

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les plaquettes sanguines : un rôle dans la transduction des signaux

Karine Missy
Sylvie Giuriato
Stéphane Bodin
Monique Plantavid
Bernard Payrastre

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, spécifique des plaquettes, est le récepteur d'adhérence majoritaire de ces cellules (80 000 molécules par plaquette) et est essentiel pour l'agrégation plaquettaire. Dans les plaquettes au repos, $\alpha_{IIb}\beta_3$ est dans un état de basse affinité, incapable de lier le fibrinogène soluble. L'activation des plaquettes par des agonistes physiologiques va entraîner un changement de conformation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (signalisation *inside-out*) qui pourra alors lier le fibrinogène soluble, une étape indispensable au processus d'agrégation plaquettaire. Des mécanismes de signalisation complexes induits par l'engagement de l'intégrine et son regroupement (signalisation *outside-in*) vont contribuer au contrôle de l'irréversibilité de l'agrégation et de la rétraction du clou plaquettaire. Parmi les voies de signalisation stimulées lors de l'engagement d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, l'activation d'une phospho-inositide 3-kinase joue un rôle important dans le contrôle de la stabilisation de l'agrégat plaquettaire. Son produit, le $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$, occupe une position centrale dans une boucle d'activation positive. En effet, un certain niveau d'engagement et de regroupement de l'intégrine est nécessaire à la production de ce lipide qui va alors influencer la consolidation et l'irréversibilité de l'agrégation en stabilisant le complexe d'actomyosine. Les voies métaboliques conduisant à l'accumulation de $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$, typique dans les plaquettes agrégées, ainsi que les protéines associées à $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui pourraient régler l'irréversibilité de l'agrégation seront également discutées dans cette revue.

ADRESSE

K. Missy, S. Giuriato, S. Bodin M. Plantavid, B. Payrastre: Inserm U. 326, Hôpital Purpan, IFR 30, 31059 Toulouse, France.

TIRÉS À PART

B. Payrastre.

m/s n°2, vol. 17, février 2001

Les plaquettes sanguines ont un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité du système vasculaire et constituent la première ligne de défense contre les hémorragies. Elles circulent librement dans le sang et doivent être activées de façon séquentielle et coordonnée pour remplir correctement leur rôle. Une perte du contrôle de ces mécanismes peut conduire à une hémorragie ou à la formation d'un thrombus pouvant obstruer totalement un vaisseau. Un

événement essentiel et strictement contrôlé est la transition d'un état de faible affinité de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, majoritaire à la surface des plaquettes (environ 80 000 molécules par plaquette), vers un état de forte affinité lui permettant de lier le fibrinogène soluble (*m/s 1995, n° 7, p. 1021*). La liaison du fibrinogène permettra alors la formation de ponts entre les plaquettes et, à terme, le phénomène d'agrégation. L'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ est induite par de nombreux agonistes plaquettaire. Son mécanisme, lié à un changement conformationnel de l'intégrine, est communément appelé signalisation *inside-out*. Les processus moléculaires impliqués dans cette activation sont complexes et restent assez mal connus. Le terme *outside-in*, désigne, lui, les événements de signalisation qui émanent de l'intégrine dès la fixation d'une molécule de fibrinogène sur $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ceux-ci évoluent en fonction du degré d'oligomérisation ou de regroupement (*clustering*) des intégrines dans la membrane plasmique, et impliquent le recrutement et/ou l'activation de protéines effectrices et de protéines structurales du cytosquelette d'actine. Ils contrôlent les réponses tardives de la plaquette telles que l'agrégation irréversible ou la rétraction du clou plaquettaire. L'étude des plaquettes de patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann*, dépourvues d'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ fonctionnelle, ont beaucoup contribué à mettre en évidence les mécanismes moléculaires régissant ce mécanisme de signalisation *outside-in*. Quelques revues générales récentes décrivent les divers aspects de la signalisation bidirectionnelle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [1, 2]. L'objectif de cette mini-synthèse est de résumer les mécanismes impliqués dans la régulation de l'affinité d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ et de mettre l'accent sur l'une des voies de signalisation *outside-in* qui implique une phospho-inositide 3-kinase (PI 3-kinase) au cœur d'une boucle d'activation contrôlant le caractère irréversible de l'agrégation plaquettaire.

Mécanismes impliqués dans la signalisation inside-out d' $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est indispensable à l'adhérence, à l'étalement et surtout à l'agrégation des plaquettes lors de l'hémostase. Dans les plaquettes au repos, $\alpha_{IIb}\beta_3$ est dans un état de faible affinité incapable de lier le fibrinogène soluble. Des données biochimiques et biophysiques indiquent que la modification de l'affinité de l'intégrine lors de l'activation plaquettaire est due à un changement conformationnel [1]. De nombreux agonistes plaquettaire tels que la thrombine, l'adénosine diphosphate (ADP), les complexes immuns interagissant avec Fc γ RIIa, le collagène, le thromboxane A2 ou la thrombospondine sont capables d'induire une augmentation de l'affinité d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ grâce à une signalisation *inside-out* [1, 2]. Leurs récepteurs agissent soit par l'intermédiaire de protéines G hétérotrimériques, soit par l'activation de tyrosine kinases telles que Src ou Syk. Les cascades d'événements de signalisation qui en découlent conduisent, par l'intermédiaire de mécanismes moléculaires encore mal connus, au changement conformationnel d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [2], indispensable à l'augmentation d'affinité de l'intégrine pour son ligand extracellulaire (*figure 1*) (*m/s 2000, n° 8-9, p. 974-8*). De plus, dès la fixation du fibrino-

gène, une diffusion latérale de l'intégrine dans la membrane et le remodelage de son interaction avec le cytosquelette vont contribuer à un regroupement des molécules d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui augmente son avidité pour le fibrinogène [1, 3].

