



HAL
open science

Etude fonctionnelle de la signalisation intracellulaire médiée par l'intégrine α IIb β 3 au cours de l'interaction avec le fibrinogène immobilisé

Alexandre Salsmann

► **To cite this version:**

Alexandre Salsmann. Etude fonctionnelle de la signalisation intracellulaire médiée par l'intégrine α IIb β 3 au cours de l'interaction avec le fibrinogène immobilisé. Biologie moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2006. Français. NNT : 2006NAN10001 . tel-01748069

HAL Id: tel-01748069

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748069v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R. : Sciences & Techniques Biologiques
École Doctorale : Biologie-Santé-Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, NANCY I

en Biologie Moléculaire et Cellulaire

PAR

Alexandre SALSMANN

**Étude fonctionnelle de la signalisation intracellulaire
médiée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ au cours de l'interaction
avec le fibrinogène immobilisé**

présentée et soutenue publiquement le lundi 23 Janvier 2006

Président du Jury : M. Michel Dauça, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs : Mme Ellen Van Obberghen-Schilling, Docteur, CNRS-UMR6543, Nice
M. Bernard Payrastre, Docteur, INSERM U563, Toulouse
Examineurs : Mme Monique Aumailley, Professeur, Institut de Biochimie, Cologne
M. François Lanza, Docteur, INSERM U311, Strasbourg
Directeur de Thèse : Mme Nelly Kieffer, Professeur, Université du Luxembourg

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Madame le Professeur Nelly Kieffer qui m'a chaleureusement accueilli dans son équipe de recherche et qui m'a soutenu tout au long de ces années de travail. Merci pour la confiance dont vous avez témoigné.

Je suis tout particulièrement reconnaissant envers Monsieur Michel Dauça, mon professeur tout au long de mon cursus à l'Université de Nancy, qui m'a permis de plonger dans ce monde de la biologie cellulaire et qui a accepté de présider le jury de ma thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame Ellen Van Obberghen-Schilling et à Monsieur Bernard Payrastra qui ont bien voulu juger ce travail en tant que rapporteurs. Je les remercie vivement pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance à Madame Monique Aumailley et Monsieur François Lanza qui ont accepté de faire partie du jury.

Je remercie très sincèrement Madame Gretel Luthe et Madame Monique Aumailley pour leur accueil à Cologne et leurs généreux conseils concernant les expériences de pulldown.

J'adresse de chaleureux remerciements à Madame Dominique Baruch, Madame Paulette Legendre, Monsieur Jean-Bernard Regnouf de Vains et Monsieur Michel Boisbrun pour leurs collaborations scientifiques fructueuses.

J'adresse mes remerciements au Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour son soutien financier sans lequel ce travail n'aurait jamais vu le jour, ainsi qu'au Fonds National de la Recherche du Luxembourg pour son soutien financier pour l'impression du manuscrit.

Un grand Merci à tous les membres du laboratoire qui ont travaillé à mes côtés, et qui ont su me conseiller, m'aider et m'encourager pendant tout ce temps : Martine, Michèle, Sandra, Sophie, Christine, Danijela, Patrick, Chantal, Christiane, Stéphanie, Fabrice, Laurent, Sébastien.

Je souhaite exprimer ma plus profonde reconnaissance à Lis Schaffner-Reckinger qui a su m'encadrer dès mon arrivée au laboratoire et qui m'a accompagné tout au long de ce travail avec tant de compétences et de convivialité. Merci pour tes encouragements et ton extrême gentillesse.

Je tiens également à remercier très chaleureusement Mel qui a toujours été là pour me soutenir au cours de ces années et avec qui je partage tant de bons moments depuis mon arrivée à Luxembourg. Un grand merci aussi à tous mes amis qui, par leur présence continue, m'ont soutenu moralement et ont contribué au bon déroulement de cette thèse à leur manière. Je pense notamment à Ren, Oliv, Camille, Fab, Dove, Misch, Cindy, à mes amis de Fac et aux Poissons Rouges.

J'aimerais finalement remercier très sincèrement Jennie pour m'avoir soutenu, encouragé et réconforté avec une disponibilité, une bonne humeur et un amour à toute épreuve.

Enfin, je voudrais remercier du fond du coeur et dédier cette thèse à ma soeur, à mes parents, ainsi qu'à mes grands-parents pour leur extraordinaire soutien dont j'ai pu bénéficier à chaque instant.

RÉSUMÉ

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ des plaquettes, principal récepteur du fibrinogène, joue un rôle prépondérant dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, en établissant un lien physique et dynamique entre le fibrinogène sanguin et les protéines plaquettaires intracellulaires de la signalisation et du cytosquelette. Le processus de reconnaissance du fibrinogène par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est complexe puisqu'au moins 2 sites distincts d'interaction ont été identifiés jusqu'à présent: le site universel de reconnaissance $^{572}\text{RGD}^{574}$ (Arg-Gly-Asp) et une séquence dodécapeptide $^{400}\text{HHLGGAKQAGDV}^{411}$ (H12). Cependant, il n'est pas encore clairement défini si ces 2 sites de reconnaissance fonctionnent indépendamment, de façon synergique ou par compétition.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons examiné au niveau moléculaire le rôle respectif des motifs dodécapeptide et $^{572}\text{RGD}^{574}$ du fibrinogène dans le processus d'étalement cellulaire médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, au niveau de plaquettes sanguines humaines et de cellules CHO exprimant soit le récepteur recombinant sauvage $\alpha_{IIb}\beta_3\text{wt}$, soit le récepteur constitutivement actif $\alpha_{IIb}\beta_3\text{T}_{562}\text{N}$ ou non-fonctionnel $\alpha_{IIb}\beta_3\text{D}_{119}\text{Y}$, et en utilisant le fibrinogène entier ou des fragments protéolytiques de fibrinogène, le fragment D ne contenant que la séquence dodécapeptide, et le fragment C ne présentant que le motif $^{572}\text{RGD}^{574}$.

Nos résultats mettent pour la première fois en évidence 2 voies de signalisation indépendantes mais synergiques, la première voie initiée par le site dodécapeptide du fibrinogène reconnu par la sous-unité α_{IIb} , et conduisant à un attachement cellulaire, à la formation de complexes focaux, à la phosphorylation de FAK et à l'activation de Rac1, et la seconde voie impliquant le motif $^{572}\text{RGD}^{574}$ qui joue un rôle de commutateur moléculaire au niveau de la sous-unité β_3 , entraînant l'activation maximale de RhoA, la polymérisation et l'organisation de l'actine en fibres de stress, la formation d'adhérences focales matures et l'étalement cellulaire complet.

Mots clés : intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ - cellules CHO - plaquettes sanguines - fibrinogène - fragments de fibrinogène - RGD - dodécapeptide - fibres de stress - RhoA GTPases.

TABLE DES MATIERES

Table des matières	1
Table des illustrations.....	5
Abréviations	7
Liste des publications et communications	9
INTRODUCTION.....	13
Chapitre I : La famille des intégrines	15
1. Les récepteurs d'adhérence	15
2. Les intégrines	19
2.1. Diversité des intégrines	21
2.2. Caractéristiques des sous-unités α	21
2.2.1. Généralités et classification	21
2.2.2. Les domaines fonctionnels.....	23
2.3. Caractéristiques des sous-unités β	24
2.3.1. Généralités et classification	24
2.3.2. Les domaines fonctionnels.....	25
3. Mode de fonctionnement des intégrines.....	27
3.1. Signalisation « inside-out » et activation des intégrines.....	31
3.2. Clustering des intégrines signalisation « outside-in »	32
Chapitre II : Relation structure-fonction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	35
1. Rôle physiologique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface plaquettaire	35
2. Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	37
2.1. Biosynthèse et formation du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$	37
2.2. Les domaines extracellulaires.....	39
2.3. Les parties cytoplasmiques.....	42
3. Spécificité de reconnaissance.....	44
3.1. Généralités.....	45
3.2. Biosynthèse et structure du fibrinogène	47
3.3. Les sites d'interaction du fibrinogène avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	48
3.4. Rôle du fibrinogène dans le processus d'hémostase.....	55
4. Le mécanisme d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	57
4.1. Rôle des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	59
4.2. Rôle des domaines transmembranaires de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	61
4.3. Rôle de la taline dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	63
4.4. Les modifications conformationnelles des domaines extracellulaires de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	65
4.5. Rôle des ponts disulfure intramoléculaires au niveau de β_3	68

Chapitre III : La signalisation intracellulaire médiée par $\alpha_{IIb}\beta_3$	71
1. La signalisation inside-out	71
2. La signalisation outside-in $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dépendante	73
2.1. Recrutement et rôles joués par les protéines du cytosquelette.....	75
2.1.1. Rôle de la taline	75
2.1.2. Rôle de la vinculine	77
2.1.3. Rôle de la paxilline	77
2.1.4. Rôle de l' α -actinine	78
2.1.5. Autres protéines	78
2.2. Les protéines de la signalisation	79
2.2.1. La famille des Src kinases.....	79
2.2.2. La protéine Syk.....	83
2.2.3. La FAK	85
2.2.4. La protéine Shc	86
2.2.5. La PI3-kinase	86
2.2.6. La famille des RhoGTPases.....	86
2.2.7. Autres protéines	87
Chapitre IV : La famille des RhoGTPases	89
1. Étude physiologique des protéines de la famille des RhoGTPases	89
1.1. Description et structure des RhoGTPases	89
1.2. Mode de fonctionnement des RhoGTPases.....	91
1.2.1. Généralités	91
1.2.2. Les RhoGTPases et leurs régulateurs.....	93
1.2.2.1. Les GEFs.....	93
1.2.2.2. Les GAPs	95
1.2.2.3. Les GDIs	95
1.2.2.4. Étude de la régulation de l'activité de RhoA.....	97
1.2.3. Les RhoGTPases et leurs effecteurs.....	99
1.2.3.1. Les effecteurs de Cdc42 et Rac	99
1.2.3.2. Les effecteurs de RhoA	101
2. Rôles physiologiques des RhoGTPases au niveau du cytosquelette	103
OBJECTIFS	107
RÉSULTATS	113
Chapitre I : Un nouveau rôle fonctionnel du motif RGD du fibrinogène en tant que commutateur moléculaire responsable de l'activation spécifique de RhoA au cours du processus d'étalement cellulaire médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	115
INTRODUCTION	117
Article I. "A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent RhoA activation during cell spreading "	123
Article II. Revue: "RGD, the Rho'd to cell spreading"	135
DISCUSSION	143

Chapitre II : Influence des conditions de flux au niveau de l'attachement et de l'étalement cellulaire sur fibrinogène et facteur von Willebrand immobilisés, de cellules CHO exprimant l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ à l'état de repos ou constitutivement activée	153
INTRODUCTION	155
Article III. "CHO cells expressing the high affinity $\alpha_{11b}\beta_3 T_{562}N$ integrin demonstrate enhanced adhesion under shear"	157
DISCUSSION	169
CONCLUSION ET DISCUSSION FINALE	173
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189
ANNEXE : Matériel et Méthodes.....	215

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
 BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
 Rue du Jardin Botanique - BP 11
 54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

20001 ARTS AND SCIENCES LIBRARY
- 100 ST
UNIVERSITY OF TORONTO
200A
2001 - 100 ST UNIVERSITY

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES :

Figure 1 : La super-famille des récepteurs d'adhérence	16
Figure 2 : Organisation structurale des sous-unités α et β des intégrines	22
Figure 3 : Les diverses fonctions cellulaires contrôlées par les intégrines	28
Figure 4 : Mécanisme bidirectionnel de signalisation médié par les intégrines	30
Figure 5 : Structure de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$	40
Figure 6 : Schématisation au niveau atomique des sites MIDAS, LIMBS et ADMIDAS de la sous-unité β_3	40
Figure 7 : Structure de la molécule de fibrinogène.....	46
Figure 8 : Visualisation spatiale de l'interaction d'un peptide synthétique RGD avec $\alpha_v\beta_3$	50
Figure 9 : Représentation des domaines Cap et SDL de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$	52
Figure 10 : Modèle d'activation de l'intégrine	56
Figure 11 : Représentation des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$	58
Figure 12 : Représentation des domaines transmembranaires de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$	60
Figure 13 : Séparation spatiale des parties cytoplasmiques et transmembranaires de l'intégrine lors de l'activation	62
Figure 14 : Représentation des parties extracellulaires de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$	66
Figure 15 : Arrangements des protéines du cytosquelette au niveau des adhérences focales.....	76
Figure 16 : Régulation de l'activité de Src au cours de l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$	80
Figure 17 : Implication de la protéine Syk dans la signalisation outside-in	82
Figure 18 : Rôle de pivot de la FAK dans la signalisation outside-in	84
Figure 19 : Cycle de régulation de l'activité des protéines de la famille des RhoGTPases.....	90
Figure 20 : Mécanisme de régulation de l'activité de Rho	96
Figure 21 : Rôle des RhoGTPases dans la formation des complexes focaux et des adhérences focales.....	102
Figure 22 : Interaction de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ avec la séquence dodécapeptide du fibrinogène	119
Figure 23 : Modèle d'adhésion cellulaire sur fibrinogène immobilisé médié par $\alpha_{11b}\beta_3$	151
Figure 24 : Réarrangements conformationnels des parties extracellulaires de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$	176
Figure 25 : Modélisation du mécanisme d'activation des intégrines médié par la taline	180
Figure 26 : Représentation structurale des intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ en complexe avec la fibronectine	183
Figure 27 : Représentation en ruban des modules III-9 et III-10 de la fibronectine.....	185
Figure 28 : Complexité des voies de signalisation intracellulaires.....	187

TABLEAUX :

Tableau 1 : Principaux ligands et distribution cellulaire de quelques intégrines.....	18
Tableau 2 : Diversité de la famille des intégrines	18
Tableau 3 : Principaux facteurs GEF des RhoGTPases chez les mammifères	92
Tableau 4 : Principaux facteurs GAP des RhoGTPases chez les mammifères.....	94
Tableau 5 : Principaux effecteurs des RhoGTPases chez les mammifères	100

ABRÉVIATIONS

aa	acides aminés
ABP	'actin binding protein'
ADMIDAS	adjacent au site MIDAS
ADN	acide désoxyribonucléique
AF	adhérences focales
AUP-1	'ancient ubiquitous protein-1'
BET	bromure d'éthidium
β -TD	' β -tail domain'
CAM	'cell adhesion molecule'
CFP	'cyan fluorescent protein'
CHO	'Chinese hamster ovary'
CIB	'calcium- and integrin-binding protein'
CJM	'cell junction molecule'
CRIB	'Cdc42/Rac-interactive binding'
DAG	diacylglycérol
DH	'Dbl-homology'
DTT	dithiothréitol
EGF	'epidermal growth factor'
EGFR	'epidermal growth factor receptor'
Erk	'extracellular signal-regulated kinase'
FAK	'focal adhesion kinase'
FERM	'4.1 band, ezrin, radixin, moesin'
fg	fibrinogène
FITC	'fluorescein isothiocyanate'
FN	fibronectine
FRET	'fluorescence resonance energy transfer'
FvW	facteur von Willebrand
GAP	'GTPase-activating protein'
GDI	'GDP dissociation inhibitor'
GEF	'guanidine nucleotide exchange factor'
GFP	'green fluorescent protein'
GST	'glutathion S-transférase'
ICAP-1	'integrin cytoplasmic domain-associated protein-1'
Ig-CAM	'immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules'
ILK	'integrin linked kinase'
IP3	inositol trisphosphate
LDL	'low density lipoprotein'
LIBS	'ligand induced binding site'
LIMBS	'ligand-associated metal binding site'
LMW	'low molecular weight'
LPA	'lysophosphatidic acid'
MAP	'mitogen-activated protein'
MEC	matrice extracellulaire
MEKK1	'MAP extracellular signal-regulated kinase kinase 1'

MIDAS	'metal ion-dependant adhesion site'
MLC	'myosin light chain'
NFkB	'nuclear factor kB
PAK	'p21-activated kinase'
PCR	'polymerase chain reaction'
PDI	'protein disulfide isomerase'
PH	'pleckstrin homology'
PI3K	'phosphoinositide-3 kinase'
PIP ₂	'phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate'
PIPK	'phosphatidylinositol phosphate kinase'
PIX	'PAK-interacting exchange factor'
PKC	'protein kinase C'
PKN	'protein kinase N'
PLC	'phospholipase C'
PSI	'pleckstrin semaphorin integrin homology domain'
PTB	'phosphotyrosine binding domain'
PTP	'protein tyrosine phosphatase'
RBD	'rhotekin binding domain'
REM1	'Rho effector class 1'
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROK	'Rho kinase'
SAM	'substrate adhesion molecule'
SFK	'Src family kinase'
SH 2-3	'Src homology domain 2-3'
TRITC	'tetramethylrhodamine isothiocyanate'
VASP	'vasodilator-stimulated phosphoprotein'
VLA	'very late antigen'
WASP	'Wiskott-Aldrich Syndrome protein'
YFP	'yellow fluorescent protein'

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Publications

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, Sébastien Plançon and Nelly Kieffer.

“A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -dependent RhoA activation during cell spreading”. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 280, No 39, 33610-33619, 2005.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger and Nelly Kieffer.

“RGD, the Rho’d to cell spreading”. *European Journal of Cell Biology*, 85, 3-4, 2006.

Paulette Legendre, **Alexandre Salsmann**, Julie Rayes, Olivier Trassard, Nelly Kieffer and Dominique Baruch.

CHO cells expressing the high affinity $\alpha_{11b}\beta_3T_{562N}$ integrin demonstrate enhanced adhesion under shear”. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4, 236-246, 2006.

Collaboration avec l’unité INSERM U428, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, GDRE-ITI, Paris V, France.

Michel Boisbrun, Philippe Engrand, **Alexandre Salsmann**, Nelly Kieffer and Jean-Bernard Regnouf de Vains.

“Synthesis of RGD derivatives via a convergent strategy”. (article en préparation).

Collaboration avec l’UMR 7565 CNRS, GEVSM, Faculté de Pharmacie, Nancy I, France.

2. Communications

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, and Nelly Kieffer.
“Involvement of the α subunit of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in ligand-induced signaling events”,
présentation par affiche.

Cell Adhesion Meeting, 23-25 Mai 2003, Luxembourg.

Elisabeth Schaffner-Reckinger, **Alexandre Salsmann**, and Nelly Kieffer.

“Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ interaction with immobilized fibrinogen”, communication orale
XIXème Congrès de l’ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis),
12-18 juillet 2003, Birmingham, Angleterre.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, and Nelly Kieffer.

“New approach of understanding of $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated cell adhesion to immobilized
fibrinogen”, communication orale.

Meeting of Research Training Network on Real-Time Thrombosis, 2-5 Octobre 2003,
Dublin, Eire.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, and Nelly Kieffer.

“Involvement of the α subunit of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in ligand-induced signaling events”,
présentation par affiche.

ESF/EURESCO Meeting on Molecular Biology of Cellular Interactions –
EuroConference on the Role in Morphogenesis and Cellular Differentiation, 17-22
Octobre 2003, Obernai, France.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, and Nelly Kieffer.

“Involvement of the α subunit of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in ligand-induced signaling events”,
présentation par affiche.

Journée des boursiers du Ministère de la Culture, de l’Enseignement Supérieur et de la
Recherche du Luxembourg, “Festival des sciences 2003”, Université du Luxembourg,
Luxembourg.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, and Nelly Kieffer.

“The RGD motif is the molecular switch that triggers integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent RhoA
activation during cell spreading”, communication orale.

Meeting of Research Training Network on Real-Time Thrombosis, 1-3 Septembre
2004, Toulon, France.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, and Nelly Kieffer.

“A new functional role of the RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -dependent RhoA activation during cell spreading”,
présentation par affiche.

Adhesion Meeting 2005, Podosomes – Invadopodia – Focal adhesions, 28-30 Avril 2005, Munich, Allemagne.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, and Nelly Kieffer.

“A new functional role of the RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -dependent RhoA activation during cell spreading”,
communication orale.

XXème Congrès de l’ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis),
6-12 Août 2005, Sydney, Australie.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, and Nelly Kieffer.

“A new functional role of the RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -dependent RhoA activation during cell spreading”,
présentation par affiche.

FEBS/ESF Advanced Workshop on Integrated Approaches in Cytoskeleton Research,
27-31 Août 2005, Luxembourg.

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Fabrice Kabile, and Nelly Kieffer.

“A new functional role of the RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -dependent RhoA activation during cell spreading”,
présentation par affiche.

Journée des boursiers du Ministère de la Culture, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche du Luxembourg, “Festival des sciences 2005”, Université du Luxembourg, Luxembourg

3. Prix

Adhesion Meeting 2005, Podosomes – Invadopodia – Focal adhesions, 28-30 Avril 2005, Munich, Allemagne.

1^{er} prix de présentation par affiche (75 participants).

XXème Congrès de l’ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis),
6-12 Août 2005, Sydney, Australie.

Prix “Young Investigator Award”.

1. The first part of the document
describes the general situation
of the country in 1950.

2. The second part

describes the economic situation
of the country in 1950.
The main problem was
the lack of capital.
The government had to
take measures to
improve the situation.

The government had to
take measures to
improve the situation.
The main problem was
the lack of capital.
The government had to
take measures to
improve the situation.

The government had to
take measures to
improve the situation.
The main problem was
the lack of capital.
The government had to
take measures to
improve the situation.

The government had to
take measures to
improve the situation.
The main problem was
the lack of capital.
The government had to
take measures to
improve the situation.

INTRODUCTION

2023-2024

Chapitre I :

La famille des intégrines

1. Les récepteurs d'adhérence

Dans leur grande majorité, les cellules des organismes pluricellulaires sont organisées en ensembles coopératifs appelés tissus. Ces cellules sont maintenues en place soit par adhérence directe des cellules entre elles, soit par contact avec un réseau complexe de macromolécules structurales extracellulaires sécrétées directement par les cellules, et appelé matrice extracellulaire (MEC). Les molécules impliquées dans ce processus d'adhérence cellulaire sont de trois ordres : i) ce sont, au niveau intracellulaire, les protéines du cytosquelette en relation plus ou moins directe avec les récepteurs, ii) au niveau membranaire, les récepteurs eux-mêmes, et iii) au niveau extracellulaire, la MEC ou les protéines membranaires d'autres cellules. Ces molécules peuvent être actives: en permettant la transduction de signaux cellulaires, des mouvements cellulaires ou des changements de forme cellulaire ; ou passives: en maintenant ainsi la stabilité et l'intégrité des tissus.

Ce mécanisme d'adhérence cellulaire assurant le développement et l'intégrité des tissus et organes, est de ce fait impliqué dans le fonctionnement d'une grande variété de phénomènes physiologiques tels que l'hémostase, l'embryogenèse, les réactions inflammatoires, la prolifération cellulaire, la cicatrisation ou l'apoptose. Cependant, ces processus biologiques sont souvent associés à des dysfonctionnements se traduisant par des pathologies graves telles que les maladies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde), l'athérosclérose, l'ostéoporose, le cancer, ou au niveau vasculaire, l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (Schwartz et al., 1995; Wehrle-Haller and Imhof, 2003).

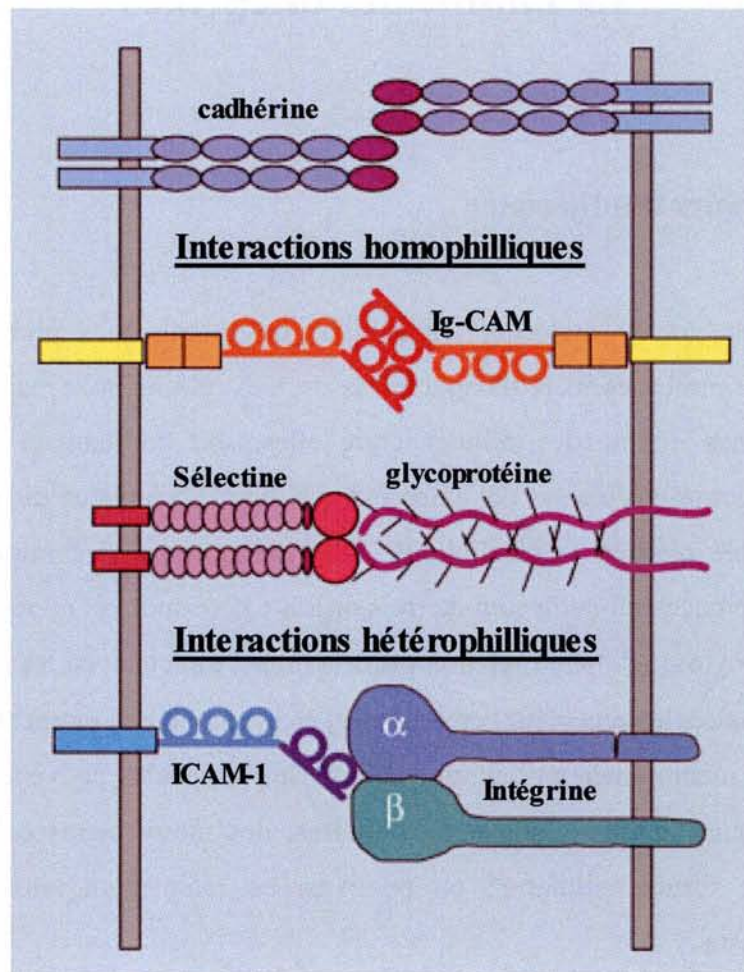


Figure 1 : La super-famille des récepteurs d'adhérence (D'après Hynes, 1999).

Les molécules d'adhérence ont été classées en différents types selon la nature des molécules avec lesquelles elles interagissent. On distingue ainsi les molécules CAM (pour cell adhesion molecule) qui assurent l'adhérence entre cellules, les SAM (pour substrate adhesion molecule) qui interviennent dans l'interaction entre cellule et matrice, et les CJM (pour cell junction molecule) que l'on retrouve au niveau des complexes jonctionnels (Braga, 2002; D'Souza-Schorey, 2005; Schneeberger and Lynch, 2004; Yin and Green, 2004). Dans l'adhérence cellule-cellule, on définit la liaison homophile lorsque 2 cellules interagissent par l'intermédiaire de récepteurs identiques, et la liaison hétérophilique réalisée entre récepteurs de types différents.

Les récepteurs d'adhérence sont regroupés en plusieurs grandes superfamilles géniques de glycoprotéines membranaires, parmi lesquelles on retrouve les molécules d'adhérence à motif immunoglobuline (Ig-CAM), les cadhérines, les sélectines et les intégrines (Figure 1). En outre, il est possible de classer ces récepteurs selon 2 critères fonctionnels. Un premier critère correspond à la nécessité de la présence d'ions calcium dans le milieu extracellulaire. En effet, les membres de la famille des Ig-CAMs ne requièrent pas ces ions, alors qu'ils sont indispensables aux propriétés d'adhérence des cadhérines, sélectines et intégrines. Par ailleurs, les récepteurs d'adhérence peuvent être classés selon leur localisation subcellulaire et leur état d'activité avant les processus d'adhésion. Certaines Ig-CAMs et cadhérines sont par exemple constitutivement actives au niveau membranaire, alors que les intégrines nécessitent une activation préalable avant de pouvoir fixer un ligand. Certaines sélectines sont quant à elles absentes de la membrane plasmique, stockées dans des granules intracellulaires (granules α des plaquettes, corps de Weibel-Pallade des cellules endothéliales) et rapidement disponibles à la surface cellulaire par exocytose sous l'effet d'une stimulation.

