

Les anti-plaquettaires sans risque de saignement : nouvelles cibles et stratégies

Mathieu Schaff¹, Christian Gachet² et Pierre Henri Mangin²

¹ Atherothrombosis and Vascular Biology Laboratory, Baker IDI Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australie

² UMR_S949, INSERM, Etablissement Français du Sang (EFS)-Alsace, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Auteur correspondant : Pierre Henri Mangin, pierre.mangin@efs.sante.fr

Reçu le 4 août 2015

Résumé – Les médicaments anti-plaquettaires comme l'aspirine, le clopidogrel et les antagonistes de l'intégrine α I**IIb** β 3 ont permis de réduire grandement la morbidité et la mortalité associées à la thrombose artérielle. Une limite majeure de ces agents est qu'ils augmentent le risque de saignement. Au cours des dernières années, plusieurs stratégies anti-thrombotiques innovantes, qui ne prolongeraient pas le temps de saignement, ont été proposées. Ces approches ciblent l'interaction entre la glycoprotéine (GP) VI et le collagène ou l'axe GPIb/facteur de von Willebrand, le récepteur PAR-1 de la thrombine, la forme activée d' α I**IIb** β 3 ou le récepteur P2Y₁ de l'ADP. Si un antagoniste de PAR-1 a récemment été commercialisé, les preuves cliniques de l'efficacité et de la sûreté des autres agents restent encore à établir. Cette revue examine ces nouvelles approches anti-plaquettaires potentiellement plus sûres.

Mots clés : Hémostase / thrombose artérielle / accident vasculaire cérébral / plaquettes sanguines / thérapies anti-thrombotiques

Abstract – Anti-platelets without a bleeding risk: novel targets and strategies.

Anti-platelet agents such as aspirin, clopidogrel and antagonists of integrin α I**IIb** β 3 allowed to efficiently reduce morbidity and mortality associated with arterial thrombosis. A major limit of these drugs is that they increase the risk of bleeding. During the last few years, several innovative anti-thrombotic strategies with a potentially low bleeding risk were proposed. These approaches target the collagen receptor glycoprotein (GP) VI, the GPIb/von Willebrand factor axis, the thrombin receptor PAR-1, the activated form of integrin α I**IIb** β 3 or the ADP receptor P2Y₁. While an antagonist of PAR-1 was recently marketed, the clinical proofs of the efficiency and safety of the other agents remain to be established. This review evaluates these new anti-platelet approaches toward safer anti-thrombotic therapies.

Key words: Hemostasis / arterial thrombosis / stroke / blood platelets / anti-thrombotic therapies

Abréviations

ADP	Adénosine 5'-diphosphate	PAR	<i>Protease-activated receptor</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
CYR61	<i>Cysteine-rich protein 61</i>	PLC	Phospholipase C
Fab	<i>Antigen-binding fragment</i>	RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
FW	Facteur de von Willebrand	scFv	<i>Single-chain antibody</i>
GP	Glycoprotéine	TxA2	Thromboxane A2

Introduction

Les plaquettes sanguines jouent un rôle majeur dans l'hémostase, qui représente l'ensemble des processus physiologiques permettant d'aboutir à la prévention des hémorragies spontanées et à l'arrêt du saignement résultant d'une brèche vasculaire (Versteeg *et al.*, 2013; Berndt *et al.*, 2014). L'adhérence des plaquettes repose principalement sur la glycoprotéine (GP) Ib-V-IX, qui interagit avec le facteur de von Willebrand (FW), et les intégrines, notamment $\alpha\text{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$ qui se lient respectivement au fibrinogène, au collagène et à la laminine de la paroi vasculaire (Versteeg *et al.*, 2013; Berndt *et al.*, 2014). L'engagement de ces récepteurs induit des signaux intracellulaires initiant l'activation des plaquettes, qui est renforcée par l'interaction entre le collagène et la GPVI et par des agonistes solubles produits par les plaquettes activées tels que l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), le thromboxane A2 (TxA2), ainsi que de la thrombine générée à proximité du site de lésion (Ruggeri, 2002). Ceci conduit à l'augmentation de l'affinité de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ pour le fibrinogène plasmatique, permettant l'agrégation des plaquettes en un clou hémostatique colmatant la brèche vasculaire (Versteeg *et al.*, 2013; Berndt *et al.*, 2014).

Les plaquettes jouent également un rôle clef dans la thrombose artérielle. Celle-ci survient le plus souvent dans des artères malades touchées par l'athérosclérose, un processus inflammatoire dégénératif chronique caractérisé par un épaississement de la paroi vasculaire et évoluant vers la formation de plaques athéromateuses (Libby, 2002). Ces plaques comprennent un noyau lipidique riche en cholestérol et en cellules spumeuses, entouré d'une chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses et de collagène. La croissance de certaines plaques conduit à un rétrécissement progressif de la lumière vasculaire appelé sténose. À un stade avancé, un déséquilibre entre un contenu lipidique trop important et une enveloppe fibreuse fine entraîne la fragilisation des plaques. Ces plaques dites évoluées sont sujettes à l'érosion ou à la rupture, conduisant à l'exposition d'un matériel hautement réactif pour les plaquettes incluant notamment des quantités élevées de collagène (Ruggeri, 2002). Ceci provoque une agrégation massive des plaquettes, qui peuvent former un thrombus occlusif, entraînant alors une ischémie tissulaire. La thrombose artérielle est responsable de l'infarctus du myocarde et de l'accident vasculaire ischémique cérébral, aujourd'hui premières causes de morbidité et de mortalité dans le monde (WHO, 2013; GBD, 2015).

Les plaquettes jouant un rôle clef dans la thrombose artérielle, elles représentent des cibles thérapeutiques majeures. Actuellement, trois grands

types de médicaments anti-plaquettaires sont utilisés en clinique (figure 1) (Gachet, 2015). Les deux premiers, l'aspirine et les antagonistes du récepteur P2Y₁₂, ciblent les deux plus importantes boucles amplificatrices de l'activation. L'aspirine inhibe la cyclo-oxygénase-1, bloquant ainsi la production de TxA2 (Patrono *et al.*, 2005). Les anti-P2Y₁₂ comme le clopidogrel, le prasugrel et le ticagrelor inhibent le récepteur P2Y₁₂ de l'ADP (Gachet, 2006). Ces médicaments ont une efficacité reconnue et sont utilisés à la fois en situation aiguë et à titre préventif pour diminuer les récurrences de thrombose (Ferreiro & Angiolillo, 2012). Le principal inconvénient de l'aspirine est son effet anti-thrombotique limité (Patrono *et al.*, 2005). Les anti-P2Y₁₂ sont plus efficaces, mais ils augmentent significativement le risque hémorragique (Jackson & Schoenwaelder, 2003; Gachet, 2006). Actuellement, la combinaison clopidogrel/aspirine constitue le traitement de référence des syndromes coronariens aigus et des patients subissant une intervention transluminale percutanée comme l'angioplastie avec pose de stent (Yousuf and Bhatt, 2011; Ferreiro & Angiolillo, 2012; Ferri *et al.*, 2013; Gachet, 2015). La troisième grande catégorie d'anti-plaquettaires, les antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (abciximab, eptifibatide, tirofiban), inhibent directement l'agrégation en empêchant la liaison du fibrinogène aux plaquettes activées (Armstrong & Peter, 2012). Les anti- $\alpha\text{IIb}\beta_3$ sont très efficaces, mais induisent un fort risque d'accident hémorragique, empêchant leur utilisation en traitement chronique. Actuellement, leur emploi est limité à certains sous-groupes de patients à haut risque thrombotique (Yousuf & Bhatt, 2011; Armstrong & Peter, 2012).

Les anti-plaquettaires actuels ont prouvé leur efficacité et, combinés à la chirurgie et aux mesures hygiéno-diététiques comme la lutte antitabac, ont contribué à une réduction remarquable de la morbi-mortalité d'origine cardiovasculaire dans les pays développés (WHO, 2013; GBD, 2015). En France, on estime ainsi qu'entre 1995 et 2005 l'amélioration des traitements a permis de diminuer de moitié la mortalité par infarctus du myocarde (Danchin *et al.*, 2007). Cette baisse, également observée dans d'autres pays occidentaux (Muller-Nordhorn *et al.*, 2008), se poursuivrait depuis à un rythme de 5 % par an environ (Wagner *et al.*, 2011). Au contraire, les pays en développement ont été confrontés à une forte augmentation des cas de thrombose artérielle, ce qui explique pourquoi cette maladie reste la première cause de mortalité dans le monde avec plus de 14 millions de décès par an (WHO, 2013; GBD, 2015). Elle est également devenue une menace économique majeure, occasionnant d'importantes dépenses de santé et pertes de productivité pour un coût global annuel estimé à 700 milliards d'euros (Bloom *et al.*, 2011).

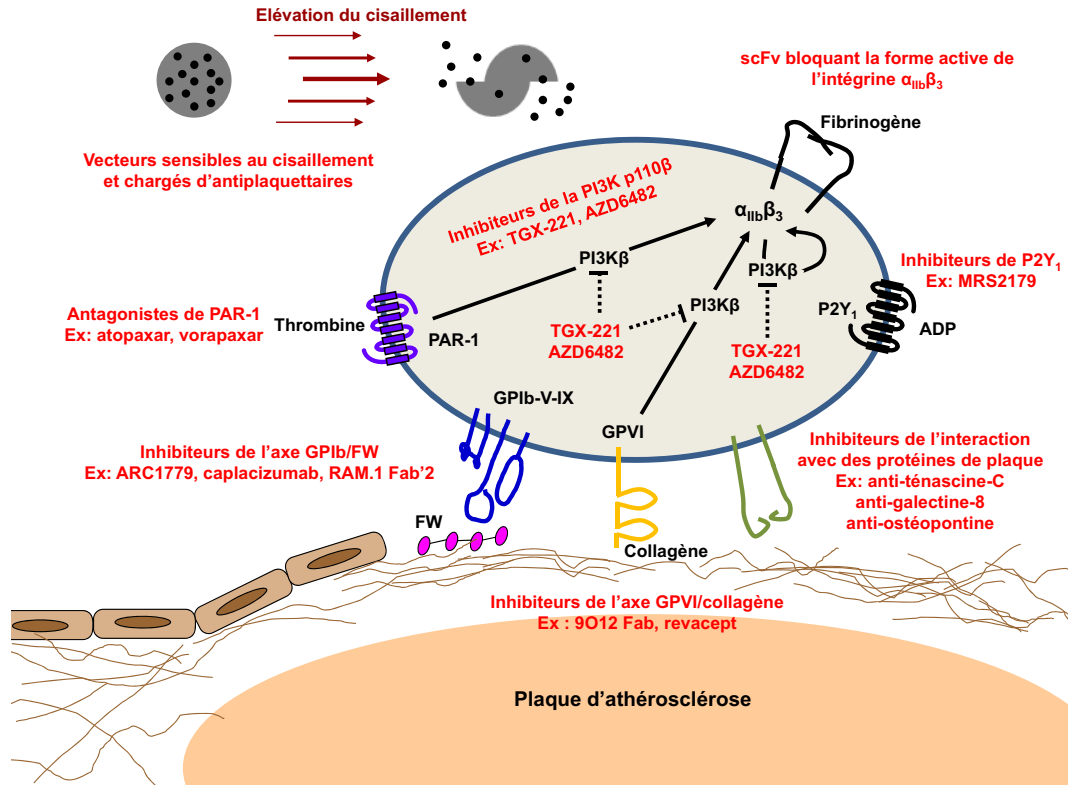


Fig. 1. Représentation schématique du mode d'action des nouvelles stratégies antiplaquettaires. GP, glycoprotéine; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PAR-1, « *protease-activated receptor-1* »; scFv, « *single-chain antibody* »; FW, facteur de von Willebrand.