L'une des voies de signalisation commune à tous les agonistes plaquettaire est l'activation rapide du métabolisme des phospho-inositides avec stimulation de phospholipases C (PLC) spécifiques des phospho-inositides et production des deux second messagers, inositol *trisphosphate* (IP₃) et diacylglycérol. Il est bien admis aujourd'hui que cette voie classique participe au mécanisme d'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [4-6]. Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques tels que les récepteurs de la thrombine PAR1 (*protease activated receptor 1*) (*m/s 1996, n° 8-9, p. 981*) ou du thromboxane A2 activent une PLC β . Les récepteurs activant la voie des tyrosine kinases tels que Fc γ RIIa ou l'un des récepteurs du collagène, GpVI, stimulent une phospholipase C (PLC γ 2). Nous avons montré récemment que la stimulation de PLC γ 2 par Fc γ RIIa et GpVI nécessite la mise en jeu d'une PI 3-kinase et la production de phosphatidylinositol 3,4,5-*trisphosphate* (PtdIns(3,4,5)P₃) [7, 8]. La PLC γ 2 interagit directement avec ce phospho-inositide, vraisemblablement par l'intermédiaire de son domaine PH (*pleckstrin homo-*

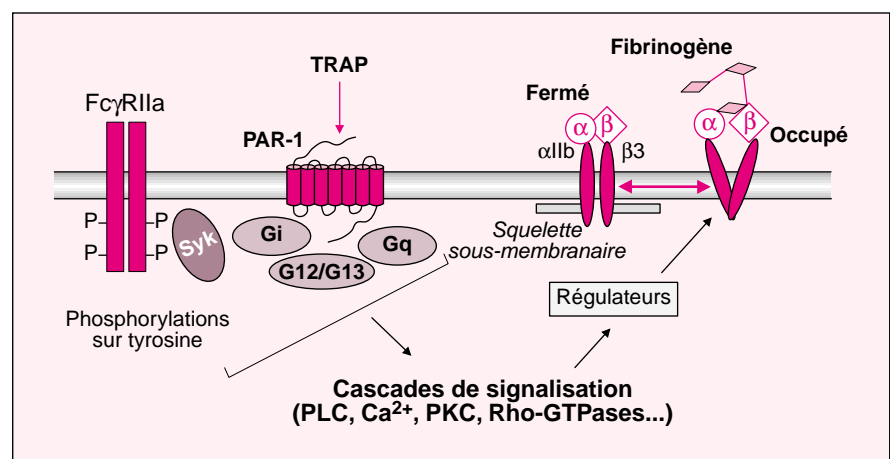


Figure 1. La signalisation *inside-out* conduit à un changement conformationnel d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui se traduit par une augmentation d'affinité pour son ligand. De nombreux récepteurs, agissant soit par recrutement et activation de tyrosine kinases, soit par couplage à des protéines G hétérotrimériques, entraînent l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$. Comme indiqué dans le texte, certaines voies de signalisation impliquées dans cette activation dite *inside-out* ont été identifiées.

* La thrombasthénie de Glanzmann est une pathologie plaquettaire hémorragique congénitale rare, caractérisée par une anomalie quantitative ou qualitative de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

logy), ce qui lui permet une localisation adéquate à la membrane pour hydrolyser ses substrats. Ce résultat illustre le rôle de la PI 3-kinase et de ses produits en tant qu'organisateur spatio-temporel de certaines voies de signalisation. Dans ces cas précis, mise en jeu de FcγRIIa et GpVI, la PI 3-kinase peut donc être un régulateur indirect de l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ alors qu'elle n'est pas impliquée de façon majeure lors d'une activation par la thrombine [7]. La mobilisation calcique induite par la production d' IP_3 est nécessaire mais pas suffisante à l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [4]. Par ailleurs, la stimulation des protéine-kinases C (PKC) conventionnelles par le diacylglycérol semble jouer un rôle très important dans l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [1, 5, 6]. Cependant, bien que la partie cytoplasmique de la chaîne β_3 de l'intégrine soit phosphorylée sur des résidus sérine et thréonine en réponse à une stimulation des plaquettes par la thrombine [6, 9], l'implication directe des PKC reste à démontrer. Une autre sérine-thréonine kinase, ILK (*integrin-linked kinase*) interagit avec la partie cytoplasmique de la chaîne β des intégrines et pourrait participer à sa phosphorylation. Dans ce contexte, il est intéressant de noter qu'une mutation ponctuelle dans la chaîne β_3 (S752P) des plaquettes, décrite chez un patient, entraîne un grave défaut d'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [10]. Cette sérine pourrait être phosphorylée dans des conditions normales mais sa mutation en proline entraîne vraisemblablement une modification conformationnelle incompatible avec l'activation de l'intégrine. Cependant, d'autres sites de phosphorylation tels que la thréonine 753 seraient importants plutôt pour la régulation de la signalisation *outside-in* d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [11].

