 2007.

[13] J. W. Semple, J. E. Italiano Jr, et J. Freedman, « Platelets and the immune continuum », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, n° 4, p. 264‑274, avr. 2011.

[14] C. Flaujac, S. Boukour, et E. Cramer-Bordé, « Platelets and viruses: an ambivalent relationship », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, n° 4, p. 545‑556, févr. 2010.

[15] S. Boukour, J.-M. Massé, L. Bénit, A. Dubart-Kupperschmitt, et E. M. Cramer, « Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 4, n° 2, p. 426‑435, févr. 2006.

[16] T. B. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, et Y. van Kooyk, « DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells », *Cell*, vol. 100, n° 5, p. 587‑597, mars 2000.

[17] C. Chaipan, E. J. Soilleux, P. Simpson, H. Hofmann, T. Gramberg, A. Marzi, M. Geier, E. A. Stewart, J. Eisemann, A. Steinkasserer, K. Suzuki-Inoue, G. L. Fuller, A. C. Pearce, S. P. Watson, J. A. Hoxie, F. Baribaud, et S. Pöhlmann, « DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets », *J. Virol.*, vol. 80, n° 18, p. 8951‑8960, sept. 2006.

[18] K. J. Clemetson, J. M. Clemetson, A. E. Proudfoot, C. A. Power, M. Baggiolini, et T. N. Wells, « Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets », *Blood*, vol. 96, n° 13, p. 4046‑4054, déc. 2000.

[19] R. S. Basch, Y. H. Kouri, et S. Karpatkin, « Expression of CD4 by human megakaryocytes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 87, n° 20, p. 8085‑8089, oct. 1990.

[20] D. Zucker-Franklin, S. Seremetis, et Z. Y. Zheng, « Internalization of human immunodeficiency virus type I and other retroviruses by megakaryocytes and platelets », *Blood*, vol. 75, n° 10, p. 1920‑1923, mai 1990.

[21] P. Ljungman, F. Z. Wang, D. A. Clark, V. C. Emery, M. Remberger, O. Ringdén, et A. Linde, « High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients », *Br. J. Haematol.*, vol. 111, n° 3, p. 774‑781, déc. 2000.

[22] J. G. McHutchison, G. Dusheiko, M. L. Shiffman, M. Rodriguez-Torres, S. Sigal, M. Bourliere, T. Berg, S. C. Gordon, F. M. Campbell, D. Theodore, N. Blackman, J. Jenkins, N. H. Afdhal, et TPL102357 Study Group, « Eltrombopag for thrombocytopenia in patients with cirrhosis associated with hepatitis C », *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, n° 22, p. 2227‑2236, nov. 2007.

[23] F. Cocchi, A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, et P. Lusso, « Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells », *Science*, vol. 270, n° 5243, p. 1811‑1815, déc. 1995.

[24] T. S. Tsegaye, K. Gnirß, N. Rahe-Meyer, M. Kiene, A. Krämer-Kühl, G. Behrens, J. Münch, et S. Pöhlmann, « Platelet activation suppresses HIV-1 infection of T cells », *Retrovirology*, vol. 10, n° 1, p. 48, mai 2013.

[25] D. J. Auerbach, Y. Lin, H. Miao, R. Cimbro, M. J. Difiore, M. E. Gianolini, L. Furci, P. Biswas, A. S. Fauci, et P. Lusso, « Identification of the platelet-derived chemokine CXCL4/PF-4 as a broad-spectrum HIV-1 inhibitor », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 109, n° 24, p. 9569‑9574, juin 2012.

[26] M. Iannacone, G. Sitia, M. Isogawa, J. K. Whitmire, P. Marchese, F. V. Chisari, Z. M. Ruggeri, et L. G. Guidotti, « Platelets prevent IFN-alpha/beta-induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, n° 2, p. 629‑634, janv. 2008.

[27] T. Saitoh, J. Komano, Y. Saitoh, T. Misawa, M. Takahama, T. Kozaki, T. Uehata, H. Iwasaki, H. Omori, S. Yamaoka, N. Yamamoto, et S. Akira, « Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1 », *Cell Host Microbe*, vol. 12, n° 1, p. 109‑116, juill. 2012.

[28] C. N. Jenne, C. H. Y. Wong, F. J. Zemp, B. McDonald, M. M. Rahman, P. A. Forsyth, G. McFadden, et P. Kubes, « Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps », *Cell Host Microbe*, vol. 13, n° 2, p. 169‑180, févr. 2013.

[29] M. Othman, A. Labelle, I. Mazzetti, H. S. Elbatarny, et D. Lillicrap, « Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance », *Blood*, vol. 109, n° 7, p. 2832‑2839, avr. 2007.

[30] C. Krishnamurti, R. A. Peat, M. A. Cutting, et S. W. Rothwell, « Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 66, n° 4, p. 435‑441, avr. 2002.

[31] A. Lafeuillade, M. C. Alessi, I. Poizot-Martin, C. Boyer-Neumann, C. Zandotti, R. Quilichini, L. Aubert, C. Tamalet, I. Juhan-Vague, et J. A. Gastaut, « Endothelial cell dysfunction in HIV infection », *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 5, n° 2, p. 127‑131, 1992.

[32] K. de Gaetano Donati, R. Rabagliati, L. Iacoviello, et R. Cauda, « HIV infection, HAART, and endothelial adhesion molecules: current perspectives », *Lancet Infect Dis*, vol. 4, n° 4, p. 213‑222, avr. 2004.

[33] P. A. Holme, F. Müller, N. O. Solum, F. Brosstad, S. S. Frøland, et P. Aukrust, « Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection », *FASEB J.*, vol. 12, n° 1, p. 79‑89, janv. 1998.

[34] V. F. Corrales-Medina, J. Simkins, J. A. Chirinos, J. A. Serpa, L. L. Horstman, W. Jy, et Y.-S. Ahn, « Increased levels of platelet microparticles in HIV-infected patients with good response to highly active antiretroviral therapy », *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 54, n° 2, p. 217‑218, juin 2010.

[35] N. R. Klatt, N. T. Funderburg, et J. M. Brenchley, « Microbial translocation, immune activation, and HIV disease », *Trends Microbiol.*, vol. 21, n° 1, p. 6‑13, janv. 2013.

[36] T. Youssefian, A. Drouin, J.-M. Masse, J. Guichard, et E. M. Cramer, « Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation », *Blood*, vol. 99, n° 11, p. 4021‑4029, mai 2002.

[37] K. Wolf, D. A. Tsakiris, R. Weber, P. Erb, M. Battegay, et Swiss HIV Cohort Study, « Antiretroviral therapy reduces markers of endothelial and coagulation activation in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 », *J. Infect. Dis.*, vol. 185, n° 4, p. 456‑462, févr. 2002.

[38] J. Wang, W. Zhang, M. A. Nardi, et Z. Li, « HIV-1 Tat-induced platelet activation and release of CD154 contribute to HIV-1-associated autoimmune thrombocytopenia », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° 3, p. 562‑573, mars 2011.

[39] Z. Sui, L. F. Sniderhan, G. Schifitto, R. P. Phipps, H. A. Gelbard, S. Dewhurst, et S. B. Maggirwar, « Functional synergy between CD40 ligand and HIV-1 Tat contributes to inflammation: implications in HIV type 1 dementia », *J. Immunol.*, vol. 178, n° 5, p. 3226‑3236, mars 2007.

[40] D. C. Davidson, M. P. Hirschman, A. Sun, M. V. Singh, K. Kasischke, et S. B. Maggirwar, « Excess soluble CD40L contributes to blood brain barrier permeability in vivo: implications for HIV-associated neurocognitive disorders », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 12, p. e51793, 2012.

[41] D. C. Davidson, M. P. Hirschman, S. L. Spinelli, C. N. Morrell, G. Schifitto, R. P. Phipps, et S. B. Maggirwar, « Antiplatelet activity of valproic acid contributes to decreased soluble CD40 ligand production in HIV type 1-infected individuals », *J. Immunol.*, vol. 186, n° 1, p. 584‑591, janv. 2011.

[42] K. A. Metcalf Pate, C. E. Lyons, J. L. Dorsey, E. N. Shirk, S. E. Queen, R. J. Adams, L. Gama, C. N. Morrell, et J. L. Mankowski, « Platelet Activation and Platelet-Monocyte Aggregate Formation Contribute to Decreased Platelet Count During Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection in Pig-tailed Macaques », *J. Infect. Dis.*, juill. 2013.

[43] C. Bethel-Brown, H. Yao, S. Callen, Y. H. Lee, P. K. Dash, A. Kumar, et S. Buch, « HIV-1 Tat-mediated induction of platelet-derived growth factor in astrocytes: role of early growth response gene 1 », *J. Immunol.*, vol. 186, n° 7, p. 4119‑4129, avr. 2011.

[44] R. Ahmad, S. T. A. Sindhu, E. Toma, R. Morisset, et A. Ahmad, « Elevated levels of circulating interleukin-18 in human immunodeficiency virus-infected individuals: role of peripheral blood mononuclear cells and implications for AIDS pathogenesis », *J. Virol.*, vol. 76, n° 24, p. 12448‑12456, déc. 2002.

[45] R. Ahmad, A. Iannello, S. Samarani, R. Morisset, E. Toma, M. Grosley, et A. Ahmad, « Contribution of platelet activation to plasma IL-18 concentrations in HIV-infected AIDS patients », *AIDS*, vol. 20, n° 14, p. 1907‑1909, sept. 2006.

[46] D. Francisci, S. Giannini, F. Baldelli, M. Leone, B. Belfiori, G. Guglielmini, L. Malincarne, et P. Gresele, « HIV type 1 infection, and not short-term HAART, induces endothelial dysfunction », *AIDS*, vol. 23, n° 5, p. 589‑596, mars 2009.

[47] L. Landrø, T. Ueland, K. Otterdal, S. S. Frøland, et P. Aukrust, « Persistently raised plasma levels of platelet-derived inflammatory mediators in HIV-infected patients during highly active anti-retroviral therapy », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° 5, p. 1075‑1077, mai 2011.

[48] D. Francisci, E. Falcinelli, B. Belfiori, E. Petito, G. Guglielmini, L. Malincarne, A. Mezzasoma, M. Sebastiano, V. Conti, S. Giannini, S. Bonora, F. Baldelli, et P. Gresele, « In vivo platelet activation and platelet hyperreactivity in abacavir-treated HIV-infected patients », *Thromb. Haemost.*, vol. 110, n° 2, mai 2013.

[49] D:A:D Study Group, C. A. Sabin, S. W. Worm, R. Weber, P. Reiss, W. El-Sadr, F. Dabis, S. De Wit, M. Law, A. D'Arminio Monforte, N. Friis-Møller, O. Kirk, C. Pradier, I. Weller, A. N. Phillips, et J. D. Lundgren, « Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration », *Lancet*, vol. 371, n° 9622, p. 1417‑1426, avr. 2008.

[50] A. Martin, J. Amin, D. A. Cooper, A. Carr, A. D. Kelleher, M. Bloch, D. Baker, I. Woolley, S. Emery, et STEAL study group, « Abacavir does not affect circulating levels of inflammatory or coagulopathic biomarkers in suppressed HIV: a randomized clinical trial », *AIDS*, vol. 24, n° 17, p. 2657‑2663, nov. 2010.

[51] D. C. Davidson, G. Schifitto, et S. B. Maggirwar, « Valproic Acid Inhibits the Release of Soluble CD40L Induced by Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in Human Immunodeficiency Virus Infected Individuals », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 3, p. e59950, 2013.

[52] N. von Hentig, A.-K. Förster, K. Kuczka, U. Klinkhardt, S. Klauke, P. Gute, S. Staszewski, S. Harder, et J. Graff, « Platelet-leucocyte adhesion markers before and after the initiation of antiretroviral therapy with HIV protease inhibitors », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 62, n° 5, p. 1118‑1121, nov. 2008.

[53] R. P. Beynon, V. K. Bahl, et B. D. Prendergast, « Infective endocarditis », *BMJ*, vol. 333, n° 7563, p. 334‑339, août 2006.

[54] R. L. Leask, N. Jain, et J. Butany, « Endothelium and valvular diseases of the heart », *Microsc. Res. Tech.*, vol. 60, n° 2, p. 129‑137, févr. 2003.

[55] T. Pessi, V. Karhunen, P. P. Karjalainen, A. Ylitalo, J. K. Airaksinen, M. Niemi, M. Pietila, K. Lounatmaa, T. Haapaniemi, T. Lehtimäki, R. Laaksonen, P. J. Karhunen, et J. Mikkelsson, « Bacterial signatures in thrombus aspirates of patients with myocardial infarction », *Circulation*, vol. 127, n° 11, p. 1219‑1228, e1‑6, mars 2013.

[56] M. McAdow, D. M. Missiakas, et O. Schneewind, « <i>Staphylococcus aureus</i> Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections », *Journal of Innate Immunity*, vol. 4, n° 2, p. 141‑148, 2012.

[57] P. Moreillon, J. M. Entenza, P. Francioli, D. McDevitt, T. J. Foster, P. François, et P. Vaudaux, « Role of Staphylococcus aureus coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis », *Infect. Immun.*, vol. 63, n° 12, p. 4738‑4743, déc. 1995.

[58] M. Levi, M. Schultz, et T. van der Poll, « Sepsis and thrombosis », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 39, n° 5, p. 559‑566, juill. 2013.

[59] B. Østerud et E. Bjørklid, « Sources of tissue factor », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 32, n° 1, p. 11‑23, févr. 2006.

[60] C. C. Clawson, G. H. Rao, et J. G. White, « Platelet interaction with bacteria. IV. Stimulation of the release reaction. », *The American Journal of Pathology*, vol. 81, n° 2, p. 411, nov. 1975.

[61] L. Burnier, P. Fontana, B. R. Kwak, et A. Angelillo-Scherrer, « Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine », *Thromb. Haemost.*, vol. 101, n° 3, p. 439‑451, mars 2009.

[62] R. Flaumenhaft, « Formation and fate of platelet microparticles », *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 36, n° 2, p. 182‑187, mars 2006.

[63] T. Wiedmer et P. J. Sims, « Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles », *Blood*, vol. 78, n° 11, p. 2880‑2886, déc. 1991.

[64] G. T. Brown et T. M. McIntyre, « Lipopolysaccharide Signaling without a Nucleus: Kinase Cascades Stimulate Platelet Shedding of Proinflammatory IL-1 -Rich Microparticles », *The Journal of Immunology*, vol. 186, n° 9, p. 5489‑5496, mars 2011.

[65] J. Kappelmayer, I. Beke Debreceni, A. Vida, P. Antal-Szalmás, K. J. Clemetson, et B. Nagy Jr, « Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation », *J. Thromb. Haemost.*, janv. 2013.

[66] K. Hashimoto, M. Jayachandran, W. G. Owen, et V. M. Miller, « Aggregation and microparticle production through toll-like receptor 4 activation in platelets from recently menopausal women », *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 54, n° 1, p. 57‑62, juill. 2009.

[67] S. Ge, B. Hertel, S. H. Emden, J. Beneke, J. Menne, H. Haller, et S. von Vietinghoff, « Microparticle generation and leucocyte death in Shiga toxin-mediated HUS », *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 27, n° 7, p. 2768‑2775, juill. 2012.