Intégrines	ligands reconnus	Distribution majeure
$\alpha_{IIb}\beta_3$	fibrinogène, fibronectine, vitronectine, FvW, thrombospondine	plaquettes, mégacaryocytes
$\alpha_v\beta_3$	vitronectine, fibrinogène, fibronectine, ostéopontine, FvW, collagène,	cellules endothéliales, lymphocytes B et T, cellules tumorales, cellules gliales, monocytes
$\alpha_v\beta_5$	fibrinogène, fibronectine, vitronectine	fibroblastes, monocytes, macrophages, cellules épithéliales, oligodendrocytes
$\alpha_v\beta_1$	fibrinogène, fibronectine, vitronectine, collagène, FvW	oligodendrocytes
$\alpha_2\beta_1$	laminine, collagène	plaquettes, fibroblastes, Lymphocytes B et T, astrocytes, cellules endothéliales, cellules épithéliales
$\alpha_4\beta_1$	fibronectine	fibroblastes, lymphocytes B et T, cellules épithéliales, cellules musculaires, éosinophiles
$\alpha_5\beta_1$	fibronectine	plaquettes, fibroblastes, lymphocytes B et T, cellules endothéliales, astrocytes, thymocytes
$\alpha_6\beta_1$	laminine	fibroblastes, leucocytes, thymocytes, cellules épithéliales, cellules endothéliales
$\alpha_x\beta_2$	fibrinogène	leucocytes, cellules dendritiques, macrophages, cellules microgliales
$\alpha_6\beta_4$	laminine	cellules de Schwann, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules épithéliales
$\alpha_v\beta_8$	fibronectine	oligodendrocytes, cellules de Schwann, cellules nerveuses

Tableau 1 : Principaux ligands et distribution cellulaire de quelques intégrines

	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	β_7	β_8
α_1 *	✓							
α_2 *	✓							
α_3	✓							
α_4	✓						✓	
α_5	✓							
α_6	✓			✓				
β_7	✓							
α_8	✓							
α_9	✓							
α_{10} *	✓							
α_{11} *	✓							
α_{IIb}			✓					
α_V	✓		✓		✓	✓		✓
α_D *		✓						
α_L *		✓						
α_M *		✓						
α_X *		✓						
α_E *							✓	

Tableau 2 : Diversité de la famille des intégrines. Les sous-unités α marquées d'un astérisque (*) comprennent un domaine I (Cf. paragraphe 2.2.1)

2. Les intégrines

Les intégrines constituent la plus vaste famille des récepteurs d'adhérence. Elles sont en effet très largement distribuées à la surface cellulaire de l'ensemble des cellules eucaryotes (Hynes, 1992). Ce sont les récepteurs d'adhérence les plus impliqués dans l'interaction avec la MEC, et interagissent avec le collagène, la laminine, la fibronectine, le facteur von Willebrand (FvW) ou encore le fibrinogène (Tableau 1). Elles se différencient cependant des autres récepteurs d'adhésion par l'hétérogénéité de leurs deux sous-unités transmembranaires α et β . De ce fait, elles participent de manière hétérotypique aux interactions cellule-MEC et cellule-cellule. Au niveau des plaquettes sanguines par exemple, elles ont pour but d'assurer à la fois l'adhérence à la matrice du sous-endothélium et l'agrégation des plaquettes entre elles. C'est finalement par leur rôle d'intégration de la MEC au cytosquelette d'actine de la cellule, que leur a été attribué le terme d'« intégrine » en 1987 (Hynes, 1987; Tamkun et al., 1986).

2.1. Diversité des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques d'environ 280 Å de longueur, composées d'une chaîne α et d'une chaîne β liées de manière non-covalente. Les avancées réalisées au niveau du séquençage du génome humain ont permis d'identifier 26 gènes codant pour 18 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes, s'associant entre-elles pour former au moins 24 hétérodimères $\alpha\beta$ différents (Tableau 2) (Humphries, 2000; Humphries et al., 2003 ; Xiong et al., 2003). Différentes intégrines peuvent reconnaître un même ligand. Cependant, la même sous-unité peut montrer plusieurs spécificités de fixation, en raison de l'implication des 2 sous-unités dans la reconnaissance d'un ligand (Fernandez et al., 1998).

Actuellement, les intégrines sont plus généralement classées en fonction de leur capacité à reconnaître une courte séquence peptidique universelle correspondant aux trois acides aminés RGD (Arg-Gly-Asp). Le rôle de cette séquence, initialement identifiée par Pierschbacher et Ruoslahti en tant que motif de reconnaissance de la molécule de fibronectine par l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984), permet en effet de distinguer les intégrines qui interagissent avec un ligand de manière RGD-dépendante, des intégrines qui ne nécessitent pas la présence de ce motif (Koivunen et al., 1993). Parmi ces intégrines RGD-indépendantes, $\alpha_9\beta_1$ interagit avec la tenascine-C par l'intermédiaire d'un motif IDG (Yokosaki et al., 1998), $\alpha_M\beta_2$ reconnaît le motif KRLDGS au niveau de la chaîne γ du fibrinogène (Altieri et al., 1993; Ugarova et al., 1998), $\alpha_4\beta_7$ interagit avec une séquence LDV de la molécule de fibronectine (Rüegg et al., 1992). Quant au sous-groupe des intégrines RGD-dépendantes, il est constitué de nombreuses intégrines ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$), dont notamment celles formées d'une chaîne α_v ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$) (Ruoslahti, 1996; Takagi et al., 2003). En outre, ce sous-groupe des intégrines RGD-dépendantes peut lui-même être subdivisé en deux en raison de la capacité de certains récepteurs à pouvoir interagir avec certains ligands par l'intermédiaire d'un site auxiliaire au motif RGD, appelé site de synergie. Ainsi, des intégrines telles que $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou $\alpha_5\beta_1$ nécessitent respectivement la présence additionnelle d'une séquence KQAGDV du fibrinogène (Kloczewiak et al., 1984) et PHSRN de la fibronectine (Aota et al., 1994) lors du processus de reconnaissance de leur ligand.

Enfin, la découverte de différents variants d'épissage pour certaines des sous-unités des intégrines contribue davantage à cette diversité des intégrines, à l'origine de la spécificité de reconnaissance de ces hétérodimères au niveau extracellulaire d'une part, mais également au niveau subcellulaire avec le recrutement de protéines structurales responsables de l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires (Fullard, 2004; Shimaoka et al., 2002; Xiong et al., 2001).

2.2. Caractéristiques des sous-unités α

2.2.1. Généralités et classification

Les sous-unités α des intégrines sont composées de 940 à 1140 acides aminés, pour un poids moléculaire de 120 à 180 kDa. Elles sont toutes organisées en une large partie extracellulaire N-terminale suivie d'un domaine transmembranaire et d'une courte partie cytoplasmique en position C-terminale. Cependant, un classement en 2 groupes est établi basé sur leur structure respective. En effet, lors de leur maturation post-traductionnelle dans l'appareil de Golgi, certaines sous-unités α subissent un clivage générant une protéine bicaténaire composée d'une chaîne lourde entièrement extracellulaire d'environ 125 kDa reliée par un pont disulfure unique à une chaîne légère d'environ 25 kDa qui contient le domaine transmembranaire et la partie cytoplasmique. Ce premier groupe, qui correspond à la moitié des sous-unités α , comprend les sous-unités α_{IIb} , α_v , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , α_7 , α_8 et α_9 . A noter que la sous-unité α_4 constitue une exception en étant clivée en 2 chaînes presque identiques de 70 et 80 kDa (Takada et al., 1989). Le deuxième groupe est constitué des 9 autres sous-unités α qui ne subissent pas de clivage post-traductionnel, mais qui sont caractérisées par la présence d'un domaine supplémentaire inséré au niveau de la partie extracellulaire. Ce domaine est appelé le domaine I (I pour insert) (Liddington and Bankston, 1998) ou encore domaine A (A pour son homologie avec le domaine A du FvW) (Colombatti et al., 1993) (Tableau 2 et Figure 2). Enfin, la sous-unité α_E , du deuxième groupe subit également le clivage post-traductionnel caractéristique du premier groupe. Elle est cependant classée dans le deuxième groupe en raison d'une chaîne extracellulaire beaucoup plus courte (158 résidus) que celles constituant les chaînes lourdes des sous-unités α du premier groupe (Shaw et al., 1994).

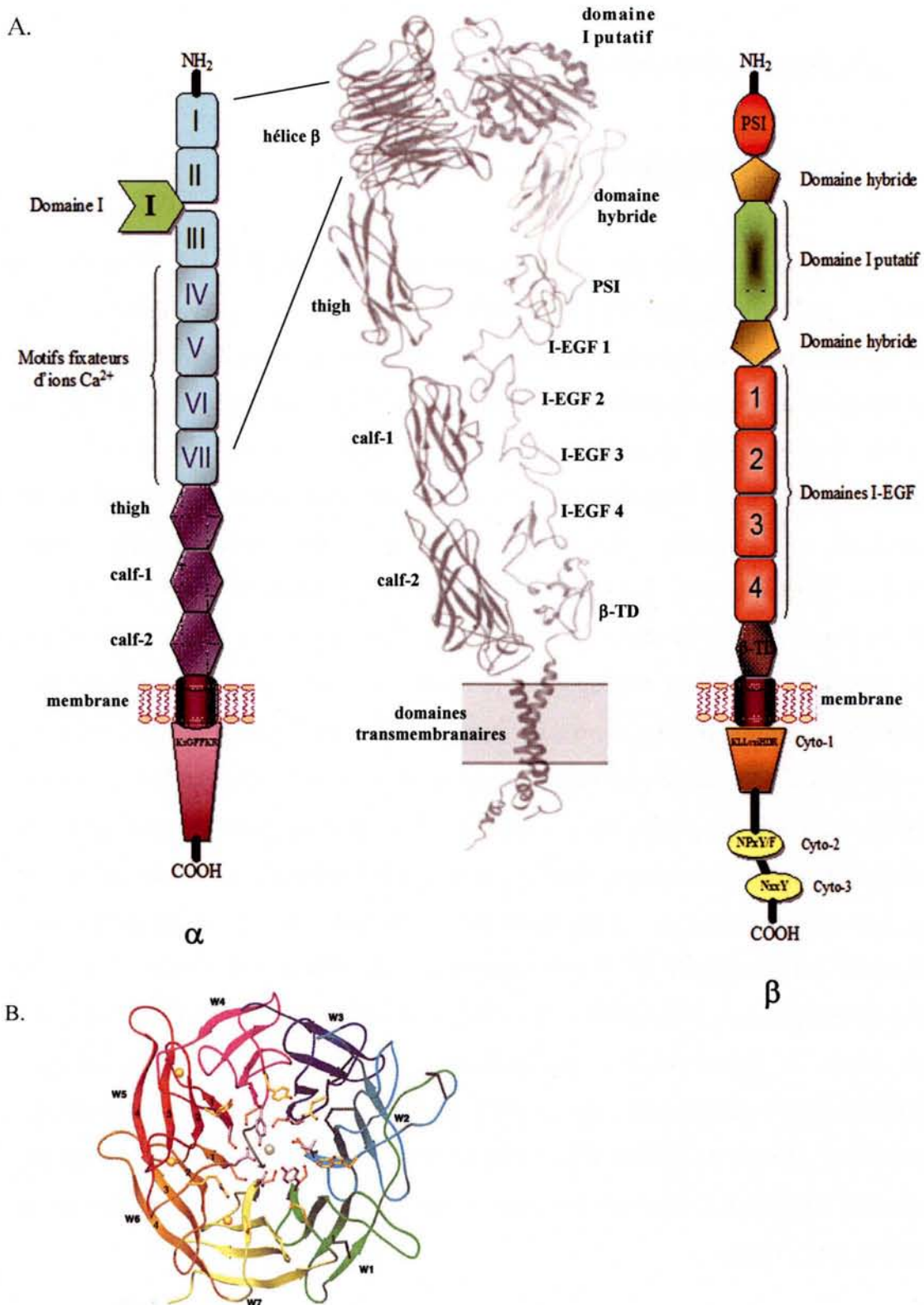


Figure 2 : A. Organisation structurale des sous-unités α et β des intégrines (Modèle structural d'après Arnaout, 2005). B. Structure modélisée de l'hélice β de la sous-unité α vue de dessus. Les 7 segments sont numérotés de W1 à W7 (D'après Springer, 1997).

2.2.2. Les domaines fonctionnels

La partie amino-terminale extracellulaire des sous-unités α est de nature globulaire et est constituée d'environ 440 acides aminés (aa) ordonnés en 7 segments répétitifs (Springer, 1997). L'homologie de séquence de ces segments avec la sous-unité β des protéines G a permis d'établir un modèle structural tridimensionnel, dans lequel les 7 segments s'assemblent en une hélice appelée « β propeller » ou « hélice β » en adoptant chacun une structure en feuillet β composés de 4 brins antiparallèles agencés autour d'un axe (Figure 2B) (Huang and Springer, 1997; Springer, 1997). Récemment, les structures cristallines complètes des domaines extracellulaires des intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Xiong et al., 2001) et $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Xiao et al., 2004) ont été déterminées, confirmant ce modèle. Des motifs capables de fixer des ions calcium bivalents (Ca^{2+}) ont été identifiés sur la face inférieure de l'hélice β , au niveau des boucles, appelées coudes β , des feuilletts β 4 à 7 (ou feuilletts 5 à 7 pour les sous-unités α qui possèdent le domaine I) (Figure 2). Ces sites présentent une structure similaire aux motifs hélice-boucle-hélice « EF-hand » identifiés chez de nombreuses protéines fixatrices de calcium telles que la calmoduline (Kretsinger, 1976; Kretsinger and Nockolds, 1973; Marsden et al., 1990; Tuckwell et al., 1992). Chez les intégrines composées d'une sous-unités α du deuxième groupe, le domaine I d'environ 200 aa est inséré sur la face supérieure de cette hélice β , plus précisément entre le deuxième et troisième feuillet (Huang and Springer, 1997). Ce domaine constitue chez ces intégrines le principal site d'interaction avec le ligand (Diamond et al., 1993; Michishita et al., 1993), par l'intermédiaire d'un site MIDAS (pour metal ion-dependant adhesion site) (Lee et al., 1995; Leitinger and Hogg, 1999; Qu and Leahy, 1996). Ce site MIDAS est constitué d'une séquence DXSXS très conservée à travers tous les domaines I des intégrines, qui permet au récepteur de fixer des ions métalliques et de reconnaître les résidus chargés négativement des ligands (Takagi et al., 2002a; Tozer et al., 1996a, Tozer et al., 1996b; Tuckwell and Humphries, 1997).

Cette hélice β est suivie de 3 domaines extracellulaires juxtamembranaires, appelés thigh, calf-1 et calf 2, structurés en feuilletts β (Xiong et al., 2001), qui se prolongent au niveau transmembranaire par une structure en hélice α hydrophobe

présentant un motif consensus GxxxG jouant un rôle important dans l'hétérodimérisation des sous-unités du récepteur (Lemmon et al., 1992; Luo et al., 2004). Finalement, la sous-unité α se termine au niveau C-terminal cytoplasmique par une courte séquence de 20 à 50 aa non conservés, hormis une séquence juxtamembranaire KxGFFKR (chez les vertébrés) (Figure 2), qui joue un rôle important dans l'expression membranaire des intégrines, l'association avec la chaîne β , et la transduction de signaux provenant de la cellule ou de son milieu externe (De Melker et al., 1997; Hynes, 2002).

2.3. Caractéristiques des sous-unités β

2.3.1. Généralités et classification

A la différence des sous-unités α , les sous-unités β des intégrines sont uniquement monocaténaïres. Elles sont composées de 640 à 800 acides aminés, pour des masses moléculaires comprises entre 90 et 110 kDa (seule exception : la sous-unité β_4 qui compte environ 1820 aa). Les 3 premières sous-unités β décrites furent appelées β_1 , β_2 et β_3 , et la première idée fut que chaque sous-unité pouvait s'associer à différentes sous-unités α . Les intégrines ont donc été à l'origine classées en 3 groupes en fonction de leur sous-unité β . Ainsi, le groupe VLA (pour very late antigen) caractérise les intégrines β_1 (Hemler et al., 1987), le groupe des intégrines leucocytaires correspond aux intégrines β_2 (Kishimoto et al., 1987), et les intégrines β_3 forment le sous-groupe des cytoadhésines (Ginsberg et al., 1988). Par la suite, d'autres études ont démontré que la famille des intégrines était plus complexe, avec notamment 5 autres sous-unités β identifiées, β_4 (Kajiji et al., 1989), β_5 (McLean et al., 1990), β_6 (Sheppard et al., 1990), β_7 (Yuan et al., 1990) et β_8 (Moyle et al., 1991), et qu'une même chaîne α pouvait également s'associer avec différentes chaînes β , comme la chaîne α_v qui s'associe avec β_1 , β_3 , β_5 , β_6 et β_8 (Shimaoka et al., 2002) (Tableau 2).

2.3.2. Les domaines fonctionnels

La région extracellulaire N-terminale des sous-unités β est constituée d'un premier domaine appelé domaine PSI (pour pleckstrin semaphorin integrin homology domain) (Bork et al., 1999; Shimaoka et al., 2002) (Figure 2A). Ce domaine PSI est composé d'environ 50 aa, dont 8 résidus cystéine engagés dans des ponts disulfures intradomains, avec notamment un pont disulfure à distance entre la deuxième cystéine au niveau N-terminal et la huitième cystéine éloignée de plus de 400 aa, et située après le domaine hybride. Il a été montré que ce pont permettait de stabiliser l'intégrine dans son état de faible affinité pour le ligand (Xiao et al., 2004; Zang and Springer, 2001). Le domaine PSI est suivi d'un domaine I d'environ 240 aa, appelé domaine I putatif puisque très homologue à celui de la chaîne α , et comprenant également un site MIDAS DXSXS (Lee et al., 1995). Ce site MIDAS est entouré de 2 autres sites de coordination métallique, le site ADMIDAS (adjacent au site MIDAS) et le site LIMBS (pour ligand-associated metal binding site) (Xiong et al., 2002; Xiong et al., 2001). D'un point de vue fonctionnel, chez les intégrines ne possédant pas de domaine I au niveau de leur sous-unité α , ce domaine I putatif est capable d'interagir directement avec le ligand, alors que pour les intégrines qui possèdent un domaine I, il semble réguler indirectement l'interaction du domaine I avec le ligand (Kamata et al., 2002; Loftus et al., 1990; Takagi et al., 2002a). Ce domaine I putatif des sous-unités β est inséré dans un domaine appelé domaine hybride (aa 50-100 et 350-400 approximativement).

La partie C-terminale du domaine hybride est suivie d'une répétition de 4 domaines riches en cystéines d'environ 45 aa chacun appelés I-EGF (pour integrin-EGF) en raison de leur homologie avec le facteur de croissance épidermique EGF (pour epidermal growth factor). Enfin, un domaine β -TD (pour tail domain), également riche en cystéines, lie la partie extracellulaire à la membrane. L'engagement de ces cystéines dans de nombreux ponts disulfures intramoléculaires joue un rôle crucial au niveau de la structure et de la stabilité des intégrines (Calvete et al., 1991). Ces domaines permettent notamment de transmettre les signaux par l'intermédiaire de différents mouvements structuraux vers chaque extrémité de l'intégrine (Beglova et al., 2002; Takagi et al., 2001a). De la même façon que pour la chaîne α , le domaine transmembranaire de la sous-unité β est constitué d'une hélice α

avec de nouveau un résidu glycine conservé en position centrale qui joue un rôle dans l'interaction avec la chaîne α (Luo et al., 2005; Partridge et al., 2005).

Quant à la partie cytoplasmique, dépourvue d'activité enzymatique intrinsèque, elle comprend entre 15 et 65 aa, à l'exception de celle de β_4 et β_8 (Williams et al., 1994). Cette courte queue cytoplasmique est caractérisée par la présence de 3 séquences hautement conservées cyto-1, -2 et -3 (Figure 2), correspondant respectivement à une séquence juxtamembranaire KLLvxiHDR (où x est un résidu non-conservé, i un des résidus I, F ou L et v un des résidus V, I ou M), un motif NPXY/F, et un dernier motif NXXY du côté C-terminal (Reszka et al., 1992). Alors que cyto-1 ne semble interagir qu'avec la protéine cytosquelettique skélémine (Reddy et al., 1998), les motifs cyto-2 et cyto-3 recrutent de nombreuses autres protéines cytosquelettiques ou de signalisation essentielles dans les voies de signalisation conduisant à l'étalement cellulaire (Liu et al., 2000; Ylänné et al., 1995).

Le motif cyto-2 NPXY/F a initialement été identifié en tant que séquence consensus permettant l'internalisation par endocytose des récepteurs des LDL (pour low density lipoprotein) et de l'insuline (Chen et al., 1990; Rajagopalan et al., 1991). Des analyses par RMN (pour résonance magnétique nucléaire) ont montré par la suite que la présence du résidu proline dans le motif NPXY/F est à l'origine d'une boucle β (Backer et al., 1992; Bansal and Gierasch, 1991; Forman-Kay and Pawson, 1999; Margolis et al., 1999; Ulmer et al., 2001), formant un site de reconnaissance caractéristique indispensable pour les interactions avec les protéines présentant un domaine d'interaction PTB (pour phosphotyrosine binding domain) (Calderwood et al., 2003; Trub et al., 1995). Par ailleurs, il est intéressant de noter que pour les intégrines β_3 , ce processus d'interaction est hautement régulé par l'état de phosphorylation de la sous-unité β au niveau des résidus tyrosine des motifs NPXY et NXXY (Calderwood et al., 2003; Forman-Kay and Pawson, 1999; Phillips et al., 2001), alors que pour les intégrines β_2 présentant des motifs NPLF dépourvus de ces résidus tyrosine cytoplasmiques, ce sont des résidus phénylalanine, thréonine et sérine qui sont impliqués (Hibbs et al., 1991). Ces motifs conservés des sous-unités β interviennent donc de façon primordiale dans le contrôle du recrutement des protéines cytoplasmiques (Liddington and Ginsberg, 2002; Schaffner-Reckinger et al., 1998;

Vinogradova et al., 2004), ainsi que dans la modulation de l'affinité de l'intégrine (O'Toole et al., 1995) ou encore l'internalisation des intégrines (Chen et al., 1990). D'une façon générale, cette partie cytoplasmique des sous-unités β joue un rôle de pivot dans la signalisation cellulaire en établissant un lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine intracellulaire, d'autant plus important que l'existence de nombreux variants d'épissage au niveau des différentes sous-unités β_1 (β_{1B} , β_{1C} , β_{1C-2} et β_{1D}), β_3 (β_{3B} et β_{3C}), β_4 (β_{4B} , β_{4C} , β_{4D} et β_{4E}) et β_5 (β_{5B}) (de Melker and Sonnenberg, 1999) permet de mettre en évidence une régulation subtile des fonctions des intégrines.

3. Mode de fonctionnement des intégrines

Une grande diversité de processus physiologiques, tant vitaux comme le développement embryonnaire, l'hémostase, la cicatrisation, la réponse immunitaire, la différenciation cellulaire, que pathologiques comme la thrombose, la thrombasthénie ou la dissémination métastatique des cellules tumorales, dépendent d'une régulation dynamique des propriétés adhésives des intégrines (Hynes and Zhao, 2000). Ces propriétés sont déterminées, d'une part, par l'état d'affinité, et d'autre part, par l'état d'avidité des intégrines. L'avidité est fonction du degré d'oligomérisation ou d'agrégation des récepteurs dans la membrane cellulaire. L'état d'affinité des intégrines dépend de la conformation de leur domaine extracellulaire.

D'une façon générale, les intégrines sont impliquées dans le transfert bidirectionnel d'informations entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule (Hynes and Zhao, 2000), en établissant un lien dynamique entre les molécules d'adhérence extracellulaires et le cytosquelette de la cellule, par la régulation de divers signaux tels que les mouvements ioniques transmembranaires et intracellulaires, le métabolisme des lipides, la voie des RhoGTPases, la cascade Ras-ERK, ou les phosphorylations par les tyrosines kinases (Clark and Brugge, 1995; Schlaepfer and Hunter, 1997; Schwartz et al., 1995). Les intégrines contrôlent ainsi de nombreuses fonctions cellulaires (Figure 3) chez la plupart des types cellulaires comme par exemple la progression du cycle cellulaire au niveau de la phase G1, au cours duquel la répllication de cellules adhérentes telles que les fibroblastes ou les cellules

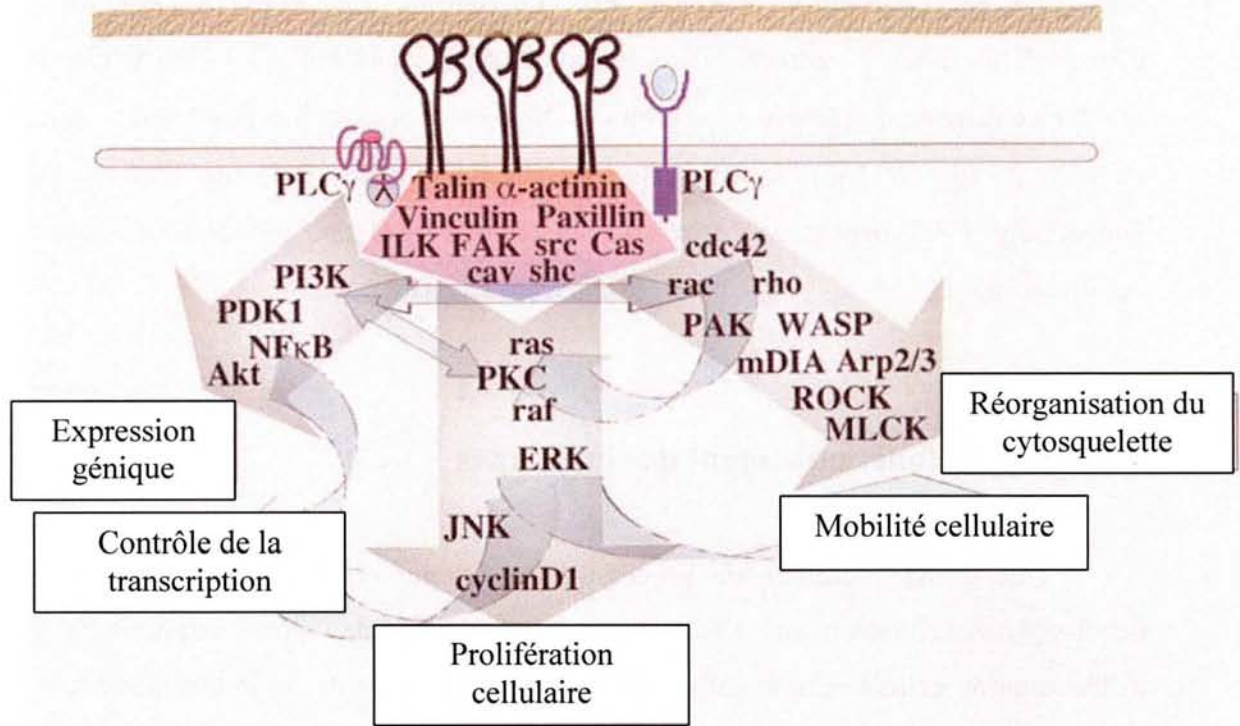


Figure 3: Les diverses fonctions cellulaires contrôlées par les intégrines (D'après Hynes, 2002)

endothéliales nécessite la fixation à un substrat solide (Folkman and Moscona, 1978). Certaines études suggèrent que suite à l'engagement de l'intégrine, cette prolifération cellulaire est médiée principalement par la voie de la MAP (pour mitogen-activated protein) kinase ERK (pour extracellular signal-regulated kinase) par l'intermédiaire de l'adaptateur transmembranaire cavéoline-1 établissant un lien physique entre le récepteur, au niveau notamment de la sous-unité α des intégrines $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$, et certaines tyrosine kinases telles que Fyn ou Yes, qui recrutent la protéine Shc, puis le complexe Grb2/Sos (Barberis et al., 2000; Schwartz, 1997; Wary et al., 1998).