D'un point de vue moléculaire, des données biochimiques suggèrent qu'à la surface des plaquettes au repos, $\alpha_{IIb}\beta_3$ est en fait maintenue dans un état de basse affinité grâce à une contrainte structurale qui serait levée en réponse à la signalisation *inside-out*. La levée de cette contrainte, vraisemblablement liée à une réorganisation intramoléculaire de l'interaction d' α_{IIb} avec β_3 , fait intervenir des protéines intracellulaires capables d'interagir directe-

ment avec la partie cytoplasmique de l'intégrine. *In vitro*, de nombreuses protéines structurales et/ou intervenant dans les mécanismes de signalisation sont capables d'interagir physiquement avec la partie cytoplasmique des intégrines. Parmi elles, la β_3 -endonexine, présente dans les plaquettes, pourrait être impliquée dans le processus d'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [12]. Le cytosquelette sous-membranaire pourrait également jouer un rôle important pour le maintien de l'intégrine dans un état de faible affinité car une population d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ interagit directement avec ce cytosquelette dans les plaquettes au repos [13]. Il faut toutefois noter que l'assemblage d'actine observé très rapidement lors de l'activation des plaquettes n'intervient pas dans les phases précoces d'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ mais plutôt dans le regroupement massif des intégrines et la liaison irréversible du fibrinogène [14]. Bien que leur rôle précis ne soit pas clairement identifié, les GTPases de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42) contribuent très probablement indirectement à l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [1]. Il a été démontré dans de nombreux types cellulaires que ces petites protéines G jouent un rôle majeur dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine [15, 16]. Dans les plaquettes, ces GTPases sont fortement exprimées ainsi que leurs régulateurs: les facteurs d'échanges, les inhibiteurs de la dissociation du GDP et les stimulateurs de l'activité GTPasique. Il a été suggéré que RhoA ne réglerait pas directement l'affinité de l'intégrine, mais indirectement en intervenant dans le processus de regroupement des intégrines [17]. De plus, Rac participe à l'assemblage du réseau d'actine en activant une phospho-inositide 5-kinase et donc la production de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, un lipide à inositol capable d'interagir avec plusieurs protéines contrôlant cet assemblage [18]. Enfin, il est important de souligner que l'activation de l'intégrine est un mécanisme réversible et qu'il existe des régulateurs négatifs. Ainsi, l'élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc et l'activation de la protéine-kinase A qui en découle, ou l'activation de la protéine-kinase G en réponse à une élévation des taux de GMPc sont des événements

capables de bloquer rapidement l'activation et l'agrégation des plaquettes en modulant la signalisation *inside-out* d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [19, 20].

Les événements induits par l'engagement d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou signalisation *outside-in*

Il est clairement établi aujourd'hui que les intégrines ne se limitent pas à lier des protéines adhérentes extracellulaires mais agissent également en tant que véritables récepteurs qui transmettent une information de signalisation intracellulaire. Dès la fixation d'une molécule de fibrinogène, des signaux intracellulaires spécifiques sont émis grâce aux protéines effectrices recrutées très rapidement à la proximité de la partie cytoplasmique d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ et ce de façon indépendante de la polymérisation d'actine [21]. Cette phase initiale du mécanisme de signalisation *outside-in* va contribuer à activer encore $\alpha_{IIb}\beta_3$. Lors du regroupement des intégrines et de la formation d'un complexe constitué de protéines de signalisation et de protéines structurales du cytosquelette d'actine, une interaction forte entre α_{IIb}/β_3 et ce cytosquelette se constitue conduisant à la formation d'adhérences focales (*figure 2*). Le recrutement de nombreuses enzymes et de protéines adaptatrices, à proximité immédiate de l'intégrine, permet la formation d'adhérences focales dites matures [1]. Ces complexes, ancrés aux filaments d'actine néoformés, sont co-purifiés avec le cytosquelette correspondant à la fraction insoluble dans le Triton X-100 après sédimentation à 12000 g [13, 22, 23]. Parmi les signaux induits par l'engagement d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, on note une mobilisation calcique, la phosphorylation sur résidus de tyrosine de nombreuses protéines ou encore l'activation du métabolisme des phospho-inositides. Des tyrosine kinases de la famille Src [21, 22] et de la famille Tec [24, 25], la kinase d'adhésion focale (*focal adhesion kinase*, FAK) [22], des kinases de lipides telles que PI 3-kinase [22] et des phosphatases de protéines ou de lipides [26, 27] sont relocalisées au niveau des zones d'adhérence focale en réponse à l'engagement d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (*figure 2*). Récemment, l'équipe de