[68] J. E. Italiano Jr, A. T. A. Mairuhu, et R. Flaumenhaft, « Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 17, n° 6, p. 578‑584, nov. 2010.

[69] F. D. George, « Microparticles in vascular diseases », *Thrombosis Research*, vol. 122, Supplement 1, p. S55‑S59, 2008.

[70] R. Lacroix, F. Sabatier, A. Mialhe, A. Basire, R. Pannell, H. Borghi, S. Robert, E. Lamy, L. Plawinski, L. Camoin-Jau, V. Gurewich, E. Angles-Cano, et F. Dignat-George, « Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro », *Blood*, vol. 110, n° 7, p. 2432‑2439, oct. 2007.

[71] S. F. Mause, P. von Hundelshausen, A. Zernecke, R. R. Koenen, et C. Weber, « Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, n° 7, p. 1512‑1518, juill. 2005.

[72] J. M. Sowa, S. A. Crist, T. L. Ratliff, et B. D. Elzey, « Platelet influence on T- and B-cell responses », *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 57, n° 4, p. 235‑241, août 2009.

[73] S.-C. Lo, C.-Y. Hung, D.-T. Lin, H.-C. Peng, et T.-F. Huang, « Involvement of platelet glycoprotein Ib in platelet microparticle mediated neutrophil activation », *J. Biomed. Sci.*, vol. 13, n° 6, p. 787‑796, nov. 2006.

[74] W. Jy, W. W. Mao, L. Horstman, J. Tao, et Y. S. Ahn, « Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro », *Blood Cells Mol. Dis.*, vol. 21, n° 3, p. 217‑231; discussion 231a, 1995.

[75] E. Boilard, P. A. Nigrovic, K. Larabee, G. F. M. Watts, J. S. Coblyn, M. E. Weinblatt, E. M. Massarotti, E. Remold-O'Donnell, R. W. Farndale, J. Ware, et D. M. Lee, « Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production », *Science*, vol. 327, n° 5965, p. 580‑583, janv. 2010.

[76] H. Ogura, T. Kawasaki, H. Tanaka, T. Koh, R. Tanaka, Y. Ozeki, H. Hosotsubo, Y. Kuwagata, T. Shimazu, et H. Sugimoto, « Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis », *J Trauma*, vol. 50, n° 5, p. 801‑809, mai 2001.

[77] J. S. Bennett, B. W. Berger, et P. C. Billings, « The structure and function of platelet integrins », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7 Suppl 1, p. 200‑205, juill. 2009.

[78] E. Josefsson, K. W. McCrea, D. Ní Eidhin, D. O'Connell, J. Cox, M. Höök, et T. J. Foster, « Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of Staphylococcus aureus », *Microbiology (Reading, Engl.)*, vol. 144 (Pt 12), p. 3387‑3395, déc. 1998.

[79] D. McDevitt, P. Francois, P. Vaudaux, et T. J. Foster, « Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of Staphylococcus aureus », *Mol. Microbiol.*, vol. 11, n° 2, p. 237‑248, janv. 1994.

[80] D. Ní Eidhin, S. Perkins, P. Francois, P. Vaudaux, M. Höök, et T. J. Foster, « Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of Staphylococcus aureus », *Mol. Microbiol.*, vol. 30, n° 2, p. 245‑257, oct. 1998.

[81] J. I. Flock, G. Fröman, K. Jönsson, B. Guss, C. Signäs, B. Nilsson, G. Raucci, M. Höök, T. Wadström, et M. Lindberg, « Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from Staphylococcus aureus », *EMBO J.*, vol. 6, n° 8, p. 2351‑2357, août 1987.

[82] J. Mitchell, A. Tristan, et T. J. Foster, « Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of Staphylococcus lugdunensis », *Microbiology (Reading, Engl.)*, vol. 150, n° Pt 11, p. 3831‑3841, nov. 2004.

[83] Y. Usui, Y. Ohshima, Y. Ichiman, T. Ohtomo, M. Suganuma, et K. Yoshida, « Platelet aggregation induced by strains of various species of coagulase-negative staphylococci », *Microbiol. Immunol.*, vol. 35, n° 1, p. 15‑26, 1991.

[84] M. P. Brennan, A. Loughman, M. Devocelle, S. Arasu, A. J. Chubb, T. J. Foster, et D. Cox, « Elucidating the role of Staphylococcus epidermidis serine-aspartate repeat protein G in platelet activation », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, n° 8, p. 1364‑1372, août 2009.

[85] D. Cox, S. W. Kerrigan, et S. P. Watson, « Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° 6, p. 1097‑1107, juin 2011.

[86] H. Miajlovic, M. Zapotoczna, J. A. Geoghegan, S. W. Kerrigan, P. Speziale, et T. J. Foster, « Direct interaction of iron-regulated surface determinant IsdB of Staphylococcus aureus with the GPIIb/IIIa receptor on platelets », *Microbiology (Reading, Engl.)*, vol. 156, n° Pt 3, p. 920‑928, mars 2010.

[87] H. J. Petersen, C. Keane, H. F. Jenkinson, M. M. Vickerman, A. Jesionowski, J. C. Waterhouse, D. Cox, et S. W. Kerrigan, « Human platelets recognize a novel surface protein, PadA, on Streptococcus gordonii through a unique interaction involving fibrinogen receptor GPIIbIIIa », *Infect. Immun.*, vol. 78, n° 1, p. 413‑422, janv. 2010.

[88] C. Plummer, H. Wu, S. W. Kerrigan, G. Meade, D. Cox, et C. W. Ian Douglas, « A serine-rich glycoprotein of Streptococcus sanguis mediates adhesion to platelets via GPIb », *Br. J. Haematol.*, vol. 129, n° 1, p. 101‑109, avr. 2005.

[89] B. A. Bensing, J. A. López, et P. M. Sullam, « The Streptococcus gordonii surface proteins GspB and Hsa mediate binding to sialylated carbohydrate epitopes on the platelet membrane glycoprotein Ibalpha », *Infect. Immun.*, vol. 72, n° 11, p. 6528‑6537, nov. 2004.

[90] I. R. Siboo, H. F. Chambers, et P. M. Sullam, « Role of SraP, a Serine-Rich Surface Protein of Staphylococcus aureus, in binding to human platelets », *Infect. Immun.*, vol. 73, n° 4, p. 2273‑2280, avr. 2005.

[91] M. O'Seaghdha, C. J. van Schooten, S. W. Kerrigan, J. Emsley, G. J. Silverman, D. Cox, P. J. Lenting, et T. J. Foster, « Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions », *FEBS J.*, vol. 273, n° 21, p. 4831‑4841, nov. 2006.

[92] M. F. Byrne, S. W. Kerrigan, P. A. Corcoran, J. C. Atherton, F. E. Murray, D. J. Fitzgerald, et D. M. Cox, « Helicobacter pylori binds von Willebrand factor and interacts with GPIb to induce platelet aggregation », *Gastroenterology*, vol. 124, n° 7, p. 1846‑1854, juin 2003.

[93] E. I. Peerschke, W. Yin, et B. Ghebrehiwet, « Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis », *Mol. Immunol.*, vol. 47, n° 13, p. 2170‑2175, août 2010.

[94] Y. Morita, S. Matsuo, et N. Okada, « [Function of complement system and its role in biodefense] », *Nippon Rinsho*, vol. 63 Suppl 7, p. 41‑46, juill. 2005.

[95] I. Ford, C. W. Douglas, J. Heath, C. Rees, et F. E. Preston, « Evidence for the involvement of complement proteins in platelet aggregation by Streptococcus sanguis NCTC 7863 », *Br. J. Haematol.*, vol. 94, n° 4, p. 729‑739, sept. 1996.

[96] A. Loughman, J. R. Fitzgerald, M. P. Brennan, J. Higgins, R. Downer, D. Cox, et T. J. Foster, « Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by Staphylococcus aureus clumping factor A », *Mol. Microbiol.*, vol. 57, n° 3, p. 804‑818, août 2005.

[97] E. I. B. Peerschke, T. K. Murphy, et B. Ghebrehiwet, « Activation-dependent surface expression of gC1qR/p33 on human blood platelets », *Thromb. Haemost.*, vol. 89, n° 2, p. 331‑339, févr. 2003.

[98] O. A. Hamad, P. H. Nilsson, D. Wouters, J. D. Lambris, K. N. Ekdahl, et B. Nilsson, « Complement component C3 binds to activated normal platelets without preceding proteolytic activation and promotes binding to complement receptor 1 », *J. Immunol.*, vol. 184, n° 5, p. 2686‑2692, mars 2010.

[99] A. H. Schmaier, P. M. Smith, et R. W. Colman, « Platelet C1- inhibitor. A secreted alpha-granule protein », *J. Clin. Invest.*, vol. 75, n° 1, p. 242‑250, janv. 1985.

[100] P. J. Capel, J. G. van de Winkel, I. E. van den Herik-Oudijk, et J. S. Verbeek, « Heterogeneity of human IgG Fc receptors », *Immunomethods*, vol. 4, n° 1, p. 25‑34, févr. 1994.
[101] D. L. Cassel, M. A. Keller, S. Surrey, E. Schwartz, A. D. Schreiber, E. F. Rappaport, et S. E. McKenzie, « Differential expression of Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIB and Fc gamma RIIC in hematopoietic cells: analysis of transcripts », *Mol. Immunol.*, vol. 30, n° 5, p. 451‑460, avr. 1993.
[102] R. F. Reilly, « The pathophysiology of immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia », *Semin Dial*, vol. 16, n° 1, p. 54‑60, févr. 2003.
[103] R. G. Worth, C. D. Chien, P. Chien, M. P. Reilly, S. E. McKenzie, et A. D. Schreiber, « Platelet FcgammaRIIA binds and internalizes IgG-containing complexes », *Exp. Hematol.*, vol. 34, n° 11, p. 1490‑1495, nov. 2006.
[104] R. E. Fitzpatrick, L. C. Wijeyewickrema, et R. N. Pike, « The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis », *Future Microbiol*, vol. 4, n° 4, p. 471‑487, mai 2009.
[105] M. Arvand, S. Bhakdi, B. Dahlbäck, et K. T. Preissner, « Staphylococcus aureus alpha-toxin attack on human platelets promotes assembly of the prothrombinase complex », *J. Biol. Chem.*, vol. 265, n° 24, p. 14377‑14381, août 1990.
[106] A. E. Bryant, C. R. Bayer, R. Y. Z. Chen, P. H. Guth, R. J. Wallace, et D. L. Stevens, « Vascular dysfunction and ischemic destruction of tissue in Streptococcus pyogenes infection: the role of streptolysin O-induced platelet/neutrophil complexes », *J. Infect. Dis.*, vol. 192, n° 6, p. 1014‑1022, sept. 2005.
[107] M. K. Johnson, D. Boese-Marrazzo, et W. A. Pierce Jr, « Effects of pneumolysin on human polymorphonuclear leukocytes and platelets », *Infect. Immun.*, vol. 34, n° 1, p. 171‑176, oct. 1981.
[108] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, et C. A. Janeway Jr, « A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity », *Nature*, vol. 388, n° 6640, p. 394‑397, juill. 1997.
[109] C. A. Janeway et R. Medzhitov, « Innate Immune Recognition », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 20, n° 1, p. 197‑216, janv. 2002.
[110] T. Kawai et S. Akira, « The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors », *Nat. Immunol.*, vol. 11, n° 5, p. 373‑384, mai 2010.
[111] F. N. Lauw, D. R. Caffrey, et D. T. Golenbock, « Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin », *Trends in Immunology*, vol. 26, n° 10, p. 509‑511, oct. 2005.
[112] D. Werling et T. W. Jungi, « TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response », *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 91, n° 1, p. 1‑12, janv. 2003.
[113] S. Akira, S. Uematsu, et O. Takeuchi, « Pathogen recognition and innate immunity », *Cell*, vol. 124, n° 4, p. 783‑801, févr. 2006.
[114] R. Barbalat, L. Lau, R. M. Locksley, et G. M. Barton, « Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands », *Nat. Immunol.*, vol. 10, n° 11, p. 1200‑1207, nov. 2009.
[115] Z. Szatmary, « Molecular biology of toll-like receptors », *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 31, n° 4, p. 357‑366, déc. 2012.
[116] R. Shiraki, N. Inoue, S. Kawasaki, A. Takei, M. Kadotani, Y. Ohnishi, J. Ejiri, S. Kobayashi, K.-I. Hirata, S. Kawashima, et M. Yokoyama, « Expression of Toll-like receptors on human platelets », *Thromb. Res*, vol. 113, n° 6, p. 379‑385, 2004.
[117] F. Cognasse, H. Hamzeh, P. Chavarin, S. Acquart, C. Genin, et O. Garraud, « Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets », *Immunol. Cell Biol*, vol. 83, n° 2, p. 196‑198, avr. 2005.
[118] L. M. Beaulieu et J. E. Freedman, « The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes », *Thromb. Res.*, vol. 125, n° 3, p. 205‑209, mars 2010.