Les prévisions actuelles indiquent que, d'ici 2030, plus de 23 millions de personnes mourront d'un infarctus du myocarde ou d'un accident vasculaire cérébral chaque année, pour un coût économique de plus de 850 milliards d'euros (Bloom *et al.*, 2011; Mendis *et al.*, 2011). Relever ce défi nécessitera d'importantes avancées internationales pour améliorer les politiques de prévention primaire, les systèmes de santé et, surtout, les traitements.

1 Le risque hémorragique iatrogène : un problème clinique majeur

Tous les agents anti-plaquettaires actuellement utilisés en clinique augmentent le risque hémorragique (Yousuf & Bhatt, 2011). Les saignements sont généralement mineurs (Ex. hématurie, hématomène, épistaxis) mais peuvent être beaucoup plus graves, avec parfois une issue fatale, lorsqu'ils sont intracrâniens ou rétropéritonéaux (Serebruany *et al.*, 2004; VIDAL, 2012). Une méta-analyse incluant 51 essais de supériorité chez 338191 patients traités pour syndromes ischémiques a montré que 1,7 % des patients sous aspirine, 2,1 % sous clopidogrel et

3,6 % sous anti- α IIb/3 avaient souffert de saignements majeurs (Serebruany *et al.*, 2004). Avec la bithérapie clopidogrel/aspirine, ce taux est porté à 4,5 % (Eusébio *et al.*, 2010). Par ailleurs, des études rétrospectives récentes ont révélé qu'en pratique réelle, l'incidence des saignements majeurs pouvait être jusqu'à quatre fois supérieure à celle observée dans les essais cliniques (Eusébio *et al.*, 2010).

Avec les médicaments actuels, la balance entre un risque hémorragique réduit et un bénéfice anti-thrombotique appréciable peut être délicate à trouver, particulièrement chez les patients âgés, de faible poids, diabétiques ou insuffisants rénaux (Basra *et al.*, 2011; Chassot *et al.*, 2012). En prévention primaire, le rapport bénéfice/risque n'est pas suffisamment favorable pour préconiser la généralisation des anti-plaquettaires (Yousuf & Bhatt, 2011). En prévention secondaire après un infarctus cérébral, le risque d'hémorragies intracrâniennes graves est dangereusement élevé, et seule l'aspirine, éventuellement combinée au dipyridamole, un vasodilatateur, est recommandée (Choi & Kermode, 2011). Le cas des patients sous anti-plaquettaires qui doivent subir une intervention chirurgicale ou endoscopique est fréquent et complexe. La crainte d'hémorragies excessives,

particulièrement en neurochirurgie, conduit souvent à interrompre temporairement les anti-plaquettaires, ce qui expose le patient à un risque accru d'évènements ischémiques (Haute Autorité de Santé, 2011; Chassot *et al.*, 2012). Un dilemme similaire se pose lors d'une revascularisation par pontage ou endartériectomie, car les antiplaquettaires comme le clopidogrel majorent les saignements graves, qui peuvent aller jusqu'à nécessiter une ré-opération (Sharpe *et al.*, 2010; Trachiotis, 2010; Baracchini *et al.*, 2011; Chassot *et al.*, 2012). En l'absence de consensus, il revient aux chirurgiens d'individualiser précisément chaque risque avant de choisir.

2 Nouvelles cibles anti-plaquettaires

2.1 La forme activée de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, qui est le récepteur plaquettaire le plus abondant, est principalement exprimée dans la lignée mégacaryocytaire. Chaque plaquette contient environ 80 000 copies en surface ainsi que 30 000 supplémentaires sur les membranes du système canaliculaire ouvert et des granules α , qui sont exposées après activation (Wagner *et al.*, 1996). L' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ reconnaît plusieurs protéines possédant une séquence RGD comme le fibrinogène, le FW, la fibronectine et la vitronectine (Varga-Szabo *et al.*, 2008). En conditions de flux faible, cette intégrine participe au recrutement des plaquettes au site de lésion en liant le fibrinogène présent dans le sous-endothélium (Savage *et al.*, 1996). De plus, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ interagit avec le FW adsorbé aux fibres de collagène, permettant de ralentir le roulement des plaquettes sur cette surface (Savage *et al.*, 1998). La fonction principale d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est de lier le fibrinogène plasmatique, dont la nature dimérique permet le pontage et l'agrégation des plaquettes. Ce processus nécessite l'activation préalable de l'intégrine par une signalisation dite « *inside-out* » (Varga-Szabo *et al.*, 2008). L'engagement puis le regroupement des intégrines induit une signalisation « *outside-in* », qui est importante pour la stabilisation des agrégats et joue un rôle critique en hémostase et thrombose (Law *et al.*, 1999; Goschnick *et al.*, 2006; Valiyaveetil *et al.*, 2007; Takizawa *et al.*, 2010).

L'importance physiologique d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est attestée par une maladie hémorragique, la thrombasthénie de Glanzmann, qui résulte de l'absence ou la non fonctionnalité de ce récepteur et se caractérise par l'incapacité des plaquettes à s'agréger (Nurden, 2006). De plus, l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est la cible d'une classe de médicaments anti-thrombotiques très efficaces, qui sont utilisés principalement en situation aiguë lors d'un infarctus du myocarde (Yousuf & Bhatt, 2011).

Les antagonistes d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ inhibent directement l'agrégation en empêchant la liaison du fibrinogène,

de la fibrine et du FW aux plaquettes activées (Mackman, 2008; Michelson, 2010). Les trois principales molécules utilisées en clinique sont l'abciximab (ReoPro[®]), composé du fragment Fab (*Antigen-binding*) recombinant d'un anticorps monoclonal murin humanisé (c7E3), l'eptifibatide (Integrilin[®]), un heptapeptide cyclique contenant une séquence KGD, et le tirofiban (Aggrastat[®]), une petite molécule non peptidique dérivée de la tyrosine (Bhatt & Topol, 2003). Ces médicaments doivent être administrés par voie intraveineuse et sont par conséquent réservés à l'usage hospitalier (VIDAL, 2012). Les anti- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sont préconisés dans la prise en charge des syndromes coronariens aigus et des patients subissant une intervention coronarienne percutanée (VIDAL, 2012; Sabbah & Lacotte, 2011; Yousuf & Bhatt, 2011). Leur principale limite est qu'ils induisent un fort risque hémorragique, empêchant notamment leur utilisation en traitement chronique (Yousuf & Bhatt, 2011). Une thrombopénie est par ailleurs observée chez 3 à 4 % des patients sous abciximab (Le Beller & Alhenc-Gelas, 2004). Le développement d'anti- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ actifs par voie orale a été abandonné en raison d'un effet paradoxal activateur des plaquettes augmentant le taux de mortalité (Bhatt & Topol, 2003). En conclusion, si le ciblage d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ réduit la survenue d'évènements ischémiques, son utilisation est principalement limitée aux patients subissant une intervention coronarienne percutanée et elle provoque des incidents hémorragiques dont certains peuvent être fatals.

Il a été proposé que ce n'est pas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ qui constitue une cible anti-thrombotique peu sûre mais que c'est la stratégie de ciblage qui n'est pas optimale. Le groupe de Barry Coller a ainsi développé deux nouveaux antagonistes d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ qui sont administrables par voie intramusculaire et dépourvus d'un effet paradoxal activateur des plaquettes (Li *et al.*, 2014). Cependant, bien que ces petites molécules aient démontré une efficacité anti-thrombotique chez la souris, leur effet sur le temps de saignement n'a pas été évalué (Li *et al.*, 2014). Une autre stratégie originale a été proposée par le groupe de Karlheinz Peter, qui consiste à cibler cette intégrine exclusivement dans sa conformation active (Schwarz *et al.*, 2006; Armstrong & Peter, 2012). Cette équipe a développé un fragment scFv (*Single-chain antibody*) d'un anticorps bloquant qui reconnaît seulement la forme activée d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, c'est-à-dire la forme qui lie le fibrinogène (Schwarz *et al.*, 2004; Eisenhardt *et al.*, 2007). Elle a pu montrer que cet agent inhibe la thrombose expérimentale chez la souris sans prolonger le temps de saignement (Schwarz *et al.*, 2006). À ce jour, ce scFv a été humanisé, mais n'a pas encore été évalué chez l'Homme (Schwarz *et al.*, 2004; Eisenhardt *et al.*, 2007). Il peut également être conjugué à d'autres agents anti-thrombotiques pour cibler spécifiquement le thrombus

et donc inhiber localement le processus thrombotique. Il a notamment été montré que ce scFv couplé à l'ADPase CD39, à un anti-coagulant ou à l'activateur tissulaire du plasminogène permet de réduire significativement une thrombose localisée ou de lyser le thrombus (Stoll *et al.*, 2007; Hohmann *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). L'avantage de cette stratégie est que les doses administrées sont théoriquement inférieures aux doses pleinement actives et permettent donc de limiter l'impact sur le processus hémostatique.

2.2 Les récepteurs de la thrombine : PAR (Protease Activated Receptors)

2.2.1 Généralités sur les PAR

La thrombine est une protéase qui joue un rôle clef dans la coagulation et représente également l'agoniste plaquettaire le plus puissant (Coughlin, 2005). De fortes concentrations de thrombine sont retrouvées au niveau des plaques d'athérosclérose avancées (Kalz *et al.*, 2014), suggérant qu'une meilleure efficacité anti-thrombotique pourrait être obtenue en combinant le clopidogrel et l'aspirine avec un inhibiteur de la thrombine comme l'héparine (Coughlin, 2005; Bonaca *et al.*, 2009). Cependant, cette stratégie a été associée à de graves problèmes de saignement et de ce fait comporte un indice thérapeutique très étroit (Coughlin, 2005; Bonaca *et al.*, 2009). Le ciblage des récepteurs de la thrombine a été vu comme une alternative potentiellement plus sûre car bloquant l'activation des plaquettes par la thrombine tout en épargnant l'action de cette dernière sur la coagulation (Coughlin, 2005; Ferreiro & Angiolillo, 2012). La thrombine active les plaquettes *via* sa liaison aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de la famille PAR. Les plaquettes humaines et de primates non humains expriment les sous-types PAR-1 et PAR-4, alors que les plaquettes de souris expriment PAR-3 et PAR-4 (Coughlin, 2005). Les plaquettes possèdent 1500 à 2000 copies de chaque PAR (Molino *et al.*, 1997). PAR-1 est un récepteur de forte affinité, qui induit l'activation plaquettaire en réponse aux faibles concentrations de thrombine, tandis que PAR-4 y contribue seulement aux fortes concentrations (Coughlin, 2005). PAR-3 fonctionne comme un corécepteur, qui facilite l'activation de PAR-4 en augmentant la concentration locale de thrombine. La thrombine possède un mode d'action particulier : en clivant l'extrémité N-terminale extracellulaire de PAR-1 et -4, elle démasque des sites au niveau de la nouvelle extrémité, qui se replie et joue le rôle d'auto-agoniste (Coughlin, 2005). PAR-1 et -4 sont couplés à des protéines des familles Gq et G12, qui activent la phospholipase C (PLC) γ , des phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) et des petites protéines G de type Rho et Ras (Shock *et al.*, 1997; Coughlin, 2005; Angiolillo

et al., 2010; Gratacap *et al.*, 2011). Il a été proposé que PAR-1 est également couplé à une protéine Gi inhibant l'adénylate cyclase (Angiolillo *et al.*, 2010). Cette signalisation complexe explique les nombreux effets de la thrombine : contraction et changement de forme des plaquettes, sécrétion du contenu des granules, synthèse de TxA2, activation des intégrines et exposition des phospholipides pro-coagulants (Coughlin, 2005; Angiolillo *et al.*, 2010). Les PAR ne peuvent être activés qu'une seule fois, après quoi ils sont rapidement endocytés puis dégradés dans les lysosomes (Coughlin, 2005).