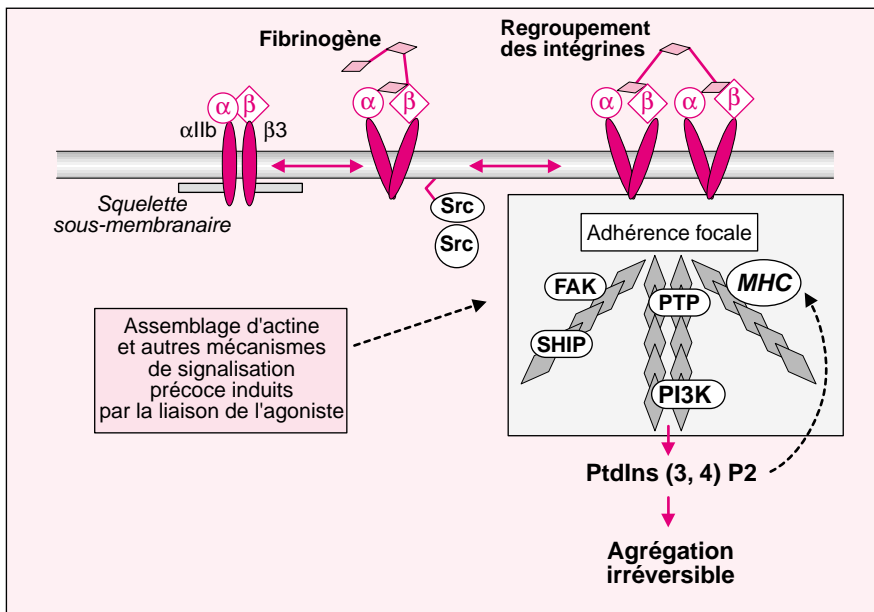


Figure 2. La signalisation dépendante d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou signalisation *outside-in*. La signalisation en aval d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ est séquentielle et conduit à la formation d'adhérences focales. Une PI 3-kinase et son produit, le PtdIns(3,4)P₂, jouent un rôle important dans le maintien de l'agrégation irréversible. PTP: phosphotyrosine phosphatase; PI3K: PI 3-kinase; FAK: kinase d'adhésion focale; MHC: chaîne lourde de myosine; SHIP: inositol 5-phosphatase à domaine SH2.

D.R. Phillips [28] a démontré le rôle critique des deux résidus de tyrosine de la partie cytoplasmique de la chaîne β_3 dans les réponses physiologiques des plaquettes de souris *in vivo*. Ces résidus de tyrosine sont phosphorylés lors de l'agrégation plaquettaire [29, 30]. Il est intéressant de noter que la tyrosine 747 est située dans un motif NPXY, potentiellement capable d'interagir avec des domaines PTB (*phosphotyrosine binding*). La mutation de ces résidus tyrosine affecte l'agrégation irréversible et la rétraction du clou plaquettaire démontrant leur rôle dans la signalisation *outside-in*. La tyrosine kinase impliquée dans la phosphorylation de la chaîne β_3 n'est pas connue à ce jour mais Syk et les kinases de la famille Src pourraient être impliquées. FAK, dont le recrutement aux zones d'adhérence focale, la phosphorylation et l'activation nécessitent à la fois l'engagement des intégrines et la polymérisation de l'actine est également un bon candidat puisque la phosphorylation de β_3 intervient au moment de l'agrégation [22, 31]. Cette kinase interagit avec l'intégrine et avec plusieurs protéines du cytosquelette et

de la signalisation. La PI 3-kinase α s'associe directement à FAK lors de l'agrégation des plaquettes [22]. Cette liaison implique le résidu tyrosine phosphorylé (Y397) de FAK qui interagit avec le domaine SH2 carboxy-terminal de la sous-unité p85 α de PI 3-kinase [32] et le domaine SH3 de p85 α qui lie une région riche en proline de FAK [22]. D'un point de vue fonctionnel cette interaction pourrait être importante car une PI 3-kinase est impliquée dans le maintien de l'agrégation et la maturation des plaques d'adhérence [33, 34].

Activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$, PI 3-kinase et agrégation irréversible des plaquettes

Les PI 3-kinases, une famille d'enzymes qui phosphorylent la position 3 du noyau inositol des phosphoinositides, sont impliquées dans de nombreuses réponses biologiques telles que la réorganisation du cytosquelette, la migration cellulaire, la prolifération et la survie ou encore les effets métaboliques de l'insuline [35]. Elles ont été classées en trois groupes selon leurs caractéristiques structurales, la spécificité de leurs substrats et

leurs mécanismes de régulation [36]. Leurs produits lipidiques, les D3-phospho-inositides, sont aujourd'hui considérés comme des seconds messagers intracellulaires. Ils peuvent interagir de façon directe et spécifique avec des modules protéiques fonctionnels tels que certains domaines PH, certains domaines SH2 ou les domaines FYVE [35]. Les D3-phospho-inositides sont donc impliqués dans le contrôle de la localisation membranaire de certaines protéines de signalisation et organisent de façon spatio-temporelle plusieurs voies de signalisation. Tous les types de PI 3-kinases sont représentés dans les plaquettes humaines [37] et certaines d'entre elles jouent un rôle important dans l'activation de ces cellules [7, 33, 34, 37]. Dans les plaquettes stimulées par la thrombine ou par le peptide agoniste du récepteur de la thrombine PAR-1 (TRAP), la synthèse du PtdIns(3,4,5)P₃ est rapide et transitoire, alors que le PtdIns(3,4)P₂ s'accumule plus lentement [22, 38, 39]. De façon intéressante, la synthèse de PtdIns(3,4)P₂ est fortement et spécifiquement affectée dans les plaquettes de patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann ou dans des plaquettes de donneur sain stimulées en présence du peptide RGDS, qui entre en compétition avec le fibrinogène pour sa fixation à $\alpha_{IIb}\beta_3$ [40]. Ces résultats démontrent que l'accumulation de PtdIns(3,4)P₂ nécessite l'engagement d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ [22, 40]. La synthèse de ce phosphoinositide est donc largement contrôlée par un mécanisme lié à la signalisation *outside-in*. Nous avons récemment observé que l'ADP sécrété lors de l'activation plaquettaire était spécifiquement impliqué en tant que co-facteur du TRAP du récepteur de la thrombine pour la production de PtdIns(3,4)P₂ [34]. L'ADP pourrait en fait contribuer, grâce à son récepteur couplé à la protéine G hétérotrimérique Gi [41], à une plus forte activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ conduisant à une signalisation *outside-in* plus complète. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la synthèse de PtdIns(3,4)P₂ restent assez mal connus et plusieurs possibilités ont été proposées (*figure 3*): (1) l'activation d'une PI 3-kinase de type I (éventuellement celle associée à FAK) produisant du PtdIns(3,4,5)P₃ rapidement transformé par une 5-phosphatase