À l'inverse, l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est également modulée par l'activité des intégrines, puisqu'il a été montré que le maintien de cellules en suspension sans contact avec des protéines de la MEC pouvait déclencher le programme apoptotique, également appelé anoïkis (Frisch and Francis, 1994; Meredith et al., 1993). D'autre part, le contrôle primordial de la différenciation et de l'expression génique est aussi dépendant du fonctionnement des intégrines, de par leur clustering ou l'induction de changements de morphologie cellulaire, d'organisation cytosquelettique, de tensions mécaniques, et ceci pour une grande variété de cellules, notamment les cellules épithéliales, les cellules musculaires, les adipocytes, les kératinocytes ou encore les chondrocytes (Schwartz et al., 1995). L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est par exemple responsable du déclenchement d'un programme d'expression génique dépendant du facteur de transcription NF κ B (pour nuclear factor κ B). En effet, l'activation du facteur NF κ B par l'adhésion de cellules endothéliales à la fibronectine joue un rôle crucial dans la régulation des phénomènes d'angiogénèse et d'inflammation, au travers de l'induction de voies de signalisation intracellulaire médiées par Ras, PI3K ou les RhoGTPases (Klein et al., 2002). Enfin, un rôle qui nous intéresse plus particulièrement ici, et qui sera discuté par la suite est le rôle joué par l'interaction intégrine-MEC dans l'activation, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, ainsi que l'adhésion et la migration cellulaires en général.

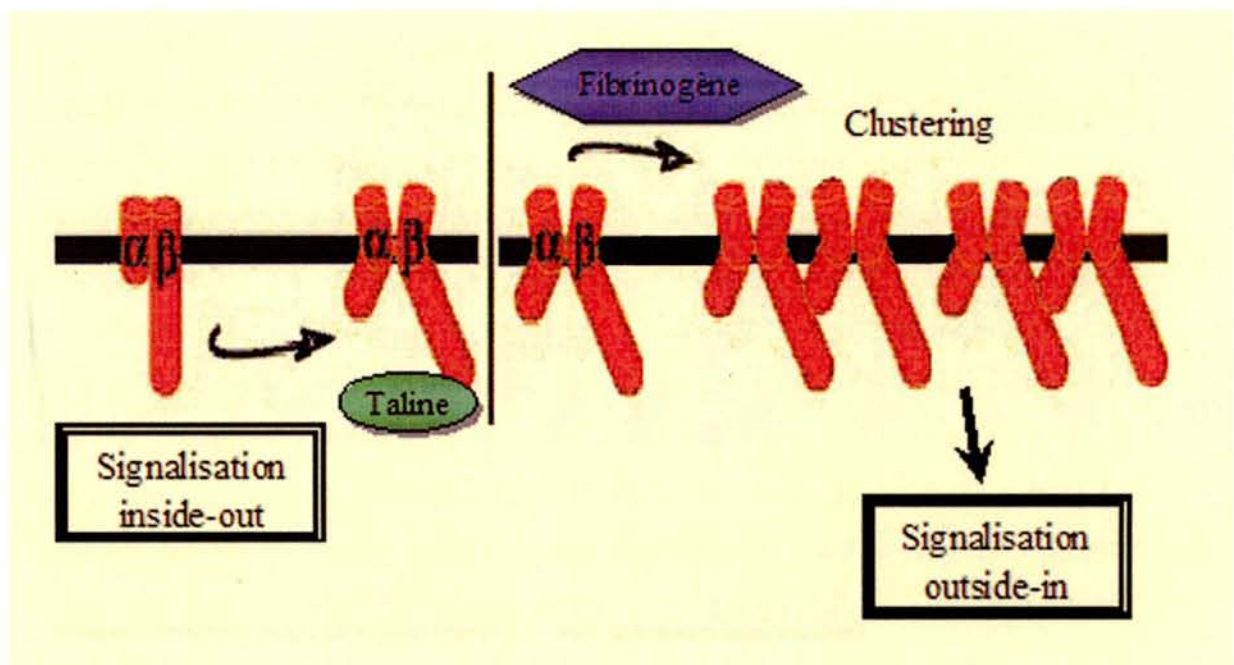


Figure 4 : Mécanisme bidirectionnel de signalisation médié par les intégrines (D'après Shattil et Newman, 2004)

Les intégrines fonctionnent donc en tant que relai bidirectionnel dans la transmission des signaux au travers de la membrane plasmique. Le mécanisme mis en jeu est dans un premier temps un transfert de signaux intracellulaires de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur par l'intermédiaire de l'intégrine. Ce processus de signalisation est désigné par le terme « inside-out » (Figure 4). A l'inverse, la signalisation « outside-in » traduit le transfert des signaux provenant de l'extérieur de la cellule, et transmis vers l'intérieur via l'intégrine

3.1. Signalisation « inside-out » et activation des intégrines

Au cours de la signalisation inside-out, l'affinité des intégrines pour leur ligand extracellulaire est augmentée dans un laps de temps inférieur à la seconde, et se caractérise dans un premier temps par l'initiation d'une cascade de signalisation au niveau intracellulaire induite par d'autres récepteurs membranaires de la cellule. Cette signalétique induit un certain nombre de changements conformationnels qui se répercutent le long de l'intégrine, et qui conduisent à une augmentation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand extracellulaire (Liddington and Ginsberg, 2002; Takagi et al., 2002b). Ce dernier phénomène, spécifique des intégrines par rapport aux autres récepteurs membranaires, est plus généralement appelé « processus d'activation » et sera détaillé au cours du chapitre II.

Parmi les protéines activatrices des intégrines, la taline est certainement la mieux caractérisée, car elle fut la première protéine détectée en interaction directe avec l'intégrine (Horwitz et al., 1986), et de par sa capacité à interagir avec diverses sous-unités β telles que β_{1A} , β_{1D} , β_2 , β_7 et surtout β_3 (Calderwood et al., 1999; Knezevic et al., 1996; Pfaff et al., 1998; Sampath et al., 1998). La cytohésine-1 au niveau des intégrines β_2 (Kolanus et al., 1996; Nagel et al., 1998), la calréticuline qui interagit avec le motif GFFKR de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Coppolino et al., 1995), et la β_3 -endonexine pour β_3 (Kashiwagi et al., 1997), ainsi que certaines enzymes telles que la PI3K ou autres phospholipases (Kunapuli, 1998; Lee et al., 1996), jouent également un rôle dans la signalisation inside-out et donc dans la régulation de l'affinité des intégrines. Enfin, il est intéressant de noter que l'activation peut être également obtenue de manière artificielle en utilisant certains anticorps dits activateurs, tels que

l'anticorps D3GP3 (Kouns et al., 1990), ou l'anticorps anti-LIBS2 (pour anti-ligand-induced binding site) (O'Toole et al., 1990), qui activent l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et induisent la fixation du fibrinogène soluble et l'agrégation plaquettaire (Shattil et al., 1985). Ces résultats indiquent par ailleurs que les régions reconnues par ces anticorps au niveau de la sous-unité β_3 (aa 422-490 pour D3GP3, aa 602-690 pour l'anti-LIBS2), sont éloignées de la poche de reconnaissance du ligand, et définissent des régions jouant un rôle déterminant dans le processus d'activation de l'intégrine, en l'occurrence ici la région charnière domaine hybride- domaine I-EGF1 reconnue par D3GP3, et le domaine périmembranaire β -TD reconnu par l'anti-LIBS2. A noter en outre que ces régions sont caractérisées par la présence de nombreux ponts disulfures, témoignant de ce fait de leur importance dans le maintien de l'état conformationnel du récepteur et lors de réarrangements structuraux conduisant à l'activation de l'intégrine (Yan and Smith, 2000).

3.2. Clustering des intégrines et signalisation « outside-in »

La reconnaissance d'un ligand extracellulaire constitue la première étape de la signalisation outside-in et déclenche une série de modifications structurales au niveau de l'intégrine, conduisant à l'initiation d'une cascade de signaux intracellulaires correspondant au recrutement de diverses protéines au niveau de l'extrémité C-terminale cytoplasmique du récepteur, assurant ainsi le lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine de la cellule (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Hynes, 1992; Martin et al., 2002a). En parallèle, cette interaction avec le ligand conduit à un regroupement ou « clustering » des intégrines à la surface membranaire en complexes qui constituent de véritables points d'ancrage de la cellule, que l'on peut regrouper sous le terme d'adhérences matricielles, et qui augmente l'avidité pour le ligand (Peerschke, 1995; Shattil et al., 1998) (Figure 4). Ces complexes sont hétérogènes d'un point de vue moléculaire et peuvent apparaître sous différentes formes.

On trouve notamment les complexes focaux, observés rapidement à la périphérie cellulaire (Nobes and Hall, 1995; Zaidel-Bar et al., 2004), et qui évoluent en une organisation finale mature, l'adhérence focale (AF) (Ballestrem et al., 2001;

DeMali et al., 2003; Zaidel-Bar et al., 2003; Zaidel-Bar et al 2004). Ce sont ces AF qui vont assurer le lien mécanique entre la MEC et le cytosquelette d'actine de la cellule (Hynes, 1992; Martin et al., 2002a). Elles sont constituées de nombreuses protéines cytoplasmiques structurales, adaptatrices et de signalisation. Cependant, en dépit du fait que ces AF soient présentées comme des structures statiques, elles constituent avant tout des complexes hautement dynamiques de par leurs assemblages, désassemblages et translocations qui ont lieu au cours des processus d'adhésion, polarisation, migration et division cellulaire (Zaidel-Bar et al., 2004; Zamir et al., 2000; Zamir et al., 2001). A côté de ces AF « classiques » sont retrouvées également des adhérences dites fibrillaires, et qui sont plutôt caractéristiques des intégrines $\alpha_5\beta_1$ en contact avec la fibronectine (Zamir et al., 1999). Elles diffèrent des AF par leur morphologie caractéristique plus allongée et leur distribution dans des zones plus centrales de la face ventrale des cellules. De fortes concentrations en tensine γ sont aussi détectées, mais peu de protéines phosphorylées (Zaidel-Bar et al., 2004). Enfin, les podosomes constituent une dernière forme d'adhérence médiée par les intégrines (Linder and Aepfelbacher, 2003; Marchisio et al., 1984). Ce sont de petites structures cylindriques contenant un noyau d'actine, entouré de protéines phosphorylées et d'autres protéines typiques des AF comme la vinculine ou la taline. Les podosomes sont caractéristiques des cellules hématopoïétiques dépourvues d'AF, et sont notamment impliqués dans la mobilité des monocytes et des macrophages (Zamir and Geiger, 2001).

D'un point de vue général, au niveau de ces différentes structures, les parties cytoplasmiques des intégrines ne sont pas en communication directe avec l'actine, si bien qu'un grand nombre de protéines assure la connexion au niveau structural, alors que d'autres interviennent spécifiquement dans la transduction de signaux (Critchley, 2000; Geiger et al., 2001). On recense en effet actuellement plus de 50 protéines (Zamir and Geiger, 2001) dont les plus caractéristiques sont, au niveau du cytosquelette, la vinculine, la paxilline, la taline, l' α -actinine, la tensine, l'actopaxine et l'actine. La plupart de ces protéines présentent un site direct d'interaction avec les parties cytoplasmiques des intégrines (Liu et al., 2000; Zamir and Geiger, 2001). Les protéines du cytosquelette interagissent en outre entre elles, comme l'actopaxine avec la paxilline et l'actine (Nikolopoulos and Turner, 2000), mais aussi avec les

nombreuses protéines de la signalisation, mettant ainsi en évidence leur rôle fondamental dans l'organisation du cytosquelette et dans la signalisation intracellulaire conduisant à des événements d'adhérence ou de mobilité cellulaire. La paxilline par exemple, comporte des sites de fixation pour d'innombrables protéines telles la FAK, PYK2, Csk, Src, Arf et RhoGTPases, PAK (pour p21-Cdc42/RacGTPase-activated serine threonine kinase), Nck, Pix/Cool ou encore ROK (pour Rho kinase) (Sabe et al., 1994; Salgia et al., 1996; Schaller and Parsons, 1994; Turner et al., 1999; Turner and Miller, 1994), témoignant de la complexité des voies de signalisation mises en jeu.

Chapitre II :

Relation structure-fonction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est le principal récepteur du fibrinogène plasmatique et est presque exclusivement exprimée à la surface des plaquettes sanguines (Phillips et al., 1988). Également connue sous le nom de glycoprotéine GPIIb-IIIa, elle appartient avec le récepteur de la vitronectine $\alpha_v\beta_3$ au sous-groupe des cytoadhésines en raison de leur sous-unité β_3 (Ginsberg et al., 1988). Alors que les récepteurs $\alpha_v\beta_3$ sont très faiblement exprimés à la surface membranaire des plaquettes sanguines (entre 50 et 100 récepteurs par plaquette environ) (Coller et al., 1991), et jouent alors un rôle négligeable au cours de l'agrégation plaquettaire (Law et al., 1996), les récepteurs $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont exprimés en très grand nombre (entre 50 000 et 80 000 récepteurs par plaquette environ), ce qui représente approximativement 15% des protéines présentes (Jennings and Phillips, 1982). De ce fait, $\alpha_{IIb}\beta_3$ joue un rôle essentiel dans l'hémostase primaire, en permettant l'association des plaquettes entre elles ou à la matrice sous-endothéliale des vaisseaux sanguins (Phillips et al., 1988; Plow and Ginsberg, 1989).

1. Rôle physiologique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface plaquettaire

Les plaquettes sont des particules anucléées discoïdes issues de la lignée mégacaryocytaire qui circulent librement dans le sang (à une concentration de 1,5 à 4.10^8 plaquettes/mL) et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité du système vasculaire: elles constituent la première ligne de défense contre l'hémorragie (Plow et al., 1986; Kieffer and Phillips, 1990; Kieffer et al., 1991; Payrastre et al., 2000). Ce rôle fondamental des plaquettes dans la régulation de l'hémostase se traduit par un mode de fonctionnement subtil et particulièrement bien contrôlé de son

principal récepteur, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. En effet, comme il en a déjà été question dans le premier chapitre, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est un récepteur inductible et est exprimée à la surface des plaquettes circulantes constitutivement dans un état « de repos », c'est à dire un état de faible affinité pour son ligand, le fibrinogène plasmatique (Kieffer and Phillips, 1990). Les plaquettes circulant dans le flux sanguin sont alors non-thrombogènes et incapables d'interagir avec l'endothélium vasculaire ou le fibrinogène plasmatique. Cependant, lors d'une blessure vasculaire, la libération d'agonistes solubles tels que l'ADP ou la thrombine, ainsi que l'exposition des protéines du sous-endothélium vasculaire, initient l'adhésion et l'agrégation plaquettaires. Ce processus conduit dans un premier temps à l'adhérence rapide des plaquettes au niveau de la brèche vasculaire. Cette adhérence est assurée par les récepteurs GPIb-IX-V qui vont interagir avec le Facteur von Willebrand (FvW) dans des conditions de flux élevé, ou encore l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, qui reconnaît le collagène dans des conditions de faible flux. Ces récepteurs seront responsables de la reconnaissance initiale du site endommagé, et de l'attachement plaquettaire au niveau du sous-endothélium.

Par la suite, la signalisation intracellulaire initiée par ces récepteurs, de même que la signalisation induite par les agonistes, activent l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ce processus permet alors aux plaquettes d'interagir rapidement avec le fibrinogène soluble. Le fibrinogène étant une molécule dimérique possédant plusieurs sites d'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, son interaction avec plusieurs plaquettes voisines conduit à l'agrégation plaquettaire, aboutissant à la formation d'un thrombus permettant de colmater la brèche vasculaire (Blockmans et al., 1995; Fullard, 2004). Ce phénomène est d'autant plus rapide que la quantité de récepteurs $\alpha_{IIb}\beta_3$ disponibles à la surface plaquettaire est pratiquement doublée en raison de la libération d'un pool interne de récepteurs présents dans les membranes internes du système canaliculaire ainsi que dans des granules de stockage α (Berman et al., 1986; Quinn et al., 1999). En outre, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ activée est également impliquée dans l'étalement des plaquettes au niveau du sous-endothélium en interagissant avec le FvW immobilisé. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ joue de ce fait un rôle majeur dans le mécanisme de régulation de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires durant l'hémostase, si bien que des défauts génétiques

caractérisés par une expression insuffisante voire nulle de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, ou l'expression d'un récepteur non fonctionnel sont à l'origine d'une maladie hémorragique grave, la thrombasthénie de Glanzmann (Caen et al., 1966; Kieffer and Phillips, 1990; Nurden and Caen, 1974; Phillips and Agin, 1977a). Au contraire, l'agrégation excessive des plaquettes et la formation de thrombi peut conduire à une occlusion vasculaire, responsable d'un arrêt cardiaque (infarctus du myocarde) ou à un accident vasculaire cérébral dû à une obstruction des vaisseaux sanguins.

2. Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

2.1. Biosynthèse et formation du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est le principal récepteur à la surface plaquettaire. Toutefois, les plaquettes étant des éléments anucléés très pauvres en ARNm, la biosynthèse de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ a plutôt été étudiée dans différents modèles cellulaires tels que les mégacaryocytes (Duperray et al., 1987), la lignée érythroleucémique HEL (Rosa and McEver, 1989), les cellules COS-1 (Bennett et al., 1993; O'Toole et al., 1989), les cellules CHO (Fujisawa et al., 1992) et les cellules M21 (Kieffer et al., 1991). Le gène codant pour la sous-unité α_{IIb} a été localisé au niveau du chromosome 17, et plus précisément dans la région q21.1-q21.3 (Cong et al., 1988). Il couvre une région de 17,2 kb comportant une trentaine d'exons (Heidenreich et al., 1990), et est transcrit en un ARNm de 3,5 kb codant pour un peptide de 1039 aa, avec une séquence leader de 32 nucléotides (Prandini et al., 1988). La sous-unité α_{IIb} est traduite en une seule chaîne polypeptidique (Duperray et al., 1987), qui est ensuite clivée au niveau de l'appareil de Golgi en deux parties reliées par un pont disulfure (Bray et al., 1986; Rosa and McEver, 1989). Quant à la sous-unité β_3 , le gène codant a été identifié à 250 kb du gène α_{IIb} (Bray et al., 1988) au niveau de la région q21-22 du bras long du même chromosome 17, et couvre une région de 63 kb (Wilhide et al., 1997). Le gène comporte 15 exons avec un premier intron particulièrement long de 16,7 kb. L'ARNm transcrit a une taille de 3,17 kb et

est traduit en un polypeptide de 762 acides aminés avec un peptide signal de 26 aa du côté N-terminal (Fitzgerald et al., 1987; Rosa et al., 1988; Sosnoski et al., 1988).

Il est intéressant de noter que les plaquettes produisent 5 fois plus de la forme précurseur de la sous-unité α_{IIb} par rapport à β_3 si bien que toutes les molécules de β_3 synthétisées sont assemblées en hétérodimères, le surplus de molécules pré- α_{IIb} étant dégradé (Rosa and McEver, 1989). Il a également été montré que l'association des deux sous-unités au niveau du réticulum endoplasmique est une étape cruciale dans la maturation nécessaire à l'expression d'un récepteur totalement fonctionnel à la surface de la cellule (Duperray et al., 1989; OToole et al., 1989). Au cours de ce processus de dimérisation, un certain nombre de protéines chaperonnes du réticulum telles que la protéine BiP (GRP78) et la calnexine semblent jouer un rôle important (Kahn et al., 1996; Lenter and Vestweber, 1994). Après leur assemblage, les hétérodimères $\alpha\beta$ sont transportés dans l'appareil de Golgi où différentes modifications post-traductionnelles sont opérées. Il y a notamment clivage du précurseur α_{IIb} et formation du pont disulfure entre les deux chaînes α_H et α_L matures, plus précisément entre le résidu cystéine en position 826 C-terminale de la chaîne lourde extracellulaire et le résidu cystéine en position 9 N-terminale de la chaîne légère transmembranaire (Calvete et al., 1989; Calvete and Gonzalez-Rodriguez, 1986; Phillips and Agin, 1977b). Iwamoto et collaborateurs ont montré que ce clivage de la sous-unité α_{IIb} en deux chaînes, et la liaison par un pont disulfure, constituait une étape ultime de la maturation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ puisqu'en absence de ce clivage, le récepteur ne devient pas fonctionnel (Calvete, 1995; Iwamoto et al., 1994). En outre, l'absence d'une des sous-unités, lors de la formation du complexe $\alpha\beta$, empêche la maturation et l'exportation vers la surface de la sous-unité isolée, et conduit à sa dégradation dans le cytoplasme (Bray, 1994).

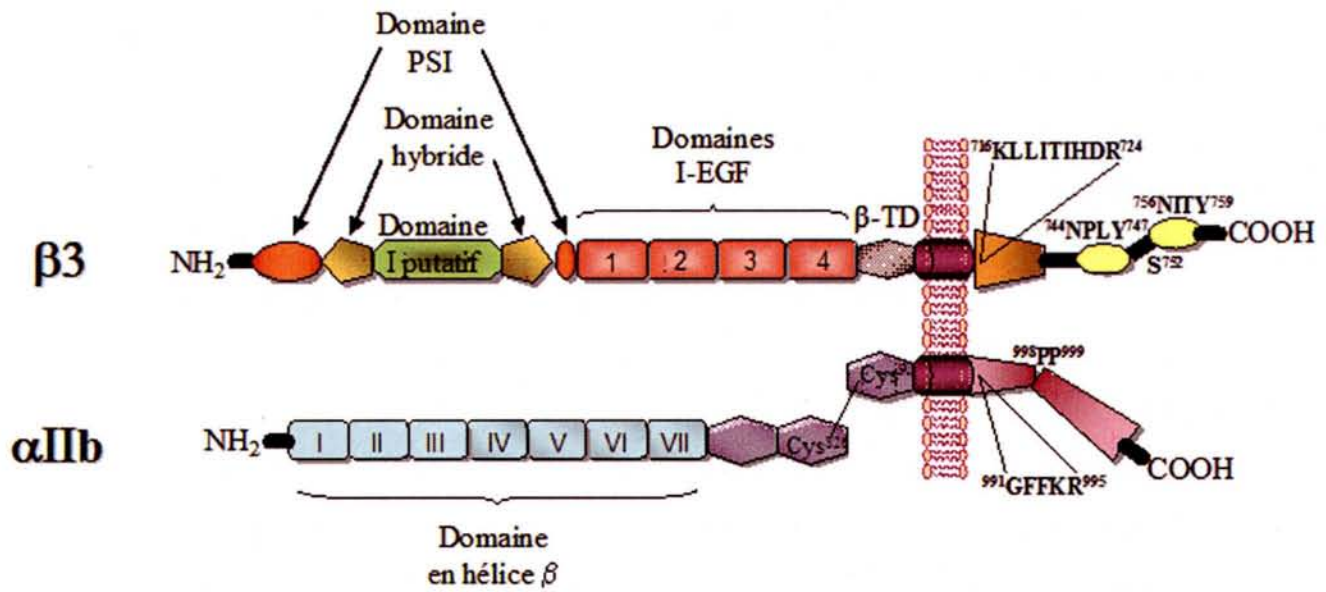
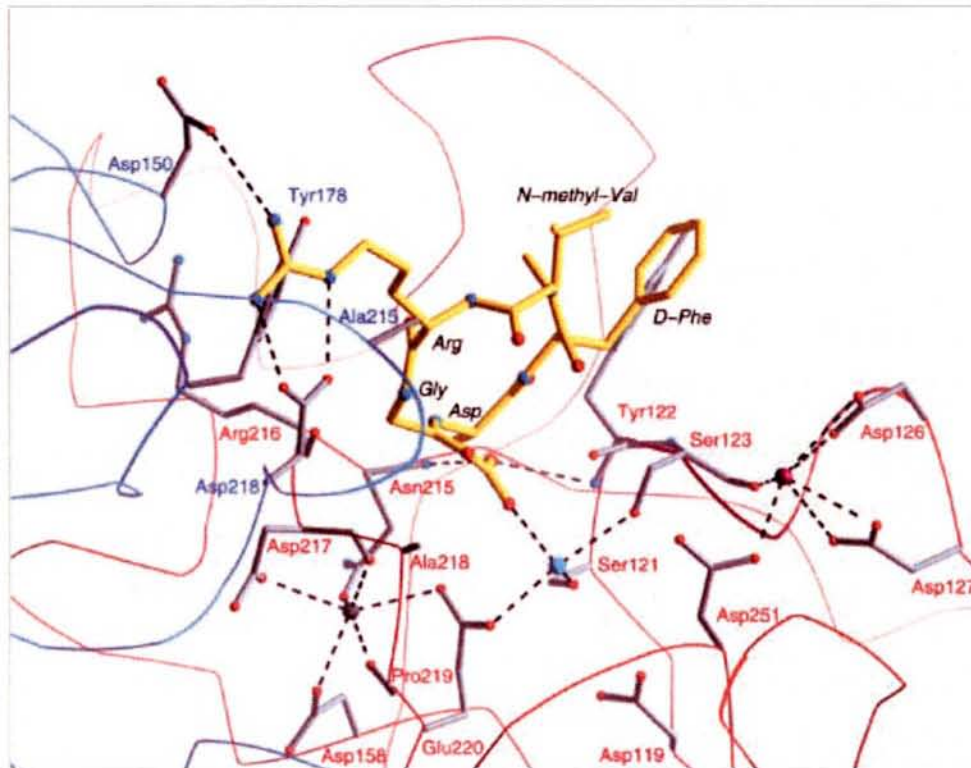
L'association des sous-unités α_{IIb} et β_3 en complexe stable est également sous le contrôle du calcium puisque le traitement du récepteur purifié par des chélateurs du calcium comme l'EDTA ou l'EGTA induit sa dissociation irréversible (Jennings and Phillips, 1982; Kunicki et al., 1981). Une stabilité diminuée du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ a aussi été observée chez certains patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann ayant une mutation ponctuelle au niveau de β_3 , notamment les mutations R²¹⁴W (Lanza et al., 1992), D¹¹⁹Y (Loftus et al., 1990) ou encore S¹⁶²L (Jackson et al., 1998).