2.2.2 Le rôle des PAR en thrombose artérielle et intérêt de leur ciblage

Les souris déficientes pour le gène de PAR-3 ou -4 présentent une augmentation marquée du temps de saignement et sont protégées contre la thrombose artérielle dans plusieurs modèles (Sambrano *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2004; Vandendries *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012). L'inhibition de PAR-1 chez des primates non humains a mis en évidence le fait que ce récepteur joue un rôle critique en thrombose artérielle (Cook *et al.*, 1995; Derian *et al.*, 2003; Chintala *et al.*, 2008, 2010). En revanche, son rôle apparaît mineur en hémostase, probablement parce que PAR-4 est toujours fonctionnel, ce qui suggère qu'il pourrait constituer une cible potentiellement sûre (Cook *et al.*, 1995; Derian *et al.*, 2003; Chintala *et al.*, 2008). Chez l'animal, différents antagonistes réversibles de PAR-1 comme le vorapaxar et l'atopaxar inhibent la thrombose artérielle sans prolonger le temps de saignement (Cook *et al.*, 1995; Derian *et al.*, 2003; Chintala *et al.*, 2008, 2010; Kogushi *et al.*, 2011). Des études de phase I ont confirmé que le vorapaxar et l'atopaxar ne compromettent pas l'hémostase (Serebruany *et al.*, 2009; Kosoglou *et al.*, 2012). Associé à la bithérapie clopidogrel/aspirine chez des patients subissant une intervention coronarienne percutanée, le vorapaxar a permis de réduire davantage la survenue d'infarctus du myocarde et de décès, sans aggraver le risque hémorragique (Becker *et al.*, 2009; Goto *et al.*, 2010b). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'atopaxar (Goto *et al.*, 2010a; O'Donoghue *et al.*, 2011; Wiviott *et al.*, 2011). Deux études de phase III ont été engagées afin d'évaluer le bénéfice de la trithérapie clopidogrel/aspirine/vorapaxar dans le traitement des syndromes coronariens aigus (Harrington *et al.*, 2009) et en prévention secondaire (Morrow *et al.*, 2009). Récemment, ces essais ont en partie été interrompus en raison d'une augmentation importante des saignements intracrâniens, particulièrement chez les patients ayant un antécédent d'ischémie cérébrale (Merck, 2012; Scirica *et al.*, 2012; Tricoci *et al.*, 2012).

Cependant, chez les patients sans antécédent d'accident vasculaire cérébral le vorapaxar a entraîné une baisse de 19 % du risque relatif de mortalité ou d'événements ischémiques récurrents (Scirica *et al.*, 2012). Ceci a mené la FDA (*Food and Drug Administration*) et l'EMA (*European Medicines Agency*) à approuver son utilisation (Zontivity[®]) pour des patients à risque élevé souffrant d'infarctus du myocarde et/ou nécessitant une intervention percutanée coronarienne, à condition qu'ils ne présentent pas d'antécédent d'accident vasculaire cérébral. En conclusion, si le traitement par vorapaxar semble réduire la survenue d'événements ischémiques, son utilisation s'accompagne d'un risque hémorragique accru. Cette approche ne présente donc pas les caractéristiques d'un anti-plaquettaire plus sûr en comparaison avec les molécules utilisées en clinique.

2.3 Le complexe GPIb-V-IX

2.3.1 Généralités sur le complexe GPIb-V-IX

Le complexe GPIb-V-IX, qui appartient à la superfamille des protéines riches en leucine, est exclusivement exprimé dans les plaquettes et les mégacaryocytes (Lanza *et al.*, 2008). C'est un récepteur multimérique constitué de quatre types de glycoprotéines transmembranaires de type I : la GPIb α (135 kDa), liée par des ponts disulfures à deux sous-unités GPIb β (24 kDa) pour former la GPIb, qui s'associe de manière non covalente à la GPIX (20 kDa) et à la GPV (82 kDa). La stoechiométrie du complexe est respectivement de 2:4:2:1 avec 25000 copies de GPIb-IX pour environ 12000 copies de GPV (Bergmeier & Hynes, 2012). Le complexe GPIb-V-IX est le principal récepteur du FW, dont la fonction est d'assurer le recrutement des plaquettes circulantes, particulièrement en conditions de flux élevé. Le recrutement peut se faire au niveau du sous-endothélium lésé, initiant l'adhérence des plaquettes (Savage *et al.*, 1996) ou à la surface d'une plaquette activée, permettant ainsi la croissance du thrombus (Kulkarni *et al.*, 2000). Les sites de liaison pour le FW sont localisés sur la portion N-terminale de la GPIb α . La GPIb α interagit également avec la thrombospondine-1, la thrombine, les facteurs de coagulation XI et XII, le kininogène de haut poids moléculaire, la P-sélectine et l'intégrine leucocytaire α M β 2, suggérant un rôle du complexe GPIb-V-IX dans la coagulation et l'inflammation (Lanza *et al.*, 2008).

Au niveau intracellulaire, la sous-unité GPIb α du complexe GPIb-V-IX interagit avec la filamine A qui assure le lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine. Ce pontage est important pour l'expression du complexe à la surface des plaquettes

et son ancrage membranaire (Lanza *et al.*, 2008). D'autres partenaires directs ont été identifiés dont la calmoduline (Andrews *et al.*, 2001) et plusieurs isoformes de la protéine adaptatrice 14-3-3 (Mangin *et al.*, 2009). La liaison du FW déclenche une signalisation impliquant des tyrosine kinases de la famille Src et la PLC de type γ 2, ce qui mène à la mobilisation des stocks internes de calcium, à l'activation de l'intégrine α IIB β 3 et au changement de forme des plaquettes, qui se contractent et émettent des filopodes (Mangin *et al.*, 2003). L'importance de cette signalisation *in vivo* n'est pas connue. Le complexe GPIb-V-IX promeut également l'activité procoagulante des plaquettes par un mécanisme mal connu qui semble indépendant du domaine extracellulaire de la GPIb α (Ravanat *et al.*, 2010).

L'importance physiologique du complexe est soulignée par l'existence d'une maladie hémorragique rare, le syndrome de Bernard-Soulier, qui est la conséquence d'une absence d'expression ou d'une anomalie fonctionnelle de l'une des sous-unités du complexe GPIb-IX (Lanza, 2006). Cette maladie se traduit par une thrombopénie, des plaquettes géantes et un prolongement du temps de saignement.

2.3.2 Le rôle du complexe GPIb-V-IX en thrombose artérielle et ciblage de l'axe GPIb α /FW

Le rôle clef du complexe GPIb-V-IX en thrombose artérielle, notamment lié à sa capacité à lier le FW, est clairement établi. D'une part, des études génétiques réalisées chez l'homme ont révélé un risque accru de thrombose chez les porteurs de certains variants asymptomatiques de GPIb α dotés d'une meilleure affinité pour le FW (Di Paola *et al.*, 2005; Matsubara *et al.*, 2005). D'autre part, des souris invalidées pour une sous-unité du complexe, et qui n'expriment pas GPIb-V-IX à leur surface, ou des souris transgéniques qui expriment un complexe pour lequel le domaine extracellulaire de la GPIb α a été remplacé par celui du récepteur de l'interleukine 4, présentent un défaut majeur dans plusieurs modèles expérimentaux de thrombose artérielle (Bergmeier *et al.*, 2006; Konstantinides *et al.*, 2006; Strassel *et al.*, 2007).

L'intérêt d'une stratégie anti-thrombotique ciblant l'axe GPIb α /FW s'appuie sur plusieurs études pharmacologiques. Des agents ciblant la région N-terminale de la GPIb α , comme le fragment recombinant du FW, VCL, un peptide dérivé du venin de serpent, ou le Fab de l'anticorps bloquant 6B4 inhibent efficacement la thrombose expérimentale sans prolonger le temps de saignement chez le cobaye et chez le babouin (Azzam *et al.*, 1995; Kageyama *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2002; Wadanoli *et al.*, 2007; Ulrichs *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2014). Par ailleurs, des Fabs comme

AjvW-2 ou des oligonucléotides synthétiques bloquant le site de liaison A1 de la GPIb α au niveau du FW, ont montré une efficacité anti-thrombotique dans des modèles expérimentaux chez la souris, le chien et le babouin (Azzam *et al.*, 1995; Kageyama *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2002; Wadanoli *et al.*, 2007; Ulrichs *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2014). De plus, AjvW-2 ne prolonge pas le temps de saignement chez le chien et le cobaye, contrairement à un antagoniste de l'intégrine α Ib β 3 (Kageyama *et al.*, 1997). Un deuxième avantage du ciblage de l'axe GPIb α /FW par rapport aux anti-plaquettaires actuels réside dans son efficacité dans des modèles d'accident vasculaire cérébral. En effet, des souris traitées par des agents bloquant la GPIb α avant ou après avoir subi une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne, présentent une diminution significative de la survenue de régions infarctées au niveau cérébral (Kleinschnitz *et al.*, 2007; Momi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Surtout, les auteurs ont montré que ce traitement ne s'accompagnait pas d'hémorragies intracrâniennes (Kleinschnitz *et al.*, 2007; Momi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Plus récemment, il a été décrit que le blocage de l'interaction GPIb α /FW par l'acide aurin tricarboxylique, permettait de dissoudre une thrombose occlusive induite par le FeCl $_3$ au niveau de l'artère cérébrale moyenne (Le Behot *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats indique que le ciblage de l'axe GPIb α /FW permettrait de traiter la thrombose artérielle avec un risque hémorragique moins important que les antagonistes d' α Ib β 3.

À l'heure actuelle, très peu d'essais cliniques ont été menés pour évaluer l'impact du ciblage de l'axe GPIb α /FW sur le risque hémorragique et son intérêt en thrombose artérielle. Seuls deux agents ciblant le domaine A1 du FW ont été évalués chez l'homme à savoir un aptamère, l'ARC1779 (Diener *et al.*, 2009), et le caplacizumab (ALX-0081), qui est un « *nanobody* » composé d'un fragment d'anticorps comprenant une seule région variable (Ulrichs *et al.*, 2011). Des études de phase I ont montré que ces agents ne prolongent que modérément le temps de saignement (Gilbert *et al.*, 2007; Bartunek *et al.*, 2008, 2010). Dans un essai de phase II, l'ARC1779 a réduit la fréquence des embolies cérébrales après endartériectomie carotidienne, mais deux tiers des patients souffraient de complications hémorragiques contre aucun pour le placebo (Markus *et al.*, 2011). Le caplacizumab, pour sa part, entraîne un risque de saignement comparable à la trithérapie clopidogrel/aspirine/abciximab lorsqu'il est associé à la bithérapie clopidogrel/aspirine chez des patients subissant une intervention coronarienne percutanée (seul ce critère a été évalué) (Ablynx, 2011). L'ensemble de ces données suggèrent que le blocage de l'axe GPIb α /FW permettrait de prévenir ou de réduire ef-

ficacement un thrombus artériel, mais qu'une telle approche pourrait entraîner un risque hémorragique.

2.3.3 Le ciblage de la sous-unité GPIb β du complexe GPIb-V-IX

Une étude réalisée dans notre laboratoire avait montré que RAM.1, un anticorps monoclonal de rat ciblant la partie extracellulaire de la GPIb β humaine et de souris, inhibe l'adhérence plaquettaire au FW en conditions de flux (Perrault *et al.*, 2001, 2003). D'autre part, nous avons montré que RAM.1 inhibe la signalisation en aval du complexe GPIb-V-IX ainsi que la génération de thrombine en réponse au collagène et au facteur tissulaire (Maurer *et al.*, 2013). RAM.1 diminue également la formation de thrombus *in vitro* après perfusion de sang sur du collagène, particulièrement en conditions de flux pathologiques (Maurer *et al.*, 2013). Enfin, nous avons démontré que des fragments Fab'2 de RAM.1 inhibent la thrombose artérielle produite mécaniquement ou par un laser, sans prolonger le temps de saignement, suggérant que cet anticorps n'impacte pas l'hémostase (Maurer *et al.*, 2013). Ces données indiquent que le ciblage de GPIb β pourrait prévenir la croissance excessive des thrombi avec un effet potentiellement mineur sur le risque de saignement. Ceci devra être évalué dans des essais cliniques de phase I et II chez l'Homme.