[119] M. St Paul, S. Paolucci, N. Barjesteh, R. D. Wood, K. A. Schat, et S. Sharif, « Characterization of chicken thrombocyte responses to Toll-like receptor ligands », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 8, p. e43381, 2012.
[120] J. N. Thon, C. G. Peters, K. R. Machlus, R. Aslam, J. Rowley, H. Macleod, M. T. Devine, T. A. Fuchs, A. S. Weyrich, J. W. Semple, R. Flaumenhaft, et J. E. Italiano Jr, « T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling », *J. Cell Biol.*, vol. 198, n° 4, p. 561‑574, août 2012.
[121] G. Andonegui, S. M. Kerfoot, K. McNagny, K. V. J. Ebbert, K. D. Patel, et P. Kubes, « Platelets express functional Toll-like receptor-4 », *Blood*, vol. 106, n° 7, p. 2417‑2423, oct. 2005.
[122] M. Jayachandran, G. J. Brunn, K. Karnicki, R. S. Miller, W. G. Owen, et V. M. Miller, « In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk », *J. Appl. Physiol.*, vol. 102, n° 1, p. 429‑433, janv. 2007.
[123] J. R. Boiko et L. Borghesi, « Hematopoiesis sculpted by pathogens: Toll-like receptors and inflammatory mediators directly activate stem cells », *Cytokine*, vol. 57, n° 1, p. 1‑8, janv. 2012.
[124] C. C. Clawson et J. G. White, « Platelet interaction with bacteria. V. Ultrastructure of congenital afibrinogenemic platelets », *Am. J. Pathol.*, vol. 98, n° 1, p. 197‑211, janv. 1980.
[125] C. C. Clawson, « Platelet interaction with bacteria. 3. Ultrastructure », *Am. J. Pathol.*, vol. 70, n° 3, p. 449‑471, mars 1973.
[126] X. Li, T. Iwai, H. Nakamura, Y. Inoue, Y. Chen, M. Umeda, et H. Suzuki, « An ultrastructural study of Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation », *Thromb. Res.*, vol. 122, n° 6, p. 810‑819, 2008.
[127] A. J. Antczak, J. A. Vieth, N. Singh, et R. G. Worth, « Internalization of IgG-coated targets results in activation and secretion of soluble CD40 ligand and RANTES by human platelets », *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 18, n° 2, p. 210‑216, févr. 2011.
[128] J. G. White, « Why human platelets fail to kill bacteria », *Platelets*, vol. 17, n° 3, p. 191‑200, mai 2006.
[129] A. Y. Abdulrehman, E. C. G. Jackson, et A. McNicol, « Platelet activation by Streptococcus sanguinis is accompanied by MAP kinase phosphorylation », *Platelets*, vol. 24, n° 1, p. 6‑14, 2013.
[130] L. O'Brien, S. W. Kerrigan, G. Kaw, M. Hogan, J. Penadés, D. Litt, D. J. Fitzgerald, T. J. Foster, et D. Cox, « Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A », *Mol. Microbiol.*, vol. 44, n° 4, p. 1033‑1044, mai 2002.
[131] P. M. Sullam, W. C. Hyun, J. Szöllösi, J. f Dong, W. M. Foss, et J. A. López, « Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor FcgammaRIIA on the platelet plasma membrane », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 9, p. 5331‑5336, févr. 1998.
[132] B. Sun, J. Li, et J. i Kambayashi, « Interaction between GPIbalpha and FcgammaIIA receptor in human platelets », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 266, n° 1, p. 24‑27, déc. 1999.
[133] B. Boylan, C. Gao, V. Rathore, J. C. Gill, D. K. Newman, et P. J. Newman, « Identification of FcgammaRIIa as the ITAM-bearing receptor mediating alphaIIbbeta3 outside-in integrin signaling in human platelets », *Blood*, vol. 112, n° 7, p. 2780‑2786, oct. 2008.
[134] S. W. Kerrigan et D. Cox, « Platelet-bacterial interactions », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, n° 4, p. 513‑523, févr. 2010.
[135] K. P. Fong, C. Barry, A. N. Tran, E. A. Traxler, K. M. Wannemacher, H.-Y. Tang, K. D. Speicher, I. A. Blair, D. W. Speicher, T. Grosser, et L. F. Brass, « Deciphering the human platelet sheddome », *Blood*, vol. 117, n° 1, p. e15‑26, janv. 2011.
[136] A. McNicol, A. Agpalza, E. C. G. Jackson, H. Hamzeh-Cognasse, O. Garraud, et F. Cognasse, « Streptococcus sanguinis-induced cytokine release from platelets », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° 10, p. 2038‑2049, oct. 2011.

[137] H. D. Haaland et H. Holmsen, « Potentiation by adrenaline of agonist-induced responses in normal human platelets in vitro », *Platelets*, vol. 22, n° 5, p. 328‑337, 2011.
[138] K. Krauel, C. Weber, S. Brandt, U. Zähringer, U. Mamat, A. Greinacher, et S. Hammerschmidt, « Platelet factor 4 binding to lipid A of Gram-negative bacteria exposes PF4/heparin-like epitopes », *Blood*, vol. 120, n° 16, p. 3345‑3352, oct. 2012.
[139] O. Garraud, P. Damien, J. Berthet, C.-A. Arthaud, H. Hamzeh-Cognasse, et F. Cognasse, « Plaquettes sanguines, réponses aux signaux de danger infectieux et inflammation : vers un nouveau paradigme ? », *Transfusion Clinique et Biologique*, vol. 18, n° 2, p. 165‑173, avr. 2011.
[140] A. Assinger, M. Laky, S. Badrnya, A. Esfandeyari, et I. Volf, « Periodontopathogens induce expression of CD40L on human platelets via TLR2 and TLR4 », *Thromb. Res.*, vol. 130, n° 3, p. e73‑78, sept. 2012.
[141] F. Cognasse, S. Lafarge, P. Chavarin, S. Acquart, et O. Garraud, « Lipopolysaccharide induces sCD40L release through human platelets TLR4, but not TLR2 and TLR9 », *Intensive Care Medicine*, vol. 33, n° 2, p. 382‑384, déc. 2006.
[142] B. F. Kraemer, R. A. Campbell, H. Schwertz, M. J. Cody, Z. Franks, N. D. Tolley, W. H. A. Kahr, S. Lindemann, P. Seizer, C. C. Yost, G. A. Zimmerman, et A. S. Weyrich, « Novel Anti-bacterial Activities of β-defensin 1 in Human Platelets: Suppression of Pathogen Growth and Signaling of Neutrophil Extracellular Trap Formation », *PLoS Pathog.*, vol. 7, n° 11, p. e1002355, nov. 2011.
[143] L. Drago, M. Bortolin, C. Vassena, S. Taschieri, et M. Del Fabbro, « Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity », *BMC Microbiol.*, vol. 13, p. 47, 2013.
[144] M. R. Yeaman, « Platelets in defense against bacterial pathogens », *Cell Mol Life Sci*, vol. 67, n° 4, p. 525‑544, févr. 2010.
[145] D. A. Trier, K. D. Gank, D. Kupferwasser, N. Y. Yount, W. J. French, A. D. Michelson, L. I. Kupferwasser, Y. Q. Xiong, A. S. Bayer, et M. R. Yeaman, « Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X1 and P2Y12 receptor-induced activation and kinocidin release », *Infect. Immun.*, vol. 76, n° 12, p. 5706‑5713, déc. 2008.
[146] D. Yang, Q. Chen, D. M. Hoover, P. Staley, K. D. Tucker, J. Lubkowski, et J. J. Oppenheim, « Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 74, n° 3, p. 448‑455, sept. 2003.
[147] Y.-Q. Tang, M. R. Yeaman, et M. E. Selsted, « Antimicrobial Peptides from Human Platelets », *Infect Immun*, vol. 70, n° 12, p. 6524‑6533, déc. 2002.
[148] M. R. Yeaman, N. Y. Yount, A. J. Waring, K. D. Gank, D. Kupferwasser, R. Wiese, A. S. Bayer, et W. H. Welch, « Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1768, n° 3, p. 609‑619, mars 2007.
[149] W. M. Shafer, *Antimicrobial Peptides and Human Disease*. Springer, 2006.
[150] M. Tohidnezhad, D. Varoga, R. Podschun, C. J. Wruck, A. Seekamp, L.-O. Brandenburg, T. Pufe, et S. Lippross, « Thrombocytes are effectors of the innate immune system releasing human beta defensin-3 », *Injury*, vol. 42, n° 7, p. 682‑686, juill. 2011.
[151] M. Tohidnezhad, D. Varoga, C. J. Wruck, R. Podschun, B. H. Sachweh, J. Bornemann, M. Bovi, T. T. Sönmez, A. Slowik, A. Houben, A. Seekamp, L. O. Brandenburg, T. Pufe, et S. Lippross, « Platelets display potent antimicrobial activity and release human beta-defensin 2 », *Platelets*, sept. 2011.
[152] J. R. Ward, L. Bingle, H. M. Judge, S. B. Brown, R. F. Storey, M. K. B. Whyte, S. K. Dower, D. J. Buttle, et I. Sabroe, « Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor », *Thromb. Haemost*, vol. 94, n° 4, p. 831‑838, oct. 2005.
[153] F. A. Bozza, A. M. Shah, A. S. Weyrich, et G. A. Zimmerman, « Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, vol. 40, n° 2, p. 123‑134, févr. 2009.

[154] T. Tremblay, E. Aubin, R. Lemieux, et R. Bazin, « Picogram doses of lipopolysaccharide exacerbate antibody-mediated thrombocytopenia and reduce the therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin in mice », *Br. J. Haematol.*, vol. 139, n° 2, p. 297‑302, oct. 2007.

[155] J. W. Semple, R. Aslam, M. Kim, E. R. Speck, et J. Freedman, « Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets », *Blood*, vol. 109, n° 11, p. 4803‑4805, juin 2007.

[156] F. Cognasse, H. Hamzeh-Cognasse, et O. Garraud, « [Platelets "Toll-like receptor" engagement stimulates the release of immunomodulating molecules] », *Transfus Clin Biol*, vol. 15, n° 4, p. 139‑147, sept. 2008.

[157] R. Aslam, E. R. Speck, M. Kim, A. R. Crow, K. W. A. Bang, F. P. Nestel, H. Ni, A. H. Lazarus, J. Freedman, et J. W. Semple, « Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo », *Blood*, vol. 107, n° 2, p. 637‑641, janv. 2006.

[158] B. S. Park, D. H. Song, H. M. Kim, B.-S. Choi, H. Lee, et J.-O. Lee, « The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex », *Nature*, vol. 458, n° 7242, p. 1191‑1195, avr. 2009.

[159] O. Garraud et F. Cognasse, « Platelet Toll-like receptor expression: the link between "danger" ligands and inflammation », *Inflamm Allergy Drug Targets*, vol. 9, n° 5, p. 322‑333, déc. 2010.

[160] A. Ståhl, M. Svensson, M. Mörgelin, C. Svanborg, P. I. Tarr, J. C. Mooney, S. L. Watkins, R. Johnson, et D. Karpman, « Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic Escherichia coli binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome », *Blood*, vol. 108, n° 1, p. 167‑176, juill. 2006.

[161] G. Zhang, J. Han, E. J. Welch, R. D. Ye, T. A. Voyno-Yasenetskaya, A. B. Malik, X. Du, et Z. Li, « Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway », *J. Immunol.*, vol. 182, n° 12, p. 7997‑8004, juin 2009.

[162] F. Cognasse, H. Hamzeh-Cognasse, S. Lafarge, O. Delezay, B. Pozzetto, A. McNicol, et O. Garraud, « Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets », *British Journal of Haematology*, vol. 141, n° 1, p. 84‑91, avr. 2008.

[163] J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, C.-A. Arthaud, M.-A. Eyraud, F. Zéni, B. Pozzetto, A. McNicol, O. Garraud, et F. Cognasse, « Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion », *Clin. Immunol.*, vol. 145, n° 3, p. 189‑200, déc. 2012.

[164] M. T. Rondina, H. Schwertz, E. S. Harris, B. F. Kraemer, R. A. Campbell, N. Mackman, C. K. Grissom, A. S. Weyrich, et G. A. Zimmerman, « The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human platelets », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° 4, p. 748‑758, avr. 2011.

[165] P. Blair, S. Rex, O. Vitseva, L. Beaulieu, K. Tanriverdi, S. Chakrabarti, C. Hayashi, C. A. Genco, M. Iafrati, et J. E. Freedman, « Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase », *Circ. Res.*, vol. 104, n° 3, p. 346‑354, févr. 2009.

[166] H. Kälvegren, C. Skoglund, C. Helldahl, M. Lerm, M. Grenegård, et T. Bengtsson, « Toll-like receptor 2 stimulation of platelets is mediated by purinergic P2X1-dependent Ca2+ mobilisation, cyclooxygenase and purinergic P2Y1 and P2Y12 receptor activation », *Thromb. Haemost.*, vol. 103, n° 2, p. 398‑407, févr. 2010.

[167] S. Rex, L. M. Beaulieu, D. H. Perlman, O. Vitseva, P. S. Blair, M. E. McComb, C. E. Costello, et J. E. Freedman, « Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release », *Thromb. Haemost*, vol. 102, n° 1, p. 97‑110, juill. 2009.

[168] K. Hoebe, P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zähringer, et B. Beutler, « CD36 is a sensor of diacylglycerides », *Nature*, vol. 433, n° 7025, p. 523‑527, févr. 2005.

[169] A. Assinger, M. Laky, G. Schabbauer, A. M. Hirschl, E. Buchberger, B. R. Binder, et I. Volf, « Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2 », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° 4, p. 799‑809, avr. 2011.

[170] C. H. Y. Wong, C. N. Jenne, B. Petri, N. L. Chrobok, et P. Kubes, « Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance », *Nat. Immunol.*, vol. 14, n° 8, p. 785‑792, août 2013.

[171] F. Semeraro, C. T. Ammollo, J. H. Morrissey, G. L. Dale, P. Friese, N. L. Esmon, et C. T. Esmon, « Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4 », *Blood*, vol. 118, n° 7, p. 1952‑1961, août 2011.

[172] T. Kawai et S. Akira, « Innate immune recognition of viral infection », *Nat. Immunol.*, vol. 7, n° 2, p. 131‑137, févr. 2006.

[173] S. Panigrahi, Y. Ma, L. Hong, D. Gao, X. Z. West, R. G. Salomon, T. V. Byzova, et E. A. Podrez, « Engagement of Platelet Toll-Like Receptor 9 by Novel Endogenous Ligands Promotes Platelet Hyperreactivity and Thrombosis », *Circulation Research*, vol. 112, n° 1, p. 103‑112, avr. 2013.

[174] S. Akira, « TLR signaling », *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 311, p. 1‑16, 2006.

[175] Z. Li, G. Zhang, J. A. Marjanovic, C. Ruan, et X. Du, « A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 41, p. 42469‑42475, oct. 2004.

[176] J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, et F. Cognasse, « Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways », *Br. J. Haematol.*, vol. 151, n° 1, p. 89‑92, oct. 2010.

[177] F. Morello, A. Perino, et E. Hirsch, « Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system », *Cardiovasc. Res.*, vol. 82, n° 2, p. 261‑271, mai 2009.

[178] T. Ha, Y. Hu, L. Liu, C. Lu, J. R. McMullen, J. Kelley, R. L. Kao, D. L. Williams, X. Gao, et C. Li, « TLR2 ligands induce cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism », *Cardiovasc. Res.*, vol. 87, n° 4, p. 694‑703, sept. 2010.

[179] S. L. Spinelli, A. E. Casey, S. J. Pollock, J. M. Gertz, D. H. McMillan, S. D. Narasipura, N. A. Mody, M. R. King, S. B. Maggirwar, C. W. Francis, M. B. Taubman, N. Blumberg, et R. P. Phipps, « Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, vol. 30, n° 3, p. 591‑598, mars 2010.

[180] V. M. Miller, M. Jayachandran, K. Hashimoto, J. A. Heit, et W. G. Owen, « Estrogen, inflammation, and platelet phenotype », *Gend Med*, vol. 5 Suppl A, p. S91‑S102, 2008.

[181] E. Malaver, M. A. Romaniuk, L. P. D'Atri, R. G. Pozner, S. Negrotto, R. Benzadón, et M. Schattner, « NF-kappaB inhibitors impair platelet activation responses », *J. Thromb. Haemost*, vol. 7, n° 8, p. 1333‑1343, août 2009.

[182] S. Ghosh et M. S. Hayden, « New regulators of NF-κB in inflammation », *Nat Rev Immunol*, vol. 8, n° 11, p. 837‑848, nov. 2008.

[183] S. Schubert, H. Schwertz, A. S. Weyrich, Z. G. Franks, S. Lindemann, M. Otto, H. Behr, H. Loppnow, A. Schlitt, M. Russ, P. Presek, K. Werdan, et M. Buerke, « Staphylococcus aureus α-Toxin Triggers the Synthesis of B-Cell Lymphoma 3 by Human Platelets », *Toxins (Basel)*, vol. 3, n° 2, p. 120‑133, févr. 2011.

[184] A. S. Weyrich, M. M. Denis, H. Schwertz, N. D. Tolley, J. Foulks, E. Spencer, L. W. Kraiss, K. H. Albertine, T. M. McIntyre, et G. A. Zimmerman, « mTOR-dependent synthesis of Bcl-3 controls the retraction of fibrin clots by activated human platelets », *Blood*, vol. 109, n° 5, p. 1975‑1983, mars 2007.