Par ailleurs, une étude indique que le domaine cytoplasmique de la sous-unité α_{IIb} , et notamment la séquence conservée GFFKR jouerait un rôle important dans l'expression membranaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Loh et al., 1996). Il a en effet été montré chez des lymphocytes B, que la délétion ou la substitution de ce motif GFFKR par un motif polyalanine (AAAAA) empêchaient l'exposition à la surface de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Loh et al., 1996). D'autre part, les 2 phenylalanines du motif GFFKR semblent essentielles pour l'hétérodimérisation du récepteur (De Melker et al., 1997).

Finalement, au terme de sa maturation et du processus d'expression membranaire, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ se compose d'une sous-unité α_{IIb} présentant une masse moléculaire de 136 kDa en conditions physiologiques, alors qu'en conditions réductrices, elle est partagée en une chaîne lourde de 125 kDa et une chaîne légère de 25 kDa. Quant à la sous-unité β_3 , elle présente un poids moléculaire apparent de 95 kDa, qui augmente à 114 kDa en conditions réductrices (Jennings and Phillips, 1982).

2.2. Les domaines extracellulaires

Les 2 sous-unités s'assemblent au niveau extracellulaire pour former une sorte de « tête » globulaire ($90 \times 60 \times 45 \text{ \AA}^3$) composée de l'hélice β de la sous-unité α_{IIb} et des domaines hybrides et I putatif de la sous-unité β_3 , et qui repose sur 2 « jambes » s'insérant dans la membrane. Au niveau de la tête globulaire de l'intégrine, la chaîne lourde de α_{IIb} , entièrement extracellulaire et qui ne possède pas de domaine I, comporte du côté N-terminal 7 segments répétitifs qui s'assemblent en une hélice β , présentée lors du chapitre I (Figure 2 et 5) (Springer, 1997). Les 4 derniers segments de cette hélice β sont capables de fixer à leur base un cation bivalent (Ca^{2+}) (Gulino et al., 1992). Le site de fixation de l'ion calcium est localisé à chaque fois dans une boucle présentant une séquence consensus de 9 résidus DhD/NxD/NGhxD (où h est un résidu hydrophobe et x un aa quelconque), qui coordinent le cation par leurs atomes d'oxygène (Springer, 1997; Xiong et al., 2001). L'association des 2 sous-unités ainsi que le maintien du récepteur dans son état de faible affinité sont dépendants de la présence de ces cations calcium au niveau des 4 sites (Gulino et al., 1992; Kirchhofer et al., 1991).

Figure 5 : Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ Figure 6 : Schématisation au niveau atomique de l'interaction d'un peptide synthétique RGD avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les pointillés représentent les interactions au niveau des sites LIMBS, MIDAS et ADMIDAS (D'après Xiong et al., 2002).

Du côté de la sous-unité β_3 , la tête est représentée par le domaine hybride (aa 55-108 et 353-432) dans lequel est inséré le domaine I putatif (aa 109-352), qui contient 3 sites de coordination métallique, le site MIDAS putatif formé par les chaînes latérales des résidus Asp¹¹⁹, Ser¹²¹, Ser¹²³, Glu²²⁰ et Asp²⁵¹, et qui constitue une crevasse au centre du site, et les sites ADMIDAS, formés par l'extrémité carbonyle des résidus Ser¹²³ et Met³³⁵, et par les chaînes latérales des résidus Asp¹²⁶ et Asp¹²⁷, et LIMBS formés par l'extrémité carboxylate du résidu Glu²²⁰, les chaînes latérales des résidus Asp¹⁵⁸, Asn²¹⁵ et Asp²¹⁷ et les fonctions carbonyle des résidus Asp²¹⁷ et Pro²¹⁹ (Xiong et al., 2002; Xiong et al., 2003; Xiong et al., 2001) (Figure 6). Xiong et collaborateurs ont montré que le cation métallique du site MIDAS de β_3 coordinaient directement l'interaction avec la chaîne latérale d'un résidu acide caractéristique des ligands des intégrines (Xiong et al., 2002), alors que les 2 autres sites adjacents ADMIDAS et LIMBS semblent servir respectivement de sites de régulation négative et positive de l'interaction (Chen et al., 2003).

Cette tête globulaire, qui comporte donc la poche de fixation du ligand, repose sur 2 jambes représentées par la partie C-terminale des sous-unités α_{IIb} et β_3 . La sous-unité α_{IIb} est composée successivement des domaines « thigh » (aa 439-592), « calf 1 » (aa 602-738) et « calf 2 » (aa 739-956). Un ion métallique a été trouvé au niveau du domaine calf 1, et le domaine calf 2 présente une boucle à l'origine de la liaison par pont disulfure avec la chaîne légère de α_{IIb} . Quant à la sous-unité β_3 , elle comporte le domaine PSI du côté N-terminal (aa 1-54), non compris dans la tête globulaire et contenant 7+1 cystéines impliquées dans des ponts disulfures (Cf. paragraphe 4.5.), ainsi que 4 domaines consécutifs I-EGF (aa 453-605) proches de la membrane (Takagi et al., 2001a), également riches en cystéines, suivis d'un domaine β -TD terminal (aa 606-690). Ces derniers domaines interviennent dans le mécanisme d'activation de l'intégrine et leur rôle sera discuté par la suite. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ s'insère dans la membrane au niveau de ses domaines transmembranaires en hélice α hydrophobe. Les 2 domaines interagissent entre eux par l'intermédiaire de résidus glycine, en position 972 et 976 au niveau de la chaîne α_{IIb} et principalement par la glycine Gly⁷⁰⁸ de la chaîne β_3 . Du fait de cette étroite interaction, les domaines

transmembranaires régulent fortement l'affinité du récepteur (Ginsberg et al., 2005; Luo et al., 2005; Partridge et al., 2005).

2.3. Les parties cytoplasmiques

Les parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, bien que de faible longueur (20 aa pour α_{IIb} et 47 pour β_3), jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'affinité de l'intégrine. En effet, la chaîne α_{IIb} présente une séquence juxtamembranaire $^{991}\text{GFFKR}^{995}$ remarquablement conservée au niveau des différentes sous-unités α des intégrines (Vinogradova et al., 2000; Williams et al., 1994), qui semble établir des interactions hydrophobes et électrostatiques avec une autre séquence périmembranaire conservée de la sous-unité β_3 ($^{716}\text{KLLITIHDR}^{724}$). Cette interaction, notamment par l'intermédiaire d'un pont salin entre les résidus R^{995} de α_{IIb} et D^{723} de β_3 (Hughes et al., 1996), contraint l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à garder une conformation de faible affinité pour le fibrinogène (Hughes et al., 1996; Peyruchaud et al., 1998; Vinogradova et al., 2002). La partie cytoplasmique de la sous-unité α_{IIb} contient également deux résidus proline en position 998 et 999 qui n'interviennent pas dans l'interaction avec β_3 , mais qui jouent un rôle non négligeable dans la stabilité de l'état de repos du récepteur, puisque leur mutation en alanine induit l'activation (Leisner et al., 1999; Vinogradova et al., 2000). Ces 2 résidus proline sont à l'origine d'une boucle dans laquelle s'insère un ion calcium (Haas and Plow, 1996; Vallar et al., 1999). L'ion calcium interagit avec l'extrémité α_{IIb} C-terminale en raison de la présence de nombreux résidus acides peu conservés ($^{1001}\text{EEDDEEGE}^{1008}$), qui exercent en outre un effet contraignant lors du mécanisme d'activation du récepteur (Vinogradova et al., 2000).

Au niveau de la partie cytoplasmique de β_3 , les deux motifs hautement conservés, cyto-2 ($^{744}\text{NPLY}^{747}$) et cyto-3 ($^{756}\text{NITY}^{759}$), jouent un rôle essentiel dans le recrutement de nombreuses protéines du cytosquelette, et dans la signalisation conduisant à l'étalement cellulaire (Liu et al., 2000; Ylänne et al., 1995) (Figure 5). Du fait de la présence d'un résidu tyrosine dans chacun des motifs, ils constituent un

lieu de phosphorylation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Chen et al., 1990). Alors que certaines études indiquent que l'interaction de la taline avec β_3 (Calderwood et al., 2002) ne nécessite pas d'évènements de phosphorylation au niveau de ces tyrosines, la fixation de la protéine Shc à β_3 requiert de tels évènements (Cowan et al., 2000).

Au niveau des plaquettes, cette étape de phosphorylation de β_3 nécessite le recrutement de Src, voire Fyn et Lyn, ainsi que la polymérisation de l'actine, et l'agrégation ou l'étalement plaquettaire (Law et al., 1999; Law et al., 1996; Phillips et al., 2001). Ceci indique que la phosphorylation de β_3 au niveau de ces sites est un évènement tardif de la signalisation outside-in, permettant alors le recrutement des protéines Shc, Grb2 (Jenkins et al., 1998), et la fixation de la chaîne lourde de la myosine, nécessaire à la contraction cellulaire et à la rétraction du caillot plaquettaire (Law et al., 1999). Une étude récente montre d'ailleurs que l'interaction Eph/éphrine contribue à la stabilisation de l'agrégat plaquettaire en facilitant la phosphorylation au niveau des résidus tyrosine de la partie cytoplasmique de β_3 et le recrutement de la myosine (Prévost et al., 2005).

Le domaine $^{744}\text{NPLY}^{747}$, ainsi qu'un résidu sérine en position 752 apparaissent également être importants dans la régulation de l'affinité de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, puisque les mutations Y^{747}A et S^{752}P inhibent l'activation du récepteur (O'Toole et al., 1994; O'Toole et al., 1995). De même, la mutation Y^{759}A empêche la formation d'AF et l'étalement cellulaire (Schaffner-Reckinger et al., 1998). Cependant, l'empêchement de la phosphorylation de ces 3 résidus n'est pas à l'origine de cette régulation, puisque les mutations Y^{747}F , Y^{759}F et S^{752}A n'affectent pas l'activation du récepteur (O'Toole et al., 1995; Schaffner-Reckinger et al., 1998), suggérant que c'est l'intégrité structurale de ces domaines qui joue un rôle dans l'activation du récepteur et la signalisation initiale conduisant à l'organisation du cytosquelette. Quant à la mutation S^{752}P , elle génère un phénotype de type thrombasthénie de Glanzmann, et est certainement la première mutation identifiée affectant l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Calvete, 1995; Chen et al., 1994). Enfin, de nombreux résidus thréonine présents au niveau de la partie cytoplasmique de β_3 en positions 720, 741, 751, 753, 755, 758 et 762 (van Willigen et Akkerman, 1997) jouent un rôle au cours de l'agrégation plaquettaire (Parise et al., 1990). Ils sont impliqués dans la signalisation outside-in conduisant au recrutement de protéines cytoplasmiques telles que FAK, Src, Syk, ou

ILK (pour integrin linked kinase). Concernant la signalisation inside-out, la phosphorylation du résidu Thr⁷⁶² C-terminal jouerait également un rôle dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (van Willigen et Akkerman, 1997; Litjens et al., 2003).

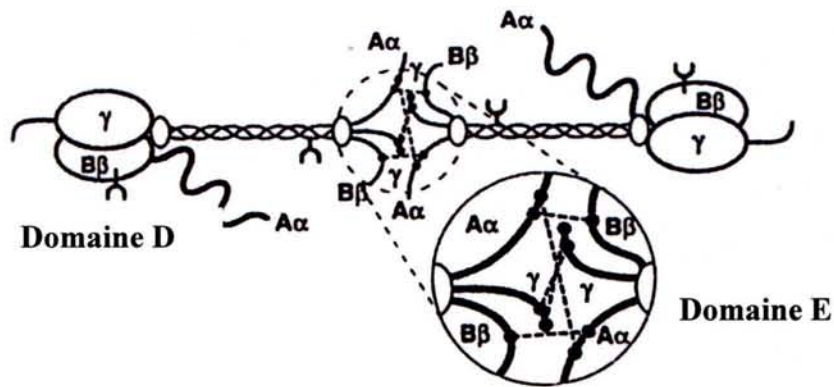
3. Spécificité de reconnaissance: le fibrinogène

Le fibrinogène (fg) est une glycoprotéine circulante du plasma sanguin, et constitue le principal ligand de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, bien que d'autres molécules telles que la fibronectine, le FvW, la vitronectine, la thrombospondine ou différents collagènes interagissant avec $\alpha_{IIb}\beta_3$ aient été identifiées. D'autre part, le fg interagit également avec d'autres récepteurs, tels que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Cheresh et al., 1989), $\alpha_5\beta_1$ (Suehiro et al., 1997), et le récepteur ICAM-1 (Languino et al., 1993) au niveau des cellules endothéliales, ou encore l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ au niveau des leucocytes monocytes et neutrophiles (Altieri et al., 1993). La molécule de fg est en fait la mieux étudiée en raison de l'importance de son interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ lors du processus d'agrégation plaquettaire. Cette importance du fg au niveau de l'hémostase est soulignée par l'identification de nombreuses maladies hémorragiques chez des patients présentant des anomalies du fg d'ordre qualitatif telles que la dysfibrinogénie causant une hypocoagulabilité (Blombäck, 1996) ou quantitatif telles que l'afibrinogénie ou l'hypofibrinogénie (Lane et al., 1980; Neerman-Arbez et al., 2000), conduisant à un allongement des temps de saignement dû à un ralentissement du processus d'agrégation plaquettaire.

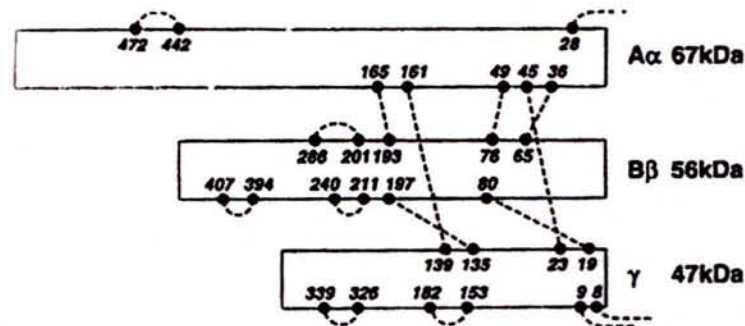
3.1. Généralités

Le fg humain est synthétisé au niveau du foie par les hépatocytes, mais chez d'autres espèces, la synthèse a déjà été observée au niveau des mégacaryocytes. Il circule dans le sang à une concentration d'environ 9 μM pour une demi-vie de 100 h, et peut être converti, au cours de l'agrégation plaquettaire, en fibrine après clivage par l' α -thrombine. L'interaction du fg plasmatique soluble avec l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ au repos est impossible et nécessite une activation préalable de l'intégrine. Cependant, lorsque le fibrinogène est immobilisé sur une surface, il subit des changements de conformation qui permettent directement la reconnaissance par l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ dans son état inactif. En effet, l'immobilisation du fg au niveau de parois de vaisseaux sanguins ou *in vitro* sur une surface en verre, altère la conformation de la molécule, de sorte qu'elle est directement reconnue par l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ non-activée (Kieffer et al., 1991; Savage and Ruggeri, 1991). Dès lors, au niveau plaquettaire, le fg adsorbé peut jouer un rôle d'agoniste primaire, responsable d'une signalisation outside-in conduisant à l'activation des plaquettes. Néanmoins, bien que le mécanisme de reconnaissance du fibrinogène immobilisé par rapport au fibrinogène plasmatique par l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ soit différent (Kieffer et al., 1991), il a été montré que les évènements de signalisation cellulaires induits au cours de l'adhésion et de l'étalement plaquettaires sont similaires à ceux observés pendant l'agrégation plaquettaire (Phillips et al., 2001).

A.



B.



C.

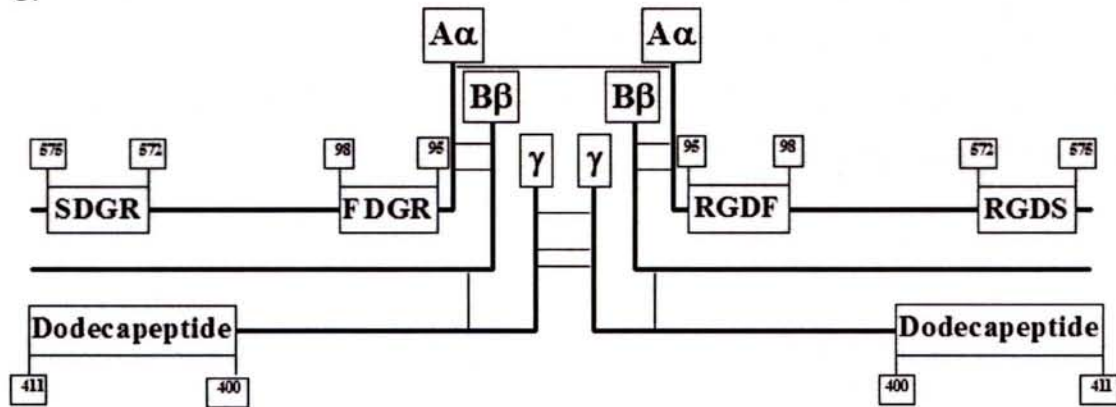


Figure 7 : A. Structure d'une molécule de fibrinogène. B. Localisation des résidus cystéine impliqués dans des ponts disulfures intra- et inter-chaîne au niveau d'une demi-molécule de fibrinogène. C. Schématisation de la molécule de fibrinogène et localisation des motifs RGD et de la séquence dodécapeptide (D'après Ruggeri, 1999b).

3.2. Biosynthèse et structure du fibrinogène

D'un point de vue biochimique, le fibrinogène humain, de PM 340 kDa, est une molécule hétérodimérique composée de deux copies de 3 chaînes polypeptidiques distinctes $A\alpha$, $B\beta$, et γ reliées par des ponts disulfures à leur extrémité N-terminale (Blombäck, 1996; Doolittle et al., 1996; Herrick et al., 1999) (Figure 7A et B). Sous leur forme circulante prédominante, la chaîne $A\alpha$ est constituée de 610 aa pour un poids moléculaire apparent de 67kDa, la chaîne $B\beta$ comprend 461 aa pour un poids de 56 kDa, et la chaîne γ possède 411 aa pour un poids moléculaire de 47kDa (Ruggeri et al., 1999b). De par sa structure, le fibrinogène a un diamètre de 475 Å et une longueur de 48 nm, suffisant pour permettre d'effectuer le lien entre deux plaquettes adjacentes distantes d'environ 250-500 Å, assurant ainsi le pontage protéique dans l'agrégat plaquettaire (Skaer, 1975).

Les 3 chaînes du fg sont codées par 3 gènes distincts situés sur le chromosome 4 (région q23-q32), et la transcription et la traduction sont réalisées indépendamment. L'assemblage des chaînes débute par l'attachement des chaînes $A\alpha$ et γ avec une chaîne $B\beta$, puis les complexes $A\alpha$ - $B\beta$ et γ - $B\beta$ se lient à la chaîne manquante pour former une demi-molécule de fg. Puis l'association de 2 demi-molécules forme une molécule entière de fg. Cet assemblage complexe de la molécule de fg fait intervenir de nombreux pontages inter- et intrachânes entre les 58 cystéines présentes, et 11 ponts disulfures sont notamment localisés au niveau N-terminal des différentes chaînes au centre de la molécule de fg appelé domaine E (Figure 7A et B). Les extrémités C-terminales de la molécule constituent le domaine D et contiennent les extrémités des chaînes $B\beta$ et γ , alors que la partie C-terminale de la chaîne $A\alpha$ apparaît très flexible. Le fg subit enfin de nombreuses glycosylations, phosphorylations, hydroxylations et sulfatations dans l'appareil de Golgi avant d'être sécrété.

De nombreuses variations dans la longueur des différentes chaînes du fg sont connues à l'heure actuelle. L'ADNc de la chaîne A α code par exemple pour 15 aa supplémentaires au niveau C-terminal, apportant à 625 aa le nombre de résidus du polypeptide mature. Mais cette forme n'a jamais été isolée dans le plasma en raison de clivages protéolytiques. D'autre part, un variant du fg avec un poids moléculaire très grand de 420 kDa peut également être trouvé dans le plasma (Fu and Grieninger, 1994). Enfin, une chaîne variante de la chaîne γ , appelée γ' , au niveau de laquelle les quatre derniers résidus AGDV⁴¹¹ en position C-terminale sont remplacés par une séquence anionique de 20 aa et de séquence ⁴⁰⁸VRPEHPAETEDSLYPEDDL⁴²⁷, existe aussi dans le plasma, à la suite d'un splicing alternatif de l'ARNm (Chung and Davie, 1984; Mosesson, 2005). Ces 2 formes γ et γ' sont effectives mais la forme γ' , qui ne représente que 8% des chaînes γ totales (Mosesson et al., 1972), ne présente qu'une affinité faible pour les plaquettes, et ne supporte pas l'agrégation plaquettaire (Harfenist et al., 1984; Peerschke et al., 1986). Cependant, les molécules de fg hétérodimériques contenant à la fois une chaîne γ et une chaîne γ' représentent près de 15% du fibrinogène circulant (Mosesson, 1983; Mosesson et al., 1972), et jouent un rôle tout aussi déterminant que les molécules de fg homodimériques γ dans le processus de coagulation et de polymérisation de la fibrine. Ce rôle est d'autant plus important que ce fg γ - γ' est constitutivement lié au facteur XIII (Siebenlist et al., 1996), et que les résidus γ' 414-427, absents de la chaîne γ , constituent un site de haute affinité pour l' α -thrombine, notamment grâce aux deux résidus tyrosine sulfatés en position 418 et 427 (Meh et al., 2001), ce qui favorise la formation du caillot plaquettaire, qui est en outre plus résistant à la fibrinolyse (Collet et al., 2004; Falls and Farrell, 1997).

3.3. Les sites d'interaction du fibrinogène avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Le fg possède en tout deux copies de trois sites distincts d'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$: deux sites sont constitués par des séquences RGD (Arg-Gly-Asp) (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984) situées respectivement en position N-terminale 95-98 (RGDF) et sur la partie flexible C-terminale 572-575 (RGDS) de la chaîne A α

(Doolittle, 1979; Cheresch, 1989; Hawiger, 1989) (Figure 7C). Le motif RGD a initialement été identifié au niveau de la fibronectine avant d'être retrouvé dans de nombreuses autres protéines adhésives telles que le fibrinogène, le FvW, la vitronectine, la thrombospondine, l'ostéopontine. Le troisième site, le dodécapeptide ou H12, est une séquence spécifique du fibrinogène et n'existe pas dans d'autres ligands. Ce dodécapeptide correspond aux 12 acides aminés terminaux de l'extrémité C-terminale de la chaîne γ du fibrinogène (résidus 400 à 411: HHLGGAKQAGDV) (Kloczewiak, 1982; Kloczewiak, 1984) (Figure 7C). Actuellement, le rôle fonctionnel précis joué par ces deux séquences RGD et dodécapeptide n'est pas très clair.

D'autre part, il est intéressant de signaler, qu'un troisième site d'interaction a été récemment identifié au niveau des résidus 370-383 de la chaîne γ du fg. Ce site serait reconnu par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, ainsi que par $\alpha_5\beta_1$, et jouerait un rôle dans la rétraction du caillot plaquettaire (Podolnikova et al., 2003).

Cependant, alors que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ semble reconnaître préférentiellement la séquence dodécapeptide, les autres récepteurs capables d'interagir avec le fg fonctionnent différemment. Ainsi, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ reconnaissent principalement le motif $^{572}\text{RGDS}^{575}$ de la chaîne $A\alpha$ du fg (Cheresch et al., 1989; Suehiro et al., 1997; Yokoyama et al., 1999). Quant aux récepteurs RGD-indépendants $\alpha_M\beta_2$ et ICAM-1, leurs sites d'interaction se situent également sur la chaîne γ du fg, mais au niveau des résidus 190-202 et 377-395 pour $\alpha_M\beta_2$ (Altieri et al., 1993; Ugarova et al., 1998), et 117-133 pour ICAM-1 (Altieri et al., 1995).

Au niveau de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, les domaines fonctionnels extracellulaires d'interaction avec le fg ne sont pas encore clairement caractérisés. Les premiers travaux visant à déterminer la localisation des sites de fixation du fg ont été réalisés dans les années 90, et les premiers résultats obtenus ont permis de situer ces domaines fonctionnels au niveau des séquences en aa 109-171 (D'Souza et al., 1988; D'Souza et al., 1994), 211-222 (Charo et al., 1991) et 274-368 (Alemany et al., 1996) au niveau de β_3 , et 294-314 (D'Souza et al., 1990; Gartner and Taylor, 1990; Taylor and Gartner, 1992) pour la sous-unité α_{IIb} .

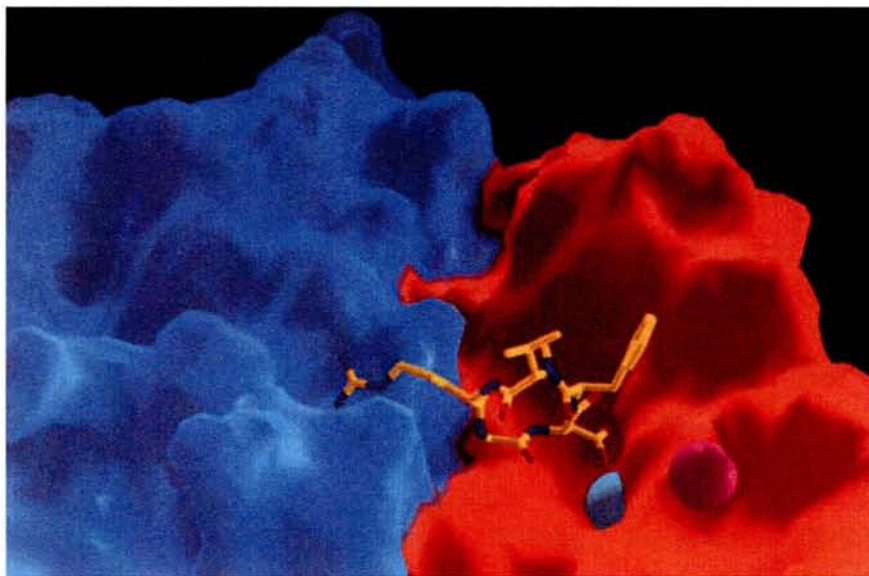
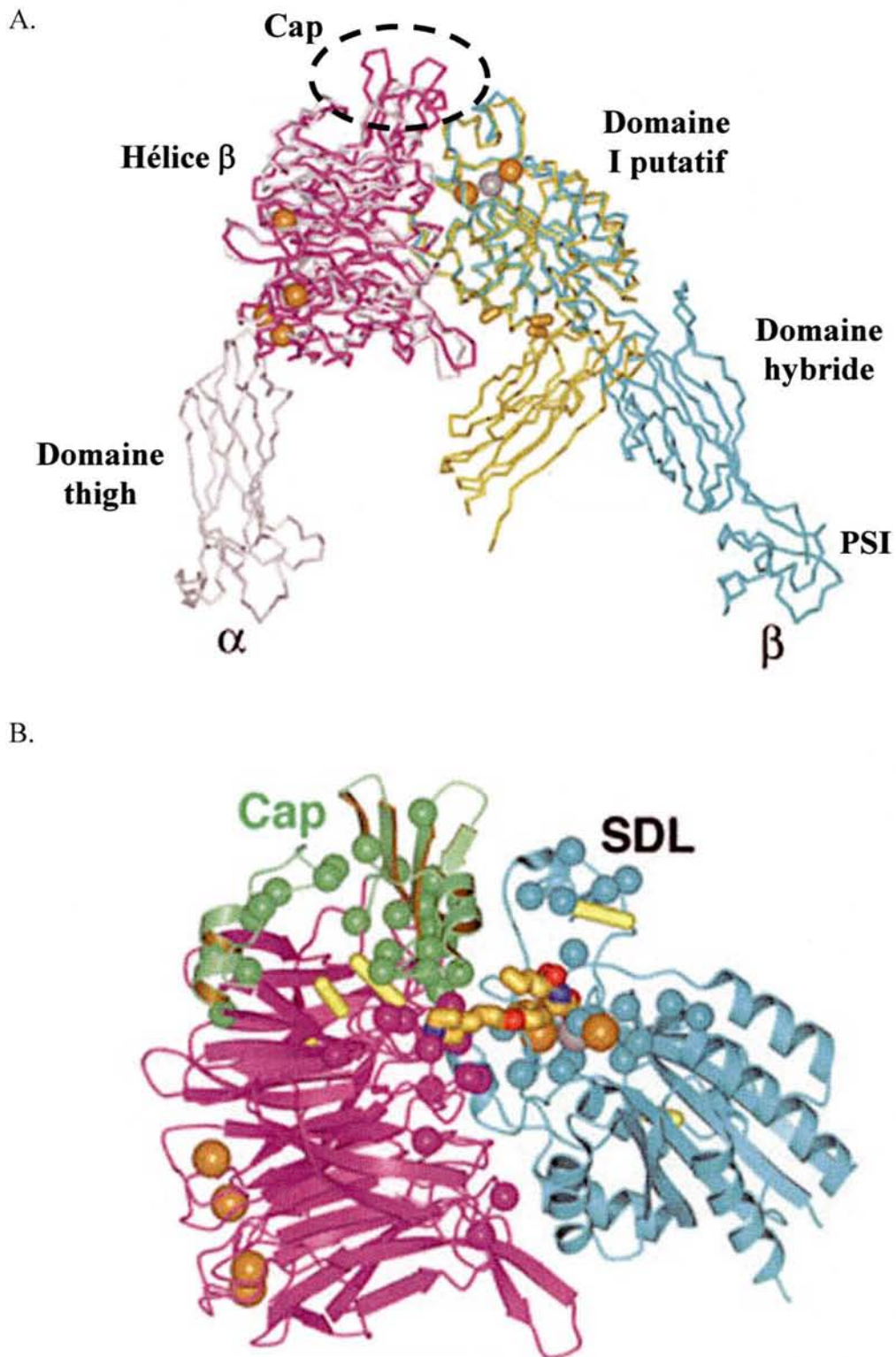


Figure 8 : Visualisation spatiale de l'interaction d'un peptide synthétique RGD avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (D'après Xiong et al., 2002).