2.4 La GPVI

2.4.1 La GPVI est un récepteur d'adhérence et d'activation des plaquettes

La GPVI est une glycoprotéine de 58 kDa exprimée spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire à raison de 3000 à 5000 copies par plaquette (Best *et al.*, 2003). Elle comporte deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline interagissant avec le collagène fibrillaire. Par sa région transmembranaire, elle s'associe à la chaîne γ des récepteurs Fc (γ RFc), qui est nécessaire à son expression et lui assure une capacité de signalisation (Watson *et al.*, 2005). La GPVI est un récepteur de faible affinité pour le collagène, permettant l'attachement des plaquettes en condition statique (Chen *et al.*, 2002; Jandrot-Perrus *et al.*, 2000). En présence de flux, sa principale fonction est d'induire l'activation d'intégrines dont α 2 β 1 et α Ib β 3 *via* notamment le relargage d'ADP et de TxA $_2$, ce qui conduit à l'adhérence stable, l'étalement et l'agrégation des plaquettes (Nieswandt *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2003; Kuijpers *et al.*, 2003; Sarratt *et al.*, 2005). La GPVI participerait aussi à l'adhérence et à l'activation des plaquettes sur une surface de laminine et de vitronectine (Inoue *et al.*, 2006). Enfin, notre

laboratoire a récemment montré que la GPVI constitue également un récepteur pour la fibrine, assurant le recrutement des plaquettes circulantes à taux de cisaillement élevé, entraînant leur activation et amplifiant la génération de thrombine (Mammadova-Bach *et al.*, 2015).

2.4.2 La GPVI est-elle une cible anti-thrombotique plus sûre ?

Des patients n'exprimant pas de GPVI souffrent d'un syndrome hémorragique modéré, suggérant que cette glycoprotéine ne joue pas un rôle majeur en hémostase (Arthur *et al.*, 2007). Ceci a été confirmé chez la souris par immunodéplétion de la GPVI ou inactivation de son gène, qui ne prolongent pas ou peu le temps de saignement mesuré après section de la queue (Kato *et al.*, 2003; Grüner *et al.*, 2004; Lockyer *et al.*, 2006; Mangin *et al.*, 2006; Kalia *et al.*, 2008). Dans des modèles de thrombose basés sur des lésions de vaisseaux sains, la GPVI joue, selon les études, un rôle important (Massberg *et al.*, 2003; Munnix *et al.*, 2005; Dubois *et al.*, 2006; Kalia *et al.*, 2008; Hechler *et al.*, 2010; Bender *et al.*, 2011) ou très modeste (Dubois *et al.*, 2006; Konstantinides *et al.*, 2006; Mangin *et al.*, 2006; Hechler *et al.*, 2010; Eckly *et al.*, 2011). Ceci s'explique probablement par la quantité de ligands de GPVI qui sont exposés après lésion du vaisseau. Le rôle majeur de la GPVI en thrombose artérielle apparaît plus clairement dans un contexte d'athérosclérose. Le blocage de la GPVI diminue l'agrégation plaquettaire en réponse à un broyat de plaque d'athérosclérose humain dans un agrégomètre ou après perfusion de sang sur du matériel de plaque immobilisé dans une chambre en flux (Penz *et al.*, 2005). Plus récemment, deux équipes de recherche, dont la nôtre, ont montré que la GPVI joue un rôle critique dans des modèles de thrombose sur plaque d'athérosclérose rompue par des ultrasons ou une aiguille (Kuijpers *et al.*, 2009; Hechler & Gachet, 2011a).

Différents agents bloquant la GPVI ont été développés, dont le Fab de l'anticorps 9O12 (Lecut *et al.*, 2003). Ce Fab inhibe l'agrégation des plaquettes humaines au collagène et la formation d'un thrombus dans une chambre en perfusion recouverte de collagène (Lecut *et al.*, 2003, 2004; Ohlmann *et al.*, 2008). Des effets similaires ont été décrits *ex vivo* chez le singe (Ohlmann *et al.*, 2008). Plus récemment, le développement d'une souris transgénique exprimant la GPVI humaine a permis de montrer que le Fab 9O12 produit un effet anti-thrombotique marqué chez la souris sans prolonger le temps de saignement (Mangin *et al.*, 2012). À ce jour, ni le Fab 9O12, ni aucun autre anticorps ciblant la GPVI n'a été évalué chez l'homme. Cependant, des fragments variables simple

chaîne humanisés (hscFv) de 9O12 ont été produits (Muzard *et al.*, 2009) et pourraient être prochainement testés chez l'homme (Zahid *et al.*, 2012). Une autre approche est basée sur une protéine composée de deux domaines extracellulaires de la GPVI humaine fusionnés au fragment Fc d'une IgG (Massberg *et al.*, 2004). *In vitro*, cette « GPVI soluble » se lie au collagène, empêchant son interaction avec la GPVI plaquettaire (Massberg *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2008). Deux études ont apporté la preuve de concept de son effet anti-thrombotique chez la souris (Massberg *et al.*, 2004) et le lapin (Bültmann *et al.*, 2006). À l'inverse, aucune inhibition n'est observée dans d'autres modèles murins (Grüner *et al.*, 2005). Baptisée reva-cept, cette molécule a récemment fait l'objet d'une étude clinique de phase I, qui a montré qu'elle inhibe *ex vivo* l'agrégation plaquettaire au collagène sans prolonger le temps de saignement (Ungerer *et al.*, 2011). En juillet 2012 a débuté un essai de phase II évaluant le bénéfice de la combinaison aspirine/reva-cept dans la réduction du taux d'emboles cérébraux chez des patients subissant une endartériectomie carotidienne (advanceCOR_GmbH, 2012).

2.5 Les récepteurs P2X₁ et P2Y₁

Les plaquettes sanguines expriment trois récepteurs purinergiques, P2Y₁, P2Y₁₂ et P2X₁. Le récepteur P2Y₁₂ est un RCPG activé par l'ADP qui, comme détaillé précédemment, est la cible d'une classe d'agents anti-plaquettaire incluant le clopidogrel et le prasugrel. Bien qu'efficaces et largement utilisés, ces médicaments s'accompagnent d'une augmentation du risque de saignement. De plus, l'importance du P2Y₁₂ en hémostase a été soulignée chez des patients chez lesquels ce récepteur est non fonctionnel et qui présentent un syndrome hémorragique. À la différence du P2Y₁₂, les récepteurs P2X₁ et P2Y₁ pourraient jouer un rôle dans la thrombose mais pas dans l'hémostase (Gachet, 2008).

P2X₁ est un récepteur canal de l'ATP exprimé dans de nombreux tissus. Il est responsable d'un influx rapide de Ca²⁺ et de Na⁺ extracellulaires causant une réponse transitoire et a la particularité d'être très rapidement désensibilisé. Sa stimulation entraîne un changement de forme des plaquettes qui ne s'accompagne pas d'une agrégation. Les souris déficientes pour le gène de P2X₁ ou traitées avec un antagoniste de ce récepteur ont un temps de saignement inchangé mais sont résistantes à la thrombose artérielle dans plusieurs modèles expérimentaux, suggérant qu'il pourrait représenter une cible anti-thrombotique potentiellement intéressante (Hechler *et al.*, 2003; Gachet, 2008).

Le récepteur P2Y₁, qui est retrouvé à la surface des plaquettes, a un profil d'expression particulièrement

large. De nombreux tissus en contiennent dont le cœur, la paroi des vaisseaux sanguins, le système nerveux et les organes reproducteurs (Hechler & Gachet, 2011b). Sur les plaquettes, il est présent à raison d'environ 150 copies et joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse à l'ADP. P2Y₁ est un RCPG couplé à une protéine G_q, responsable de l'activation de la PLC γ et de l'élévation du Ca²⁺ cytosolique. Ceci induit un changement de forme ainsi qu'une agrégation faible et transitoire des plaquettes (Hechler & Gachet, 2011b). P2Y₁ participe également à l'activité pro-coagulante des plaquettes (Leon *et al.*, 2003, 2004) et à leur activation par le collagène (Fabre *et al.*, 1999; Leon *et al.*, 2001; Mangin *et al.*, 2004). Le rôle du P2Y₁ en thrombose expérimentale a été clairement établi. Des souris déficientes pour le P2Y₁ sont protégées dans un modèle de thromboembolisme induit par injection d'un mélange de collagène et d'adrénaline ou de facteur tissulaire (Leon *et al.*, 1999, 2001). L'absence de P2Y₁ ou son blocage par un antagoniste tel que le MRS2179 inhibe également la formation d'un thrombus artériel après lésion d'un vaisseau sain au FeCl₃ ou par un laser, ou au niveau d'une plaque athéromateuse lésée par une aiguille ou des ultrasons (Leon *et al.*, 2001; Lenain *et al.*, 2003; Hechler & Gachet, 2011a). De manière intéressante, l'absence de P2Y₁ ou son blocage ne semblent pas avoir d'effet majeur sur l'hémostase et ne prolongent pas le temps de saignement de souris. Au final, ces résultats suggèrent que le P2Y₁ est une cible potentiellement sûre qui inhiberait efficacement la thrombose artérielle sans entraîner de risque hémorragique. À ce jour, aucun essai clinique évaluant l'effet d'un anti-P2Y₁ n'a été entrepris, ce qui est probablement lié au fait qu'un antagoniste stable n'a pas encore été développé.

2.6 La PI3K p110 β

Les PI3K constituent une famille de lipide kinases qui jouent un rôle clef dans les voies de signalisation de nombreux récepteurs plaquettaires incluant la GPVI, le P2Y₁₂, l'intégrine α IIb β 3 et PAR-1 (Gratacap *et al.*, 2011). Les souris déficientes pour l'isoforme de PI3K p110 β présentent une thrombose expérimentale réduite mais un temps de saignement à la queue normal, suggérant que cette enzyme pourrait être une cible anti-thrombotique (Martin *et al.*, 2010). Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat et le lapin avec un inhibiteur sélectif de la p110 β dénommé TGX-221 (Jackson *et al.*, 2005; Sturgeon *et al.*, 2008; Bird *et al.*, 2011). Cependant, cet agent a nettement augmenté le temps de saignement chez la souris, même à des doses anti-thrombotiques faibles, ce qui pourrait être dû au fait que, chez cette espèce, il affecte d'autres isoformes de la PI3K comme p110 α (Bird *et al.*, 2011). Un autre inhibiteur de la p110 β , AZD6482, qui a

aboli la thrombose chez le chien, a été testé chez des volontaires sains et a démontré une action anti-plaquettaire modérée couplée à une légère prolongation du temps de saignement (Nylander *et al.*, 2012). Cet agent a récemment été optimisé pour améliorer son profil pharmacocinétique et sa sélectivité envers la p110 β , et pourrait être prochainement testé en phase II (Giordanetto *et al.*, 2014).

2.7 Stratégies qui agissent de manière sélective dans les artères athérosclérotiques

L'inflammation et le remodelage tissulaire caractéristiques des plaques d'athérosclérose affectent profondément la composition du sous-endothélium (Libby, 2002). Les plaques d'athérosclérose sont notamment enrichies en cellules immunitaires, en lipides, ainsi qu'en une grande diversité de protéines bien connues pour réagir avec les plaquettes comme le collagène (Katsuda *et al.*, 1992; van Zanten *et al.*, 1994), la laminine (Rauch *et al.*, 2011; Schaff *et al.*, 2013) et la thrombospondine (Jurk *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2008). En outre, les plaques surexpriment fortement plusieurs protéines extracellulaires qui sont principalement absentes de la paroi artérielle saine. Des études *in vitro* ont montré que certaines de ces protéines induisent l'adhérence et l'activation des plaquettes, notamment la ténascine-C (Schaff *et al.*, 2011), la galectine-8 (Romaniuk *et al.*, 2010), l'ostéopontine (Bennett *et al.*, 1997), le CTGF (*Connective tissue growth factor*) et le CYR61 (*Cysteine-rich protein 61*) (Jedsadayamata *et al.*, 1999). Théoriquement, inhiber l'interaction entre les plaquettes et ces protéines pourrait constituer une approche très intéressante parce que l'hémostase serait préservée; cependant, la preuve de concept reste à démontrer chez l'animal.