[185] S. L. Spinelli, S. B. Maggirwar, N. Blumberg, et R. P. Phipps, « Nuclear emancipation: a platelet tour de force », *Sci Signal*, vol. 3, n° 144, p. pe37, 2010.

[186] S. Gambaryan, A. Kobsar, N. Rukoyatkina, S. Herterich, J. Geiger, A. Smolenski, S. M. Lohmann, et U. Walter, « Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 24, p. 18352‑18363, juin 2010.

[187] Fowler VG, Miro JM, Hoen B, et et al, « Staphylococcus aureus endocarditis: A consequence of medical progress », *JAMA*, vol. 293, n° 24, p. 3012‑3021, juin 2005.

[188] R. M. Klevens, M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, S. K. Fridkin, et Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators, « Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States », *JAMA*, vol. 298, n° 15, p. 1763‑1771, oct. 2007.

[189] J. R. Fitzgerald, T. J. Foster, et D. Cox, « The interaction of bacterial pathogens with platelets », *Nat Rev Micro*, vol. 4, n° 6, p. 445‑457, juin 2006.

[190] P. M. Sullam, A. S. Bayer, W. M. Foss, et A. L. Cheung, « Diminished platelet binding in vitro by Staphylococcus aureus is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis », *Infect. Immun.*, vol. 64, n° 12, p. 4915‑4921, déc. 1996.

[191] A. S. Bayer, P. M. Sullam, M. Ramos, C. Li, A. L. Cheung, et M. R. Yeaman, « Staphylococcus aureus induces platelet aggregation via a fibrinogen-dependent mechanism which is independent of principal platelet glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen-binding domains », *Infect. Immun.*, vol. 63, n° 9, p. 3634‑3641, sept. 1995.

[192] J. R. Fitzgerald, A. Loughman, F. Keane, M. Brennan, M. Knobel, J. Higgins, L. Visai, P. Speziale, D. Cox, et T. J. Foster, « Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcgammaRIIa receptor », *Mol. Microbiol.*, vol. 59, n° 1, p. 212‑230, janv. 2006.

[193] M. Zapotoczna, Z. Jevnikar, H. Miajlovic, J. Kos, et T. J. Foster, « Iron-regulated surface determinant B (IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells: Interactions of *S. aureus* IsdB with host cells », *Cellular Microbiology*, vol. 15, n° 6, p. 1026‑1041, juin 2013.

[194] S. Heptinstall, « Platelet Activation by an Extracellular Adherence Protein From Staphylococcus aureus Acting via Modulation of Sulfhydryl Groups on Platelets », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 32, n° 8, p. 1751‑1752, janv. 2012.

[195] T. Parimon, Z. Li, D. D. Bolz, E. R. McIndoo, C. R. Bayer, D. L. Stevens, et A. E. Bryant, « Staphylococcus aureus α-Hemolysin Promotes Platelet-Neutrophil Aggregate Formation », *J. Infect. Dis.*, vol. 208, n° 5, p. 761‑770, sept. 2013.

[196] T. Vanassche, A. Kauskot, J. Verhaegen, W. E. Peetermans, J. van Ryn, O. Schneewind, M. F. Hoylaerts, et P. Verhamme, « Fibrin formation by staphylothrombin facilitates Staphylococcus aureus-induced platelet aggregation », *Thromb. Haemost.*, vol. 107, n° 6, p. 1107‑1121, juin 2012.

[197] U. Tran, T. Boyle, J. W. Shupp, R. Hammamieh, et M. Jett, « Staphylococcal enterotoxin B initiates protein kinase C translocation and eicosanoid metabolism while inhibiting thrombin-induced aggregation in human platelets », *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 288, n° 1‑2, p. 171‑178, août 2006.

[198] A. K. Waller, T. Sage, C. Kumar, T. Carr, J. M. Gibbins, et S. R. Clarke, « Staphylococcus aureus lipoteichoic acid inhibits platelet activation and thrombus formation via the Paf receptor », *J Infect Dis.*, p. jit398, août 2013.

[199] O. Shannon, A. Uekötter, et J.-I. Flock, « Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from Staphylococcus aureus as an antiplatelet agent in vivo », *Thromb. Haemost.*, vol. 93, n° 5, p. 927‑931, mai 2005.

[200] A. Suehiro, Y. Oura, M. Ueda, et E. Kakishita, « Inhibitory effect of staphylokinase on platelet aggregation », *Thromb. Haemost.*, vol. 70, n° 5, p. 834‑837, nov. 1993.

[201] C.-Z. Liu, T.-F. Huang, P.-J. Tsai, P.-J. Tsai, L.-Y. Chang, et M.-C. Chang, « A segment of Staphylococcus aureus clumping factor A with fibrinogen-binding activity (ClfA221-550) inhibits platelet-plug formation in mice », *Thromb. Res.*, vol. 121, n° 2, p. 183‑191, 2007.

[202] A. Ferkau, H.-J. Gillmann, R. Mischke, S. Calmer, S. Ecklebe, M. Abid, J.-W. Minde, F. Echtermeyer, et G. Theilmeier, « Infection-associated platelet dysfunction of canine platelets detected in a flow chamber model », *BMC Vet. Res.*, vol. 9, p. 112, 2013.

[203] M. M. Levy, M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J.-L. Vincent, G. Ramsay, et International Sepsis Definitions Conference, « 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference », *Intensive Care Med*, vol. 29, n° 4, p. 530‑538, avr. 2003.

[204] A. Lever et I. Mackenzie, « Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis », *BMJ*, vol. 335, n° 7625, p. 879‑883, oct. 2007.

[205] J.-P. Quenot, C. Binquet, F. Kara, O. Martinet, F. Ganster, J.-C. Navellou, V. Castelain, D. Barraud, J. Cousson, G. Louis, P. Perez, K. Kuteifan, A. Noirot, J. Badie, C. Mezher, H. Lessire, A. Pavon, et E. Study Group, « The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study », *Crit Care*, vol. 17, n° 2, p. R65, avr. 2013.

[206] K. N. Iskander, M. F. Osuchowski, D. J. Stearns-Kurosawa, S. Kurosawa, D. Stepien, C. Valentine, et D. G. Remick, « Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding », *Physiol. Rev.*, vol. 93, n° 3, p. 1247‑1288, juill. 2013.

[207] J.-L. Vincent, S. M. Opal, J. C. Marshall, et K. J. Tracey, « Sepsis definitions: time for change », *Lancet*, vol. 381, n° 9868, p. 774‑775, mars 2013.

[208] J. Cohen, « The immunopathogenesis of sepsis », *Nature*, vol. 420, n° 6917, p. 885‑891, déc. 2002.

[209] C. Harrison, « Sepsis: calming the cytokine storm », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 9, n° 5, p. 360‑361, mai 2010.

[210] U. Andersson et K. J. Tracey, « HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, p. 139‑162, 2011.

[211] M. Leone, F. Garcin, W. Chaabane, B. Boutière-Albanèse, J. Albanèse, F. Dignat-Georges, et C. Martin, « [Activation of adhesion molecules in patients with septic shock] », *Ann Fr Anesth Reanim*, vol. 22, n° 8, p. 721‑729, oct. 2003.

[212] M. Levi, « The coagulant response in sepsis and inflammation », *Hamostaseologie*, vol. 30, n° 1, p. 10‑12, 14‑16, janv. 2010.

[213] K. Tyml, « Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis », *Microcirculation*, vol. 18, n° 2, p. 152‑162, févr. 2011.

[214] K. Okajima, « Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants », *Immunol. Rev.*, vol. 184, p. 258‑274, déc. 2001.

[215] D. Secor, F. Li, C. G. Ellis, M. D. Sharpe, P. L. Gross, J. X. Wilson, et K. Tyml, « Impaired microvascular perfusion in sepsis requires activated coagulation and P-selectin-mediated platelet adhesion in capillaries », *Intensive Care Med*, vol. 36, n° 11, p. 1928‑1934, nov. 2010.

[216] M. Poggi, O. Paulmyer-Lacroix, M. Verdier, F. Peiretti, D. Bastelica, J. Boucraut, H. R. Lijnen, I. Juhan-Vague, et M. C. Alessi, « Chronic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) overexpression dampens CD25+ lymphocyte recruitment after lipopolysaccharide endotoxemia in mouse lung », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 5, n° 12, p. 2467‑2475, déc. 2007.

[217] D. P. Inwald, S. N. Faust, P. Lister, M. J. Peters, M. Levin, R. Heyderman, et N. J. Klein, « Platelet and soluble CD40L in meningococcal sepsis », *Intensive Care Med*, vol. 32, n° 9, p. 1432‑1437, sept. 2006.

[218] M. Chew, M. Rahman, L. Ihrman, A. Erson, S. Zhang, et H. Thorlacius, « Soluble CD40L (CD154) is increased in patients with shock », *Inflamm. Res.*, vol. 59, n° 11, p. 979‑982, nov. 2010.

[219] M. Rahman, S. Zhang, M. Chew, I. Syk, B. Jeppsson, et H. Thorlacius, « Platelet shedding of CD40L is regulated by matrix metalloproteinase-9 in abdominal sepsis », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 11, n° 7, p. 1385‑1398, juill. 2013.

[220] L. Lorente, M. M. Martin, N. Varo, J. M. Borreguero-Leon, J. Sole-Violan, J. Blanquer, L. Labarta, C. Diaz, A. Jimenez, E. Pastor, F. Belmonte, J. Orbe, J. A. Rodriguez, E. Gomez-Melini, J. M. Ferrer-Aguero, J. Ferreres, M. C. LLiminana, et J. A. Paramo, « Association between serum soluble CD40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis », *Crit Care*, vol. 15, n° 2, p. R97, 2011.

[221] M. Rahman, S. Zhang, M. Chew, A. Ersson, B. Jeppsson, et H. Thorlacius, « Platelet-derived CD40L (CD154) mediates neutrophil upregulation of Mac-1 and recruitment in septic lung injury », *Ann. Surg.*, vol. 250, n° 5, p. 783‑790, nov. 2009.

[222] M. Rahman, J. Roller, S. Zhang, I. Syk, M. D. Menger, B. Jeppsson, et H. Thorlacius, « Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis », *Inflamm. Res.*, vol. 61, n° 6, p. 571‑579, juin 2012.

[223] C. van Kooten et J. Banchereau, « CD40-CD40 ligand », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 67, n° 1, p. 2‑17, janv. 2000.

[224] M. Asaduzzaman, S. Lavasani, M. Rahman, S. Zhang, O. O. Braun, B. Jeppsson, et H. Thorlacius, « Platelets support pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis », *Crit. Care Med.*, vol. 37, n° 4, p. 1389‑1396, avr. 2009.

[225] C. C. Yost, A. S. Weyrich, et G. A. Zimmerman, « The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses », *Biochimie*, vol. 92, n° 6, p. 692‑697, juin 2010.

[226] K. Inaba, B. C. Branco, P. Rhee, L. H. Blackbourne, J. B. Holcomb, P. C. Spinella, I. Shulman, J. Nelson, et D. Demetriades, « Impact of the duration of platelet storage in critically ill trauma patients », *J Trauma*, vol. 71, n° 6, p. 1766‑1773; discussion 1773‑1774, déc. 2011.

[227] F. Cognasse, J.-C. Osselaer, J. M. Payrat, P. Chavarin, L. Corash, et O. Garraud, « Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment », *Transfusion*, vol. 48, n° 5, p. 809‑813, mai 2008.

[228] H. R. Wong, N. Z. Cvijanovich, M. Hall, G. L. Allen, N. J. Thomas, R. J. Freishtat, N. Anas, K. Meyer, P. A. Checchia, R. Lin, M. T. Bigham, A. Sen, J. Nowak, M. Quasney, J. W. Henricksen, A. Chopra, S. Banschbach, E. Beckman, K. Harmon, P. Lahni, et T. P. Shanley, « Interleukin-27 is a novel candidate diagnostic biomarker for bacterial infection in critically ill children », *Crit Care*, vol. 16, n° 5, p. R213, oct. 2012.

[229] H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, K. A. Nguyen, F. Zeni, B. Pozzetto, F. Cognasse, et O. Garraud, « Contribution of activated platelets to plasma IL-27 levels », *Crit Care*, vol. 17, n° 1, p. 411, févr. 2013.

[230] S. Nomura, S. Fujita, T. Nakanishi, T. Yokoi, K. Shimamoto, R. Miyamoto, et T. Ito, « Platelet-derived microparticles cause CD154-dependent activation of dendritic cells », *Platelets*, vol. 23, n° 1, p. 81‑82, 2012.

[231] M. Gawaz, S. Fateh-Moghadam, G. Pilz, H. J. Gurland, et K. Werdan, « Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 25, n° 11, p. 843‑851, nov. 1995.

[232] D. Johansson, O. Shannon, et M. Rasmussen, « Platelet and neutrophil responses to Gram positive pathogens in patients with bacteremic infection », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 11, p. e26928, 2011.

[233] F. Kahn, S. Hurley, et O. Shannon, « Platelets promote bacterial dissemination in a mouse model of streptococcal sepsis », *Microbes and Infection*.

[234] D. M. Vandijck, S. I. Blot, J. J. De Waele, E. A. Hoste, K. H. Vandewoude, et J. M. Decruyenaere, « Thrombocytopenia and outcome in critically ill patients with bloodstream infection », *Heart Lung*, vol. 39, n° 1, p. 21‑26, févr. 2010.

[235] A. Gafter-Gvili, N. Mansur, A. Bivas, N. Zemer-Wassercug, J. Bishara, L. Leibovici, et M. Paul, « Thrombocytopenia in Staphylococcus aureus bacteremia: risk factors and prognostic importance », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 86, n° 5, p. 389‑396, mai 2011.

[236] D. Moreau, J.-F. Timsit, A. Vesin, M. Garrouste-Orgeas, A. de Lassence, J.-R. Zahar, C. Adrie, F. Vincent, Y. Cohen, B. Schlemmer, et E. Azoulay, « Platelet count decline: an early prognostic marker in critically ill patients with prolonged ICU stays », *Chest*, vol. 131, n° 6, p. 1735‑1741, juin 2007.

[237] I. C. Dormehl, J. G. Kilian, M. Maree, et L. Jacobs, « Investigation by scintigraphic methods of platelet kinetics under normal and septic shock conditions in the experimental baboon model », *Am J Physiol Imaging*, vol. 5, n° 2, p. 75‑79, 1990.

[238] S. E. McKenzie, S. M. Taylor, P. Malladi, H. Yuhan, D. L. Cassel, P. Chien, E. Schwartz, A. D. Schreiber, S. Surrey, et M. P. Reilly, « The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model », *J. Immunol.*, vol. 162, n° 7, p. 4311‑4318, avr. 1999.

[239] B. François, F. Trimoreau, P. Vignon, P. Fixe, V. Praloran, et H. Gastinne, « Thrombocytopenia in the sepsis syndrome: role of hemophagocytosis and macrophage colony-stimulating factor », *Am. J. Med.*, vol. 103, n° 2, p. 114‑120, août 1997.