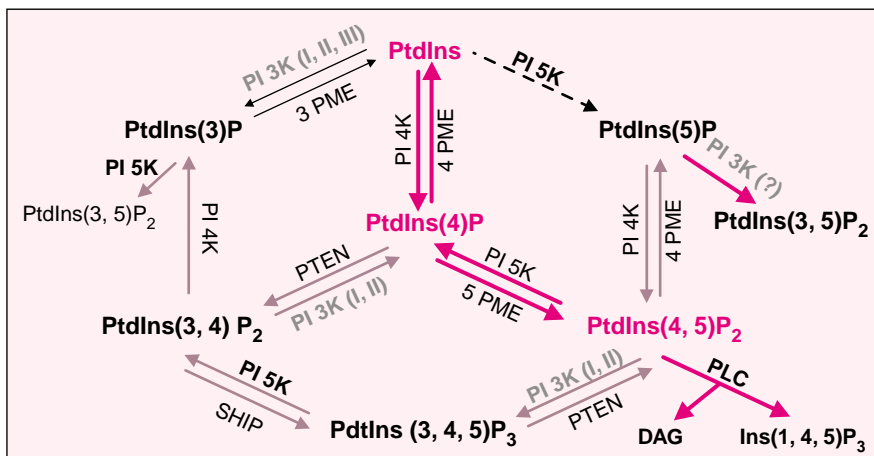


Figure 3. Le métabolisme des phospho-inositides. Les 8 phospho-inositides identifiés à ce jour et les principales enzymes capables de les métaboliser sont indiqués sur cette figure. La voie « canonique » conduisant à la synthèse de PtdIns(4,5)P₂, le substrat préférentiel des PLC, est notée en rouge. L'action concertée des kinases et des phosphatases règle les interconversions complexes entre les divers phosphoinositides. La spécificité des trois classes de PI 3-kinases (I,II,III) vis-à-vis de leurs substrats est indiquée. (PI K : phosphoinositide kinase ; PtdIns : phosphatidylinositol ; PME : phosphomonoestérase ; PLC : phospholipase C ; Ins(1,4,5)P₃ : inositol trisphosphate ; SHIP : SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase ; DAG : diacylglycérol)

[telle que SHIP1 (SH2 domain containing inositol 5-phosphatase)] potentiellement contrôlée par l'engagement des intégrines [26, 27]; (2) inhibition d'une PtdIns(3,4)P₂ 4-phosphatase [42] ou (3) activation d'une PI 3-kinase de type II produisant du PtdIns(3)P phosphorylé par une PtdIns(3)P 4-kinase [43].

En traitant les plaquettes par deux inhibiteurs de PI 3-kinase (wortmannine et LY294002), Kovacovics *et al.* [33] ont, les premiers, suggéré qu'une PI 3-kinase était impliquée dans le contrôle de l'agrégation irréversible induite par le peptide agoniste du récepteur de la thrombine. Nous avons également observé un parallélisme entre la production de PtdIns(3,4)P₂ et l'intensité de l'agrégation de plaquettes stimulées par la thrombine [22]. Cependant, ces résultats ne permettaient pas de savoir si l'accumulation de ce phospho-inositide était la cause ou la conséquence de l'agrégation irréversible. En ajoutant les inhibiteurs de PI 3-kinase après deux minutes de stimulation par le peptide agoniste du récepteur de la thrombine, alors que l'agrégation a atteint son amplitude maximale et que le taux de PtdIns(3,4)P₂ est maximal, nous avons observé une chute très rapide

et totale du taux de PtdIns(3,4)P₂, suivie du mécanisme de désagrégation [33]. Il est important de noter qu'après deux minutes de stimulation par le peptide agoniste du récepteur de la thrombine, le PtdIns(3,4,5)P₃, dont la production est transitoire, a déjà retrouvé un niveau basal, ce qui suggère fortement que l'accumulation de PtdIns(3,4)P₂ est spécifiquement responsable du maintien de l'agrégation irréversible. Nos résultats indiquent également que l'accumulation de ce phospho-inositide est due à l'activation soutenue d'une PI 3-kinase plutôt qu'à l'inhibition de son hydrolyse. La désagrégation induite par l'inhibition de PI 3-kinase s'accompagne d'une déstabilisation rapide des complexes de signalisation associés au cytosquelette. Parmi les protéines structurales, nous avons observé un détachement rapide et spécifique de la chaîne lourde de myosine (MHC) [34].