L'athérosclérose, en plus de modifier la paroi vasculaire, induit des changements majeurs dans le microenvironnement rhéologique. Ainsi, les conditions de cisaillement locales peuvent considérablement augmenter, d'une moyenne d'environ 10 dynes/cm² dans les artères saines telles que les carotides et les coronaires, jusqu'à plus de 1000 dynes/cm² dans les vaisseaux présentant une sténose sévère (Goldsmith & Turitto, 1986; Gay & Zhang, 2008). Ceci peut être exploité afin de concevoir des vecteurs sensibles au cisaillement, qui libèrent des médicaments anti-thrombotiques uniquement dans les zones de sténose, réduisant ainsi les doses nécessaires pour être efficaces et le risque de toxicité (Westein *et al.*, 2013). La preuve de principe a été apportée en utilisant des nanoparticules recouvertes d'un agent fibrinolytique et assemblées en agrégats microscopiques inactifs, qui se désintègrent en présence de cisaillement élevé (Korin *et al.*, 2012). Dans un modèle murin, cet agent a montré une action fibrinolytique marquée et localisée

au niveau du thrombus, avec une activité systémique faible et pas de saignements (Korin *et al.*, 2012). Cette stratégie pourrait être étendue à des nanoparticules conjuguées à des agents anti-plaquettaires comme des antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ou du P2Y₁₂. Une autre approche serait d'encapsuler ces médicaments dans des liposomes sensibles aux forces de cisaillement, qui restent intacts en présence de flux physiologique, mais libèrent leur chargement lorsque le cisaillement augmente (Holme *et al.*, 2012).

Conclusion

L'efficacité des médicaments anti-plaquettaires actuels est incontestable, mais le risque de saignement peut être redoutable. Plusieurs nouvelles stratégies se sont avérées prometteuses dans des modèles animaux, mais celles déjà évaluées en phase II/III ont invariablement entraîné une augmentation des saignements. Ceci pose des questions, notamment sur la façon dont sont conduits les essais cliniques. En particulier, il semble que, chez les patients atteints d'infarctus du myocarde qui reçoivent déjà de l'aspirine et/ou du clopidogrel, des niveaux supplémentaires de protection anti-thrombotique ne peuvent être atteints sans augmenter les saignements. Cependant, ces nouveaux agents pourraient se révéler efficaces en cas d'accident vasculaire cérébral, compte tenu des options thérapeutiques très limitées disponibles. Une autre option, pour laquelle une preuve de concept doit être apportée, repose sur un ciblage plus sélectif de la thrombose artérielle, comme par exemple l'inhibition de l'interaction des plaquettes avec des protéines de plaques d'athérosclérose qui sont absentes de la paroi vasculaire saine. Au final, l'identification d'un agent qui cible sélectivement la thrombose artérielle sans entraver l'hémostase reste un défi majeur.

Remerciements. Mathieu Schaff était soutenu par une subvention de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ; Ref SPE20130326580).

Références

- Ablynx (2011). Ablynx reports phase II data for ALX-0081 in high risk ACS patients undergoing a PCI procedure. Media release Ghent 2011 Nov 10. <http://hugininfo/137912/R/1562875/484367pdf>.
- advanceCOR_GmbH (2012). Revacept in symptomatic carotid stenosis (Revacept/CS/02). Martinsried, Germany. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01645306> Assessed at 28012015.
- Andrews, R.K., Munday, A.D., Mitchell, C.A., and Berndt, M.C. (2001). Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood*, 98, 681-687.
- Angiolillo, D.J., Capodanno, D., and Goto, S. (2010). Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J*, 31, 17-28.
- Armstrong, P.C., and Peter, K. (2012). GPIIb/IIIa inhibitors: from bench to bedside and back to bench again. *Thromb Haemost*, 107, 808-814.
- Arthur, J.F., Dunkley, S., and Andrews, R.K. (2007). Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol*, 139, 363-372.
- Azzam, K., Garfinkel, L.I., Bal dit Sollier, C., Cisse Thiam, M., and Drouet, L. (1995). Antithrombotic effect of a recombinant von Willebrand factor, VCL, on nitrogen laser-induced thrombus formation in guinea pig mesenteric arteries. *Thromb Haemost*, 73, 318-323.
- Baracchini, C., Gruppo, M., Mazzalai, F., Lorenzetti, R., Meneghetti, G., and Ballotta, E. (2011). Predictors of neck bleeding after eversion carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*, 54, 699-705.
- Bartunek, J., Barbato, E., Holz, J.B., Vercruyse, K., Ulrichs, H., AblynxNV., and Heyndrickx, G. (2008). ALX-0081 a novel anti-thrombotic: results of a single-dose phase 1 study in healthy volunteers and further development in patients with stable angina undergoing PCI. Abstracts from American Heart Association Scientific Sessions New Orleans 2008 Nov 8-12. *Circulation*, 118, S_656 Abstract Number 2009.
- Bartunek, J., Barbato, E., Vercruyse, K., Duby, C., Wijns, W., Heyndrickx, G., and Holz, J.B. (2010). Safety and efficacy of anti-von Willebrand factor nanobody ALX-0081 in stable angina patients undergoing percutaneous coronary intervention. Abstracts from American Heart Association Scientific Sessions Chicago 2010 Nov 14-17. *Circulation*, 122, Abstract Number 15084.
- Basra, S.S., Tsai, P., and Lakkis, N.M. (2011). Safety and efficacy of antiplatelet and antithrombotic therapy in acute coronary syndrome patients with chronic kidney disease. *J Am Coll Cardiol*, 58, 2263-2269.
- Becker, R.C., Moliterno, D.J., Jennings, L.K., Pieper, K.S., Pei, J., Niederman, A., Ziada, K.M., Berman, G., Strony, J., Joseph, D., Mahaffey K.W., Van de Werf F., Veltri E., Harrington R.A.; TRA-PCI Investigators. (2009). Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II study. *Lancet*, 373, 919-928.
- Bender, M., Hagedorn, I., and Nieswandt, B. (2011). Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl(3)-induced thrombosis. *J Thromb Haemost*, 9, 1423-1426.
- Bennett, J.S., Chan, C., Vilaire, G., Mousa, S.A., and DeGrado, W.F. (1997). Agonist-activated alphavbeta3 on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *J Biol Chem*, 272, 8137-8140.

- Bergmeier, W., and Hynes, R.O. (2012). Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, pii: a005132.
- Bergmeier, W., Piffath, C.L., Goerge, T., Cifuni, S.M., Ruggeri, Z.M., Ware, J., and Wagner, D.D. (2006). The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 16900-16905.
- Berndt, M.C., Metharom, P., and Andrews, R.K. (2014). Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia*, 20, 15-22.
- Best, D., Senis, Y.A., Jarvis, G.E., Eagleton, H.J., Roberts, D.J., Saito, T., Jung, S.M., Moroi, M., Harrison, P., Green, F.R., and Watson S.P. (2003). GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood*, 102, 2811-2818.
- Bhatt, D.L., and Topol, E.J. (2003). Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 15-28.
- Bird, J.E., Smith, P.L., Bostwick, J.S., Shipkova, P., and Schumacher, W.A. (2011). Bleeding response induced by anti-thrombotic doses of a phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-beta inhibitor in mice. *Thromb Res*, 127, 560-564.
- Bloom, D.E., Cafiero, E.T., Jane-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Bloom, L.R., Fathima, S., Feigl, A.B., Gaziano, T., Mowafi, M., Pandya, A., Prettnner, K., Rosenberg, L., Seligman, B., Stein, A.Z., Weinstein, C. (2011). The Global Economic Burden of Non-communicable Diseases. World Economic Forum, Geneva and Harvard School of Public Health, Boston.
- Bonaca, M.P., Steg, P.G., Feldman, L.J., Canales, J.F., Ferguson, J.J., Wallentin, L., Califf, R.M., Harrington, R.A., and Giugliano, R.P. (2009). Antithrombotics in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 54, 969-984.
- Bültmann, A., Herdeg, C., Li, Z., Munch, G., Baumgartner, C., Langer, H., Kremmer, E., Geisler, T., May, A., Ungerer, M., Gawaz M. (2006). Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation *in vivo*. *Thromb Haemost*, 95, 763-766.
- Chassot, P.G., Spahn, D.R., and Delabays, A. (2012). Précis d'anesthésie cardiaque - Annexe B : antiplaquettaires. Lausanne avril 2012 <http://www.precisdanesthesiecardiaque.ch/Pdf/Annexe%20B%20Antiplaquettaires.pdf>, 71p.
- Chen, H., Locke, D., Liu, Y., Liu, C., and Kahn, M.L. (2002). The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. *J Biol Chem*, 277, 3011-3019.
- Chintala, M., Shimizu, K., Ogawa, M., Yamaguchi, H., Doi, M., and Jensen, P. (2008). Basic and translational research on proteinase-activated receptors: antagonism of the proteinase-activated receptor 1 for thrombin, a novel approach to antiplatelet therapy for atherothrombotic disease. *J Pharmacol Sci*, 108, 433-438.
- Chintala, M., Strony, J., Yang, B., Kurowski, S., and Li, Q. (2010). SCH 602539, a protease-activated receptor-1 antagonist, inhibits thrombosis alone and in combination with cangrelor in a Folts model of arterial thrombosis in cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 2143-2149.
- Choi, J., and Kermode, J.C. (2011). New therapeutic approaches to combat arterial thrombosis: better drugs for old targets, novel targets, and future prospects. *Mol Interv*, 11, 111-123.
- Cook, J.J., Sitko, G.R., Bednar, B., Condra, C., Mellott, M.J., Feng, D.M., Nutt, R.F., Shafer, J.A., Gould, R.J., and Connolly, T.M. (1995). An antibody against the exosite of the cloned thrombin receptor inhibits experimental arterial thrombosis in the African green monkey. *Circulation*, 91, 2961-2971.
- Coughlin, S.R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, 3, 1800-1814.
- Danchin, N., Simon, T., Mulak, G., Bataille, V., Barnay, C., Ferrieres, J., Simoneau, D., Gobillot, C., Vaur, L., Gueret, P., Blanchard, D., and Cambou, J.P. (2007). The french acute ST-elevation myocardial infarction (FAST-MI) registry: major improvement in early and 6-month mortality over the past 10 years and its relation with early use of recommended medications and reperfusion therapy. Abstracts from the American College of Cardiology 56th Annual Scientific Session New Orleans 2007 Mar 24-27, Abstract Number 07-LBCT-354458-ACC.
- Derian, C.K., Damiano, B.P., Addo, M.F., Darrow, A.L., D'Andrea, M.R., Nedelman, M., Zhang, H.C., Maryanoff, B.E., and Andrade-Gordon, P. (2003). Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther*, 304, 855-861.
- Di Paola, J., Jugessur, A., Goldman, T., Reiland, J., Tallman, D., Sayago, C., and Murray, J.C. (2005). Platelet glycoprotein I(b)alpha and integrin alpha2 beta1 polymorphisms: gene frequencies and linkage disequilibrium in a population diversity panel. *J Thromb Haemost*, 3, 1511-1521.
- Diener, J.L., Daniel Lagassé, H.A., Duerschmied, D., Merhi, Y., Tanguay, J.F., Hutabarat, R., Gilbert, J., Wagner, D.D., and Schaub, R. (2009). Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779. *J Thromb Haemost*, 7, 1155-1162.
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B., and Furie, B.C. (2006). Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation *in vivo*. *Blood*, 107, 3902-3906.
- Eckly, A., Hechler, B., Freund, M., Zerr, M., Cazenave, J.P., Lanza, F., Mangin, P.H., and Gachet, C. (2011). Mechanisms underlying FeCl(3)-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*, 9, 779-789.
- Eisenhardt, S.U., Schwarz, M., Bassler, N., and Peter, K. (2007). Subtractive single-chain antibody (scFv)