[240] S. G. Zakynthinos, S. Papanikolaou, T. Theodoridis, E. G. Zakynthinos, V. Christopoulou-Kokkinou, G. Katsaris, et A. C. Mavrommatis, « Sepsis severity is the major determinant of circulating thrombopoietin levels in septic patients », *Crit. Care Med.*, vol. 32, n° 4, p. 1004‑1010, avr. 2004.

[241] « [Characterisation of enucleated cells apoptosis: human platelets and erythrocytes] », *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*, vol. 99, n° 1, p. 92‑110, janv. 2013.

[242] S. Elmore, « Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death », *Toxicol Pathol*, vol. 35, n° 4, p. 495‑516, janv. 2007.

[243] J. Li, Y. Xia, A. M. Bertino, J. P. Coburn, et D. J. Kuter, « The mechanism of apoptosis in human platelets during storage », *Transfusion*, vol. 40, n° 11, p. 1320‑1329, nov. 2000.

[244] V. Leytin, D. J. Allen, S. Mykhaylov, E. Lyubimov, et J. Freedman, « Thrombin-triggered platelet apoptosis », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 4, n° 12, p. 2656‑2663, déc. 2006.

[245] M. J. White, S. M. Schoenwaelder, E. C. Josefsson, K. E. Jarman, K. J. Henley, C. James, M. A. Debrincat, S. P. Jackson, D. C. S. Huang, et B. T. Kile, « Caspase-9 mediates the apoptotic death of megakaryocytes and platelets, but is dispensable for their generation and function », *Blood*, vol. 119, n° 18, p. 4283‑4290, mai 2012.

[246] B. Qi et J. M. Hardwick, « A Bcl-xL Timer Sets Platelet Life Span », *Cell*, vol. 128, n° 6, p. 1035‑1036, mars 2007.

[247] B. F. Kraemer, R. A. Campbell, H. Schwertz, Z. G. Franks, A. Vieira de Abreu, K. Grundler, B. T. Kile, B. K. Dhakal, M. T. Rondina, W. H. A. Kahr, M. A. Mulvey, R. C. Blaylock, G. A. Zimmerman, et A. S. Weyrich, « Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein, by human platelets », *Blood*, vol. 120, n° 25, p. 5014‑5020, déc. 2012.

[248] K. Yamakawa, H. Ogura, T. Koh, Y. Ogawa, N. Matsumoto, Y. Kuwagata, et T. Shimazu, « Platelet mitochondrial membrane potential correlates with severity in patients with systemic inflammatory response syndrome », *J Trauma Acute Care Surg*, vol. 74, n° 2, p. 411‑417; discussion 418, févr. 2013.

[249] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, et A. Zychlinsky, « Neutrophil extracellular traps kill bacteria », *Science*, vol. 303, n° 5663, p. 1532‑1535, mars 2004.

[250] A. C. Ma et P. Kubes, « Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis », *J. Thromb. Haemost*, vol. 6, n° 3, p. 415‑420, mars 2008.

[251] S. R. Clark, A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Y. Green, et P. Kubes, « Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood », *Nat. Med.*, vol. 13, n° 4, p. 463‑469, avr. 2007.

[252] M. Köckritz-Blickwede et V. Nizet, « Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps », *Journal of Molecular Medicine*, vol. 87, n° 8, p. 775‑783, mai 2009.

[253] M. Phillipson et P. Kubes, « The neutrophil in vascular inflammation », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 11, p. 1381‑1390, 2011.
[254] S. Yousefi, C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, et H. U. Simon, « Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps », *Cell Death Differ.*, vol. 16, n° 11, p. 1438‑1444, nov. 2009.
[255] J. Xu, X. Zhang, R. Pelayo, M. Monestier, C. T. Ammollo, F. Semeraro, F. B. Taylor, N. L. Esmon, F. Lupu, et C. T. Esmon, « Extracellular histones are major mediators of death in sepsis », *Nat. Med.*, vol. 15, n° 11, p. 1318‑1321, nov. 2009.
[256] Z. G. Franks, R. A. Campbell, A. S. Weyrich, et M. T. Rondina, « Platelet-leukocyte interactions link inflammatory and thromboembolic events in ischemic stroke », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1207, p. 11‑17, oct. 2010.
[257] M. Gawaz, H. Langer, et A. E. May, « Platelets in inflammation and atherogenesis », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 12, p. 3378‑3384, déc. 2005.
[258] A. Tabuchi et W. M. Kuebler, « Endothelium-platelet interactions in inflammatory lung disease », *Vascul. Pharmacol.*, vol. 49, n° 4‑6, p. 141‑150, déc. 2008.
[259] M. Gawaz, H. Langer, et A. E. May, « Platelets in inflammation and atherogenesis », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 12, p. 3378‑3384, déc. 2005.
[260] T. D. Warner, « Influence of endothelial mediators on the vascular smooth muscle and circulating platelets and blood cells », *Int Angiol*, vol. 15, n° 2, p. 93‑99, juin 1996.
[261] D. B. Cines, E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle, B. S. Schwartz, E. S. Barnathan, K. R. McCrae, B. A. Hug, A. M. Schmidt, et D. M. Stern, « Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders », *Blood*, vol. 91, n° 10, p. 3527‑3561, mai 1998.
[262] J. Chen et J. A. López, « Interactions of Platelets with Subendothelium and Endothelium », *Microcirculation*, vol. 12, n° 3, p. 235–246, 2005.
[263] L. Totani et V. Evangelista, « Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, n° 12, p. 2357‑2361, déc. 2010.
[264] D. D. Wagner, « The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin », *Thromb. Haemost.*, vol. 70, n° 1, p. 105‑110, juill. 1993.
[265] T. Katayama, Y. Ikeda, M. Handa, T. Tamatani, S. Sakamoto, M. Ito, Y. Ishimura, et M. Suematsu, « Immunoneutralization of glycoprotein Ibalpha attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo », *Circ. Res.*, vol. 86, n° 10, p. 1031‑1037, mai 2000.
[266] P. S. Frenette, C. V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J. H. Hartwig, D. Vestweber, et D. D. Wagner, « P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo », *J. Exp. Med.*, vol. 191, n° 8, p. 1413‑1422, avr. 2000.
[267] M. Sperandio, M. L. Smith, S. B. Forlow, T. S. Olson, L. Xia, R. P. McEver, et K. Ley, « P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules », *J. Exp. Med.*, vol. 197, n° 10, p. 1355‑1363, mai 2003.
[268] T. Bombeli, B. R. Schwartz, et J. M. Harlan, « Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha », *J. Exp. Med.*, vol. 187, n° 3, p. 329‑339, févr. 1998.
[269] J. Dong, J. L. Moake, L. Nolasco, A. Bernardo, W. Arceneaux, C. N. Shrimpton, A. J. Schade, L. V. McIntire, K. Fujikawa, et J. A. López, « ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions », *Blood*, vol. 100, n° 12, p. 4033‑4039, déc. 2002.
[270] S. Massberg, G. Enders, F. C. Matos, L. I. Tomic, R. Leiderer, S. Eisenmenger, K. Messmer, et F. Krombach, « Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo », *Blood*, vol. 94, n° 11, p. 3829‑3838, déc. 1999.

[271] B. Singh, C. Fu, et J. Bhattacharya, « Vascular expression of the alpha(v)beta(3)-integrin in lung and other organs », *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, vol. 278, n° 1, p. L217‑226, janv. 2000.
[272] J. Panés, M. A. Perry, D. C. Anderson, A. Manning, B. Leone, G. Cepinskas, C. L. Rosenbloom, M. Miyasaka, P. R. Kvietys, et D. N. Granger, « Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo », *Am. J. Physiol.*, vol. 269, n° 6 Pt 2, p. H1955‑1964, déc. 1995.
[273] P. C. Brooks, R. A. Clark, et D. A. Cheresh, « Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis », *Science*, vol. 264, n° 5158, p. 569‑571, avr. 1994.
[274] C. Buensuceso, M. de Virgilio, et S. J. Shattil, « Detection of integrin alpha IIbbeta 3 clustering in living cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 17, p. 15217‑15224, avr. 2003.
[275] P. Wonerow, A. C. Pearce, D. J. Vaux, et S. P. Watson, « A critical role for phospholipase Cgamma2 in alphaIIbbeta3-mediated platelet spreading », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 39, p. 37520‑37529, sept. 2003.
[276] K. Thornber, O. J. T. McCarty, S. P. Watson, et C. J. Pears, « Distinct but critical roles for integrin alphaIIbbeta3 in platelet lamellipodia formation on fibrinogen, collagen-related peptide and thrombin », *FEBS J.*, vol. 273, n° 22, p. 5032‑5043, nov. 2006.
[277] C. M. Hawrylowicz, G. L. Howells, et M. Feldmann, « Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production », *J. Exp. Med.*, vol. 174, n° 4, p. 785‑790, oct. 1991.
[278] M. Gawaz, K. Brand, T. Dickfeld, G. Pogatsa-Murray, S. Page, C. Bogner, W. Koch, A. Schömig, et F. Neumann, « Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis », *Atherosclerosis*, vol. 148, n° 1, p. 75‑85, janv. 2000.
[279] G. Kaplanski, C. Farnarier, S. Kaplanski, R. Porat, L. Shapiro, P. Bongrand, et C. A. Dinarello, « Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism », *Blood*, vol. 84, n° 12, p. 4242‑4248, déc. 1994.
[280] V. Henn, J. R. Slupsky, M. Gräfe, I. Anagnostopoulos, R. Förster, G. Müller-Berghaus, et R. A. Kroczek, « CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells », *Nature*, vol. 391, n° 6667, p. 591‑594, févr. 1998.
[281] J. R. Slupsky, M. Kalbas, A. Willuweit, V. Henn, R. A. Kroczek, et G. Müller-Berghaus, « Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40 », *Thromb. Haemost.*, vol. 80, n° 6, p. 1008‑1014, déc. 1998.
[282] A. E. May, T. Kälsch, S. Massberg, Y. Herouy, R. Schmidt, et M. Gawaz, « Engagement of Glycoprotein IIb/IIIa (αIIbβ3) on Platelets Upregulates CD40L and Triggers CD40L-Dependent Matrix Degradation by Endothelial Cells », *Circulation*, vol. 106, n° 16, p. 2111‑2117, oct. 2002.
[283] V. S. Dole, W. Bergmeier, H. A. Mitchell, S. C. Eichenberger, et D. D. Wagner, « Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin », *Blood*, vol. 106, n° 7, p. 2334‑2339, oct. 2005.
[284] R. Flaumenhaft, A. T. A. Mairuhu, et J. E. Italiano, « Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 36, n° 8, p. 881‑887, nov. 2010.
[285] A. Risitano, L. M. Beaulieu, O. Vitseva, et J. E. Freedman, « Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer », *Blood*, vol. 119, n° 26, p. 6288‑6295, juin 2012.
[286] B. Laffont, A. Corduan, H. Plé, A.-C. Duchez, N. Cloutier, E. Boilard, et P. Provost, « Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles », *Blood*, vol. 122, n° 2, p. 253‑261, juill. 2013.
[287] A. Schober, D. Manka, P. von Hundelshausen, Y. Huo, P. Hanrath, I. J. Sarembock, K. Ley, et C. Weber, « Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury », *Circulation*, vol. 106, n° 12, p. 1523‑1529, sept. 2002.

[288] P. von Hundelshausen, R. R. Koenen, M. Sack, S. F. Mause, W. Adriaens, A. E. I. Proudfoot, T. M. Hackeng, et C. Weber, « Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium », *Blood*, vol. 105, n° 3, p. 924‑930, févr. 2005.

[289] T. F. Deuel, R. M. Senior, D. Chang, G. L. Griffin, R. L. Heinrikson, et E. T. Kaiser, « Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes », *PNAS*, vol. 78, n° 7, p. 4584‑4587, janv. 1981.

[290] B. Scheuerer, M. Ernst, I. Dürrbaum-Landmann, J. Fleischer, E. Grage-Griebenow, E. Brandt, H. D. Flad, et F. Petersen, « The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages », *Blood*, vol. 95, n° 4, p. 1158‑1166, févr. 2000.

[291] B. S. Beikmann, I. D. Tomlinson, S. J. Rosenthal, et A. M. Andrews, « Serotonin uptake is largely mediated by platelets versus lymphocytes in peripheral blood cells », *ACS Chem Neurosci*, vol. 4, n° 1, p. 161‑170, janv. 2013.

[292] J. Y. Lee, M. Y. Lee, S. M. Chung, et J. H. Chung, « Chemically induced platelet lysis causes vasoconstriction by release of serotonin », *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 149, n° 2, p. 235‑242, avr. 1998.

[293] D. Duerschmied, G. L. Suidan, M. Demers, N. Herr, C. Carbo, A. Brill, S. M. Cifuni, M. Mauler, S. Cicko, M. Bader, M. Idzko, C. Bode, et D. D. Wagner, « Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice », *Blood*, vol. 121, n° 6, p. 1008‑1015, févr. 2013.

[294] N. Cloutier, A. Paré, R. W. Farndale, H. R. Schumacher, P. A. Nigrovic, S. Lacroix, et E. Boilard, « Platelets can enhance vascular permeability », *Blood*, vol. 120, n° 6, p. 1334‑1343, août 2012.

[295] P. von Hundelshausen, R. R. Koenen, et C. Weber, « Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion », *Microcirculation*, vol. 16, n° 1, p. 84‑96, janv. 2009.

[296] K. C. Ahn, A. J. Jun, P. Pawar, S. Jadhav, S. Napier, O. J. T. McCarty, et K. Konstantopoulos, « Preferential binding of platelets to monocytes over neutrophils under flow », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 329, n° 1, p. 345‑355, avr. 2005.

[297] S. Nikolaus et S. Schreiber, « Diagnostics of inflammatory bowel disease », *Gastroenterology*, vol. 133, n° 5, p. 1670‑1689, nov. 2007.

[298] J. J. Lukawska, L. Livieratos, B. M. Sawyer, T. Lee, M. O'Doherty, P. J. Blower, M. Kofi, J. R. Ballinger, C. J. Corrigan, G. Gnanasegaran, E. Sharif-Paghaleh, et G. E. D. Mullen, « Real-time differential tracking of human neutrophil and eosinophil migration in vivo », *J. Allergy Clin. Immunol.*, août 2013.

[299] J. Yang, B. C. Furie, et B. Furie, « The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction », *Thromb. Haemost.*, vol. 81, n° 1, p. 1‑7, janv. 1999.

[300] V. Evangelista, S. Manarini, R. Sideri, S. Rotondo, N. Martelli, A. Piccoli, L. Totani, P. Piccardoni, D. Vestweber, G. de Gaetano, et C. Cerletti, « Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule », *Blood*, vol. 93, n° 3, p. 876‑885, févr. 1999.

[301] « Laboratory markers of platelet activation and their clinical... : Current Opinion in Hematology ». [En ligne]. Disponible sur: http://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/1999/09000/Laboratory_markers_of_platelet_activation_and.12.aspx. [Consulté le: 23-sept-2013].

[302] P. A. da Costa Martins, J. M. van Gils, A. Mol, P. L. Hordijk, et J. J. Zwaginga, « Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 79, n° 3, p. 499‑507, mars 2006.