Plus récemment, la structure cristalline de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en complexe avec un ligand RGD et de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, a permis d'identifier les résidus importants de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans la reconnaissance du fg (Arnaout et al., 2002; Xiao et al., 2004). C'est la structure cristalline du récepteur $\alpha_v\beta_3$, lié ou non avec un peptide cyclique RGD, qui a été identifiée dans un premier temps par Xiong et collaborateurs (Xiong et al., 2002; Xiong et al., 2001). Du fait de la grande homologie entre $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui partagent la même sous-unité β et plus de 50% d'homologie entre leur chaîne α , de fortes corrélations dans la structure et la fonction des 2 récepteurs ont pu être décrites. La structure du complexe $\alpha_v\beta_3$ -RGD (Xiong et al., 2002) a notamment révélé que RGD s'insérait dans une large interface entre le domaine en hélice β de la sous-unité α_v et le domaine I putatif de la sous-unité β_3 (Figure 6 et 8). Il a effectivement été montré que les chaînes latérales des résidus R et D, orientées dans des directions opposées, interagissent exclusivement avec l'hélice β et le domaine I putatif respectivement. Alors que l'Arg (R) s'insère dans un étroit sillon formé par les boucles des segments 3 et 4 en haut de l'hélice β entre les résidus Tyr¹⁷⁸ et Ala²¹⁵, et en établissant des ponts salins avec les résidus Asp²¹⁸ et Asp¹⁵⁰, le résidu Asp (D) entre en contact avec l'ion Mn²⁺ du site MIDAS de la chaîne β et établit des ponts hydrogène avec les résidus Tyr¹²² et Asn²¹⁵. Le résidu Gly (G) repose quant à lui dans cette crevasse et établit quelques liaisons hydrophobes avec la chaîne α , notamment avec le résidu Arg²¹⁶ (Xiong et al., 2002).

Cependant, bien que les deux intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ appartiennent au sous-groupe des intégrines RGD-dépendantes, et partagent la même chaîne β_3 , elles interagissent avec le fg selon un mécanisme différent, puisqu'il a été montré que l'interaction de la séquence dodécapeptide du fg avec la sous-unité α_{IIb} jouait un rôle majeur au cours de la reconnaissance $\alpha_{IIb}\beta_3$ -fg (Kloczewiak et al., 1982; Kloczewiak et al., 1983; Kloczewiak et al., 1984; Cheresh et al., 1989; D'Souza et al., 1990; Smith et al., 1990; Farrell et al., 1992; Farrell and Thiagarajan, 1994; Savage et al., 1995; Holmback et al., 1996; Rooney et al., 1996). Ceci suggère que certains résidus de la sous-unité α_{IIb} sont capables de reconnaître spécifiquement au niveau du fg la séquence dodécapeptide auxiliaire au site RGD.



Les travaux récemment publiés par Xiao et collaborateurs au sujet de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ soutiennent ce concept, et démontrent, à une résolution atomique, que deux sites d'interaction distincts avec le fg sont maintenant clairement identifiés, une boucle SDL (pour specificity determining loop) au niveau du domaine I putatif de β_3 qui reconnaît le motif RGD, et un domaine, appelé domaine Cap, comprenant 4 boucles insérées au niveau supérieur de l'hélice β nécessaire pour la reconnaissance macromoléculaire du fibrinogène (Xiao et al., 2004). En effet, la superposition des intégrines $\alpha_{11b}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$ semble montrer une quasi-similarité de structure entre elles, mis à part au niveau des segments 2 à 4 de l'hélice β de la sous-unité α_{11b} , où les insertions 1 et 2 du segment 2 en forme d'épingle à cheveux forment un feuillet β antiparallèle surélevé correspondant au domaine Cap (Figure 9A). Ces résultats suggèrent donc que ce feuillet β spécifique de la sous-unité α_{11b} , ainsi que l'insert 3 adjacent, pourraient jouer un rôle fondamental dans la reconnaissance du site dodécapeptide du fg. Ces résultats sont d'autant plus plausibles qu'ils sont en accord avec l'identification par mutagenèse de près d'une trentaine de résidus essentiels dans la reconnaissance du fg au niveau de ces segments 2 à 4 de l'hélice β (Kamata et al., 2001) (Figure 9B), auxquels s'ajoutent certains résidus identifiés précédemment dont la mutation naturelle ou artificielle empêche l'adhésion et/ou l'agrégation : Gly¹⁸⁴, Tyr¹⁸⁹, Tyr¹⁹⁰, Phe¹⁹¹ et Gly¹⁹³ (Kamata et al., 1996), Phe¹⁶⁰ et Asp¹⁶³ (Honda et al., 1998), Leu¹⁸³ et Leu²¹⁴ (Grimaldi et al., 1998), Asp²²⁴ (Tozer et al., 1999), Pro¹⁴⁵ (Basani et al., 2000), Arg¹⁴⁷, Tyr¹⁵⁵, Arg¹⁶⁵, Ser²²², Phe²³¹ et Asp²³² (Puzon-McLaughlin et al., 2000). Plus récemment, les résidus Gln¹¹¹, His¹¹² et Asn¹¹⁴ ont été identifiés jouant aussi un rôle prépondérant dans l'interaction avec le fg (Tamura et al., 2004).

En accord avec ces données, des travaux réalisés avec le récepteur RGD-dépendant $\alpha_5\beta_1$, qui interagit avec la fibronectine par l'intermédiaire d'un motif RGD (module III-10) et d'une séquence auxiliaire (module III-9) (Aota et al., 1994; Yokosaki et al., 1998), ont également permis de déterminer des séquences en aa au niveau des 2^{ème} et 3^{ème} segment de l'hélice β de la sous-unité α (Tyr204-Gln214) qui participent à la reconnaissance de la séquence auxiliaire (Humphries et al., 2003; Mould et al., 2000; Mould et al., 2003), bien que les récentes avancées au niveau

structural ne témoignent pas de l'évidence d'une interaction forte (Takagi et al., 2003).

Il est enfin intéressant de noter que la séquence 294-314 de la sous-unité α_{IIb} correspondant au second domaine de fixation du calcium, et précédemment identifiée comme un site de fixation du dodécapeptide (D'Souza et al., 1990), est située au niveau du segment 5 de l'hélice β , c'est à dire proche des boucles proéminentes des segments 2 et 3 mais localisée au niveau de la face inférieure de l'hélice β . En conséquence, de nombreux auteurs ne la présentent plus comme un site majeur de fixation du ligand (Puzon-McLaughlin et al., 2000; Springer, 1997). Cependant, alors que Kamata et collaborateurs montrent en effet que l'absence de cette région n'affecte ni la fixation du fg, ni la fixation d'anticorps mimétique du fg (Kamata et al., 2001), Gidwitz et collaborateurs confirment le rôle de cette séquence dans la fixation du dodécapeptide dans une étude récente mettant en jeu l'utilisation d'anticorps contre les motifs RGD et dodécapeptide (Gidwitz et al., 2004). En outre, il a été montré que des peptides synthétiques correspondant aux résidus 265-284 et 313-332, situés de part et d'autre de cette séquence α_{IIb} 294-314, inhibaient également l'agrégation plaquettaire et l'association du fg avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et ce avec une affinité même supérieure au peptide α_{IIb} 294-314 (Biris et al., 2003). De plus, Mitsios et collaborateurs ont pu identifier au niveau du peptide 313-332, un motif de séquence RAD essentiel dans l'interaction avec le fg (Mitsios et al., 2004). Ces derniers résultats confirment finalement que ce domaine correspondant à l'extrémité C-terminale du segment 4 et au segment 5, joue effectivement un rôle dans la reconnaissance du fg.

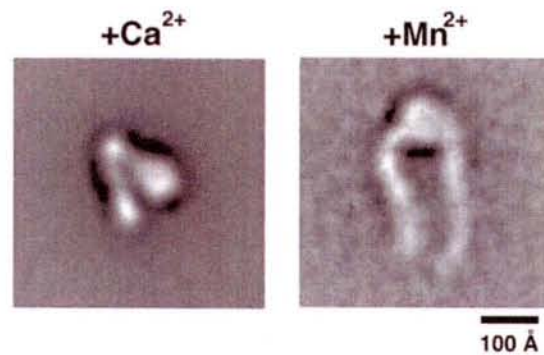
D'autre part, du côté du site I putatif de β_3 , les 2 résidus Asp¹⁵⁸ et Asn²¹⁵ localisés de chaque côté de la boucle 159-188 formée par le pont disulfure C¹⁷⁷-C¹⁸⁴ ont été identifiés comme jouant un rôle important dans la spécificité de ligation du fg (Puzon-McLaughlin et al., 2000; Yamanouchi et al., 2002), et s'ajoutent à la liste des résidus Asp¹¹⁹, Ser¹²¹, Ser¹²³, Arg²¹⁴, Asn²¹⁵, Asp²¹⁷ et Glu²²⁰ primordiaux pour la liaison du ligand (Bajt et al., 1992; Bajt and Loftus, 1994; Lanza et al., 1992; Loftus et al., 1990; Tozer et al., 1996; Xiong et al., 2001).

3.4. Rôle du fibrinogène dans le processus d'hémostase

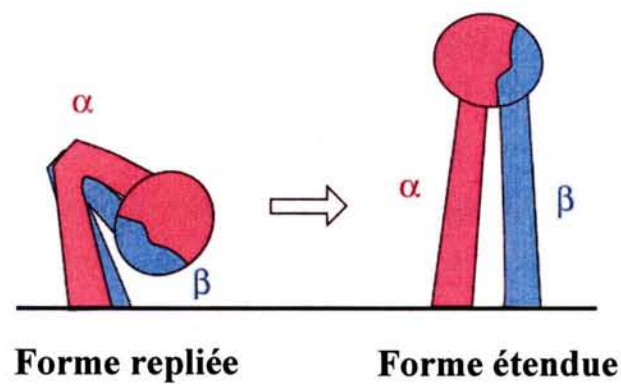
Au cours du processus d'agrégation plaquettaire, le fg soluble plasmatique est converti en monomères de fibrine insoluble, qui s'organisent spontanément en réseau sous l'influence initiale d'une sérine protéase, l' α -thrombine. Cette enzyme clive dans un premier temps l'extrémité N-terminale de la chaîne A α du fg, et libère un fibrinopeptide (FPA) de 16 résidus (Blombäck et al., 1978; Scheraga, 1958). L'extrémité N-terminale libérée constitue alors un site de polymérisation (Laudano and Doolittle, 1978) et interagit avec une région complémentaire située entre les résidus 337 et 379 de la chaîne γ d'une molécule de fg voisine (Pratt et al., 1997; Shimizu et al., 1992), et conduit à un assemblage de 2 molécules de fibrine. Par la suite, un second clivage par l' α -thrombine s'effectue au niveau de l'extrémité N-terminale de la chaîne B β et relâche un fibrinopeptide (FPB) de 14 résidus (Shainoff and Dardik, 1983). La nouvelle extrémité B β N-terminale interagit alors avec un site complémentaire au niveau du domaine D (Figure 7) en position C-terminale de la molécule voisine de fg (Everse et al., 1998; Medved et al., 1993), permettant de renforcer l'assemblage des fibres de fibrine. Cette structure est alors stabilisée par interaction croisée entre les séquences dodécapeptide des 2 molécules voisines (Mosesson et al., 1995). Ce processus consiste en fait en une ligation covalente calcium-dépendante, par interaction respectivement entre les résidus Gln398/399 et Lys406 de deux chaînes γ , la transglutamination étant catalysée par le facteur XIII (ou γ -glutamyl ϵ -aminolysyl transamidase) (Doolittle et al., 1971; Siebenlist et al., 2001). Il est intéressant de noter que ce facteur XIII intervient également dans l'oligomérisation des domaines C-terminaux des chaînes α comprenant le motif RGDS, augmentant ainsi l'interaction avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_5\beta_1$ exprimées à la surface des cellules endothéliales (Belkin et al., 2005; Medved et al., 1985).

L'assemblage en réseau de ces fibres de fibrine correspond alors à la formation du caillot, et constitue le ligand des plaquettes pendant la rétraction du caillot plaquettaire, première étape conduisant à l'initiation du processus de cicatrisation. Il est intéressant de noter qu'aucun des sites de reconnaissance ⁵⁷²RGDS⁵⁷⁵ et dodécapeptide du fg jouant un rôle dans l'adhésion et l'agrégation

A.



B.



C.

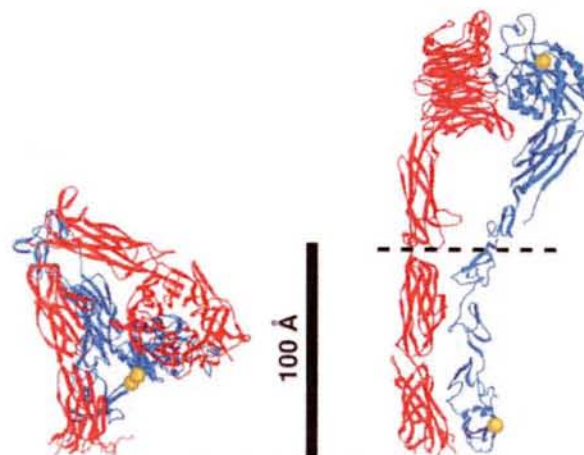


Figure 10 : A. Microphotographie par microscopie électronique du domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sous sa forme de repos (en présence de calcium), ou à l'état activé (par le manganèse). B. Schématisation des deux structures repliées et étendues adoptées par l'intégrine. C. Représentation par diagramme en rubans des deux conformations adoptées par l'intégrine (D'après Takagi et Springer, 2002b).

plaquettaires ne sont pas impliqués dans cette rétraction du caillot (Rooney et al., 1998; Rooney et al., 1996; Smith et al., 1997; Farrell, 2004), indiquant que d'autres domaines au niveau du fg/fibrine sont spécifiques. En effet, une étude met en évidence un rôle déterminant des résidus 15 à 42 de la chaîne B β (Hamaguchi et al., 1993). D'autre part, deux autres sites reconnus par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ lors du processus de rétraction du caillot ont été identifiés dans une région proche du dodécapeptide sur la chaîne γ du fg, les sites γ 316-322 (Remijn et al., 2003) et γ 370-383 (Podolnikova et al., 2003). En plus de son rôle dans les processus d'adhésion et d'agrégation plaquettaires, le fg joue donc également un rôle primordial dans la coagulation et la cicatrisation.

4. Le mécanisme d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Les connaissances actuelles concernant le mode de fonctionnement des intégrines, en particulier $\alpha_{IIb}\beta_3$, en fonction de leurs caractéristiques structurales, permettent de décrire de façon cohérente un modèle d'activation de l'intégrine (Figure 10). En effet, les déterminations récentes de la structure cristalline des domaines extracellulaires de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Xiao et al., 2004), de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ seule ou complexée à un peptide cyclique RGD (Xiong et al., 2002; Xiong et al., 2001), les analyses par microscopie électronique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Adair and Yeager, 2002) et $\alpha_5\beta_1$ (Mould et al., 2003; Takagi et al., 2003), les résolutions par résonance magnétique nucléaire de la structure des domaines I-EGF de la sous-unité β_2 (Beglova et al., 2002) et des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Ulmer et al., 2001; Vinogradova et al., 2000; Vinogradova et al., 2004; Vinogradova et al., 2002; Weljie et al., 2002), ont permis d'établir un aperçu plausible quant aux changements tertiaires et quaternaires qui ont lieu pendant la transition de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ de son état inactif à son état actif. De nombreuses revues ont d'ailleurs été publiées en l'espace de quelques années à propos de la structure et de la régulation de la fonction des intégrines (Arnaout, 2002; Arnaout et al., 2002; Gottschalk and Kessler, 2002; Humphries et al., 2003; Liddington and Ginsberg, 2002; Shimaoka et al., 2002; Takagi et al., 2002b; Vinogradova et al., 2002; Xiong et al., 2003). Ainsi, de

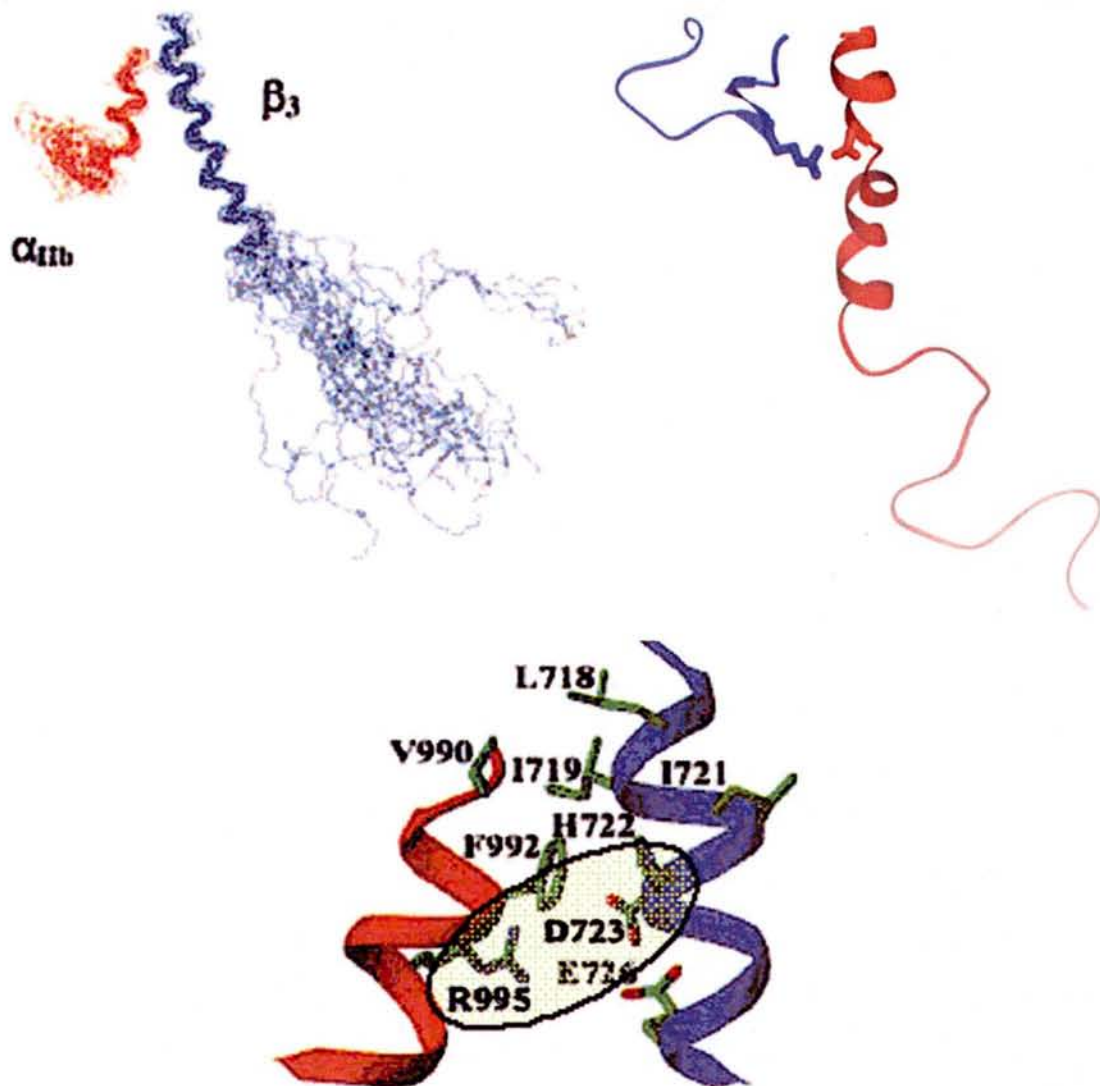


Figure 11 : Représentation en rubans des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ et mise en évidence du pont salin juxtamembranaire entre les résidus α_{11b} -Arg⁹⁹⁵ et β_3 -Asp⁷²³ (D'après Vinogradova et al., 2002 et Arnaout et al., 2005).

l'ensemble de ces études, il ressort que dans son état de repos ou de faible affinité, l'intégrine, et plus particulièrement sa partie extracellulaire, adopte une structure en « V » repliée sur elle-même, rendant impossible toute interaction avec un ligand macromoléculaire soluble. Ce n'est que lors de son déploiement et de l'exposition de la poche de fixation du ligand vers l'extérieur que l'intégrine présente sa configuration spatiale de haute affinité pour son ligand (Figure 10). Il est intéressant de noter que l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est nécessaire pour son interaction avec les ligands macromoléculaires comme le fibrinogène plasmatique (agrégation plaquettaire). Par contre, de petits peptides comme le tripeptide RGD, sont capables d'interagir avec le récepteur sous sa forme au repos.

4.1. Rôle des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Ce sont tout d'abord des expériences de délétion de la partie α_{IIb} cytoplasmique, ou uniquement du motif $^{991}\text{GFFKR}^{995}$ périmembranaire qui suggérèrent l'idée d'un possible rôle des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans le mécanisme d'activation (O'Toole et al., 1994; Peter and Bode, 1996). Et c'est la mise en évidence par Hughes et collaborateurs de l'implication des résidus R⁹⁹⁵ de la sous-unité α_{IIb} et D⁷²³ au niveau de β_3 , dans la formation d'un pont salin et maintenant l'intégrine dans son état de repos, qui confirma cette idée (Hughes et al., 1996), la mutation ponctuelle de l'un ou l'autre des deux résidus conduisant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 11). Par la suite, certaines études montrèrent que la délétion complète de la partie cytoplasmique de β_3 induit également un état constitutivement actif du récepteur, en raison de la rupture de ce pont salin (Lu et al., 2001; Takagi et al., 2001b). Enfin, des résultats similaires obtenus avec les intégrines $\alpha_L\beta_2$ et $\alpha_M\beta_2$ confirment le rôle important de l'association des parties cytoplasmiques des intégrines dans le maintien de l'état de faible affinité du récepteur pour son ligand (Lu et al., 2001).

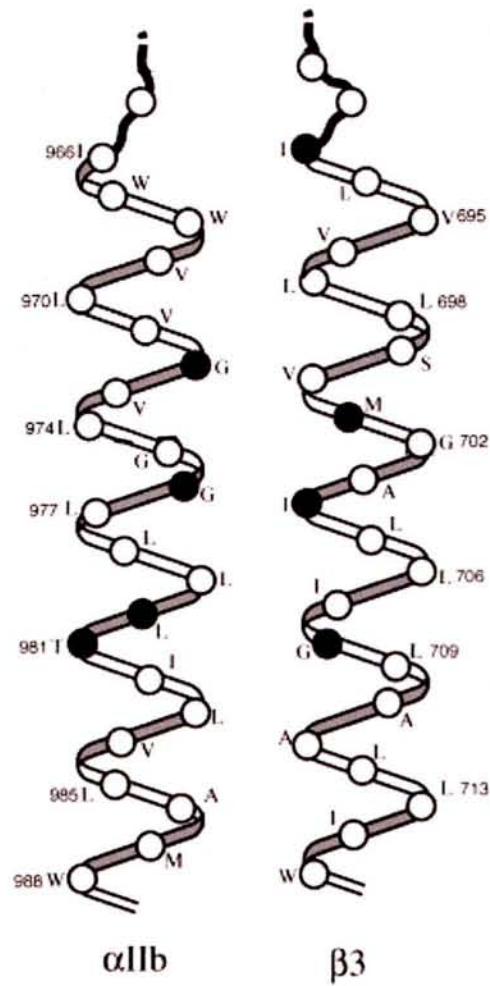


Figure 12 : Schéma des domaines transmembranaires de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$. Les sphères noires représentent les résidus dont la mutation conduit à l'activation de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ (D'après Luo et al., 2005).

4.2. Rôle des domaines transmembranaires de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Les deux sous-unités α_{IIb} et β_3 s'insèrent au niveau de la membrane en adoptant une conformation en hélice α (Figure 12). Certaines études de mutagenèse montrent que ces 2 domaines en hélice α sont fortement impliqués dans la régulation de l'activité du récepteur. En effet, les mutations des résidus Gly⁷⁰⁸ ou Mét⁷⁰¹ en asparagine, et Ile⁶⁹³ et Gly⁷⁰⁸ en leucine au niveau de l'hélice transmembranaire de β_3 , ou les mutations G⁹⁷²A, G⁹⁷²L, G⁹⁷⁶A, G⁹⁷⁶L, L⁹⁸⁰A et T⁹⁸¹L de la chaîne α_{IIb} , rompent l'association entre les 2 sous-unités et conduisent à une fixation spontanée du fg (Li et al., 2004; Li et al., 2003; Li et al., 2005; Luo et al., 2005). En fait, d'après une récente analyse, il semblerait que le résidu glycine en position 708 au niveau de β_3 , ainsi que les résidus β_3 I⁷⁰⁴ et α_{IIb} T⁹⁸¹, jouent un rôle majeur dans l'association croisée des 2 parties transmembranaires, et soient impliqués de ce fait dans la régulation de l'activation de l'intégrine (Partridge et al., 2005; Ratnikov et al., 2005). D'autre part, il apparaît qu'au cours du processus d'activation de l'intégrine, la séparation des 2 domaines transmembranaires s'accompagne d'un mouvement vers l'intérieur de la cellule, sous forme d'un effet de « piston » (Ginsberg et al., 2005; Ratnikov et al., 2005; Stefansson et al., 2004). Enfin, Li et collaborateurs montre que lors de la séparation des hélices transmembranaires du récepteur, celles-ci interagissent avec d'autres hélices homologues favorisant ainsi le clustering des intégrines et augmentant l'avidité pour le ligand (Li et al., 2001; Li et al., 2005).