- phage-display: tailoring phage-display for high specificity against function-specific conformations of cell membrane molecules. *Nat Protoc*, 2, 3063-3073.
- Eusébio, J., Reny, J.L., Fontana, P., and Nendaz, M. (2010). Cardiovascular diseases, antiplatelet agents, anticoagulants and hemorrhagic risk. *Rev Med Suisse*, 6, 1942, 1944-1946, 1948-1950.
- Fabre, J.E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J.A., Audoly, L.P., Coffman, T.M., and Koller, B.H. (1999). Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med*, 5, 1199-1202.
- Ferreiro, J.L., and Angiolillo, D.J. (2012). New directions in antiplatelet therapy. *Circ Cardiovasc Interv*, 5, 433-445.
- Ferri, N., Corsini, A., and Bellosta, S. (2013). Pharmacology of the new P2Y12 receptor inhibitors: insights on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drugs*, 73, 1681-1709.
- Gachet, C. (2006). Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 277-300.
- Gachet, C. (2008). P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*, 99, 466-472.
- Gachet, C. (2015). Antiplatelet drugs: which targets for which treatments? *J Thromb Haemost*, 13, S313-322.
- Gay, M., and Zhang, L.T. (2008). Numerical studies of blood flow in healthy, stenosed, and stented carotid arteries. *Int J Numer Meth Fl*, 61, 453-472.
- GBD (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 385, 117-171.
- Gilbert, J.C., DeFeo-Fraulini, T., Hutabarat, R.M., Horvath, C.J., Merlino, P.G., Marsh, H.N., Healy, J.M., Boufakhreddine, S., Holohan, T.V., and Schaub, R.G. (2007). First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation*, 116, 2678-2686.
- Giordanetto, F., Barlaam, B., Berglund, S., Edman, K., Karlsson, O., Lindberg, J., Nylander, S., and Inghardt, T. (2014). Discovery of 9-(1-phenoxymethyl)-2-morpholino-4-oxo-pyrido[1,2-a]pyrimidine-7-carboxamides as oral PI3Kbeta inhibitors, useful as antiplatelet agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 24, 3936-3943.
- Goldsmith, H.L., and Turitto, V.T. (1986). Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. *ICTH-Report-Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis*, 55, 415-435.
- Goschnick, M.W., Lau, L.M., Wee, J.L., Liu, Y.S., Hogarth, P.M., Robb, L.M., Hickey, M.J., Wright, M.D., and Jackson, D.E. (2006). Impaired "outside-in" integrin alphaIIb beta3 signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice. *Blood*, 108, 1911-1918.
- Goto, S., Ogawa, H., Takeuchi, M., Flather, M.D., and Bhatt, D.L. (2010a). Double-blind, placebo-controlled Phase II studies of the protease-activated receptor 1 antagonist E5555 (atopaxar) in Japanese patients with acute coronary syndrome or high-risk coronary artery disease. *Eur Heart J*, 31, 2601-2613.
- Goto, S., Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Kato, K., Yamaguchi, H., and Jensen, P. (2010b). Safety and exploratory efficacy of the novel thrombin receptor (PAR-1) antagonist SCH530348 for non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *J Atheroscler Thromb*, 17, 156-164.
- Gratacap, M.P., Guillermet-Guibert, J., Martin, V., Chicanne, G., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F., and Payrastre, B. (2011). Regulation and roles of PI3Kbeta, a major actor in platelet signaling and functions. *Adv Enzyme Regul*, 51, 106-116.
- Grüner, S., Prostredna, M., Aktas, B., Moers, A., Schulte, V., Krieg, T., Offermanns, S., Eckes, B., and Nieswandt, B. (2004). Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation*, 110, 2946-2951.
- Grüner, S., Prostredna, M., Koch, M., Miura, Y., Schulte, V., Jung, S.M., Moroi, M., and Nieswandt, B. (2005). Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood*, 105, 1492-1499.
- Hamilton, J.R., Cornelissen, I., and Coughlin, S.R. (2004). Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *J Thromb Haemost*, 2, 1429-1435.
- Harrington, R.A., Van de Werf, F., Armstrong, P.W., Aylward, P., Park, B., Veltri, E., Mahaffey, K.W., Moliterno, D.J., Strony, J., Wallentin, L., White, H.D., Diaz, R., Aylward, P., Huber, K., Van de Werf, F., Nicolau, J.C., Armstrong, P.W., Prieto, J.C., Isaza, D., Widimsky, P., Grande, P., Nieminen, M., Montalescot, G., Bode, C., Wong, L., Ofner, P., Lewis, B.S., Ambrosio, G., Valgimigli, M., Ogawa, H., Yamaguchi, T., Jukema, J.W., Cornel, J.H., White, H.D., Nordrehaug, J.E., Ruzyllo, W., Providencia, L., Tan, H.C., Dalby, A., Seung-Jung, P., Bietri, A., Cequier, A., Held, C., Pfisterer, M., Chen, M.F., Timurkaynak, T., Storey, R.F., Chen, E., Harrington, R.A., Hudson, M.P., Lincoff, A.M., Mahaffey, K.W., Morrow, D.A., Tricoci, P., and Whellan, D. (2009). The Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome (TRA*CER) trial: study design and rationale. *Am Heart J*, 158, 327-334.
- Haute Autorité de Santé (2011). Ensemble, améliorons la prise en charge de l'infarctus du myocarde. Saint-Denis, 02 avril 2009. http://www.has-santefr/portail/jcms/c_765385/infarctus-du-myocarde.
- Hechler, B., and Gachet, C. (2011a). Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thromb Haemost*, 105 Suppl 1, S3-12.
- Hechler, B., and Gachet, C. (2011b). P2 receptors and platelet function. *Purinergic signalling*, 7, 293-303.

- Hechler, B., Lenain, N., Marchese, P., Vial, C., Heim, V., Freund, M., Cazenave, J.P., Cattaneo, M., Ruggeri, Z.M., Evans, R., and Gachet C. (2003). A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med*, 198, 661-667.
- Hechler, B., Nonne, C., Eckly, A., Magnenat, S., Rinckel, J.Y., Denis, C.V., Freund, M., Cazenave, J.P., Lanza, F., and Gachet, C. (2010). Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost*, 8, 173-184.
- Hohmann, J.D., Wang, X., Krajewski, S., Selan, C., Haller, C.A., Straub, A., Chaikof, E.L., Nandurkar, H.H., Hagemeyer, C.E., and Peter, K. (2013). Delayed targeting of CD39 to activated platelet GPIIb/IIIa via a single-chain antibody: breaking the link between antithrombotic potency and bleeding? *Blood*, 121, 3067-3075.
- Holme, M.N., Fedotenko, I.A., Abegg, D., Althaus, J., Babel, L., Favarger, F., Reiter, R., Tanasescu, R., Zaffalon, P.L., Ziegler, A., Müller B., Saxer T., and Zumbuehl A. (2012). Shear-stress sensitive lenticular vesicles for targeted drug delivery. *Nat Nanotechnol*, 7, 536-543.
- Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., McCarty, O.J., Moroi, M., Ruggeri, Z.M., Kunicki, T.J., Ozaki, Y., and Watson, S.P. (2006). Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood*, 107, 1405-1412.
- Jackson, S.P., and Schoenwaelder, S.M. (2003). Antiplatelet therapy: in search of the "magic bullet". *Nat Rev Drug Discov*, 2, 775-789.
- Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., Goncalves, I., Nesbitt, W.S., Yap, C.L., Wright, C.E., Kenche, V., Anderson, K.E., Dopheide, S.M., Yuan, Y., Sturgeon S.A., Prabakaran, H., Thompson, P.E., Smith, G.D., Shepherd, P.R., Daniele, N., Kulkarni, S., Abbott, B., Saylik, D., Jones, C., Lu, L., Giuliano, S., Hughan, S.C., Angus, J.A., Robertson, A.D., and Salem, H.H. (2005). PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med*, 11, 507-514.
- Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A.H., Xiong, X., Debili, N., Chickerling, T., Le Couedic, J.P., Goodearl, A., Dussault, B., Fraser, C., Vainchenker W, and Villeval JL. (2000). Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood*, 96, 1798-1807.
- Jedsadayamata, A., Chen, C.C., Kireeva, M.L., Lau, L.F., and Lam, S.C. (1999). Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem*, 274, 24321-24327.
- Jurk, K., Clemetson, K.J., de Groot, P.G., Brodde, M.F., Steiner, M., Savion, N., Varon, D., Sixma, J.J., Van Aken, H., and Kehrel, B.E. (2003). Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb J*, 17, 1490-1492.
- Kageyama, S., Yamamoto, H., Nagano, M., Arisaka, H., Kayahara, T., and Yoshimoto, R. (1997). Anti-thrombotic effects and bleeding risk of AJvW-2, a monoclonal antibody against human von Willebrand factor. *Br J Pharmacol*, 122, 165-171.
- Kalia, N., Auger, J.M., Atkinson, B., and Watson, S.P. (2008). Critical role of FcR gamma-chain, LAT, PLCgamma2 and thrombin in arteriolar thrombus formation upon mild, laser-induced endothelial injury in vivo. *Microcirculation*, 15, 325-335.
- Kalz, J., ten Cate, H., and Spronk, H.M. (2014). Thrombin generation and atherosclerosis. *J Thromb Thrombolysis*, 37, 45-55.
- Kato, K., Kanaji, T., Russell, S., Kunicki, T.J., Furihata, K., Kanaji, S., Marchese, P., Reininger, A., Ruggeri, Z.M., and Ware, J. (2003). The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*, 102, 1701-1707.
- Katsuda, S., Okada, Y., Minamoto, T., Oda, Y., Matsui, Y., and Nakanishi, I. (1992). Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb*, 12, 494-502.
- Kleinschnitz, C., Pozgajova, M., Pham, M., Bendszus, M., Nieswandt, B., and Stoll, G. (2007). Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation*, 115, 2323-2330.
- Kogushi, M., Matsuoka, T., Kawata, T., Kuramochi, H., Kawaguchi, S., Murakami, K., Hiyoshi, H., Suzuki, S., Kawahara, T., Kajiwara, A., and Hishinuma I. (2011). The novel and orally active thrombin receptor antagonist E5555 (Atopaxar) inhibits arterial thrombosis without affecting bleeding time in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*, 657, 131-137.
- Konstantinides, S., Ware, J., Marchese, P., Almus-Jacobs, F., Loskutoff, D.J., and Ruggeri, Z.M. (2006). Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalpha and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*, 4, 2014-2021.
- Korin, N., Kanapathipillai, M., Matthews, B.D., Crescente, M., Brill, A., Mammoto, T., Ghosh, K., Jurek, S., Bencherif, S.A., Bhatta, D., Coskun, A.U., Feldman, C.L., Wagner, D.D. and Ingber, D.E. (2012). Shear-activated nanotherapeutics for drug targeting to obstructed blood vessels. *Science*, 337, 738-742.
- Kosoglou, T., Reyderman, L., Tiessen, R.G., van Vliet, A.A., Fales, R.R., Keller, R., Yang, B., and Cutler, D.L. (2012). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the novel PAR-1 antagonist vorapaxar (formerly SCH 530348) in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*, 68, 249-258.
- Kuijpers, M.J., Gilio, K., Reitsma, S., Nergiz-Unal, R., Prinzen, L., Heeneman, S., Lutgens, E., van Zandvoort, M.A., Nieswandt, B., Egbrink, M.G., and Heemskerck J.W. (2009). Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely

- ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *J Thromb Haemost*, 7, 152-161.
- Kuijpers, M.J., Schulte, V., Bergmeier, W., Lindhout, T., Brakebusch, C., Offermanns, S., Fassler, R., Heemskerk, J.W., and Nieswandt, B. (2003). Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *FASEB J*, 17, 685-687.
- Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Yap, C.L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K.A., Street, A., Harper, I.S., Lanza, F., and Jackson, S.P. (2000). A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*, 105, 783-791.
- Lanza, F. (2006). Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic parous thrombocytopenic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis*, 1, 46.
- Lanza, F., Gachet, C., Tovo, D., and Mangin, P. (2008). Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire. *Hématologie*, 14, 1-12.
- Law, D.A., DeGuzman, F.R., Heiser, P., Ministri-Madrid, K., Killeen, N., and Phillips, D.R. (1999). Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature*, 401, 808-811.
- Le Behot, A., Gauberti, M., Martinez De Lizarrondo, S., Montagne, A., Lemarchand, E., Repesse, Y., Guillou, S., Denis, C.V., Maubert, E., Orset, C., and Vivien D. (2014). GpIb alpha-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice. *Blood*, 123, 3354-3363.
- Le Beller, C., and Alhenc-Gelas, M. (2004). Thrombopénies induites par les antagonistes du complexe GPIIb/IIIa plaquettaire administrés par voie injectable (Anti-GPIIb/IIIa-induced thrombocytopenia). *Hématologie*, 10, 14-23.
- Lecut, C., Feeney, L.A., Kingsbury, G., Hopkins, J., Lanza, F., Gachet, C., Villeval, J.L., and Jandrot-Perrus, M. (2003). Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments. *J Thromb Haemost*, 1, 2653-2662.
- Lecut, C., Arocas, V., Ulrichs, H., Elbaz, A., Villeval, J.L., Lacapere, J.J., Deckmyn, H., and Jandrot-Perrus, M. (2004). Identification of residues within human glycoprotein VI involved in the binding to collagen: evidence for the existence of distinct binding sites. *J Biol Chem*, 279, 52293-52299.
- Lee, H., Sturgeon, S., Mountford, J., Jackson, S., and Hamilton, J. (2012). Safety and efficacy of targeting platelet proteinase-activated receptors in combination with existing anti-platelet drugs as antithrombotics in mice. *Br J Pharmacol*, 166, 2188-2197.
- Lei, X., Reheman, A., Hou, Y., Zhou, H., Wang, Y., Marshall, A.H., Liang, C., Dai, X., Li, B.X., Vanhoorelbeke, K., and Ni H. (2014). Anfibatide, a novel GPIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation *in vitro* and *in vivo* in murine models of thrombosis. *Thromb Haemost*, 111, 279-289.
- Lenain, N., Freund, M., Leon, C., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (2003). Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J Thromb Haemost*, 1, 1144-1149.
- Leon, C., Alex, M., Klocke, A., Morgenstern, E., Moosbauer, C., Eckly, A., Spannagl, M., Gachet, C., and Engelmann, B. (2004). Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood*, 103, 594-600.
- Leon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (1999). Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest*, 104, 1731-1737.
- Leon, C., Freund, M., Ravanat, C., Baurand, A., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (2001). Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation*, 103, 718-723.
- Leon, C., Ravanat, C., Freund, M., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (2003). Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1941-1947.
- Li, J., Vootukuri, S., Shang, Y., Negri, A., Jiang, J.K., Nedelman, M., Diacovo, T.G., Filizola, M., Thomas, C.J., and Collier, B.S. (2014). RUC-4: a novel alphaIIb beta3 antagonist for prehospital therapy of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 2321-2329.
- Li, T.T., Fan, M.L., Hou, S.X., Li, X.Y., Barry, D.M., Jin, H., Luo, S.Y., Kong, F., Liu, L.K., Dai, X.R., Zhang G.H., and Zhou L.L. (2015). A novel snake-venom derived GPIb antagonist, anfibatide, protects mice from acute experimental ischemic stroke and reperfusion injury. *Br J Pharmacol*, 172, 3904-3916.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, 868-874.
- Lockyer, S., Okuyama, K., Begum, S., Le, S., Sun, B., Watanabe, T., Matsumoto, Y., Yoshitake, M., Kambayashi, J., and Tandon, N.N. (2006). GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb Res*, 118, 371-380.
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451, 914-918.
- Mammadova-Bach, E., Ollivier, V., Loyau, S., Schaff, M., Dumont, B., Favier, R., Freyburger, G., Latger-Cannard, V., Nieswandt, B., Gachet, C., Mangin P.H., and Jandrot-Perrus M. (2015). Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*, 126, 683-691.
- Mangin, P., Yuan, Y., Goncalves, I., Eckly, A., Freund, M., Cazenave, J.P., Gachet, C., Jackson, S.P., and Lanza, F. (2003). Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway

- distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *J Biol Chem*, 278, 32880-32891.
- Mangin, P., Ohlmann, P., Eckly, A., Cazenave, J.P., Lanza, F., and Gachet, C. (2004). The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *J Thromb Haemost*, 2, 969-977.
- Mangin, P., Yap, C.L., Nonne, C., Sturgeon, S.A., Goncalves, I., Yuan, Y., Schoenwaelder, S.M., Wright, C.E., Lanza, F., and Jackson, S.P. (2006). Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood*, 107, 4346-4353.
- Mangin, P.H., Receveur, N., Wurtz, V., David, T., Gachet, C., and Lanza, F. (2009). Identification of five novel 14-3-3 isoforms interacting with the GPIb-IX complex in platelets. *J Thromb Haemost*, 7, 1550-1555.
- Mangin, P.H., Tang, C., Bourdon, C., Loyau, S., Freund, M., Hechler, B., Gachet, C., and Jandrot-Perrus, M. (2012). A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J Pharmacol Exp Ther*, 341, 156-163.
- Markus, H.S., McCollum, C., Imray, C., Goulder, M.A., Gilbert, J., and King, A. (2011). The von Willebrand inhibitor ARC1779 reduces cerebral embolization after carotid endarterectomy: a randomized trial. *Stroke*, 42, 2149-2153.
- Martin, V., Guillermet-Guibert, J., Chicanne, G., Cabou, C., Jandrot-Perrus, M., Plantavid, M., Vanhaesebroeck, B., Payrastra, B., and Gratacap, M.P. (2010). Deletion of the p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 115, 2008-2013.
- Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhofer, D., Heinzmann, U., and Nieswandt, B. (2003). A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall *in vivo*. *J Exp Med*, 197, 41-49.
- Massberg, S., Konrad, I., Bultmann, A., Schulz, C., Munch, G., Peluso, M., Lorenz, M., Schneider, S., Besta, F., Müller, I., Hu B., Langer H., Kremmer E., Rudelius M., Heinzmann U., Ungerer M., and Gawaz M. (2004). Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall *in vivo*. *FASEB J*, 18, 397-399.
- Matsubara, Y., Murata, M., Hayashi, T., Suzuki, K., Okamura, Y., Handa, M., Ishihara, H., Shibano, T., and Ikeda, Y. (2005). Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions. *Br J Haematol*, 128, 533-539.
- Maurer, E., Tang, C., Schaff, M., Bourdon, C., Receveur, N., Ravanat, C., Eckly, A., Hechler, B., Gachet, C., Lanza, F., and Mangin P.H. (2013). Targeting platelet GPIIb beta reduces platelet adhesion, GPIb signaling and thrombin generation and prevents arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 1221-1229.
- Mendis, S., Puska, P., and Norrving, B. (2011). Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization, Geneva.
- Merck (2012). Data from TRACER study of vorapaxar, Merck's investigational medicine for cardiovascular disease, presented at AHA and published in NEJM. Research & Development news Orlando 2011 Nov 13 <http://www.mercknewsroom.com/press-release/research-development-news/data-tracer-study-vorapaxar-mercks-investigational-medicine->.
- Michelson, A.D. (2010). Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 154-169.
- Molino, M., Bainton, D.F., Hoxie, J.A., Coughlin, S.R., and Brass, L.F. (1997). Thrombin receptors on human platelets. Initial localization and subsequent redistribution during platelet activation. *J Biol Chem*, 272, 6011-6017.
- Momi, S., Tantucci, M., Van Roy, M., Ulrichs, H., Ricci, G., and Gesele, P. (2013). Reperfusion of cerebral artery thrombosis by the GPIb-VWF blockade with the Nanobody ALX-0081 reduces brain infarct size in guinea pigs. *Blood*, 121, 5088-5097.
- Morrow, D.A., Scirica, B.M., Fox, K.A., Berman, G., Strony, J., Veltri, E., Bonaca, M.P., Fish, P., McCabe, C.H., and Braunwald, E. (2009). Evaluation of a novel antiplatelet agent for secondary prevention in patients with a history of atherosclerotic disease: design and rationale for the Thrombin-Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischemic Events (TRA 2 degrees P)-TIMI 50 trial. *Am Heart J*, 158, 335-341 e333.
- Moura, R., Tjwa, M., Vandervoort, P., Van Kerckhoven, S., Holvoet, P., and Hoylaerts, M.F. (2008). Thrombospondin-1 deficiency accelerates atherosclerotic plaque maturation in ApoE -/- mice. *Circ Res*, 103, 1181-1189.
- Muller-Nordhorn, J., Binting, S., Roll, S., and Willich, S.N. (2008). An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. *Eur Heart J*, 29, 1316-1326.
- Munnix, I.C., Strehl, A., Kuijpers, M.J., Auger, J.M., van der Meijden, P.E., van Zandvoort, M.A., oude Egbrink, M.G., Nieswandt, B., and Heemskerk, J.W. (2005). The glycoprotein VI-phospholipase Cgamma2 signaling pathway controls thrombus formation induced by collagen and tissue factor *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 2673-2678.
- Muzard, J., Bouabdelli, M., Zahid, M., Ollivier, V., Lacapere, J.J., Jandrot-Perrus, M., and Billiald, P. (2009). Design and humanization of a murine scFv that blocks human platelet glycoprotein VI *in vitro*. *FEBS J*, 276, 4207-4222.
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J.W., Zirngibl, H., and Fassler, R. (2001). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J*, 20, 2120-2130.