[303] H.-B. Wang, J.-T. Wang, L. Zhang, Z. H. Geng, W.-L. Xu, T. Xu, Y. Huo, X. Zhu, E. F. Plow, M. Chen, et J.-G. Geng, « P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation », *Nat Immunol*, vol. 8, n° 8, p. 882‑892, août 2007.

[304] K. Futosi, S. Fodor, et A. Mócsai, « Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 17, n° 3, p. 638‑650, août 2013.

[305] J. L. Bos, « Linking Rap to cell adhesion », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 17, n° 2, p. 123‑128, avr. 2005.

[306] D. I. Simon, Z. Chen, H. Xu, C. Q. Li, J. f Dong, L. V. McIntire, C. M. Ballantyne, L. Zhang, M. I. Furman, M. C. Berndt, et J. A. López, « Platelet glycoprotein ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) », *J. Exp. Med.*, vol. 192, n° 2, p. 193‑204, juill. 2000.

[307] S. Santoso, U. J. H. Sachs, H. Kroll, M. Linder, A. Ruf, K. T. Preissner, et T. Chavakis, « The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 », *J. Exp. Med.*, vol. 196, n° 5, p. 679‑691, sept. 2002.

[308] T. G. Diacovo, A. R. deFougerolles, D. F. Bainton, et T. A. Springer, « A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2 », *J. Clin. Invest.*, vol. 94, n° 3, p. 1243‑1251, sept. 1994.

[309] C. Weber et T. A. Springer, « Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIbbeta3 and stimulated by platelet-activating factor », *J. Clin. Invest.*, vol. 100, n° 8, p. 2085‑2093, oct. 1997.

[310] T. Chavakis, S. Santoso, K. J. Clemetson, U. J. H. Sachs, I. Isordia-Salas, R. A. Pixley, P. P. Nawroth, R. W. Colman, et K. T. Preissner, « High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging Mac-1 and glycoprotein Ib », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 46, p. 45375‑45381, nov. 2003.

[311] T. G. Diacovo, S. J. Roth, J. M. Buccola, D. F. Bainton, et T. A. Springer, « Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18 », *Blood*, vol. 88, n° 1, p. 146‑157, juill. 1996.

[312] V. Evangelista, Z. Pamuklar, A. Piccoli, S. Manarini, G. Dell'elba, R. Pecce, N. Martelli, L. Federico, M. Rojas, G. Berton, C. A. Lowell, L. Totani, et S. S. Smyth, « Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets », *Blood*, vol. 109, n° 6, p. 2461‑2469, mars 2007.

[313] F. W. Lam, A. R. Burns, C. W. Smith, et R. E. Rumbaut, « Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1 », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 300, n° 2, p. H468‑475, févr. 2011.

[314] G. Li, J. M. Sanders, M. H. Bevard, Z. Sun, J. W. Chumley, E. V. Galkina, K. Ley, et I. J. Sarembock, « CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury », *Am. J. Pathol.*, vol. 172, n° 4, p. 1141‑1152, avr. 2008.

[315] R. Jin, S. Yu, Z. Song, X. Zhu, C. Wang, J. Yan, F. Wu, A. Nanda, D. N. Granger, et G. Li, « Soluble CD40 Ligand Stimulates CD40-Dependent Activation of the β2 Integrin Mac-1 and Protein Kinase C Zeda (PKCζ) in Neutrophils: Implications for Neutrophil-Platelet Interactions and Neutrophil Oxidative Burst », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 6, p. e64631, 2013.

[316] R. L. Silverstein, A. S. Asch, et R. L. Nachman, « Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion », *J. Clin. Invest.*, vol. 84, n° 2, p. 546‑552, août 1989.

[317] A. S. Weyrich, M. R. Elstad, R. P. McEver, T. M. McIntyre, K. L. Moore, J. H. Morrissey, S. M. Prescott, et G. A. Zimmerman, « Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes », *J. Clin. Invest*, vol. 97, n° 6, p. 1525‑1534, mars 1996.

[318] F. J. Neumann, N. Marx, M. Gawaz, K. Brand, I. Ott, C. Rokitta, C. Sticherling, C. Meinl, A. May, et A. Schömig, « Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets », *Circulation*, vol. 95, n° 10, p. 2387‑2394, mai 1997.

[319] D. A. Dixon, N. D. Tolley, K. Bemis-Standoli, M. L. Martinez, A. S. Weyrich, J. D. Morrow, S. M. Prescott, et G. A. Zimmerman, « Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling », *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n° 10, p. 2727‑2738, oct. 2006.

[320] A. E. May, S. M. Kanse, L. R. Lund, R. H. Gisler, B. A. Imhof, et K. T. Preissner, « Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo », *J. Exp. Med.*, vol. 188, n° 6, p. 1029‑1037, sept. 1998.

[321] C. D. Madsen, G. M. S. Ferraris, A. Andolfo, O. Cunningham, et N. Sidenius, « uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key », *The Journal of Cell Biology*, vol. 177, n° 5, p. 927‑939, juin 2007.

[322] N. Maugeri, M. Baldini, G. A. Ramirez, P. Rovere-Querini, et A. A. Manfredi, « Platelet-leukocyte deregulated interactions foster sterile inflammation and tissue damage in immune-mediated vessel diseases », *Thromb. Res.*, vol. 129, n° 3, p. 267‑273, mars 2012.

[323] A. Celi, G. Pellegrini, R. Lorenzet, A. De Blasi, N. Ready, B. C. Furie, et B. Furie, « P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 91, n° 19, p. 8767‑8771, sept. 1994.

[324] L. Zhu, V. Castranova, et P. He, « fMLP-stimulated neutrophils increase endothelial [Ca2+]i and microvessel permeability in the absence of adhesion: role of reactive oxygen species », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 288, n° 3, p. H1331‑1338, mars 2005.

[325] J. Etulain, S. Negrotto, A. Carestia, R. G. Pozner, M. A. Romaniuk, L. P. D'Atri, G. L. Klement, et M. Schattner, « Acidosis downregulates platelet haemostatic functions and promotes neutrophil proinflammatory responses mediated by platelets », *Thromb. Haemost.*, vol. 107, n° 1, p. 99‑110, janv. 2012.

[326] M. Brunetti, N. Martelli, S. Manarini, N. Mascetra, P. Musiani, C. Cerletti, F. B. Aiello, et V. Evangelista, « Polymorphonuclear leukocyte apoptosis is inhibited by platelet-released mediators, role of TGFbeta-1 », *Thromb. Haemost.*, vol. 84, n° 3, p. 478‑483, sept. 2000.

[327] J. Etulain, M. J. Lapponi, S. J. Patrucchi, M. A. Romaniuk, R. Benzadón, G. L. Klement, S. Negrotto, et M. Schattner, « Hyperthermia inhibits platelet hemostatic functions and selectively regulates the release of alpha-granule proteins », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° 8, p. 1562‑1571, août 2011.

[328] N. Li, « Platelet–lymphocyte cross-talk », *J Leukoc Biol*, vol. 83, n° 5, p. 1069‑1078, janv. 2008.

[329] S. P. Schoenberger, R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, et C. J. Melief, « T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions », *Nature*, vol. 393, n° 6684, p. 480‑483, juin 1998.

[330] B. R. Renshaw, W. C. Fanslow 3rd, R. J. Armitage, K. A. Campbell, D. Liggitt, B. Wright, B. L. Davison, et C. R. Maliszewski, « Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice », *J. Exp. Med.*, vol. 180, n° 5, p. 1889‑1900, nov. 1994.

[331] B. D. Elzey, J. Tian, R. J. Jensen, A. K. Swanson, J. R. Lees, S. R. Lentz, C. S. Stein, B. Nieswandt, Y. Wang, B. L. Davidson, et T. L. Ratliff, « Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments », *Immunity*, vol. 19, n° 1, p. 9‑19, juill. 2003.

[332] F. Cognasse, H. Hamzeh-Cognasse, S. Lafarge, P. Chavarin, M. Cogné, Y. Richard, et O. Garraud, « Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins », *Exp. Hematol.*, vol. 35, n° 9, p. 1376‑1387, sept. 2007.

[333] B. D. Elzey, D. L. Sprague, et T. L. Ratliff, « The emerging role of platelets in adaptive immunity », *Cellular Immunology*, vol. 238, n° 1, p. 1‑9, nov. 2005.

[334] J. M. Sowa, S. A. Crist, T. L. Ratliff, et B. D. Elzey, « Platelet influence on T- and B-cell responses », *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 57, n° 4, p. 235‑241, août 2009.

[335] H. Hamzeh-Cognasse, F. Cognasse, S. Palle, P. Chavarin, T. Olivier, O. Delézay, B. Pozzetto, et O. Garraud, « Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation », *BMC Immunol*, vol. 9, p. 54, sept. 2008.

[336] A. Zernecke, « MicroRNAs in the regulation of immune cell functions--implications for atherosclerotic vascular disease », *Thromb. Haemost.*, vol. 107, n° 4, p. 626‑633, avr. 2012.

[337] A. J. Lusis, « Atherosclerosis », *Nature*, vol. 407, n° 6801, p. 233‑241, sept. 2000.

[338] J. X. Rong, M. Shapiro, E. Trogan, et E. A. Fisher, « Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 100, n° 23, p. 13531‑13536, nov. 2003.

[339] O. Soehnlein, « Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis », *Circulation Research*, vol. 110, n° 6, p. 875‑888, mars 2012.

[340] P. Libby, P. M. Ridker, G. K. Hansson, et Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis, « Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 54, n° 23, p. 2129‑2138, déc. 2009.

[341] P. Poredos et M. K. Jezovnik, « Is aspirin still the drug of choice for management of patients with peripheral arterial disease? », *VASA*, vol. 42, n° 2, p. 88‑95, mars 2013.

[342] S. R. Steinhubl, J. J. Badimon, D. L. Bhatt, J.-M. Herbert, et T. F. Lüscher, « Clinical evidence for anti-inflammatory effects of antiplatelet therapy in patients with atherothrombotic disease », *Vasc Med*, vol. 12, n° 2, p. 113‑122, janv. 2007.

[343] Heart Protection Study Collaborative Group, « MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial », *Lancet*, vol. 360, n° 9326, p. 7‑22, juill. 2002.

[344] F. Y. Ali, P. C. J. Armstrong, A.-R. A. Dhanji, A. T. Tucker, M. J. Paul-Clark, J. A. Mitchell, et T. D. Warner, « Antiplatelet Actions of Statins and Fibrates Are Mediated by PPARs », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 29, n° 5, p. 706‑711, janv. 2009.

[345] S. Massberg, K. Brand, S. Grüner, S. Page, E. Müller, I. Müller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, et M. Gawaz, « A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation », *J. Exp. Med.*, vol. 196, n° 7, p. 887‑896, oct. 2002.

[346] Y. Huo, A. Schober, S. B. Forlow, D. F. Smith, M. C. Hyman, S. Jung, D. R. Littman, C. Weber, et K. Ley, « Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E », *Nat. Med.*, vol. 9, n° 1, p. 61‑67, janv. 2003.

[347] O. Postea, E. M. Vasina, S. Cauwenberghs, D. Projahn, E. A. Liehn, D. Lievens, W. Theelen, B. K. Kramp, E. D. Butoi, O. Soehnlein, J. W. M. Heemskerk, A. Ludwig, C. Weber, et R. R. Koenen, « Contribution of platelet CX(3)CR1 to platelet-monocyte complex formation and vascular recruitment during hyperlipidemia », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, n° 5, p. 1186‑1193, mai 2012.

[348] O. A. Belton, A. Duffy, S. Toomey, et D. J. Fitzgerald, « Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis », *Circulation*, vol. 108, n° 24, p. 3017‑3023, déc. 2003.

[349] K. Daub, H. Langer, P. Seizer, K. Stellos, A. E. May, P. Goyal, B. Bigalke, T. Schönberger, T. Geisler, D. Siegel-Axel, R. A. J. Oostendorp, S. Lindemann, et M. Gawaz, « Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells », *FASEB J.*, vol. 20, n° 14, p. 2559‑2561, déc. 2006.

[350] U. Schönbeck, G. K. Sukhova, K. Shimizu, F. Mach, et P. Libby, « Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 97, n° 13, p. 7458‑7463, juin 2000.

[351] F. Mach, U. Schönbeck, G. K. Sukhova, E. Atkinson, et P. Libby, « Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling », *Nature*, vol. 394, n° 6689, p. 200‑203, juill. 1998.

[352] R. R. Azar, R. Kassab, A. Zoghbi, S. Aboujaoudé, H. El-Osta, P. Ghorra, M. Germanos, et E. Salamé, « Effects of clopidogrel on soluble CD40 ligand and on high-sensitivity C-reactive protein in patients with stable coronary artery disease », *Am. Heart J.*, vol. 151, n° 2, p. 521.e1‑521.e4, févr. 2006.

[353] R. T. A. Megens, S. Vijayan, D. Lievens, Y. Döring, M. A. M. J. van Zandvoort, J. Grommes, C. Weber, et O. Soehnlein, « Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis », *Thromb. Haemost.*, vol. 107, n° 3, p. 597‑598, mars 2012.

[354] H. Koyama, T. Maeno, S. Fukumoto, T. Shoji, T. Yamane, H. Yokoyama, M. Emoto, T. Shoji, H. Tahara, M. Inaba, M. Hino, A. Shioi, T. Miki, et Y. Nishizawa, « Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans », *Circulation*, vol. 108, n° 5, p. 524‑529, août 2003.

[355] S. Pitsilos, J. Hunt, E. R. Mohler, A. M. Prabhakar, M. Poncz, J. Dawicki, T. Z. Khalapyan, M. L. Wolfe, R. Fairman, M. Mitchell, J. Carpenter, M. A. Golden, D. B. Cines, et B. S. Sachais, « Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters », *Thromb. Haemost.*, vol. 90, n° 6, p. 1112‑1120, déc. 2003.

[356] L. B. Ware et M. A. Matthay, « The acute respiratory distress syndrome », *N. Engl. J. Med.*, vol. 342, n° 18, p. 1334‑1349, mai 2000.

[357] ARDS Definition Task Force, V. M. Ranieri, G. D. Rubenfeld, B. T. Thompson, N. D. Ferguson, E. Caldwell, E. Fan, L. Camporota, et A. S. Slutsky, « Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition », *JAMA*, vol. 307, n° 23, p. 2526‑2533, juin 2012.

[358] E. R. Johnson et M. A. Matthay, « Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment », *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, vol. 23, n° 4, p. 243‑252, août 2010.

[359] J. N. George, E. B. Pickett, S. Saucerman, R. P. McEver, T. J. Kunicki, N. Kieffer, et P. J. Newman, « Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery », *J. Clin. Invest.*, vol. 78, n° 2, p. 340‑348, août 1986.

[360] A. Zarbock, K. Singbartl, et K. Ley, « Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation », *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n° 12, p. 3211‑3219, déc. 2006.

[361] S. C. Pitchford, S. Momi, S. Giannini, L. Casali, D. Spina, C. P. Page, et P. Gresele, « Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation », *Blood*, vol. 105, n° 5, p. 2074‑2081, mars 2005.