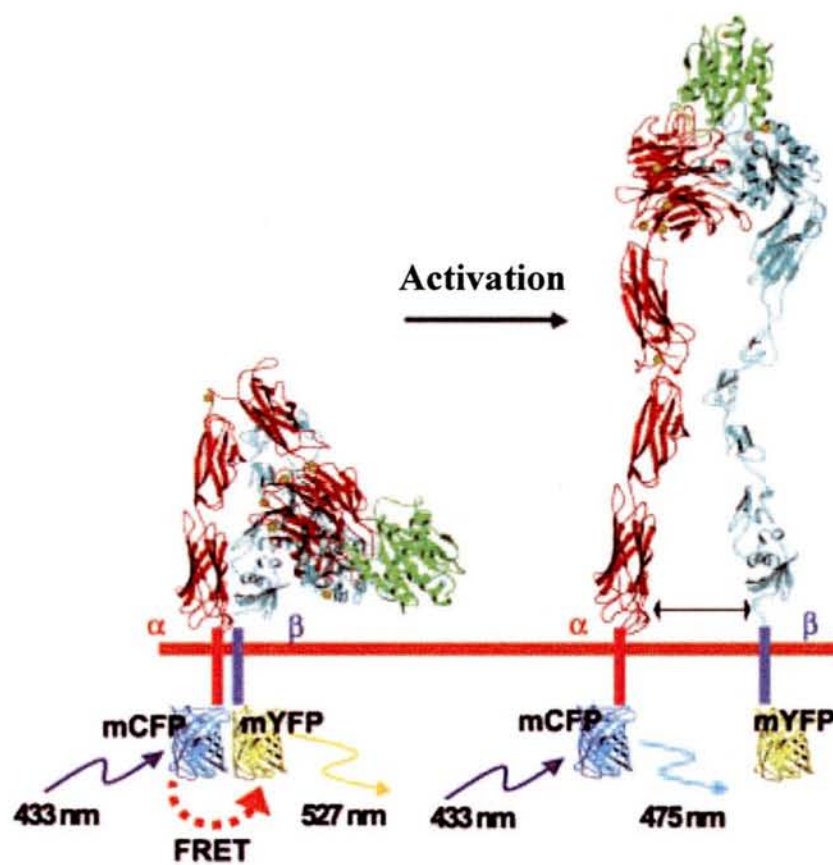


Figure 13 : Détermination de la séparation spatiale des parties cytoplasmiques de l'intégrine lors de son activation par FRET (D'après Kim et al., 2003).

4.3. Rôle de la taline dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

La taline est une protéine multifonctionnelle du cytosquelette, composée de 2541 acides aminés pour une masse moléculaire de 270 kDa environ. Elle est constituée de deux domaines: un domaine globulaire N-terminal (aa 1-433) et un domaine élongé C-terminal (aa 434-2541). Des études ont révélé que l'inhibition de l'expression de la taline (par des oligonucléotides anti-sens et par interférence d'ARN) affecte un grand nombre de processus cellulaires tels que l'expression membranaire des intégrines, l'assemblage des AF, et le mécanisme d'adhésion cellulaire intégrine-dépendant de façon générale (Albigès-Rizo et al., 1995; Paddison et al., 2002; Tadokoro et al., 2003).

Le rôle de la taline dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ a été établi par Calderwood et collaborateurs, lorsqu'ils ont montré que la surexpression du domaine globulaire de la taline contenant un domaine FERM (pour four point one, erzin, radixin moesin) provoqua une augmentation de la capacité de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à fixer son ligand (Calderwood et al., 1999). Il a ensuite été montré que c'est plus précisément le sous-domaine F3 du domaine FERM (Rees et al., 1990) qui est responsable de l'activation de l'intégrine (Calderwood et al., 2002; Calderwood et al., 1999). D'autre part, l'absence de détection par RMN de l'interaction entre les 2 parties cytoplasmiques de α_{IIb} et β_3 suite à la fixation du domaine globulaire de la taline (Vinogradova et al., 2002), a permis de mettre en évidence que l'interaction du sous-domaine F3 de la taline avec β_3 est responsable de la séparation physique des parties cytoplasmiques de l'intégrine, conduisant à l'activation de l'intégrine (Figure 13). En outre, la réduction du FRET (pour fluorescence resonance energy transfer) observée au niveau de cellules exprimant l'intégrine $\alpha_L\beta_2$ liée à différents fluorophores a permis de confirmer cette hypothèse (Kim et al., 2003). Il est intéressant de noter que ce signal d'activation de l'intégrine impliquerait un écartement spatial de plus de 14 nm des 2 sous-unités cytoplasmiques (Kim et al., 2003; Takagi et al., 2001b). Actuellement, cette rupture de l'interaction entre les parties cytoplasmiques de l'intégrine, et donc du pont salin R⁹⁹⁵-D⁷²³, et la séparation spatiale des 2 parties cytoplasmiques qui en résulte, sont considérées comme étant la dernière étape de la signalisation inside-out menant à l'activation de l'intégrine (Calderwood, 2004; Tadokoro et al., 2003).

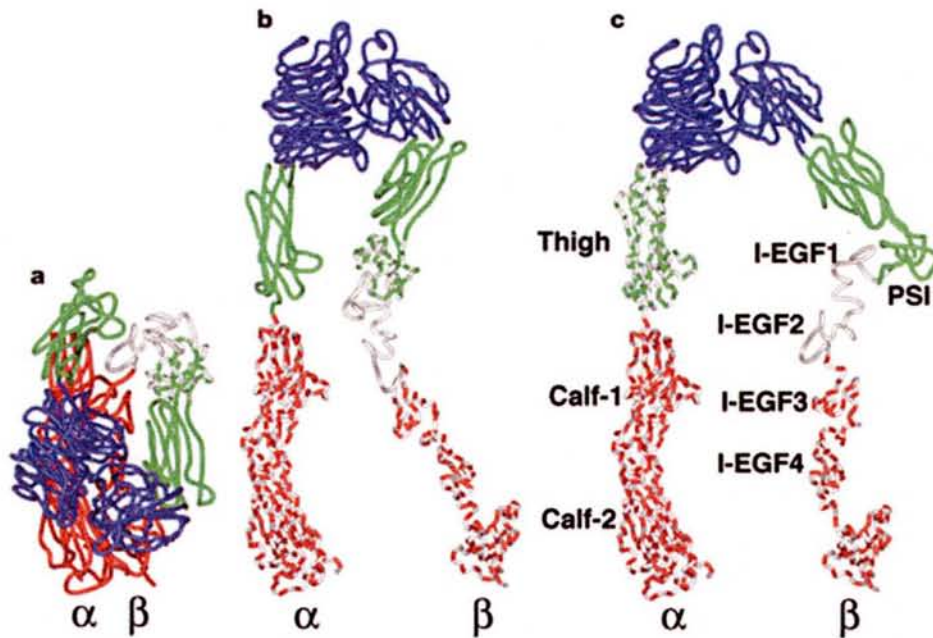
L'initiation de ce processus d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par la taline est primordiale si bien que ce mécanisme est hautement régulé. En effet, le domaine globulaire de la taline présente une affinité six fois plus forte pour β_3 que la taline entière, suggérant que le sous-domaine F3 est masqué au niveau de la taline entière (Yan et al., 2001). Il a été montré que le clivage du domaine globulaire de la taline par la calpaine, ou encore la production de PIP_2 par la $PIPKI_\gamma$ pourrait favoriser l'activation en augmentant l'affinité du domaine globulaire pour la sous-unité β_3 cytoplasmique (Di Paolo et al., 2002; Yan et al., 2001). A l'inverse, il peut exister une compétition au niveau de la sous-unité β cytoplasmique entre le domaine globulaire de la taline et d'autres protéines, comme la $PIPKI_\gamma$ (Barsukov et al., 2003), ou la protéine ICAP-1 α (pour integrin cytoplasmic-domain-associated protein) qui reconnaît le motif NPXY de la sous-unité β_{1A} (Bouvard et al., 2003; Chang et al., 2002). Un clivage de β_3 par la calpaine pourrait également avoir pour conséquence d'empêcher l'activation du récepteur (Pfaff et al., 1999).

D'autre part, des études montrent que la phosphorylation de la tyrosine Tyr⁷⁴⁷ empêche toute activation de l'intégrine par la taline (Ling et al., 2003). En effet, la structure cristalline du sous-domaine F3 en interaction avec les résidus 739 à 750 de β_3 montre que le coude formé par la proline du motif ⁷⁴⁴NPLY⁷⁴⁷ de β_3 permet au résidu Tyr⁷⁴⁷ de s'insérer dans une poche acide et hydrophobe de F3 uniquement lorsqu'il n'est pas phosphorylé (Campbell and Ginsberg, 2004; Garcia-Alvarez et al., 2003). De plus, l'introduction d'une mutation au niveau des sites Trp⁷³⁹ ou Leu⁷⁴⁶ de β_3 , ou Arg³⁵⁸, Trp³⁵⁹ et Ala³⁶⁰ du sous-domaine F3 inhibe l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par la taline (Calderwood et al., 2002; Garcia-Alvarez et al., 2003; Tadokoro et al., 2003). Enfin, la β_3 -endonexine qui reconnaît le motif C-terminal ⁷⁵⁶NITY⁷⁵⁹ de β_3 , régule positivement l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en coopérant avec la taline (Eigenthaler et al., 1997; Kashiwagi et al., 1997).

4.4. Les modifications conformationnelles des domaines extracellulaires de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

C'est au niveau des domaines extracellulaires du récepteur que surviennent les principaux changements de conformation conduisant à l'état de haute affinité de l'intégrine. De plus en plus d'études publiées ces dernières années tendent à déterminer précisément au niveau atomique, moléculaire et spatial les différentes étapes finalisant ce processus d'activation. De nombreuses études mettant en jeu des techniques de microscopie électronique et de RMN ont notamment permis de montrer que la forme repliée de l'intégrine observée par Xiong et collaborateurs par cristallisation (Xiong et al., 2001), correspond à l'état physiologique de repos du récepteur, et que l'activation se matérialise par un dépliement rapide du récepteur selon le modèle du couteau à cran d'arrêt, conduisant à une configuration totalement étendue (Beglova et al., 2002; Takagi et al., 2002b).

A.



B.

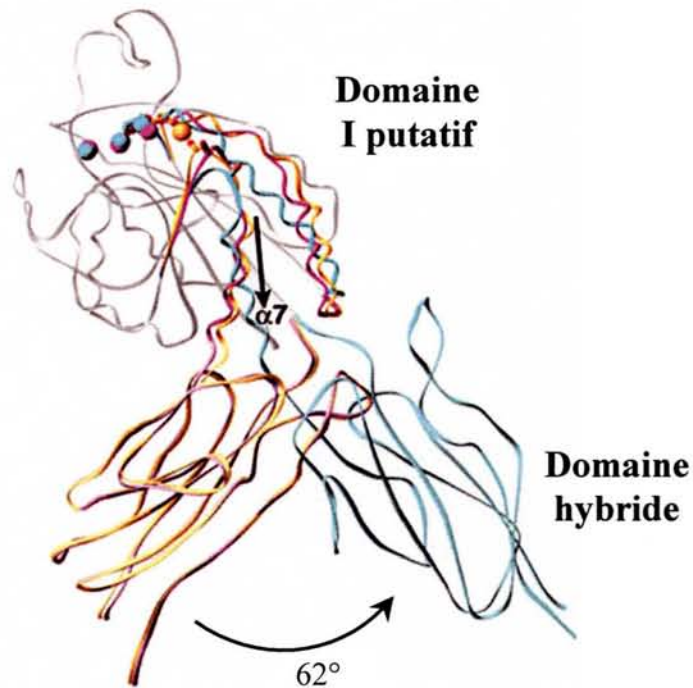


Figure 14 : A. Représentation des parties extracellulaires de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ montrant les 3 différentes conformations adoptées au cours du processus d'activation. a. conformation repliée, faible affinité. b. conformation étendue, tête en position fermée, affinité intermédiaire. c. conformation étendue finale, tête en position ouverte, affinité maximale. B. Mouvement de piston de l'hélice $\alpha 7$ du domaine I putatif de la sous-unité β_3 et réorientation du domaine hybride de 62° par rapport au domaine I putatif (D'après Xiao et al., 2004).

Deux formes étendues ont même pu être différenciées en fonction de l'angle aigu ou obtus formé entre le domaine I putatif et le domaine hybride de la chaîne β_3 , correspondant à une conformation de la tête de l'intégrine dans un état respectivement fermé ou ouvert (Takagi et al., 2002b). C'est finalement la résolution de la structure cristalline de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ par Xiao et collaborateurs qui a permis récemment de décrire à une résolution atomique les changements conformationnels et la régulation allostérique de l'affinité de l'intégrine, et d'établir un mécanisme d'activation précis de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ (Xiao et al., 2004). Les auteurs présentent notamment l'intégrine sous 3 états d'affinité, en accord avec les propositions de Takagi et collaborateurs (Takagi et al., 2002b): un état de faible affinité où le récepteur est replié sur lui-même, un état d'affinité intermédiaire où le récepteur apparaît dans une conformation étendue mais avec la tête en position fermée, et un état de forte affinité pour le ligand lorsque la tête globulaire est en configuration ouverte (Figure 14A). Plus précisément, leurs résultats suggèrent que la forme activée finale du récepteur est obtenue par réorientation du domaine hybride de 62° par rapport au domaine I putatif, par l'intermédiaire d'un mouvement de piston de l'hélice α_7 du domaine I putatif (Figure 14B). Par la suite, le domaine PSI ainsi que le domaine hybride amplifie le phénomène en jouant un rôle de levier au sein de l'intégrine, provoquant alors une séparation de 70 Å des deux sous-unités α_{11b} et β_3 au niveau d'une région charnière (formée par les domaines thigh et calf 1 d'une part, et hybride et I-EGF 1 et 2 d'autre part), responsable du redressement de la partie extracellulaire de l'intégrine. A noter que ces nouveaux résultats confirment les travaux présentés par Beglova et collaborateurs suggérant que la rupture des contacts entre les chaînes α_{11b} (Calf-1) et β_3 (I-EGF 2 et 3) entraînerait le dépliement du récepteur et un changement radical d'orientation permettant la présentation de la poche de fixation du ligand (Beglova et al., 2002). L'ensemble de ces travaux permet donc de clarifier le processus complexe selon lequel l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ passe de son état de repos à son état de haute affinité pour le fg. En outre, ces résultats ont pu être élargis aux intégrines β_1 , β_2 et β_7 , démontrant que ce mécanisme de réarrangements structuraux semble être général pour toutes les intégrines (Xiao et al., 2004).

4.5. Rôle des ponts disulfure intramoléculaires au niveau de β_3

La sous-unité β_3 comprend au total 56 cystéines très conservées dans toutes les sous-unités β , et toutes potentiellement capables de former des ponts disulfure intramoléculaires, permettant de stabiliser la structure du récepteur. Or, le processus d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ se caractérise par un ensemble successif de changements conformationnels responsables de la séparation des deux sous-unités et du dépliement de la partie externe du récepteur. De ce fait, il semblerait que des réarrangements de ponts disulfure, notamment au sein de la sous-unité β_3 , soient impliqués dans les mouvements de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ conduisant à son activation. En effet, il a été montré que la réduction de ces ponts disulfure par un agent réducteur tel que le DTT, entraînait une augmentation de l'affinité l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ pour le fg (Kouns et al., 1994; Mekrache et al., 2002; Peerschke, 1995; Steiner et al., 1993; Yan and Smith, 2001; Zucker and Masiello, 1984). Ces résultats suggèrent que ces remaniements, à savoir rupture ou réorganisation d'un ou plusieurs ponts disulfure, qui sont opérés à distance de la poche de fixation du ligand, peuvent modifier l'affinité du récepteur (Yan, 2000). La détermination récente de la structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ a permis de caractériser la plupart de ces ponts disulfure.

Un premier domaine riche en cystéines est le domaine PSI. La localisation des ponts disulfure au sein de ce domaine a été difficile du fait de la proximité de chaque résidu cystéine (Calvete et al., 1991), mais la structure actuelle précise l'existence de 3 ponts disulfure, C₁₆-C₃₈, C₅-C₂₃, C₂₆-C₄₉, et d'un quatrième pont à distance entre la cystéine C₁₃ et C₄₃₅. Concernant ce dernier pont disulfure, la structure tertiaire montre que la cystéine C₄₃₅ constitue la 8^{ème} cystéine du domaine PSI, bien qu'elle soit éloignée de la cystéine C₁₃ (Xiao et al., 2004; Xiong et al., 2004). La présence de ces ponts disulfure, ainsi que du pont C₄₀₆-C₄₃₃ au niveau du domaine hybride, rend l'interface formée par les domaines PSI-hybride particulièrement rigide. Il a néanmoins été montré par mutagenèse que la rupture des ponts disulfure C₅-C₂₃ et C₁₃-C₄₃₅ provoque l'activation du récepteur (Sun et al., 2002; Xiao et al., 2004), alors que la rupture des ponts disulfure C₁₇₇-C₁₈₄ et C₂₃₃-C₂₇₃ du domaine I putatif ne conduisent pas à l'activation du récepteur, mais affectent la stabilité de l'hétérodimère (Chen et al., 2001).

D'autre part, parmi les 56 cystéines, 31 sont localisées au niveau des seuls 4 domaines I-EGF de la sous-unité β_3 (Calvete et al., 1991). La présence de ces ponts disulfure dans cette région joue un rôle primordial dans l'intégrité du récepteur puisqu'il a notamment été montré que les mutations C₅₆₀R (Ruiz et al., 2001) ou C₅₆₀F (Ambo et al., 1998) au niveau du domaine I-EGF 3, et C₅₉₈Y (Chen et al., 2001) dans l'I-EGF 4 provoquent l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, témoignant ainsi de l'importance des remaniements des ponts disulfure intramoléculaires de β_3 lors de la transition de l'état inactif à l'état actif du récepteur. La plupart de ces mutations sont des mutations naturelles découvertes chez des patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann. Par ailleurs, Kamata et collaborateurs ont rapporté récemment que les mutations des résidus cystéine en position 435, 460, 462, 473, 495, 508, 521, 523, 536, 542, 549, 560, 575, 581, 588, 601, et 687 conduisent à la fixation spontanée du fg, et que la rupture d'un seul pont disulfure est suffisante pour activer complètement $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Kamata et al., 2004). Il est intéressant de remarquer qu'à l'exception de deux cystéines, toutes les autres cystéines sont localisées au sein des domaines I-EGF, suggérant l'importance de cette région dans le contrôle de l'activation du récepteur, d'autant plus que la mutation des cystéines en position 23, 26, 49, 374, 406, 433, 631 et 635 situées à l'extérieur des domaines I-EGF n'ont pas d'effet activateur (Kamata et al., 2004). En outre, il faut noter que la plupart des anticorps activateurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont dirigés contre ces domaines I-EGF, ce qui suggère que la reconnaissance de l'épitope induit également des remaniements conformationnels du récepteur conduisant à un état actif capable de reconnaître le fibrinogène soluble. A côté de ces cystéines, d'autres résidus jouent également un rôle structural crucial, et il a notamment été décrit que la mutation T₅₆₂N dans le domaine I-EGF-3 (Kashiwagi et al., 1999), conduit à l'activation constitutive du récepteur, en créant un nouveau site de N-glycosylation au niveau de la jonction entre les domaines I-EGF 3 et 4 et le domaine hybride.

Enfin, des résultats obtenus par Butta et collaborateurs indiquent que la délétion de la région β -TD C-terminale de la partie extracellulaire de la sous-unité β_3 , ou la rupture du pont disulfure C₆₆₃-C₆₈₇ confèrent un état de haute affinité au récepteur, suggérant que cette région est également impliquée dans le maintien de la forme inactive de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Butta et al., 2003).

De récentes études proposent que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ pourrait avoir une activité thiol-isomérase endogène induite par les ions Mn^{2+} (O'Neill et al., 2000a; Walsh et al., 2004). En effet, des sites redox potentiels ont pu être assignés à cette région des domaines I-EGF riches en cystéines non impliquées dans des ponts disulfure, et le mécanisme d'activation de l'intégrine pourrait même impliquer la réduction d'un ou deux ponts disulfure dans cette région (Yan and Smith, 2000; Yan and Smith, 2001). Cette activité thiol-isomérase a été confirmée par l'identification de 4 motifs répétés CxxC au sein des domaines I-EGF (O'Neill et al., 2000a). Les motifs CxxC sont caractéristiques des thiorédoxines, comme par exemple la PDI (pour protein disulfide isomerase), qui ont pour rôle de catalyser la formation correcte des ponts disulfure au niveau des protéines nouvellement synthétisées (Gilbert, 1997). Dans la même ligne d'évidence, d'autres travaux montrent et confirment que l'agrégation plaquettaire est contrôlée par une modulation de site redox (Essex and Li, 1999; Essex and Li, 2003), et que l'inhibition de l'activité PDI empêche l'adhésion et l'agrégation induite par des agonistes (Essex and Li, 1999; Lahav et al., 2000). Toutefois, ce concept d'activation de l'intégrine par un mécanisme redox semble être en contradiction avec les connaissances nouvellement acquises sur la structure du récepteur, selon lesquelles toutes les cystéines sont engagées dans des ponts disulfure. De plus, Lahav et collaborateurs avancent un modèle de fonctionnement plus précis selon lequel l'activité thiol-isomérase jouerait plutôt un rôle dans la stabilisation du processus d'agrégation plaquettaire et dans la cascade de changements de conformation au sein de β_3 caractéristique de la signalisation outside-in, et non pas dans l'initiation de l'interaction entre $\alpha_{IIb}\beta_3$ et son ligand suite à l'activation du récepteur (Lahav et al., 2002).

L'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ consiste donc finalement en une restructuration conformationnelle du récepteur permettant de présenter la poche de fixation au ligand, le fibrinogène plasmatique, et la présence des ponts disulfures de la sous-unité β_3 notamment au niveau des domaines I-EGF joue un rôle primordial dans ce processus.

Chapitre III :

La signalétique intracellulaire médiée par $\alpha_{IIb}\beta_3$

Le rôle universel de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est de transférer les informations biochimiques et mécaniques de façon dynamique et bidirectionnelle au travers de la membrane plasmique des plaquettes sanguines (Shattil et al., 1998). En outre, elle constitue un récepteur inductible lui permettant de moduler son affinité vis-à-vis de son principal ligand, le fibrinogène, selon un mode de fonctionnement bien précis. En effet, alors que des événements de signalisation cellulaires provenant de l'intérieur de la plaquette modulent la capacité de reconnaissance du fg (signalisation inside-out), des signaux générés suite à l'engagement et au clustering des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ au niveau membranaire régulent la signalétique conduisant à l'étalement et à l'agrégation plaquettaires (signalisation outside-in) (Liddington and Ginsberg, 2002; Miranti and Brugge, 2002; Shimaoka et al., 2002). Par conséquent, depuis quelques années, les relations entre l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et les voies de signalisation intracellulaires sont sujettes à d'intenses recherches tant au niveau des plaquettes qu'au niveau de modèles cellulaires ou de souris génétiquement modifiées.

1. La signalisation inside-out

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ exprimée à la surface plaquettaire est constitutivement dans un état initial de faible affinité pour son ligand principal, le fg. La signalisation inside-out débute par l'exposition des plaquettes à des agonistes solubles tels que la thrombine, l'ADP, l'épinephrine, le thromboxane A₂, ou à des protéines adhésives présentes au niveau du sous-endothélium des vaisseaux sanguins (collagène, FvW). Des récepteurs couplés à des protéines G ou recrutant des protéines tyrosine kinase, tels que les récepteurs PAR-1 et PAR-4 pour la thrombine (Kahn et al., 1998), les

récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ purinergiques pour l'ADP (Gachet, 2001; Hechler et al., 1998), les récepteurs GP VI et $\alpha_2\beta_1$ du collagène (Keely and Parise, 1996), ou GP Ib-V-IX du FvW (Savage et al., 1998), initient alors des cascades de signalisations intracellulaires qui aboutissent aux parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dès lors, il s'en suit des changements conformationnels de l'intégrine se propageant des parties cytoplasmiques jusqu'aux domaines extracellulaires de l'intégrine en passant par les parties transmembranaires (Calderwood, 2004; Liddington and Ginsberg, 2002), et aboutissant à un état de haute affinité avec exposition de la poche de fixation du ligand (Takagi et al., 2002b). Cet évènement en lui-même correspond au processus d'activation de l'intégrine présenté au cours du chapitre II.

Parmi les protéines activatrices des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, la PLC β (Lee et al., 1996), la β_3 -endonexine (Shattil et al., 1995), la PI3K (Kunapuli, 1998), la CIB (Tsuboi, 2002) et la taline (Calderwood et al., 1999) sont sans doute les plus connues. De nombreuses études portent sur l'étude de la PLC β , et montrent que ses produits de synthèse, les seconds messagers IP₃ (pour inositol trisphosphate) et DAG (pour diacylglycérol), sont impliqués dans l'activation de $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Shattil and Brass, 1987; van Willigen et al., 1996), probablement par l'activation par le calcium et par la protéine kinase C (PKC) activée par le DAG. En effet, un patient exprimant faiblement la PLC β_2 a été décrit comme présentant une réduction de l'agrégation plaquettaire, de la production d'IP₃ et de la phosphorylation d'un substrat de la PKC, la plekstrine (Lee et al., 1996). De plus, des inhibiteurs de la PKC bloquent directement l'activation de $\alpha_{IIb}\beta_3$, et des antagonistes de la PI3K inhibent partiellement l'agrégation plaquettaire induite par des agonistes (Rittenhouse, 1996). Certains travaux ont également montré qu'un membre de la famille des RasGTPases, R-Ras peut activer $\alpha_{IIb}\beta_3$ alors que H-Ras diminue l'affinité pour le fg chez des cellules CHO (Hughes et al., 1996; Zhang et al., 1996). D'autre part, 2 protéines ont également été identifiées comme jouant un rôle important dans la régulation de l'affinité de l'intégrine. Il s'agit de la CIB, qui interagit avec la sous-unité α_{IIb} et de la β_3 -endonexine, spécifique de la partie cytoplasmique de β_3 (Naik et al., 1997; Shattil et al., 1995). La surexpression de la β_3 -endonexine dans des cellules CHO exprimant $\alpha_{IIb}\beta_3$ est responsable d'une augmentation de la fixation du fibrinogène et de

l'agrégation (Eigenthaler et al., 1997; Kashiwagi et al., 1997). L'AUP-1 (pour ancient ubiquitous protein 1) qui se lie au domaine proximal $^{989}\text{KVGFFKR}^{995}$ de la sous-unité α_{IIb} (Kato et al., 2002) joue également un rôle dans l'activation de l'intégrine. Enfin, l'interaction de la taline avec la sous-unité β_3 semble constituer un mécanisme général clé dans la voie de signalisation inside-out conduisant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Knezevic et al., 1996; Shattil, 2005; Tadokoro et al., 2003), en provoquant, par l'intermédiaire du domaine globulaire, la séparation spatiale des 2 parties cytoplasmiques du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Kim et al., 2003; Vinogradova et al., 2002). Néanmoins, les mécanismes de signalisation conduisant à la translocation de la taline du cytoplasme vers la membrane ne sont pas encore connus.