Le PtdIns(3,4)P₂ est donc au centre d'une boucle de régulation positive puisqu'un certain niveau d'engagement d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ est nécessaire à son accumulation et qu'il joue ensuite un rôle important dans l'agrégation irréversible et la maturation des zones d'adhérence focale, potentiellement par l'intermédiaire de la stabilisation

du complexe d'actomyosine (figure 2). La phosphorylation de la chaîne légère de myosine et la polymérisation de l'actine ne sont pas affectées significativement par l'inhibition des PI 3-kinases dans des plaquettes stimulées par le TRAP. En revanche, la persistance de l'association de la MHC avec le cytosquelette est fortement inhibée. La contractilité de l'actomyosine pourrait jouer un rôle important pour obtenir un certain niveau de regroupement des intégrines et la formation d'adhérences focales mûres indispensables à l'agrégation irréversible.

Implication de protéines membranaires associées aux intégrines

La liaison du fibrinogène à $\alpha_{IIb}\beta_3$ est un événement indispensable à la signalisation *outside-in*; cependant, il apparaît de plus en plus clairement qu'il n'est pas suffisant pour obtenir la totalité des réponses cellulaires observées en aval de l'engagement des intégrines. Récemment, il a été montré que les intégrines étaient capables de former des complexes avec d'autres récepteurs membranaires au sein d'une même cellule [44]. Ces partenaires peuvent fortement influencer sur la signalisation des intégrines, ce qui représente un domaine d'étude particulièrement intéressant. L'une des protéines physiquement associées à $\alpha_{IIb}\beta_3$, appelée IAP (*integrin-associated protein*) ou CD47 [44], est un récepteur pour la partie carboxy-terminale de la thrombospondine-1, une molécule adhésive sécrétée en abondance par les plaquettes [46]. IAP est constituée d'une partie extracellulaire composée d'un domaine analogue aux immunoglobulines, impliqué dans l'interaction non covalente avec l'intégrine, de cinq domaines transmembranaires et d'une courte partie intracellulaire. Le nombre de molécules d'IAP est comparable à celui d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les plaquettes humaines suggérant que la plupart des molécules d'IAP sont associées à $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans ce modèle. De plus, la thrombospondine peut interagir avec le fibrinogène lié à l'intégrine, ce qui pourrait favoriser le regroupement entre IAP et $\alpha_{IIb}\beta_3$. Enfin, il est intéressant de noter qu'IAP est couplée de façon fonctionnelle à la protéine

G hétérotrimérique Gi [47] et peut, par ce biais, participer à régler l'affinité d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ pour son ligand [48]. De manière générale, d'autres protéines transmembranaires sont associées aux intégrines telles que les syndécans, les tétraspanes ou la cavéoline [44]. Ces partenaires, en dehors de leur rôle dans la modulation de la signalisation *inside-out* ou *outside-in*, pourraient intervenir dans la localisation des intégrines. Dans ce contexte, certaines intégrines et glycoprotéines associées (IAP, récepteur de l'urokinase) ont été récemment localisées dans les microdomaines membranaires enrichis en sphingolipides et cholestérol couramment appelés *rafts* ou DIG (*detergent insoluble glycolipid enriched domains*) [49, 50]. Plusieurs protéines telles que des protéines G hétérotrimériques ou des tyrosine kinases de la famille Src sont également enrichies dans les *rafts* et pourraient donc participer à l'initiation de cascades de signalisation dépendantes des intégrines ou de protéines membranaires associées [49, 51]. Ainsi, l'implication de ces microdomaines membranaires dans la formation des modules de signalisation constitués autour des intégrines est suggérée et constitue un champ d'investigation particulièrement intéressant.

Conclusions et perspectives

Les plaquettes représentent un modèle de choix pour l'étude des mécanismes complexes de signalisation liés aux intégrines. L'utilisation de plaquettes de souris déficientes en protéines potentiellement impliquées dans ces mécanismes devrait apporter un certain nombre de données essentielles dans un avenir proche. Par exemple, l'utilisation de souris déficientes en SHIP1 nous a permis très récemment de confirmer le rôle de cette inositol 5-phosphatase dans la production de PtdIns(3,4)P₂ et donc sa participation probable au maintien de l'agrégation irréversible. Du fait de son rôle clé, $\alpha_{IIb}\beta_3$ est une cible pharmacologique intéressante dans le traitement des thromboses. Un anticorps de souris humanisé, abciximab (*Réopro*), inhibiteur de la liaison du fibrinogène sur $\alpha_{IIb}\beta_3$ est utilisé chez des patients avant angioplastie coronaire et son utilisation s'intègre

aujourd'hui plus largement encore dans une stratégie de traitement médical des syndromes coronariens aigus. D'autres antagonistes de $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont aussi utilisés actuellement en clinique, notamment des peptides qui se lient compétitivement au site de reconnaissance RGD (par exemple l'heptapeptide cyclique, eptifibatide, *Integrilin*, possédant une séquence KGD) et des pseudopeptides qui miment les caractéristiques de géométrie et de charges de la séquence RGD (par exemple le tirofiban, *Aggrastat*). Gageons qu'une connaissance plus précise des mécanismes de signalisations *inside-out* et *outside-in* d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ mettra à jour de nouvelles cibles pharmacologiques permettant de moduler l'agrégation irréversible plutôt que de l'inhiber totalement. Dans ce contexte, les protéines impliquées dans les voies de signalisation contrôlant l'agrégation irréversible, telles que la voie PI 3-kinase, sont des cibles potentielles pour de futures stratégies thérapeutiques à visée antithrombotique ■