[362] J. Grommes, J.-E. Alard, M. Drechsler, S. Wantha, M. Mörgelin, W. M. Kuebler, M. Jacobs, P. von Hundelshausen, P. Markart, M. Wygrecka, K. T. Preissner, T. M. Hackeng, R. R. Koenen, C. Weber, et O. Soehnlein, « Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 185, n° 6, p. 628‑636, mars 2012.

[363] O. P. Barry, D. Pratico, J. A. Lawson, et G. A. FitzGerald, « Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles », *J. Clin. Invest.*, vol. 99, n° 9, p. 2118‑2127, mai 1997.

[364] G. T. Brown et T. M. McIntyre, « Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1β-rich microparticles », *J. Immunol.*, vol. 186, n° 9, p. 5489‑5496, mai 2011.

[365] W. Jy, W. W. Mao, L. Horstman, J. Tao, et Y. S. Ahn, « Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro », *Blood Cells Mol. Dis.*, vol. 21, n° 3, p. 217‑231; discussion 231a, 1995.

[366] S.-C. Lo, C.-Y. Hung, D.-T. Lin, H.-C. Peng, et T.-F. Huang, « Involvement of platelet glycoprotein Ib in platelet microparticle mediated neutrophil activation », *J Biomed Sci*, vol. 13, n° 6, p. 787‑796, nov. 2006.

[367] M. McVey, A. Tabuchi, et W. M. Kuebler, « Microparticles and acute lung injury », *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, vol. 303, n° 5, p. L364‑381, sept. 2012.

[368] A. P. Vlaar et N. P. Juffermans, « Transfusion-related acute lung injury: a clinical review », *Lancet*, avr. 2013.

[369] P. E. Marik et H. L. Corwin, « Acute lung injury following blood transfusion: expanding the definition », *Crit. Care Med.*, vol. 36, n° 11, p. 3080‑3084, nov. 2008.

[370] C. C. Silliman, A. J. Bjornsen, T. H. Wyman, M. Kelher, J. Allard, S. Bieber, et N. F. Voelkel, « Plasma and lipids from stored platelets cause acute lung injury in an animal model », *Transfusion*, vol. 43, n° 5, p. 633‑640, mai 2003.

[371] S. Y. Khan, M. R. Kelher, J. M. Heal, N. Blumberg, L. K. Boshkov, R. Phipps, K. F. Gettings, N. J. McLaughlin, et C. C. Silliman, « Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury », *Blood*, vol. 108, n° 7, p. 2455‑2462, oct. 2006.

[372] F. Cognasse, J. M. Payrat, L. Corash, J. C. Osselaer, et O. Garraud, « Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand », *Blood*, vol. 112, n° 12, p. 4779‑4780; author reply 4780‑4781, déc. 2008.

[373] J. Kaufman, S. L. Spinelli, E. Schultz, N. Blumberg, et R. P. Phipps, « Release of biologically active CD154 during collection and storage of platelet concentrates prepared for transfusion », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 5, n° 4, p. 788‑796, avr. 2007.

[374] P. R. Tuinman, M. C. Gerards, G. Jongsma, A. P. Vlaar, L. Boon, et N. P. Juffermans, « Lack of evidence of CD40 ligand involvement in transfusion-related acute lung injury », *Clin Exp Immunol*, vol. 165, n° 2, p. 278‑284, août 2011.

[375] P. Toy, O. Gajic, P. Bacchetti, M. R. Looney, M. A. Gropper, R. Hubmayr, C. A. Lowell, P. J. Norris, E. L. Murphy, R. B. Weiskopf, G. Wilson, M. Koenigsberg, D. Lee, R. Schuller, P. Wu, B. Grimes, M. J. Gandhi, J. L. Winters, D. Mair, N. Hirschler, R. Sanchez Rosen, M. A. Matthay, et TRALI Study Group, « Transfusion-related acute lung injury: incidence and risk factors », *Blood*, vol. 119, n° 7, p. 1757‑1767, févr. 2012.

[376] H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, K. A. Nguyen, C.-A. Arthaud, M.-A. Eyraud, P. Chavarin, L. Absi, J.-C. Osselaer, B. Pozzetto, F. Cognasse, et O. Garraud, « Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously oversecreted in platelet components associated with acute transfusion reactions », *Transfusion*, août 2013.

[377] A. Caudrillier, K. Kessenbrock, B. M. Gilliss, J. X. Nguyen, M. B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb, et M. R. Looney, « Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury », *J. Clin. Invest.*, vol. 122, n° 7, p. 2661‑2671, juill. 2012.

[378] O. Garraud, F. Cognasse, H. Hamzeh-Cognasse, S. Laradi, B. Pozzetto, et J.-Y. Muller, « [Blood transfusion and inflammation] », *Transfus Clin Biol*, vol. 20, n° 2, p. 231‑238, mai 2013.

[379] P. J. Barnes, « New aspects of asthma », *J. Intern. Med.*, vol. 231, n° 5, p. 453‑461, mai 1992.

[380] J. Morley, C. P. Page, et S. Sanjar, « Platelets in asthma », *Lancet*, vol. 2, n° 8457, p. 726‑727, sept. 1985.

[381] S. C. Pitchford, Y. Riffo-Vasquez, A. Sousa, S. Momi, P. Gresele, D. Spina, et C. P. Page, « Platelets are necessary for airway wall remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation », *Blood*, vol. 103, n° 2, p. 639‑647, janv. 2004.

[382] S. C. Pitchford, H. Yano, R. Lever, Y. Riffo-Vasquez, S. Ciferri, M. J. Rose, S. Giannini, S. Momi, D. Spina, B. O'connor, P. Gresele, et C. P. Page, « Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 112, n° 1, p. 109‑118, juill. 2003.

[383] A. S. Benton, N. Kumar, J. Lerner, A. A. Wiles, M. Foerster, S. J. Teach, et R. J. Freishtat, « Airway platelet activation is associated with airway eosinophilic inflammation in asthma », *J. Investig. Med.*, vol. 58, n° 8, p. 987‑990, déc. 2010.

[384] M. Joseph, A. Capron, J. C. Ameisen, M. Capron, H. Vorng, V. Pancré, J. P. Kusnierz, et C. Auriault, « The receptor for IgE on blood platelets », *Eur. J. Immunol.*, vol. 16, n° 3, p. 306‑312, mars 1986.

[385] S. Hasegawa, N. Tashiro, T. Matsubara, S. Furukawa, et C. Ra, « A comparison of FcepsilonRI-mediated RANTES release from human platelets between allergic patients and healthy individuals », *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 125 Suppl 1, p. 42‑47, 2001.

[386] B. Bartok et G. S. Firestein, « Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis », *Immunol. Rev.*, vol. 233, n° 1, p. 233‑255, janv. 2010.

[387] S. E. Gabriel et K. Michaud, « Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases », *Arthritis Research & Therapy*, vol. 11, n° 3, p. 229, 2009.

[388] G. S. Firestein, « Evolving concepts of rheumatoid arthritis », *Nature*, vol. 423, n° 6937, p. 356‑361, mai 2003.
[389] M. Chabaud, F. Fossiez, J.-L. Taupin, et P. Miossec, « Enhancing Effect of IL-17 on IL-1-Induced IL-6 and Leukemia Inhibitory Factor Production by Rheumatoid Arthritis Synoviocytes and Its Regulation by Th2 Cytokines », *J Immunol*, vol. 161, n° 1, p. 409‑414, janv. 1998.
[390] N. Saidenberg-Kermanac'h, M. Cohen-Solal, N. Bessis, M.-C. De Vernejoul, et M.-C. Boissier, « Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation », *Joint Bone Spine*, vol. 71, n° 1, p. 9‑13, janv. 2004.
[391] H. R. Schumacher Jr, « Synovial membrane and fluid morphologic alterations in early rheumatoid arthritis: microvascular injury and virus-like particles », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 256, p. 39‑64, juin 1975.
[392] F. Wang, N.-S. Wang, C.-G. Yan, J.-H. Li, et L.-Q. Tang, « The significance of platelet activation in rheumatoid arthritis », *Clin. Rheumatol.*, vol. 26, n° 5, p. 768‑771, mai 2007.
[393] G. E. Pamuk, Ö. Vural, B. Turgut, M. Demır, Ö. N. Pamuk, et N. Çakir, « Increased platelet activation markers in rheumatoid arthritis: Are they related with subclinical atherosclerosis? », *Platelets*, vol. 19, n° 2, p. 146‑154, janv. 2008.
[394] J. E. Joseph, P. Harrison, I. J. Mackie, D. A. Isenberg, et S. J. Machin, « Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis », *Br. J. Haematol.*, vol. 115, n° 2, p. 451‑459, nov. 2001.
[395] A. Bunescu, P. Seideman, R. Lenkei, K. Levin, et N. Egberg, « Enhanced Fcgamma receptor I, alphaMbeta2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets », *J. Rheumatol.*, vol. 31, n° 12, p. 2347‑2355, déc. 2004.
[396] E. Boilard, K. Larabee, R. Shnayder, K. Jacobs, R. W. Farndale, J. Ware, et D. M. Lee, « Platelets participate in synovitis via Cox-1-dependent synthesis of prostacyclin independently of microparticle generation », *J. Immunol.*, vol. 186, n° 7, p. 4361‑4366, avr. 2011.
[397] M. J. Brodie, C. N. Hensby, A. Parke, et D. Gordon, « Is prostacyclin in the major pro-inflammatory prostanoid in joint fluid? », *Life Sci.*, vol. 27, n° 7, p. 603‑608, août 1980.
[398] E. A. J. Knijff-Dutmer, J. Koerts, R. Nieuwland, E. M. Kalsbeek-Batenburg, et M. A. F. J. van de Laar, « Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 46, n° 6, p. 1498‑1503, juin 2002.
[399] J. Matricon, N. Barnich, et D. Ardid, « Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease », *Self Nonself*, vol. 1, n° 4, p. 299‑309, 2010.
[400] C. Moehle, N. Ackermann, T. Langmann, C. Aslanidis, A. Kel, O. Kel-Margoulis, A. Schmitz-Madry, A. Zahn, W. Stremmel, et G. Schmitz, « Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease », *J. Mol. Med.*, vol. 84, n° 12, p. 1055‑1066, déc. 2006.
[401] K. A. Hill, K. L. Wang, S. J. Stryker, R. Gupta, D. M. Weinrach, et M. S. Rao, « Comparative analysis of cell adhesion molecules, cell cycle regulatory proteins, mismatch repair genes, cyclooxygenase-2, and DPC4 in carcinomas arising in inflammatory bowel disease and sporadic colon cancer », *Oncol. Rep.*, vol. 11, n° 5, p. 951‑956, mai 2004.
[402] M. Ramasundara, S. T. Leach, D. A. Lemberg, et A. S. Day, « Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease », *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 24, n° 2, p. 202‑208, févr. 2009.
[403] A. M. Smith, F. Z. Rahman, B. Hayee, S. J. Graham, D. J. B. Marks, G. W. Sewell, C. D. Palmer, J. Wilde, B. M. J. Foxwell, I. S. Gloger, T. Sweeting, M. Marsh, A. P. Walker, S. L. Bloom, et A. W. Segal, « Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease », *J. Exp. Med.*, vol. 206, n° 9, p. 1883‑1897, août 2009.

[404] A. L. Hart, H. O. Al-Hassi, R. J. Rigby, S. J. Bell, A. V. Emmanuel, S. C. Knight, M. A. Kamm, et A. J. Stagg, « Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases », *Gastroenterology*, vol. 129, n° 1, p. 50‑65, juill. 2005.

[405] S. Maeda, L.-C. Hsu, H. Liu, L. A. Bankston, M. Iimura, M. F. Kagnoff, L. Eckmann, et M. Karin, « Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing », *Science*, vol. 307, n° 5710, p. 734‑738, févr. 2005.

[406] M. Natsui, K. Kawasaki, H. Takizawa, S. I. Hayashi, Y. Matsuda, K. Sugimura, K. Seki, R. Narisawa, F. Sendo, et H. Asakura, « Selective depletion of neutrophils by a monoclonal antibody, RP-3, suppresses dextran sulphate sodium-induced colitis in rats », *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, n° 12, p. 801‑808, déc. 1997.

[407] E. Kankuri, K. Vaali, R. G. Knowles, M. Lähde, R. Korpela, H. Vapaatalo, et E. Moilanen, « Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 298, n° 3, p. 1128‑1132, sept. 2001.

[408] S. Danese, A. Papa, S. Saibeni, A. Repici, A. Malesci, et M. Vecchi, « Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens », *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 102, n° 1, p. 174‑186, janv. 2007.

[409] A. Andoh, T. Tsujikawa, K. Hata, Y. Araki, K. Kitoh, M. Sasaki, T. Yoshida, et Y. Fujiyama, « Elevated circulating platelet-derived microparticles in patients with active inflammatory bowel disease », *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 100, n° 9, p. 2042‑2048, sept. 2005.

[410] B. Polińska, J. Matowicka-Karna, et H. Kemona, « Assessment of the influence of the inflammatory process on the activation of blood platelets and morphological parameters in patients with ulcerative colitis (colitis ulcerosa) », *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 49, n° 1, p. 119‑124, 2011.

[411] S. Danese, J. A. Katz, S. Saibeni, A. Papa, A. Gasbarrini, M. Vecchi, et C. Fiocchi, « Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients », *Gut*, vol. 52, n° 10, p. 1435‑1441, oct. 2003.

[412] L. Menchén, I. Marín-Jiménez, E. G. Arias-Salgado, T. Fontela, P. Hernández-Sampelayo, M. C. G. Rodríguez, et N. V. Butta, « Matrix metalloproteinase 9 is involved in Crohn's disease-associated platelet hyperactivation through the release of soluble CD40 ligand », *Gut*, vol. 58, n° 7, p. 920‑928, juill. 2009.

[413] G. E. Pamuk, O. Vural, B. Turgut, M. Demir, H. Umit, et A. Tezel, « Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study », *Am. J. Hematol.*, vol. 81, n° 10, p. 753‑759, oct. 2006.

[414] T. Vowinkel, K. C. Wood, K. Y. Stokes, J. Russell, A. Tailor, C. Anthoni, N. Senninger, C. F. Krieglstein, et D. N. Granger, « Mechanisms of platelet and leukocyte recruitment in experimental colitis », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 293, n° 5, p. G1054‑1060, nov. 2007.

[415] T. Vowinkel, C. Anthoni, K. C. Wood, K. Y. Stokes, J. Russell, L. Gray, S. Bharwani, N. Senninger, J. S. Alexander, C. F. Krieglstein, M. B. Grisham, et D. N. Granger, « CD40-CD40 ligand mediates the recruitment of leukocytes and platelets in the inflamed murine colon », *Gastroenterology*, vol. 132, n° 3, p. 955‑965, mars 2007.

[416] S. Danese, C. de la Motte, A. Sturm, J. D. Vogel, G. A. West, S. A. Strong, J. A. Katz, et C. Fiocchi, « Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients », *Gastroenterology*, vol. 124, n° 5, p. 1249‑1264, mai 2003.

[417] S. Rutella, S. Vetrano, C. Correale, C. Graziani, A. Sturm, A. Spinelli, R. De Cristofaro, A. Repici, A. Malesci, et S. Danese, « Enhanced platelet adhesion induces angiogenesis in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease microvasculature », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 15, n° 3, p. 625‑634, mars 2011.