- Nurden, A.T. (2006). Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 10.
- Nylander, S., Kull, B., Bjorkman, J.A., Ulvinge, J.C., Oakes, N., Emanuelsson, B.M., Andersson, M., Skarby, T., Inghardt, T., Fjellstrom, O., and Gustafsson D. (2012). Human target validation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)beta: effects on platelets and insulin sensitivity, using AZD6482 a novel PI3Kbeta inhibitor. *J Thromb Haemost*, 10, 2127-2136.
- O'Donoghue, M.L., Bhatt, D.L., Wiviott, S.D., Goodman, S.G., Fitzgerald, D.J., Angiolillo, D.J., Goto, S., Montalescot, G., Zeymer, U., Aylward, P.E., Guetta V., Ziecina R., Contant C.F., Flather M.D.; LANCELOT-ACS Investigators. (2011). Safety and tolerability of atopaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: the lessons from antagonizing the cellular effects of Thrombin-Acute Coronary Syndromes Trial. *Circulation*, 123, 1843-1853.
- Ohlmann, P., Hechler, B., Ravanat, C., Loyau, S., Herreschmidt, N., Wanert, F., Jandrot-Perrus, M., and Gachet, C. (2008). Ex vivo inhibition of thrombus formation by an anti-glycoprotein VI Fab fragment in non-human primates without modification of glycoprotein VI expression. *J Thromb Haemost*, 6, 1003-1011.
- Patrono, C., Garcia Rodriguez, L.A., Landolfi, R., and Baigent, C. (2005). Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med*, 353, 2373-2383.
- Penz, S., Reininger, A.J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I., Rother, E., Goetz, C., Engelmann, B., Smethurst, P.A., Ouwehand W.H., Farndale R., Nieswandt B., and Siess W. (2005). Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J*, 19, 898-909.
- Perrault, C., Mangin, P., Santer, M., Baas, M.J., Moog, S., Cranmer, S.L., Pikovski, I., Williamson, D., Jackson, S.P., Cazenave, J.P. and Lanza F. (2003). Role of the intracellular domains of GPIb in controlling the adhesive properties of the platelet GPIb/V/IX complex. *Blood*, 101, 3477-3484.
- Perrault, C., Moog, S., Rubinstein, E., Santer, M., Baas, M.J., de la Salle, C., Ravanat, C., Dambach, J., Freund, M., Santoso, S., Cazenave J.P., and Lanza F. (2001). A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIbbeta modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost*, 86, 1238-1248.
- Rauch, U., Saxena, A., Lorkowski, S., Rauterberg, J., Bjorkbacka, H., Durbeej, M., and Hultgardh-Nilsson, A. (2011). Laminin isoforms in atherosclerotic arteries from mice and man. *Histol Histopathol*, 26, 711-724.
- Ravanat, C., Strassel, C., Hechler, B., Schuhler, S., Chicanne, G., Payrastre, B., Gachet, C., and Lanza, F. (2010). A central role of GPIb-IX in the procoagulant function of platelets that is independent of the 45-kDa GPIIbalpha N-terminal extracellular domain. *Blood*, 116, 1157-1164.
- Romaniuk, M.A., Tribulatti, M.V., Cattaneo, V., Laponi, M.J., Molinas, F.C., Campetella, O., and Schattner, M. (2010). Human platelets express and are activated by galectin-8. *Biochem J*, 432, 535-547.
- Ruggeri, Z.M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 8, 1227-1234.
- Sabbah, L., and Lacotte, J. (2011). Préparation au concours de l'internat – module cardiologie vasculaire, Vernazobres-Grego. (Ed.), coll. Médecine, Paris, 424 p.
- Sambrano, G.R., Weiss, E.J., Zheng, Y.W., Huang, W., and Coughlin, S.R. (2001). Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*, 413, 74-78.
- Sarratt, K.L., Chen, H., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Hammer, D.A., and Kahn, M.L. (2005). GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood*, 106, 1268-1277.
- Savage, B., Saldivar, E., and Ruggeri, Z.M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*, 84, 289-297.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F., and Ruggeri, Z.M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*, 94, 657-666.
- Schaff, M., Receveur, N., Bourdon, C., Wurtz, V., Denis, C.V., Orend, G., Gachet, C., Lanza, F., and Mangin, P.H. (2011). Novel function of tenascin-C, a matrix protein relevant to atherosclerosis, in platelet recruitment and activation under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 117-124.
- Schaff, M., Tang, C., Maurer, E., Bourdon, C., Receveur, N., Eckly, A., Hechler, B., Arnold, C., de Arcangelis, A., Nieswandt, B., Denis C.V., Lefebvre O., Georges-Labouesse E., Gachet C., Lanza F., and Mangin P.H. (2013). Integrin alpha6beta1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation*, 128, 541-552.
- Schulz, C., Penz, S., Hoffmann, C., Langer, H., Gillitzer, A., Schneider, S., Brandl, R., Seidl, S., Massberg, S., Pichler, B., Kremmer E., Stellos K., Schönberger T., Siess W., and Gawaz M. (2008). Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession *in vivo*. *Basic Res Cardiol*, 103, 356-367.
- Schwarz, M., Rottgen, P., Takada, Y., Le Gall, F., Knackmuss, S., Bassler, N., Buttner, C., Little, M., Bode, C., and Peter, K. (2004). Single-chain antibodies for the conformation-specific blockade of activated platelet integrin alphaIIb beta3 designed by subtractive selection from naive human phage libraries. *FASEB J*, 18, 1704-1706.
- Schwarz, M., Meade, G., Stoll, P., Ylanne, J., Bassler, N., Chen, Y.C., Hagemeyer, C.E., Ahrens, I., Moran, N., Kenny, D., Fitzgerald D., Bode C., and Peter K. (2006). Conformation-specific blockade of the integrin GPIIb/IIIa: a novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets. *Circ Res*, 99, 25-33.
- Scirica, B.M., Bonaca, M.P., Braunwald, E., De Ferrari, G.M., Isaza, D., Lewis, B.S., Mehrhof, F., Merlini, P.A., Murphy, S.A., Sabatine, M.S., Tendra M.,

- Van de Werf F., Wilcox R., Morrow D.A., TRA 2° P-TIMI 50 Steering Committee Investigators. (2012). Vorapaxar for secondary prevention of thrombotic events for patients with previous myocardial infarction: a prespecified subgroup analysis of the TRA 2 degrees P-TIMI 50 trial. *Lancet*, 380,1317-1324.
- Serebruany, V.L., Malinin, A.I., Eisert, R.M., and Sane, D.C. (2004). Risk of bleeding complications with antiplatelet agents: meta-analysis of 338,191 patients enrolled in 50 randomized controlled trials. *Am J Hematol*, 75, 40-47.
- Serebruany, V.L., Kogushi, M., Dastros-Pitei, D., Flather, M., and Bhatt, D.L. (2009). The in-vitro effects of E5555, a protease-activated receptor (PAR)-1 antagonist, on platelet biomarkers in healthy volunteers and patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*, 102, 111-119.
- Sharpe, R.Y., Dennis, M.J., Nasim, A., McCarthy, M.J., Sayers, R.D., London, N.J., and Naylor, A.R. (2010). Dual antiplatelet therapy prior to carotid endarterectomy reduces post-operative embolisation and thromboembolic events: post-operative transcranial Doppler monitoring is now unnecessary. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 40, 162-167.
- Shock, D.D., He, K., Wencil-Drake, J.D., and Parise, L.V. (1997). Ras activation in platelets after stimulation of the thrombin receptor, thromboxane A2 receptor or protein kinase C. *Biochem J*, 321, 525-530.
- Stoll, P., Bassler, N., Hagemeyer, C.E., Eisenhardt, S.U., Chen, Y.C., Schmidt, R., Schwarz, M., Ahrens, I., Katagiri, Y., Pannen, B., Bode C., and Peter K. (2007). Targeting ligand-induced binding sites on GPIIb/IIIa via single-chain antibody allows effective anticoagulation without bleeding time prolongation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1206-1212.
- Strassel, C., Nonne, C., Eckly, A., David, T., Leon, C., Freund, M., Cazenave, J.P., Gachet, C., and Lanza, F. (2007). Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 241-247.
- Sturgeon, S.A., Jones, C., Angus, J.A., and Wright, C.E. (2008). Advantages of a selective beta-isoform phosphoinositide 3-kinase antagonist, an anti-thrombotic agent devoid of other cardiovascular actions in the rat. *Eur J Pharmacol*, 587, 209-215.
- Takizawa, H., Nishimura, S., Takayama, N., Oda, A., Nishikii, H., Morita, Y., Kakinuma, S., Yamazaki, S., Okamura, S., Tamura, N., Tamura N., Goto S., Sawaguchi A., Manabe I., Takatsu K., Nakauchi H., Takaki S., and Eto K. (2010). Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development *in vivo*. *J Clin Invest*, 120, 179-190.
- Trachiotis, G.D. (2010). Early antiplatelet therapy in coronary artery bypass grafting: a calculated benefit. *Innovations*, 5, 317-325.
- Tricoci, P., Huang, Z., Held, C., Moliterno, D.J., Armstrong, P.W., Van de Werf, F., White, H.D., Aylward, P.E., Wallentin, L., Chen, E., Lokhnygina Y., Pei J., Leonardi S., Rorick T.L., Kilian A.M., Jennings L.H., Ambrosio G., Bode C., Cequier A., Cornel J.H., Diaz R., Erkan A., Huber K., Hudson M.P., Jiang L., Jukema J.W., Lewis B.S., Lincoff A.M., Montalescot G, Nicolau J.C., Ogawa H., Pfisterer M., Prieto J.C., Ruzyllo W., Sinnaeve P.R., Storey R.F., Valgimigli M., Whellan D.J., Widimsky P., Strony J., Harrington R.A., Mahaffey K.W.; TRACER Investigators. (2012). Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 366, 20-33.
- Ulrichs, H., Silence, K., Schoolmeester, A., de Jaegere, P., Rossenu, S., Roodt, J., Priem, S., Lauwereys, M., Casteels, P., Van Bockstaele, F., Verschueren K. Stanssens P., Baumeister J., and Holz J.B. (2011). Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood*, 118, 757-765.
- Ungerer, M., Rosport, K., Bultmann, A., Piechatzek, R., Uhland, K., Schlieper, P., Gawaz, M., and Munch, G. (2011). Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*, 123, 1891-1899.
- Valiyaveetil, M., Feng, W., Mahabaleswar, G., Phillips, D.R., Byzova, T., and Podrez, E. (2007). Phosphorylation of platelet alphaIIb beta3 is crucial for arterial thrombosis *in vivo* and microparticle generation. *Circulation*, 116:II-75, Abstract Number 450. Abstracts from American Heart Association Scientific Sessions Orlando 2007 Nov 4-7.
- van Zanten, G.H., de Graaf, S., Slootweg, P.J., Heijnen, H.F., Connolly, T.M., de Groot, P.G., and Sixma, J.J. (1994). Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest*, 93, 615-632.
- Vandendries, E.R., Hamilton, J.R., Coughlin, S.R., Furie, B., and Furie, B.C. (2007). Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 288-292.
- Varga-Szabo, D., Pleines, I., and Nieswandt, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 403-412.
- Versteeg, H.H., Heemskerk, J.W., Levi, M., and Reitsma, P.H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*, 93, 327-358.
- VIDAL (2012). Le dictionnaire - 88ème édition (Issy-les-Moulineaux: éd. Vidal, 3024 p.
- Wadanoli, M., Sako, D., Shaw, G.D., Schaub, R.G., Wang, Q., Tchernychev, B., Xu, J., Porter, T.J., and Huang, Q. (2007). The von Willebrand factor antagonist (GPG-290) prevents coronary thrombosis without prolongation of bleeding time. *Thromb Haemost*, 98, 397-405.
- Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Collier, B.S., and Jordan, R.E. (1996). Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*, 88, 907-914.

- Wagner, A., Ruidavets, J.B., Montaye, M., Bingham, A., Ferrières, J., Amouyel, P., Ducimetière, P., and Arveiler, D. (2011). Évolution de la maladie coronaire en France de 2000 à 2007. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire du 8 novembre*, 40-41, 415-419.
- Wang, X., Palasubramaniam, J., Gkanatsas, Y., Hohmann, J.D., Westein, E., Kanojia, R., Alt, K., Huang, D., Jia, F., Ahrens, I., Medcalf, R.L., Peter, K., and Hagemeyer, C.E. (2014). Towards effective and safe thrombolysis and thromboprophylaxis: preclinical testing of a novel antibody-targeted recombinant plasminogen activator directed against activated platelets. *Circ Res*, 114, 1083-1093.
- Watson, S.P., Auger, J.M., McCarty, O.J., and Pearce, A.C. (2005). GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost*, 3, 1752-1762.
- Weiss, E.J., Hamilton, J.R., Lease, K.E., and Coughlin, S.R. (2002). Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood*, 100, 3240-3244.
- Westein, E., Flierl, U., Hagemeyer, C.E., and Peter, K. (2013). Destination known: targeted drug delivery in atherosclerosis and thrombosis. *Drug Dev Res*, 74, 460-471.
- WHO (2013). Cardiovascular diseases. Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> Accessed at 28012015.
- Wiviott, S.D., Flather, M.D., O'Donoghue, M.L., Goto, S., Fitzgerald, D.J., Cura, F., Aylward, P., Guetta, V., Dudek, D., Contant, C.F., Angiolillo D.J., Bhatt D.L., LANCELOT-CAD Investigators. (2011). Randomized trial of atopaxar in the treatment of patients with coronary artery disease: the lessons from antagonizing the cellular effect of Thrombin-Coronary Artery Disease Trial. *Circulation*, 123, 1854-1863.
- Wu, D., Meiring, M., Kotze, H.F., Deckmyn, H., and Cauwenberghs, N. (2002). Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 323-328.
- Yousuf, O., and Bhatt, D.L. (2011). The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 8, 547-559.
- Zahid, M., Mangin, P., Loyau, S., Hechler, B., Billiald, P., Gachet, C., and Jandrot-Perrus, M. (2012). The future of GPVI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost*, Epub ahead of print.