RÉFÉRENCES

- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91: 2645-57.
- Parise LV. Integrin α_{IIb}/β_3 signaling in platelet adhesion and aggregation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 597-601.
- Hato T, Pampori N, Shattil ST. Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Cell Biol* 1998; 141: 1685-95.
- Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem* 1987; 262: 992-1000.
- Shattil SJ, Cunningham M, Wiedmer T, Zhao J, Sims PJ, Brass LF. Regulation of glycoprotein IIb-IIIa receptor function studied with platelets permeabilized by the pore-forming complement proteins C5b-9. *J Biol Chem* 1992; 267: 18424-31.
- Van Willigen G, Hers I, Gorter G, Akkerman JWN. Exposure of ligand-binding sites on platelet integrin α_{IIb}/β_3 by phosphorylation of the β_3 subunit. *Biochem J* 1996; 314: 769-79.
- Gratacap MP, Payrastre B, Viala C, Mauco G, Plantavid M, Chap H. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C- γ_2 is an early key event in Fc γ RIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem* 1998; 273: 24314-21.
- Pasquet JM, Bobe R, Gross B, et al. A collagen-related peptide regulates phospholipase C- γ_2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets. *Biochem J* 1999; 342: 171-7.
- Hillery CA, Smyth SS, Parise LV. Phosphorylation of human platelet glycoprotein IIIa (GpIIIa). Dissociation from fibrinogen receptor activation and phosphorylation of GPIIIa *in vitro*. *J Biol Chem* 1991; 266: 14663-9.
- Chen YP, Djaffar I, Pidard D, et al. Ser-752 \rightarrow Pro mutation in the cytoplasmic domain of integrin β_3 subunit and defective activation of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glycoprotein IIb-IIIa) in a variant of Glanzmann thrombastenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10169-73.
- Lerea KM, Cordero KP, Sakariassen KS, Kirk RI, Fried VA. Phosphorylation sites in the integrin β_3 cytoplasmic domain in intact platelets. *J Biol Chem* 1999; 274: 1914-9.
- Kashiwagi H, Schwartz MA, Eigenthaler M, Davis KA, Ginsberg MH, Shattil SJ. Affinity modulation of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ by β_3 -endonexin, a selective binding partner of the β_3 integrin cytoplasmic tail. *J Cell Biol* 1997; 137: 1433-43.
- Bennett JS, Zigmond S, Vilaire G, Cunningham ME, Bednar B. The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin for fibrinogen. *J Biol Chem* 1999; 274: 25301-7.
- Fox JE, Shattil SJ, Kinlough-Rathbone R, Richardson M, Packham MA, Sanan DA. The platelet cytoskeleton stabilizes interactions between α_{IIb}/β_3 and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin. *J Biol Chem* 1996; 271: 7004-11.
- Honoré N, Olofsson B, Tavittian A. Participation de la cascade des gènes *Rho* à la régulation du cytosquelette: rôle possible dans les mécanismes d'oncogenèse. *Med Sci* 1995; 11: 1551-6.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509-14.
- Leng L, Kashiwagi H, Ren XD, Shattil SJ. RhoA and the function of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Blood* 1998; 91: 4206-15.
- Hartwig J, Bokoch G, Carpenter CL, et al. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 1995; 82: 643-53.
- Eigenthaler M, Walter U. Signal transduction and cyclic nucleotides in human platelets. *Thromb Haemorrh Disorders* 1994; 8: 41-5.
- Van Willigen G, Akkerman JWN. Protein kinase C and cyclic AMP regulate reversible exposure of binding sites for fibrinogen on the glycoprotein IIb-IIIa complex of human platelets. *Biochem J* 1991; 273: 115-20.
- Miranti CK, Leng L, Maschberger P, Brugge JS, Shattil SJ. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* 1998; 8: 1289-99.
- Guinebault C, Payrastre B, Racaud-Sultan C, et al. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 α with actin filaments and focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1995; 129: 831-42.