[418] K. Suzuki, K. Sugimura, K. Hasegawa, K. Yoshida, A. Suzuki, K. Ishizuka, K. Ohtsuka, T. Honma, R. Narisawa, et H. Asakura, « Activated platelets in ulcerative colitis enhance the production of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes », *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 36, n° 12, p. 1301‑1306, déc. 2001.

[419] T. Weissmüller, E. L. Campbell, P. Rosenberger, M. Scully, P. L. Beck, G. T. Furuta, et S. P. Colgan, « PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell–expressed ecto-NTPDases », *J Clin Invest*, vol. 118, n° 11, p. 3682‑3692, nov. 2008.

[420] B. Liu, Y.-X. Chen, Q. Yin, Y.-Z. Zhao, et C.-S. Li, « Diagnostic value and prognostic evaluation of Presepsin for sepsis in an emergency department », *Crit Care*, vol. 17, n° 5, p. R244, oct. 2013.

[421] R. Landmann, A. M. Reber, S. Sansano, et W. Zimmerli, « Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock », *J. Infect. Dis.*, vol. 173, n° 3, p. 661‑668, mars 1996.

[422] G. Zhang, J. Han, E. J. Welch, R. D. Ye, T. A. Voyno-Yasenetskaya, A. B. Malik, X. Du, et Z. Li, « Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway », *J. Immunol*, vol. 182, n° 12, p. 7997‑8004, juin 2009.

[423] A. Scaradavou, « HIV-related thrombocytopenia », *Blood Rev.*, vol. 16, n° 1, p. 73‑76, mars 2002.

[424] K. B. Hymes, J. B. Greene, et S. Karpatkin, « The effect of azidothymidine on HIV-related thrombocytopenia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 318, n° 8, p. 516‑517, févr. 1988.

[425] J. A. Arranz Caso, C. Sanchez Mingo, et J. Garcia Tena, « Effect of highly active antiretroviral therapy on thrombocytopenia in patients with HIV infection », *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, n° 16, p. 1239‑1240, oct. 1999.

[426] S. I. Gringhuis, J. den Dunnen, M. Litjens, B. van Het Hof, Y. van Kooyk, et T. B. H. Geijtenbeek, « C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB », *Immunity*, vol. 26, n° 5, p. 605‑616, mai 2007.

[427] J. V. Baker, K. Brummel-Ziedins, J. Neuhaus, D. Duprez, N. Cummins, D. Dalmau, J. DeHovitz, C. Lehmann, A. Sullivan, I. Woolley, L. Kuller, J. D. Neaton, R. P. Tracy, et INSIGHT SMART Study Team, « HIV Replication Alters the Composition of Extrinsic Pathway Coagulation Factors and Increases Thrombin Generation », *J Am Heart Assoc*, vol. 2, n° 4, p. e000264, août 2013.

[428] J. E. Italiano Jr et E. M. Battinelli, « Selective sorting of alpha-granule proteins », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7 Suppl 1, p. 173‑176, juill. 2009.

[429] P. Blair, S. Rex, O. Vitseva, L. Beaulieu, K. Tanriverdi, S. Chakrabarti, C. Hayashi, C. A. Genco, M. Iafrati, et J. E. Freedman, « Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase », *Circ. Res*, vol. 104, n° 3, p. 346‑354, févr. 2009.

[430] J. R. Ward, L. Bingle, H. M. Judge, S. B. Brown, R. F. Storey, M. K. B. Whyte, S. K. Dower, D. J. Buttle, et I. Sabroe, « Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor », *Thromb. Haemost.*, vol. 94, n° 4, p. 831‑838, oct. 2005.

[431] J. E. Scherberich et W. A. Nockher, « CD 14++ Monocytes, CD14+/CD16+ Subset and Soluble CD14 as Biological Markers of Inflammatory Systemic Diseases and Monitoring Immuno-suppressive Therapy », *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 37, n° 3, janv. 1999.

[432] F. Alonzo 3rd, L. Kozhaya, S. A. Rawlings, T. Reyes-Robles, A. L. DuMont, D. G. Myszka, N. R. Landau, D. Unutmaz, et V. J. Torres, « CCR5 is a receptor for Staphylococcus aureus leukotoxin ED », *Nature*, vol. 493, n° 7430, p. 51‑55, janv. 2013.

[433] T. Reyes-Robles, F. Alonzo III, L. Kozhaya, D. B. Lacy, D. Unutmaz, et V. J. Torres, « Staphylococcus aureus Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection », *Cell Host & Microbe*, vol. 14, n° 4, p. 453‑459, oct. 2013.

[434] L. O'Brien, S. W. Kerrigan, G. Kaw, M. Hogan, J. Penadés, D. Litt, D. J. Fitzgerald, T. J. Foster, et D. Cox, « Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A », *Mol. Microbiol.*, vol. 44, n° 4, p. 1033‑1044, mai 2002.

[435] S. T. Towhid, M. Nega, E.-M. Schmidt, E. Schmid, T. Albrecht, P. Münzer, O. Borst, F. Götz, et F. Lang, « Stimulation of platelet apoptosis by peptidoglycan from Staphylococcus aureus 113 », *Apoptosis*, vol. 17, n° 9, p. 998‑1008, sept. 2012.

[436] Y. Shou, N. Li, L. Li, J. L. Borowitz, et G. E. Isom, « NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis », *J. Neurochem.*, vol. 81, n° 4, p. 842‑852, mai 2002.

[437] E. M. Vasina, S. Cauwenberghs, M. A. H. Feijge, J. W. M. Heemskerk, C. Weber, et R. R. Koenen, « Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation », *Cell Death Dis*, vol. 2, p. e233, 2011.

[438] M. Rahman, D. Gustafsson, Y. Wang, H. Thorlacius, et O. Ö. Braun, « Ticagrelor reduces neutrophil recruitment and lung damage in abdominal sepsis », *Platelets*, juill. 2013.

[439] J. M. van Gils, P. A. da Costa Martins, A. Mol, P. L. Hordijk, et J. J. Zwaginga, « Transendothelial migration drives dissociation of plateletmonocyte complexes », *Thromb. Haemost.*, vol. 100, n° 2, p. 271‑279, août 2008.

[440] M. Czapiga, J.-L. Gao, A. Kirk, et J. Lekstrom-Himes, « Human platelets exhibit chemotaxis using functional N-formyl peptide receptors », *Exp. Hematol.*, vol. 33, n° 1, p. 73‑84, janv. 2005.

[441] G. T. Brown, P. Narayanan, W. Li, R. L. Silverstein, et T. M. McIntyre, « Lipopolysaccharide Stimulates Platelets through an IL-1β Autocrine Loop », *J. Immunol.*, vol. 191, n° 10, p. 5196‑5203, nov. 2013.

[442] N. Cloutier, S. Tan, L. H. Boudreau, C. Cramb, R. Subbaiah, L. Lahey, A. Albert, R. Shnayder, R. Gobezie, P. A. Nigrovic, R. W. Farndale, W. H. Robinson, A. Brisson, D. M. Lee, et E. Boilard, « The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes », *EMBO Mol Med*, nov. 2012.

[443] C. Pelegrí, P. Kühnlein, E. Buchner, C. B. Schmidt, A. Franch, M. Castell, T. Hünig, F. Emmrich, et R. W. Kinne, « Depletion of gamma/delta T cells does not prevent or ameliorate, but rather aggravates, rat adjuvant arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 39, n° 2, p. 204‑215, févr. 1996.

[444] S. R. Steinhubl, J. J. Badimon, D. L. Bhatt, J.-M. Herbert, et T. F. Lüscher, « Clinical evidence for anti-inflammatory effects of antiplatelet therapy in patients with atherothrombotic disease », *Vasc Med*, vol. 12, n° 2, p. 113‑122, mai 2007.

ANNEXES

PARTICIPATION AUX TRAVAUX DE RECHERCHE DU LABORATOIRE

Hamzeh-Cognasse H, **Damien P**, Nguyen KA, Arthaud CA, Eyraud MA, Chavarin P, Absi L, Osselaer JC, Pozzetto B, Cognasse F and Garraud O. ; Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously oversecreted in platelet components associated with acute transfusion reactions ; *Transfusion*. 2013 Aug [Epub ahead of print]

≈

Hamzeh-Cognasse H, **Damien P**, Nguyen KA, Zeni F, Pozzetto B, Cognasse F and Garraud O. ; Contribution of activated platelets to plasma IL-27 levels ; *Crit Care.* 2013 Feb 5;17(1):411

≈

Cognasse F, Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, **Damien P**, Nguyen KA, Pozzetto B and Payrat JM.; Investigative in vitro study about red blood cell concentrate processing and storage ; Am *J Respir Crit Care Med*. 2013 Jan 15;187(2):216-7

≈

Berthet J, **Damien P**, Hamzeh-Cognasse H, Arthaud CA, Eyraud MA, Zéni F, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O and Cognasse F. ; Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion ; *Clin Immunol.* 2012 Dec; 145(3):189-200

≈

Garraud O, **Damien P**, Berthet J, Arthaud CA, Hamzeh-Cognasse H and Cognasse F. ; [Blood platelets and biological response to 'danger' signals and subsequent inflammation: towards a new paradigm?]. *Transfus Clin Biol*. 2011 Apr;18(2):165-73

≈

Berthet J, **Damien P**, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Garraud O and Cognasse F.; Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways ; *Br J Haematol.* 2010 Oct; 151(1):89-92

≈

Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Berthet J, **Damien P**, Lucht F, Pozzetto B, Garraud O.; Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides ; *AIDS.* 2009 Sep 24; 23(15):2057-9

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Platelets are efficiently recruited by intestinal epithelial cells upon infectious triggering and release rantes in vitro

Hamzeh-Cognasse H., **Damien P**., Cognasse F., Grattard F., Carricajo A., Berthelot P., Pozzetto B., Garraud O.

7Th European Mucosal Immunity Congress - Amsterdam (NL) Septembre 2010

≈

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

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

10th European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology – Beaune (FR) Octobre 2010

Et

Journée annuelle de l'Institut fédératif de Recherche en Sciences et Ingéniérie de la Santé (IFRESIS) - Saint-Etienne (FR) Novembre 2010

Et

10th World congress on inflammation - Paris (FR) Juin 2011

≈

Neutrophils transmigration promotes platelets recruitment on inflamed sites

Damien P., Cognasse F., Roblin X., Peoc'h M., Pozzetto B., Garraud O. and Hamzeh-Cognasse H.

Journée annuelle de l'Institut fédératif de Recherche en Sciences et Ingéniérie de la Santé (IFRESIS) - Saint-Etienne (FR) Novembre 2011

Et

Journée annuelle de la Recherche de l'ED 488 - Saint-Etienne (FR) Juin 2012

≈

Blood Platelets in Inflammatory Tissues: A consequence of neutrophils binding and transmigration

Damien P., Eyraud M.A., Cognasse F., Roblin X., Peoc'h M., Pozzetto B., Garraud O. and Hamzeh-Cognasse H.

Journée annuelle de l'Institut fédératif de Recherche en Sciences et Ingéniérie de la Santé (IFRESIS) - Saint-Etienne (FR) Novembre 2012

≈

Highly Active Antiretroviral Therapy alters inflammation linked to platelet cytokines in HIV-1–infected patients

DamienP., Cognasse C., Lucht F., Suy F., Pozzetto B., Garraud O. and Hamzeh-Cognasse H.

11th World congress on inflammation - Natal (BR) Septembre 2013
(Obtention de la bourse de mobilité de l'Institut Universitaire de France)

COMMUNICATIONS ORALES

Human platelet NFκB links TLR2 and PAR1 to cytokine secretion
11th European. Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology - Varsovie (PL) Mai 2012

≈

HAART alters inflammation linked to platelet cytokines in HIV-1 infected patients
Présentation Pr. Olivier GARRAUD
32th International Society of Blood Transfusion Congress - Cancun (MX) Juillet 2012

≈

Libération de facteurs immunomodulateurs plaquettaires après engagement des TLRs
Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie - Paris (FR) Mars 2013

Plaquettes sanguines et entretien de l'inflammation post-infectieuse

Les plaquettes sanguines sont des cellules anucléées qui jouent un rôle majeur dans l'hémostase. Au-delà de cette fonction, elles possèdent une composante inflammatoire multifacette ; recouvrant la détection du signal de danger, la libération de cytokines et la migration leucocytaire.Dans ce contexte, la première partie de ces travaux met en avant la capacité des plaquettes à mettre en place une activation de type inflammatoire en réponse à un pathogène. En effet, lors de l'infection à HIV les plaquettes sont dans un état d'hyperéactivité et libèrent des facteurs immunomodulateurs pouvant participer à l'inflammation observée chez les patients infectées. D'une manière parallèle, les plaquettes présentent une sensibilité aux bactéries, faisant intervenir les TLR2 et 4 mais aussi les exotoxines, voire les bactéries entières. Le profil de la réponse inflammatoire induite est assez conséquent et diversifié pour participer à la physiopathologie du sepsis.

La participation des plaquettes à l'inflammation concerne également leur interconnexion avec les neutrophiles. La seconde partie des travaux traite d'ailleurs de cette coopération qui ne semble pas s'arrêter à la barrière endothéliale, car lors de leur extravasation les neutrophiles transportent avec eux les plaquettes ; qui sont encore capables d'entretenir l'inflammation au niveau du site inflammatoire (ici, modèle de l'alvéole pulmonaire). La diversité du répertoire moléculaire plaquettaire, mis en avant au cours de cette thèse, qui participe à l'inflammation ouvre plusieurs possibilités quant à l'élaboration d'anti-plaquettaires qui pourraient moduler une réponse inflammatoire exacerbée.

Mots-clés : plaquettes, inflammation, HIV, *S. aureus*, TLR, NFκB, complexes plaquettes/neutrophiles, chimioattraction

Blood platelets in post-infectious inflammation

Blood platelets are anucleate cells which play an key role in haemostasis. In addition to this function, they participate in a number of other functions related to the inflammatory response including danger detection, cytokine release, and leukocyte transmigration.In the first part of the study, we highlight the ability of platelets to undergo an inflammatory activation response to a pathogen. Indeed during HIV infection, platelets are hyperresponsive and release immunomodulatory factors that can be involved in the inflammatory state seen in the patients. In a parallel way, platelets are also sensitive to bacteria, involving TLRs 2 and 4, exotoxins, as well as whole live bacteria. The inflammatory profile induced is sufficient, and quite diversified to participate in sepsis physiopathology.

Platelet inflammatory functions also apply to their ability to crosstalk with neutrophils. Thus in the second part of our studiy, we focus on this interconnection, which does not appear to be stopping at the endothelial barrier, and can be seen during extravasation where neutrophils carry surface bound platelets in order to maintain inflammation directly onsite (alveolar inflammation model here).The diversity of platelet inflammatory activities highlighted in our work leads to several possibilities for the development of an antiplatelet therapeutic target which could modulate an exacerbated inflammatory response.

Keywords: platelets, inflammation, HIV, *S. aureus*, TLRs, NFκB, platelet/neutrophil complexes, chemoattraction