La signalisation inside-out correspond donc finalement à des cascades de signalisation complexes hautement régulées qui aboutissent à des changements conformationnels permettant à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ d'acquies un état de haute affinité et de fixer son ligand spécifique. Cette signalétique est d'autant plus régulée que certaines protéines de signalisation interviennent dans le blocage de l'activation, notamment les protéines kinases A et G qui élèvent les taux d'AMPc et GMPc inhibiteurs de l'activation et de l'agrégation plaquettaire (Eigenthaler et al., 1992; van Willigen and Akkerman, 1991). Du fait de cette complexité, le mécanisme général de signalisation tel qu'il s'organise réellement au niveau intracellulaire demeure non défini.

2. La signalisation outside-in $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dépendante

De façon générale, la signalisation outside-in est initiée par la reconnaissance d'un composant de la MEC par une intégrine. Au niveau de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, la reconnaissance du fg est responsable de cascades de signalisations intracellulaires similaires à celles observées pour toutes les intégrines au cours du processus d'adhésion cellulaire: le clustering des intégrines (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Hato et al., 1998), l'augmentation du pH intracellulaire, un flux calcique vers l'intérieur des cellules (Meredith et al., 1996), une augmentation des événements de

phosphorylation, notamment par induction de la voie des RhoGTPases (Dedhar, 2000), la réorganisation du cytosquelette (Yamada and Miyamoto, 1995). L'ensemble de ces signaux conduit à l'initiation de nombreux processus physiologiques cellulaires tels que la migration, l'adhérence ou l'agrégation (Juliano and Haskill, 1993; Rosales et al., 1995). En fait, c'est la reconnaissance du ligand et le clustering des intégrines qui régulent l'initiation de la signalisation outside-in (Hato et al., 1998; Shattil et al., 1994), et la partie cytoplasmique de la sous-unité β joue un rôle primordial dans ce processus (Arias-Salgado et al., 2003; Schaffner-Reckinger et al., 1998; Shattil, 2005; Ylanne et al., 1993), et ceci en interagissant avec les très nombreuses protéines cytoplasmiques, à la fois du cytosquelette et de la signalisation (Liu et al., 2000).

Des études menées dans les plaquettes et dans les cellules CHO ont montré que la fixation du fg par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ induit une cascade de phosphorylation au niveau de tyrosines de différentes protéines de signalisation telles que les SFKs (pour Src family kinases), la FAK, Syk, ou encore la cortactine et la protéine Shc (Clark and Brugge, 1995; Law et al., 1996; Lipfert et al., 1992; Oberfell et al., 2002; Phillips et al., 2001). L'une des plus importantes voies de signalisation est celle des SFKs, du fait de leur localisation centrale et constitutive au niveau de la sous-unité β_3 (Arias-Salgado et al., 2003). Cette voie implique de nombreuses autres protéines primordiales dans la signalétique intracellulaire conduisant à la réorganisation du cytosquelette d'actine, et 3 cascades de signalisation sont généralement décrites selon l'interaction des SFKs avec FAK, Syk ou Shc (Giancotti and Tarone, 2003). Chacunes de ces protéines apparaissent connectées entre elles plus ou moins directement, et sont soumises à la régulation par de nombreuses autres protéines activatrices ou inhibitrices, qui ne sont certainement pas toutes identifiées, et qui rendent ce processus de signalisation très complexe.

2.1. Recrutement et rôles joués par les protéines du cytosquelette

2.1.1. Rôle de la taline

Nous avons vu au cours du chapitre II que la taline joue un rôle primordial dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIB}\beta_3$ en modulant l'affinité du récepteur pour son ligand (Calderwood et al., 2002; Tadokoro et al., 2003; Arias-Salgado et al., 2005). De plus, non seulement elle interagit avec la partie cytoplasmique de la sous-unités β_3 , mais elle constitue également un constituant majeur du cytosquelette en établissant un lien direct entre l'intégrine et le cytosquelette d'actine (Calderwood and Ginsberg, 2003; Cram et al., 2003), et en prenant part de ce fait dans la signalisation outside-in (Figure 15). De par son rôle structural, elle est en effet l'un des éléments essentiels requis lors de l'assemblage des AF plaquettaires. Outre sa capacité d'interagir avec la partie cytoplasmique des intégrines, le domaine globulaire de la taline peut également interagir avec l'actine (Hemmings et al., 1996), et de nombreuses autres protéines telles que la FAK (pour focal adhesion kinase) (Chen et al., 1995), la layiline (Borowsky and O., 1998), la PIPK I_γ (pour phosphatidylinositol phosphate kinase type I_γ) et le PIP_2 (pour phosphatidyl-inositol bisphosphate) (Barsukov et al., 2003; Ling et al., 2002). Quant au domaine élongé qui interagit aussi avec β_3 (Horwitz et al., 1986; Xing et al., 2001; Tremuth et al., 2004), il présente également plusieurs sites d'interaction avec des protéines du cytosquelette telles que l'actine (McCann and Craig, 1997), la vinculine (Gilmore et al., 1993), ou la TES (Coutts et al., 2002). Du fait de l'existence de ces nombreux sites d'interaction, la taline se présente donc comme un élément essentiel de l'architecture des AF, d'autant plus important qu'elle peut posséder plusieurs sites d'interaction pour une même protéine (3 sites pour l'actine et 11 sites potentiels pour la vinculine) (Gingras et al., 2005; Hemmings et al., 1996).

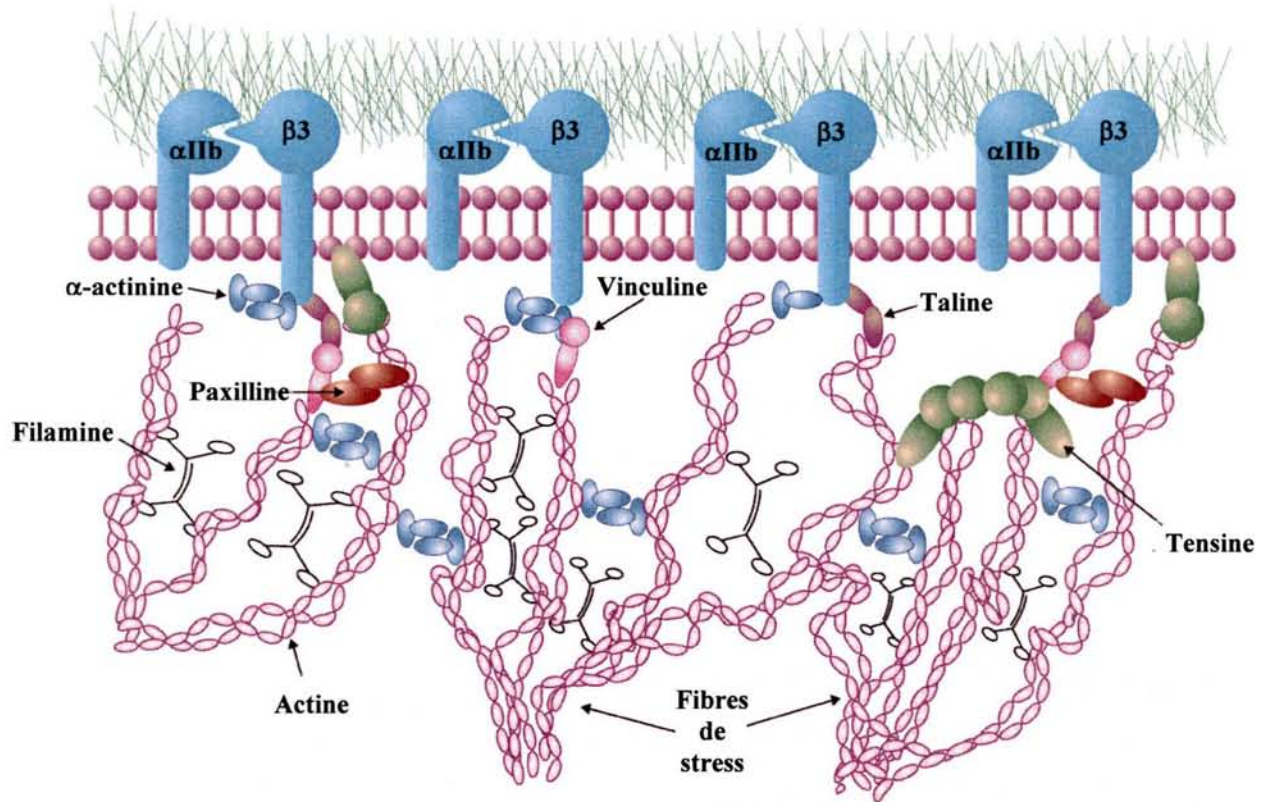


Figure 15 : Arrangements des protéines du cytosquelette au niveau des adhérences focales (D'après Miranti et Brugge, 2002).

2.1.2. Rôle de la vinculine

La vinculine est l'une des protéines les mieux caractérisées au niveau des AF (Jockusch and Rudiger, 1996) et joue un rôle très important au niveau de la connexion entre l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le cytosquelette, par son interaction avec la taline (Figure 15). La vinculine semble faciliter l'assemblage des AF en recrutant de nombreux partenaires protéiques structuraux tels que l' α -actinine, la paxilline, la ponsine, la vitexine et l'actine (Burrige and Mangeat, 1984; Turner et al., 1990; Kroemker et al., 1994; Huttelmaier et al., 1997; Kioka et al., 1999; Mandai et al., 1999;). A noter que ce rôle central au niveau du réseau protéique constituant les AF est hautement régulé par le PIP₂ (Gilmore and Burrige, 1996; Weekes et al., 1996), qui, en activant la vinculine, permet d'amplifier très rapidement les signaux en provenance de l'intégrine, conduisant à des changements rapides au niveau du cytosquelette d'actine. Il a notamment été démontré un rôle direct de la vinculine dans la polymérisation de l'actine grâce au recrutement du complexe plaquettaire de signalisation Arp2/3 (DeMali et al., 2002).

2.1.3. Rôle de la paxilline

La paxilline est une protéine localisée au niveau des AF grâce à ses nombreux domaines LIM C-terminaux (Brown et al., 1996; Turner and Miller, 1994) qui permettent les interactions protéines-protéines (Schmeichel and Beckerle, 1994). Elle est considérée comme une sorte de plate-forme permettant de centraliser un certain nombre de voies de signalisation au niveau des plaquettes. Les protéines tyrosine-kinases Src et FAK jouent notamment un rôle prépondérant dans l'activité de la paxilline en permettant le recrutement de protéines essentielles pour la transduction des signaux (Crk, p130Cas), de protéines structurales de liaison avec l'actine (vinculine, actopaxine) et régulatrices de la dynamique du cytosquelette (Arf GAP, Pix/Cool GEF, PAK) (Turner, 2000; Turner et al., 1999). D'autre part, l'activité de la paxilline est sous contrôle de protéines inhibitrices telles que Csk ou PTP-1B (Oberfell et al., 2002; Su et al., 1999).

2.1.4. Rôle de l' α -actinine

L' α -actinine est une protéine de 100 kDa de la famille des protéines interagissant avec l'actine, incluant la fimbrine, la spectrine, la dystrophine, et l'utrophine (Buensuceso et al., 2004). Tout comme la taline, elle peut effectuer un lien direct avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et joue ainsi un rôle clé dans le maintien de la stabilité des AF. Il a d'ailleurs été montré que les mutations F⁷²⁷A, K⁷²⁹A et F⁷³⁰A au niveau de la partie cytoplasmique de β_3 empêchent l'interaction avec l' α -actinine et sont responsables d'une réduction de la formation d'AF (Lyman et al., 1997). Elle entretient également certains contacts avec la vinculine et la zyxine (Goldmann, 2000), ainsi qu'avec des protéines signalétiques telles que ERK1, MEKK1 et PKN (Buensuceso et al., 2004). Enfin, son rôle dans la modulation de la plasticité du cytosquelette d'actine est principalement régulé par la FAK et la PI3K (Fraley et al., 2005; Izaguirre et al., 2001). En effet, l' α -actinine est un substrat direct de la FAK et est phosphorylée au cours de l'agrégation plaquettaire et de l'étalement sur le fg (Izaguirre et al., 2001).

2.1.5. Autres protéines

La CIB (pour calcium and integrin-binding protein) est une protéine de 22 kDa qui, contrairement à toutes les autres protéines citées précédemment, entre en contact avec la partie cytoplasmique de la sous-unité α_{IIb} , notamment au niveau de la séquence conservée ⁹⁸⁹KVGFFKR⁹⁹⁵ et plus précisément de l'Arg⁹⁹⁵ (Barry et al., 2002). Son rôle fonctionnel n'est pas encore clair car on lui a assigné un rôle aussi bien dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Tsuboi, 2002), que dans la signalisation outside-in, en se fixant préférentiellement au complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans son état activé (Naik and Naik, 2003a; Vallar et al., 1999). Enfin, l'association de CIB avec $\alpha_{IIb}\beta_3$ serait impliquée dans la formation des lamellipodes et l'étalement plaquettaire, probablement sous contrôle de la FAK (Naik and Naik, 2003a; Naik and Naik, 2003b).

Une autre protéine qui joue un rôle prépondérant dans l'organisation du cytosquelette d'actine est la filamine. Dans les plaquettes, l'isoforme la plus abondante est la filamine A. Cette protéine de 200 kDa environ, appelée précédemment ABP (pour actin-binding protein), a en effet pour rôle de relier entre eux et à la membrane les filaments d'actine, et de les stabiliser en formant un réseau tridimensionnel (Stossel et al., 2001). Elle est capable d'interagir avec un certain nombre de protéines de la signalisation, dont notamment les protéines de la famille des RhoGTPases et leurs régulateurs (Ohta et al., 1999; Bellanger et al., 2000), ou encore la PKC α (pour protein kinase α) (Tigges et al., 2003). Un rôle de régulateur de la formation des protrusions membranaires et de la polarisation cellulaire lui a également été attribué (Calderwood et al., 2001). Enfin, elle est capable d'interagir avec le récepteur GP Ib-IX-V et de moduler sa fonction au cours de la signalisation plaquettaire (Stossel et al., 2001; Williamson et al., 2002).

2.2. Les protéines de la signalisation

Les domaines cytoplasmiques du complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$, et des intégrines en général, jouent un rôle essentiel dans l'initiation des cascades de signalisation suite à la reconnaissance du ligand, et beaucoup de travaux tendent à identifier les protéines intracellulaires qui interagissent directement avec ces domaines (Liu et al., 2000). Parmi ces protéines, localisées au niveau des AF au même titre que les protéines structurales, les protéines de la famille des Src kinases font actuellement l'objet de très nombreuses études (Arias-Salgado et al., 2003). Mais il est certain qu'un nombre important d'autres protéines qui n'interagissent pas directement avec l'intégrine jouent un rôle clé dans l'initiation et la régulation des voies de signalisation intracellulaire initiées par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

2.2.1. La famille des Src kinases (SFKs)

Les SFKs sont des protéines de 52-62 kDa qui jouent un rôle prépondérant en aval des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ en générant différents signaux responsables de la régulation de l'organisation du cytosquelette, de la mobilité cellulaire et de

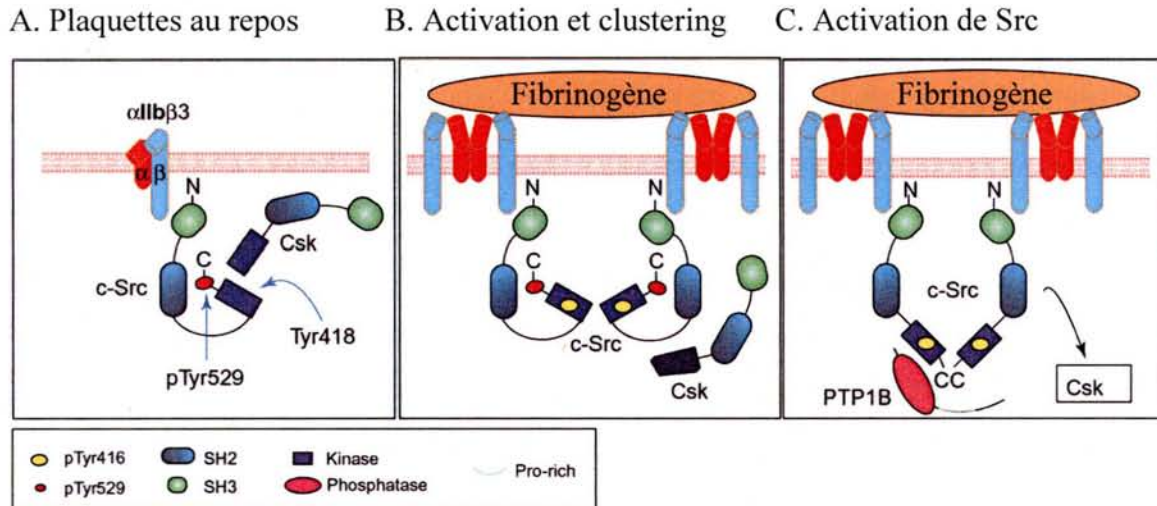


Figure 16 : Régulation de l'activité de Src au cours de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. A. Src est constitutivement liée à $\alpha_{IIb}\beta_3$ au repos et est inactive en raison de la phosphorylation de son résidu Tyr⁵²⁹. B. Clustering de Src suite à l'activation des intégrines et auto-phosphorylation du résidu Tyr⁴¹⁸. C. Activation de Src par dissociation de la kinase Csk et déphosphorylation du résidu Tyr⁵²⁹ par la phosphatase PTP-1B (D'après Shattil, 2005).

l'expression des gènes en réponse à l'adhésion cellulaire (Arias-Salgado et al., 2005). Les SFKs sont constituées des protéines ubiquitaires Src, Yes et Fyn ainsi que Hck, Lck, Lyn, Yrk, Blk et Fgr qui ne sont exprimées que dans les tissus hématopoïétiques (Thomas and Brugge, 1997). L'étalement cellulaire, qui est en fait un indicateur du fonctionnement des voies de signalisation intracellulaires, dépend donc de la présence des SFKs, en particulier la kinase Src. En effet, Src est associée constitutivement au domaine intracellulaire de la sous-unité β_3 par son domaine SH3 (pour Src Homology domain 3) (Arias-Salgado et al., 2003), et son activation est l'une des premières conséquences du clustering des intégrines suite à la reconnaissance du ligand (De Virgilio et al., 2004; Oberfell et al., 2002).

Parmi les SFKs, la kinase Src est la plus étudiée car la plus abondante, et un modèle de son activation a même été proposé (Arias-Salgado et al., 2003). Dans les plaquettes au repos, un faible pool de Src (<5% de Src total) est constitutivement lié à $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 16). Src est alors dans un état inactif, dû à l'absence de phosphorylation de son site d'activation (Y^{418}) et à la phosphorylation de sa tyrosine Y^{529} par la protéine associée Csk (Oberfell et al., 2002). La reconnaissance du fibrinogène par $\alpha_{IIb}\beta_3$ conduit au clustering des intégrines et de Src (Buensuceso et al., 2003), résultant en une augmentation locale de la concentration en Src qui conduit à une trans-autophosphorylation du site d'activation, et donc à l'activation complète de Src (Harrison, 2003), stabilisée par la déphosphorylation de la tyrosine Y^{529} par des tyrosines phosphatases (PTP-1B) (Arias-Salgado et al., 2005; Su et al., 1999) et la dissociation de Csk (Oberfell et al., 2002). Src activée s'associe alors avec FAK, Syk ou Shc, et active à son tour de nombreuses protéines régulatrices des grandes voies de signalisation intracellulaire telles que celles impliquant la PI3K, les MAP kinases ou les RhoGTPases (Shattil, 2005). Deux autres importants substrats directs de Src sont notamment la protéine p130Cas et la paxilline. En effet, p130Cas permet de recruter la protéine Nck (O'Neill et al., 2000b), et s'associe à la paxilline phosphorylée en Tyr^{31} et Tyr^{118} par Src, pour recruter Crk qui, combiné à l'adaptateur DOCK180, contribue à l'activation de Rac (Nikolopoulos and Turner, 2000). D'autre part, l'association de Crk avec la molécule C3G active la protéine Rap1 de la famille des protéines Ras, qui permet de renforcer l'interaction intégrine-MEC par le biais d'une boucle de régulation positive (Gotoh et al., 1995; Ohba et al., 2001).

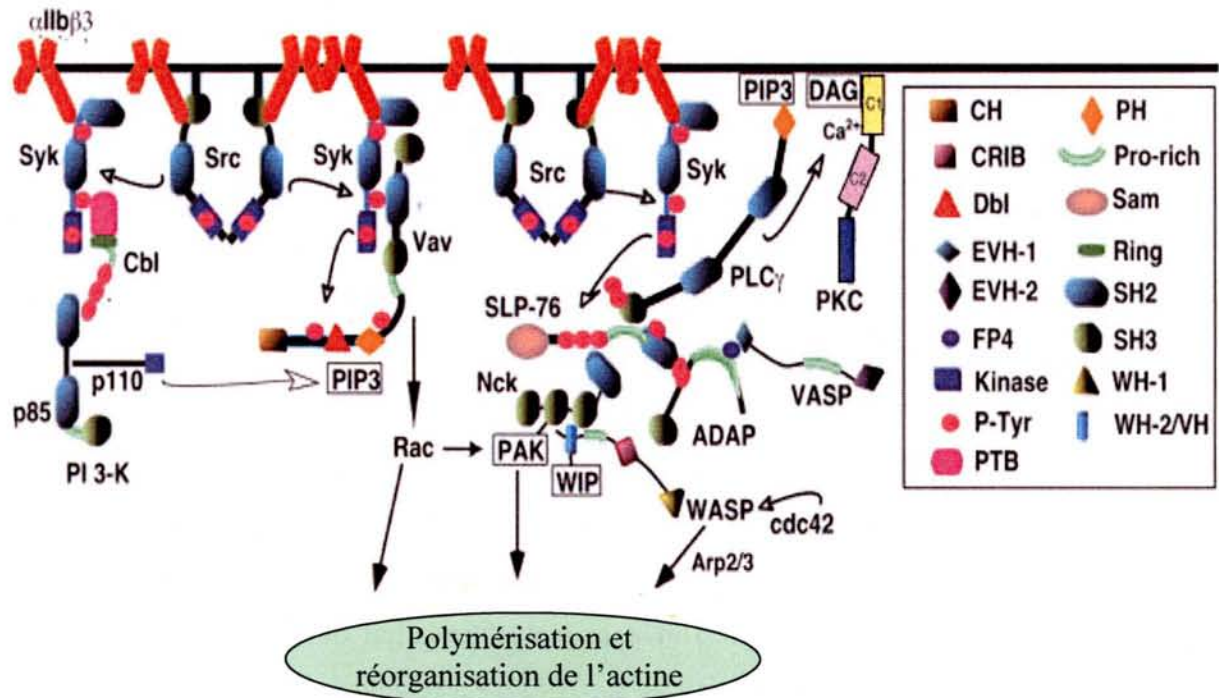


Figure 17 : Implication de la protéine Syk dans la signalisation outside-in conduisant à la polymérisation et à la réorganisation de l'actine (D'après Shattil et Newman, 2004).

2.2.2. La protéine Syk

Syk est une protéine tyrosine kinase qui se lie tout comme Src à la sous-unité β_3 cytoplasmique (Woodside et al., 2001) (Figure 17). Son activation est dépendante de l'activation de Src. Au niveau des plaquettes, Syk a pour fonction de permettre l'étalement par la formation des filopodes et lamellipodes, et ceci par assemblage de complexes de signalisation faisant intervenir des molécules adaptatrices telles que SLP-76 ou SLAP-130/ADAP, des enzymes telles que les protéines Vav ou la phospholipase $C\gamma$, et des protéines régulatrices des filaments d'actine comme Rac ou WASP (Clark et al., 1994; Miranti et al., 1998; Obergfell et al., 2002; Obergfell et al., 2001; Wonerow et al., 2002). Une étude montre que des plaquettes déficientes dans l'expression de SLP-76 présentent des défauts d'étalement sur fg, indiquant que la voie de signalisation initiée par Syk/Src intervient dans la réorganisation du cytosquelette d'actine qui a lieu lors de l'adhésion plaquettaire (Judd et al., 2002). Le rôle de Syk dans la signalisation est donc non négligeable et il est même probable que Syk intervienne également en amont de l'activation de l'intégrine en étant activée selon un mécanisme indépendant des intégrines, par la thrombine ou encore l'ADP (Clark and Brugge, 1995; Clark et al., 1994), puisque des plaquettes déficientes dans l'expression de Syk présentent un défaut d'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ suite à une stimulation par des agonistes (Law et al., 1999).

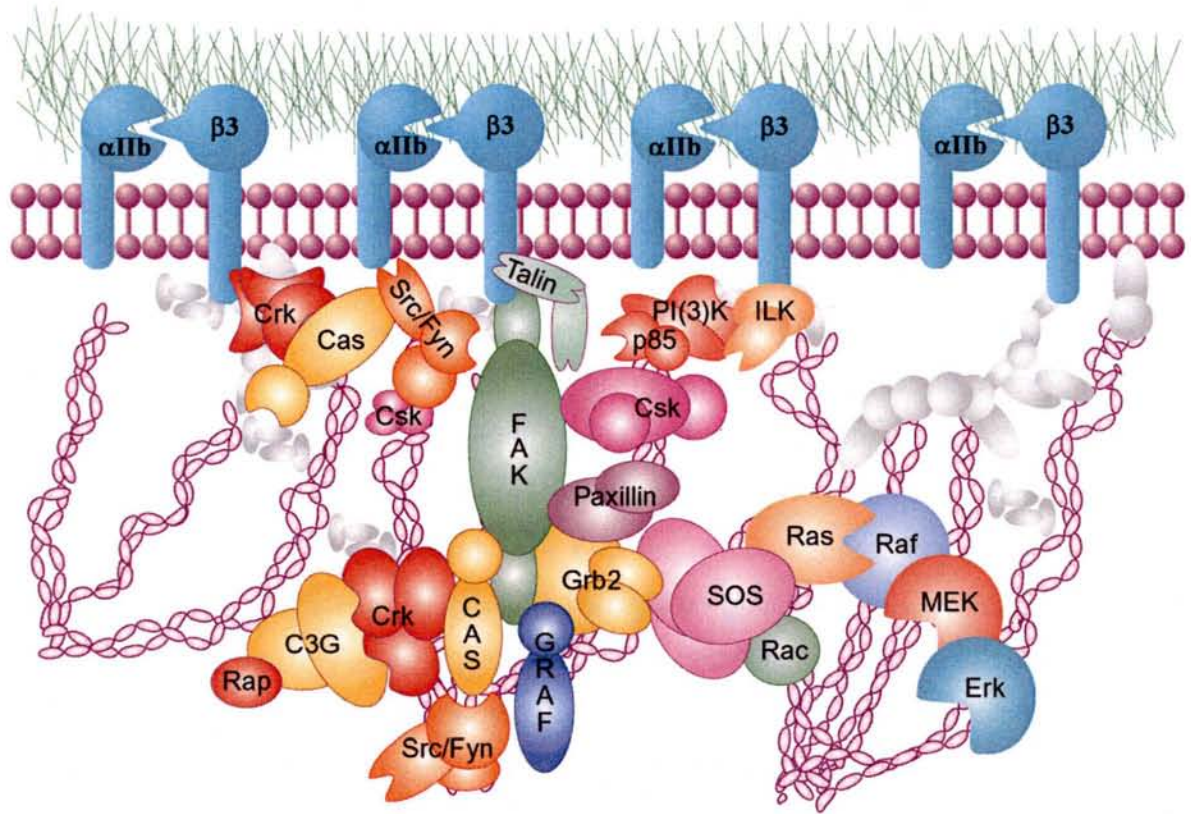


Figure 18 : Rôle de pivot de la FAK dans les événements de signalisation outside-in (D'après Miranti et Brugge, 2002).