RÉFÉRENCES

23. Grondin P, Plantavid M, Sultan C, Breton M, Mauco G, Chap H. Interaction of pp60c-src, phospholipase C, inositol-lipid, and diacylglycerol kinases with the cytoskeletons of thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1991; 266: 15705-9.
24. Laffargue M, Monnereau L, Tuech J, et al. Integrin-dependent tyrosine phosphorylation and cytoskeletal translocation of Tec in thrombin-stimulated platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 247-51.
25. Laffargue M, Ragab-Thomas J, Ragab A, et al. Phosphoinositide 3-kinase and integrin signalling are involved in activation of Bruton Tyrosine Kinase in thrombin-stimulated platelets. *FEBS Lett* 1999; 443: 66-70.
26. Giuriato S, Payrastré B, Drayer AL, et al. Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. *J Biol Chem* 1997; 272: 26857-63.
27. Giuriato S, Bodin S, Erneux C, et al. pp60c-src associates with the SH2-containing inositol-5-phosphatase SHIP1 and is involved in its tyrosine phosphorylation downstream of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in human platelets. *Biochem J* 2000; 348: 107-12.
28. Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in $\alpha_{IIb}\beta_3$ signalling and platelet function. *Nature* 1999; 401: 808-11.
29. Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR. Outside-in signal transduction: $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GpIIb-IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem* 1996; 271: 10811-5.
30. Schaffner-Reckinger E, Gouon V, Melchior C, Plancon S, Kieffer N. Distinct involvement of beta3 integrin cytoplasmic domain tyrosine residues in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signalling. *J Biol Chem* 1998; 273: 12623-32.
31. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signaling transduction pathways. The road taken. *Science* 1995; 268: 233-9.
32. Chen HC, Guan JL. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 26329-34.
33. Kovacovics TJ, Bachelot C, Toker A, et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation. *J Biol Chem* 1995; 270: 11358-66.
34. Trumel C, Payrastré B, Plantavid M, et al. A key role of ADP in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1 activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 1999; 94: 4156-65.
35. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997; 387: 673-6.
36. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 267-72.
37. Rittenhouse SE. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood* 1996; 88: 4401-14.
38. Sorisky A, King WG, Rittenhouse SE. Accumulation of PtdIns(3,4)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃ in thrombin-stimulated platelets: Different sensitivities to Ca²⁺ or functional integrin. *Biochem J* 1992; 286: 581-4.
39. Sultan C, Breton M, Mauco G, Grondin P, Plantavid M, Chap H. The novel inositol lipid phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate is produced by human platelets upon thrombin stimulation. *Biochem J* 1990; 269: 831-4.
40. Sultan C, Plantavid M, Bachelot C, et al. Involvement of platelet glycoprotein IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) in thrombin-induced synthesis of phosphatidylinositol 3'-4'-bisphosphate. *J Biol Chem* 1991; 266: 23554-7.
41. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 1998; 273: 2024-9.
42. Norris FA, Atkins RC, Majerus PW. Inositol polyphosphate 4-phosphatase is inactivated by calpain-mediated proteolysis in stimulated human platelets. *J Biol Chem* 1997; 272: 10987-9.
43. Zhang J, Banfic H, Straforini F, Tosi L, Volinia S, Rittenhouse SE. A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. *J Biol Chem* 1998; 273: 14081-4.
44. Porter JC, Hogg N. Integrin take partners, cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 390-6.
45. Lindberg FP, Gresham HD, Schwartz E, Brown EJ. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol* 1993; 123: 485-96.
46. Gao AG, Lindberg FP, Finn MB, Blystone SD, Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem* 1996; 271: 21-4.
47. Frazier WA, Gao AG, Dimitry J, et al. The thrombospondin receptor Integrin-associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric Gi. *J Biol Chem* 1999; 274: 8554-60.
48. Chung J, Gao AG, Frazier WA. Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem* 1997; 272: 14740-6.
49. Green JM, Zhelesnyak A, Chung J, et al. Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving $\alpha_v\beta_3$ integrin-associated protein (CD47), and Heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* 1999; 146: 673-82.
50. Harder T, Simons K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 534-42.
51. Chapman HA, Ying W, Simon DI, Waltz DA. Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signaling. *Thromb Haemost* 1999; 82: 291-7.

* GLOSSAIRE *

TRAP: thrombin receptor agonist peptide.
ADP: adenosine diphosphate.
TSP-1: thrombospondine-1.
IAP: integrin associated protein.
PTB: phosphotyrosine binding.
PtdIns: phosphatidylinositol.
PI 3-kinase: phospho-inositide 3-kinase.
PLC: phospholipase C.
ILK: integrin-linked-kinase.
FAK: focal adhesion kinase.
MHC: myosin heavy chain.
SHIP: SH2 domain containing inositol 5-phosphatase.
DIG: detergent insoluble glycolipid enriched domains.

Summary

Integrins and signal transduction: illustration with the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin in platelets

The platelet specific integrin, $\alpha_{IIb}\beta_3$, is largely prominent amongst the adhesion receptors (80 000 copies per platelet) and is essential for platelet aggregation. In resting platelets, $\alpha_{IIb}\beta_3$ is normally in a low activation state, unable to interact with soluble fibrinogen. Stimulation of platelets with various agonists will induce a conformational change of $\alpha_{IIb}\beta_3$ (« inside-out signalling ») which is then able to bind soluble fibrinogen resulting in the onset of platelet aggregation. A complex signalling pathway triggered by integrin ligation and clustering (« outside-in signalling ») will regulate the extent of irreversible platelet aggregation and clot retraction. Amongst the signalling enzymes activated downstream of $\alpha_{IIb}\beta_3$ engagement, a phosphoinositide 3-kinase plays an important role in the control of the irreversible phase of aggregation. Its product, PtdIns(3,4)P₂, appears as a central player in a positive feed-back loop. Indeed, a certain level of integrin engagement is required for its production and, in turn, this lipid influences the strengthening and the irreversibility of aggregation through the stabilisation of the actomyosin complexes. The metabolic pathways leading to the integrin-dependent accumulation of PtdIns(3,4)P₂ and the $\alpha_{IIb}\beta_3$ associated proteins that may regulate the irreversibility platelet aggregation are also discussed in this review.