2.2.3. La FAK

La FAK est une autre tyrosine kinase de 125 kDa, localisée au niveau des AF en raison de la présence d'une séquence FAT (focal adhesion targeting) C-terminale (Hildebrand et al., 1993; Martin et al., 2002b). Elle joue un rôle clé dans la signalisation outside-in de par ses nombreuses interactions protéiques intracellulaires et son activité catalytique (Figure 18). En effet, l'engagement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec le fibrinogène induit le recrutement de la FAK et son autotransphosphorylation au niveau du résidu tyrosine Y³⁹⁷. Une succession de phosphorylations de résidus tyrosine a ensuite lieu, notamment des résidus Y⁵⁷⁶ et Y⁵⁷⁷ par Src, rendant FAK totalement active (Schaller, 2001). Il est maintenant parfaitement décrit que la FAK établit un lien étroit avec les protéines Syk et Src (Shattil, 1999; Shattil, 2005), et joue de ce fait un rôle important dans l'initiation de la signalisation outside-in intracellulaire. L'ensemble de ses tyrosines phosphorylées lui permet également de se lier aux domaines SH2 spécifiques des tyrosines phosphorylées de nombreuses autres protéines telles que les SFKs, Csk, PTEN, Grb2 et 7, PI3K (Parsons, 2003; Schlaepfer and Hunter, 1998; Zamir and Geiger, 2001). D'autre part, la FAK peut aussi interagir avec les domaines SH3 des protéines Cas et PLC γ par l'intermédiaire d'un domaine riche en proline. Cependant, il semble difficile pour la FAK d'interagir avec toutes ces protéines en même temps, rendant la compréhension des voies de signalisation en aval de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ assez floue, d'autant plus qu'elle présente également des sites d'interaction avec un certain nombre de protéines du cytosquelette comme la taline, ou encore la paxilline qui reconnaît notamment la séquence FAT (Chen et al., 1995). Enfin, de nombreuses études montrent que la FAK intervient également dans la régulation des RhoGTPases (Chikumi et al., 2002; Zhai et al., 2003).

2.2.4. La protéine Shc

La protéine p52Shc est la seule isoforme détectée dans les plaquettes (Phillips et al., 2001). Cette molécule adaptatrice joue un rôle déterminant dans l'activation de la voie des kinases ERK en recrutant le complexe Grb2/Sos (Wary et al., 1998). Une étude montre que ces protéines Shc et Grb2 n'interagissent avec la sous-unité β_3 cytoplasmique que lorsqu'elle est phosphorylée au niveau des tyrosines des motifs conservés NPLY et NITY (Law et al., 1996). Bien que le rôle de Shc au niveau plaquettaire ne soit pas encore clairement établi, certaines études suggèrent que Shc pourrait intervenir dans la stabilité de l'agrégat plaquettaire (Phillips et al., 2001).

2.2.5. La PI3-kinase

Les PI3-kinases sont une famille d'enzymes qui jouent un rôle majeur dans la signalisation inside-out conduisant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Payraastre et al., 2000; Saci et al., 2000), et sont d'autre part impliquées dans l'adhésion primaire des plaquettes, l'étalement et l'agrégation plaquettaire (Haimovich et al., 1996). Il a en effet été montré que la PI3K α interagit directement avec la FAK après agrégation plaquettaire (Guinebault et al., 1995). En effet, la trans-autophosphorylation en Y³⁹⁷ de la FAK lui permettrait d'interagir avec le domaine SH2 de la sous-unité régulatrice (p85 α) de la PI3K (Chen et al., 1996; Reiske et al., 1999). Enfin, il a été montré que l'étalement plaquettaire sur fibrinogène conduit à l'accumulation locale de PIP₂ (pour phosphatidyl inositol bis-phosphate), responsable de la mobilisation de calcium et de l'extension des lamellipodes impliquée dans la migration cellulaire (Gironcel et al., 1996).

2.2.6. La famille des RhoGTPases

Etant donné le rôle majeur joué par la famille des RhoGTPases dans la signalisation intracellulaire médiée par les intégrines menant aux différents réarrangements du cytosquelette d'actine de la cellule, le chapitre IV y est exclusivement consacré.

2.2.7. Autres protéines

Parmi l'ensemble des protéines jouant un rôle non négligeable dans la signalisation $\alpha_{11b}\beta_3$ -dépendante, citons par exemple l'integrin-linked kinase (ILK). Cette sérine-/thréonine kinase d'environ 52 kDa est impliquée dans les voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance, mais également des intégrines (Dedhar, 2000; Dedhar et al., 1999) de par son interaction avec les parties cytoplasmiques des sous-unités β des intégrines, notamment β_3 (Dedhar and Hannigan, 1996). ILK est un élément caractéristique des AF et intervient dans de nombreuses voies de régulation du cytosquelette d'actine. Des résultats récents montrent par exemple que des pertes d'expression cellulaire d'ILK résultent en des défauts d'association entre intégrines et plaques d'adhésion musculaire, équivalentes aux AF, caractérisés par des anomalies de l'adhérence, de l'étalement et de la prolifération cellulaire (Mackinnon et al., 2002; Sakai et al., 2003; Zervas et al., 2001). D'autre part, une étude récente suggère qu'ILK contribue clairement à l'organisation du cytosquelette en régulant la voie des RhoGTPases (Khyrul et al., 2004). Enfin, ses interactions avec la FAK, l'actopaxine, les protéines plaquettaires affixine et paxilline, ou les molécules adaptatrices PINCH, renforcent son rôle central au sein du cytosquelette (Dedhar, 2000; Khyrul et al., 2004; Nikolopoulos and Turner, 2000; Nikolopoulos and Turner; Tu et al., 1999; Yamaji et al., 2002).

Les protéines Vav (95 kDa) sont également essentielles dans cette signalisation outside-in puisqu'elles ont pour fonction d'activer les protéines de la famille des RhoGTPases (Crespo et al., 1997; Han et al., 1997; Olson et al., 1996). Ces protéines, membres de la famille Dbl des GEFs (Guanine exchange factors), sont au nombre de trois, Vav1 est exprimée dans les cellules hématopoïétiques alors que Vav2 et 3 sont retrouvées partout (Bustelo, 2000). L'engagement des intégrines, et les interactions avec le cytosquelette d'actine qui en résultent, activent de nombreuses cascades de signalisation primordiales pour assurer l'étalement cellulaire. De récents résultats montrent que Vav1 peut coopérer avec Rac pour induire des réarrangements du cytosquelette au niveau de cellules T (del Pozo et al., 2003). D'autre part, Zap-70 qui est activée par les SFKs et Syk (Woodside et al., 2001; Woodside et al., 2002),

conduit à la phosphorylation et l'activation de Vav1 (Hornstein et al., 2003). Par contre, des inhibiteurs de SFKs empêchent toute phosphorylation des protéines Syk et Vav1, laissant suggérer que Syk se situe en aval des SFKs et en amont des protéines Vav dans la signalétique $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dépendante (Oberfell et al., 2002). Les protéines Vav apparaissent donc au centre de nombreux événements de signalisation intracellulaire.

Chapitre IV :

La famille des RhoGTPases

L'interaction des intégrines avec leur ligand conduit à l'activation de nombreuses protéines intracellulaires de signalisation, dont notamment les protéines de type tyrosine phosphatases, les protéines kinases AMP cyclique dépendantes, la protéine kinase C, ou encore les protéines de la super-famille des RasGTPases. Concernant cette dernière famille, on retrouve par exemple plus de 60 GTPases chez les mammifères réparties en 5 groupes majeurs : Ras, Rho, Rab, Arf et Ran, témoignant du rôle fondamental joué par ces protéines dans différents aspects du comportement cellulaire. Au cours de ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur une famille de ces protéines qui ont un intérêt particulier pour ce travail, la famille des RhoGTPases.

1. Étude physiologique des protéines de la famille des RhoGTPases

1.1. Description et structure des RhoGTPases

La famille des RhoGTPases, dont le gène *Rho* a été identifié en 1985, comprend 22 protéines connues à l'heure actuelle qui peuvent être classées en 5 sous-familles: les protéines Rho-like (RhoA, RhoB, Rho C), les protéines Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE), les protéines Cdc42-like (Cdc42, Tc10, TCL, Wrch1, Chp/Wrch2), les protéines Rac-like (Rac1, Rac2, Rac3, Rho G), les protéines RhoBTB (RhoBTB1 et RhoBTB2), ainsi que RhoD, Rif, RhoH/TTF, G25K, RhoF. Récemment, 2 nouvelles GTPases MIRO-1 et MIRO-2 furent décrites comme appartenant à la famille des RhoGTPases (Fransson et al., 2003).

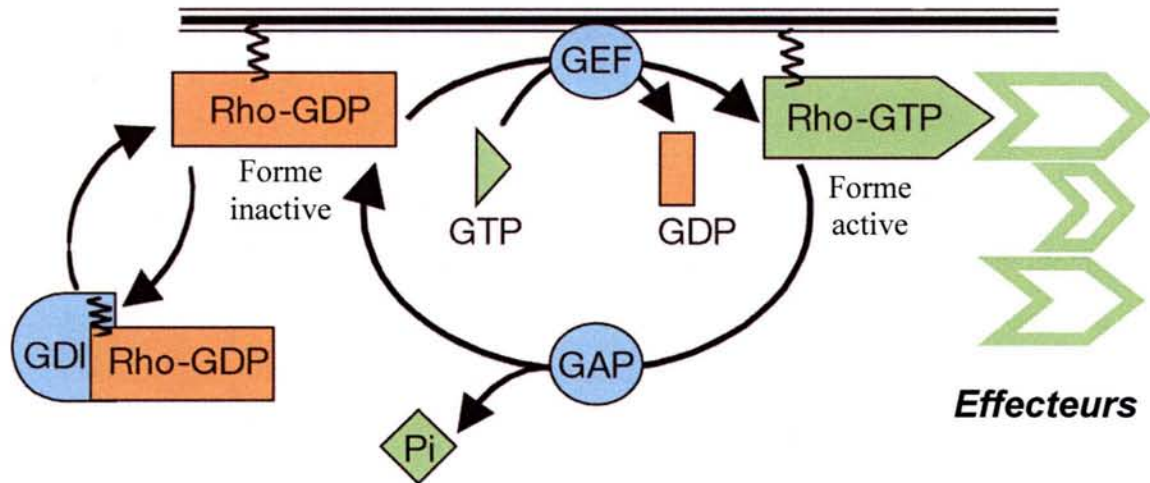


Figure 19 : Cycle de régulation de l'activité des protéines de la famille des RhoGTPases par les protéines GEF, GAP et GDI (D'après Etienne-Manneville et Hall, 2002).

Ce sont de petites protéines monomériques d'un poids moléculaire compris entre 20 et 30 kDa, et exprimées de façon très ubiquitaire à travers les espèces, de la levure à l'Homme. La comparaison de la séquence en acides aminés de certaines de ces protéines a révélé qu'elles présentent une structure primaire identique et qu'elles sont très homologues entre elles, avec notamment plus de 70% d'homologie entre Rac et Cdc42 et 45% d'homologie entre Rac et Rho. Au niveau structural, les RhoGTPases ont une structure caractéristique comprenant 6 feuillets β entourés d'hélices α (Vetter and Wittinghofer, 2001).

1.2. Mode de fonctionnement des RhoGTPases

1.2.1. Généralités

Les RhoGTPases fonctionnent selon un mode cyclique particulier caractéristique de la famille des GTPases (Figure 19). En effet, elles effectuent constamment un cycle entre un état non-activé, lorsqu'elles ont fixé une molécule de GDP et un état activé lorsqu'elles ont fixé une molécule de GTP. Les RhoGTPases dans leur état activé sont capables de reconnaître des protéines cibles et de générer une réponse physiologique jusqu'à leur retour à leur état inactivé de repos. Cette activité des RhoGTPases est modulée et catalysée par un ensemble de 3 groupes de protéines régulatrices accessoires qui gravitent autour. Ces protéines sont notamment les GEFs (pour guanine nucleotide exchange factors) (Cerione and Zheng, 1996; Zheng, 2001) qui comme leur nom l'indique sont responsable de l'activation des RhoGTPases en échangeant les molécules de GDP par des molécules de GTP. Les GAPs (pour GTPase-activating proteins) (Lamarche and Hall, 1994), quant à elles stimulent l'activité GTPase intrinsèque des protéines Rho et hydrolysent les molécules de GTP, et accélèrent ainsi le retour des GTPases à un état inactif. Une troisième famille de protéines régulatrices sont les GDIs (pour GDP dissociation inhibitors) (Olofsson, 1999; Ueda et al., 1990) qui se lient préférentiellement aux RhoGTPases sous leur forme liée à GDP afin de les stabiliser sous leur forme inactive, tout en les ciblant vers la membrane cellulaire.

GEFs	Spécificité	Distribution tissulaire
Dbl	Cdc42, Rac, Rho	cerveau, gonades
Lbc	Rho	coeur, poumons, muscle squelettique
Lfc	Rho	cellules hématopoïétiques, reins, poumons
Lsc	Rho	cellules hématopoïétiques, reins, poumons
Tiam1	Rac	cerveau, cellules hématopoïétiques
Vav1-3	Cdc42, Rac, Rho	cellules hématopoïétiques
Vav2	Cdc42, Rac, Rho	ubiquitaire
FGD1	Cdc42	cerveau, coeur, poumons, reins
Trio	Rac, Rho	ubiquitaire
Ost	Cdc42, Rho	cerveau, coeur, poumons, foie
Bcr	Cdc42, Rho	cerveau
Abr	Rho	cerveau
Smg-GDS	Rac, Rho	ubiquitaire
DEF6	Cdc42, Rac, Rho	ubiquitaire
Ect-2	Rac, Rho	kératinocytes, reins, foie, rate
Sos	Rho	ubiquitaire

Tableau 3 : Principaux facteurs GEF des RhoGTPases chez les mammifères (D'après Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997; Cerione et Zheng, 1996; Rossman et al., 2005).

1.2.2. Les RhoGTPases et leurs régulateurs

L'activité des RhoGTPases est déterminée par le rapport entre les formes liées à GDP et les formes liées à GTP dans la cellule (Boguski and McCormick, 1993). Ce rapport entre les 2 états est lui-même contrôlé par l'activité des GEFs, GAPs et GDIs qui interviennent dans la régulation des RhoGTPases au niveau temporel et spatial.

1.2.2.1. Les GEFs

Les RhoGEFs correspondent à une large famille croissante de plus de 60 protéines chez les mammifères (Rossman et al., 2005; Schmidt et al., 2002), et qui présentent 2 motifs communs analogues, le domaine DH (pour Dbl-homology), qui catalyse l'échange des nucléotides GDP par des GTP, et le domaine PH (pour pleckstrin-homology), dont le rôle n'est pas clairement défini mais qui interviendrait dans la localisation subcellulaire (Zheng et al., 1996). A noter que ces protéines GEF sont conservées au cours de l'évolution et ont été identifiées chez la drosophile et *Caenorhabditis elegans* (Benian et al., 1996; Sone, 1997). En outre, de nombreux GEFs présentent également des domaines récurrents chez les molécules de signalisation, les motifs SH3 (pour Src-homology 3) et les sites de fixation de diacylglycérol (Cerione and Zheng, 1996). Expérimentalement, certaines GEFs apparaissent comme étant spécifiques d'une seule RhoGTPase, c'est le cas par exemple de Lbc ou Lfc pour Rho, Tiam1 pour Rac ou encore FGD1 pour Cdc42, alors que d'autres tels que Vav ou Dbl agissent sur les 3 RhoGTPases (Olson et al., 1996; Zheng et al., 1995) (Tableau 3).

Leur distribution tissulaire est également très variable. Parmi les protéines Vav par exemple, Vav1 (Miranti et al., 1998) n'est exprimée que dans les cellules de la lignée hématopoïétique, alors que Vav2 est plus largement distribuée. D'autre part, il est intéressant de noter que bien souvent, ces GEFs sont situées en aval de voies de signalisation initiées suite à l'engagement des intégrines. C'est notamment le cas du complexe DOCK180. En effet, les protéines paxilline et p130Cas, lorsqu'elles sont activées par tyrosine phosphorylation, s'associent en complexe avec les protéines Crk, ELMO et DOCK180 pour activer Rac, DOCK180 étant considérée comme une Rac

GAPs	Spécificité	Distribution tissulaire
p50GAP	Cdc42*, Rac, Rho	ubiquitaire
Bcr	Cdc42, Rac*	cerveau
Abr	Cdc42, Rac	cerveau
N-Chimerin	Rac	cerveau
α_1/α_2 -chimerin	Cdc42, Rac*	cerveau, testicules
β_1/β_2 -chimerin	Rac	testicules/cerveau
p190GAP	Cdc42, Rac, Rho*	ubiquitaire
p122/DLC1	Rho	ubiquitaire
Myr5/Myr7	Cdc42, Rho*	ubiquitaire
RalBP1/RLIP76/RIP1	Cdc42*, Rac	ubiquitaire
Graf	Cdc42, Rho	ubiquitaire (surtout cerveau et foie)
PARG1	Cdc42, Rac, Rho*	ubiquitaire
Rich1/2	Cdc42, Rac	ubiquitaire
ARAP1/2	Cdc42, Rac, Rho	ubiquitaire

Tableau 4 : Principaux facteurs GAP des RhoGTPases chez les mammifères. L'astérisque marque la GTPase préférentielle (D'après Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997 ; Moon et Zheng, 2003).

GEF bien que ne comprenant pas de site d'homologie Dbl/pleckstrine caractéristique des GEFs de la famille des RhoGTPases (Brugnera et al., 2002). Un autre complexe constitué des protéines PKL (GIT) et PIX (pour Pak-interacting exchange factor) en association avec la paxilline, joue également un rôle de Rac GEF (Nikolopoulos and Turner, 2000).

1.2.2.2. Les GAPs

Les GAPs ont pour rôle d'accélérer le retour des RhoGTPases à leur état inactif en stimulant l'activité GTPase intrinsèque de chaque GTPase. p50GAP et Bcr (pour breakpoint cluster region protein) furent les premières GAPs décrites (Diekmann et al., 1991; Hall, 1990). Depuis, le nombre de GAPs connues chez les mammifères s'est fortement accru: environ 80 GAPs ont été identifiées chez l'Homme suite à la récente analyse du génome humain. Cependant, la fonction de la plupart de ces GAPs reste encore inconnue (Moon and Zheng, 2003). Diverses GAPs ont également été découvertes chez *S. Cerevisiae*, *C. elegans* ou encore la drosophile (Agnel et al., 1992; Agrez et al., 1994; Schmidt et al., 1997; Stevenson et al., 1995; Zheng et al., 1994). Les RhoGAPs présentent un domaine commun d'environ 150 acides aminés (Moon and Zheng, 2003) et de la même façon que pour les GEFs, certaines GAPs reconnaissent préférentiellement une seule RhoGTPase alors que d'autres ont un spectre d'action plus large (Tableau 4).

1.2.2.3. Les GDIs

Les GDIs, qui jouent un rôle crucial dans la translocation des RhoGTPases entre la membrane et le cytosol, furent identifiées au début des années 90, notamment RhoGDI associée à RhoA, Rac et Cdc42 (Abo et al., 1991; Chang et al., 1993; Fukumoto et al., 1990; Hart et al., 1992; Leonard et al., 1992; Ueda et al., 1990). Les GDIs sont localisées dans le cytosol, associées avec les RhoGTPases et lors de l'activation des GTPases, les GDIs se dissocient et permettent une relocalisation des GTPases au niveau des membranes (Takai et al., 1995), cette dissociation des GDIs étant induite par les membres de la famille ERM (pour ezrin/radixin/moesin) (Takahashi et al., 1997). Trois autres GDIs sont connues: D4-GDI,

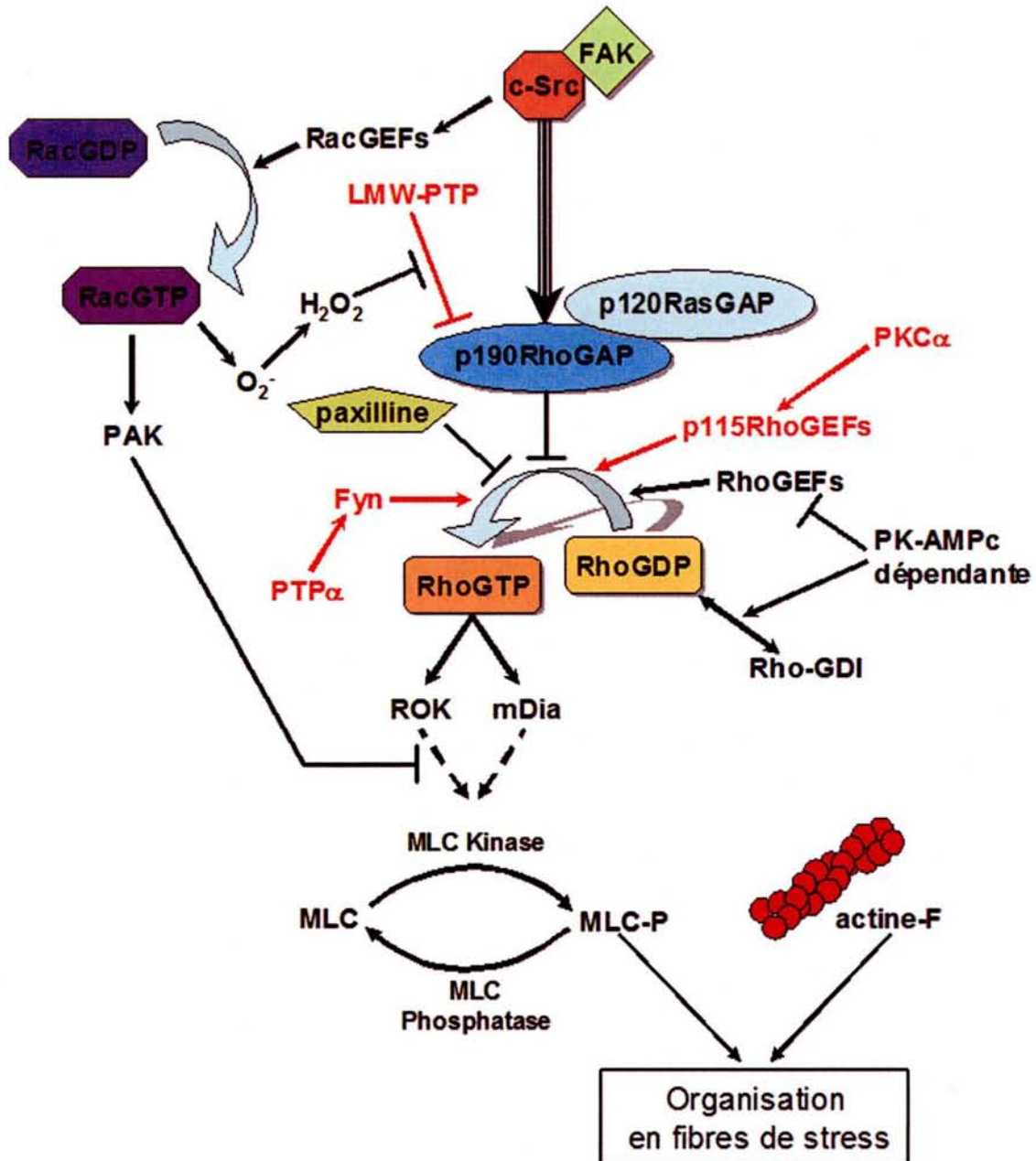


Figure 20 : Mécanisme de régulation de l'activité de Rho et de la formation des fibres de stress. Les voies de signalisation conduisant à la réactivation de Rho, suite à son inhibition transitoire initiale au cours de l'étalement cellulaire, figurent en rouge.

RhoGDI γ I et LyGDI (Adra et al., 1997; Hakoshima et al., 2003; Lelias et al., 1993). Enfin, d'autres protéines ont également été décrites comme possédant une activité GDI. Le fonctionnement de ces GDIs n'est pas encore totalement élucidé, mais il est à noter que l'activation des RhoGTPases n'est pas seulement due à l'action des GEFs mais dépend aussi des GDIs qui peuvent relâcher des quantités de GTPases actives localement aux sites d'adhésion cellulaire médiée par les intégrines (Del Pozo et al., 2002).

1.2.2.4. Etude de la régulation de l'activité de RhoA (Figure 20)

Au cours de l'engagement des intégrines, il a été montré que dans les premiers instants, il apparaît une baisse transitoire de l'activité de RhoA (Arthur and Burridge, 2001; Ren et al., 1999), qui requiert notamment la mise en jeu des protéines Src, FAK et p190RhoGAP (Arthur et al., 2000; Ren et al., 2000). En fait, la phosphorylation de p190GAP par la kinase Src va conduire à son association avec son partenaire, la protéine p120RasGAP, puis à sa translocation vers la membrane. A ce niveau, l'activité GAP de p190GAP conduira à l'inactivation de RhoA. Il a également été montré que la paxilline intervient dans cette diminution de l'activité de RhoA, puisque la mutation des sites de phosphorylation Tyr³¹ et Tyr¹¹⁸ de la paxilline abolit la baisse transitoire d'activité de RhoA, conduisant à une formation prématurée de fibres de stress (Tsubouchi et al., 2002). Il semble également que la protéine kinase AMPc-dépendante intervienne dans l'inhibition de l'activité de RhoA en diminuant l'action des RhoGEFs et à l'inverse en favorisant la fixation de RhoA aux RhoGDIs (Ellerbroek et al., 2003; Manganello et al., 2003) dû à son activation et au fort taux d'AMPc intracellulaire (Laudanna et al., 1997). Par contre, elle joue un rôle dans l'activation de Cdc42 et Rac1 (Feoktistov et al., 2000; O'Connor and Mercurio, 2001). Enfin il a été montré récemment que les radicaux libres oxygénés sous contrôle de Rac étaient nécessaires et même suffisants pour inhiber transitoirement Rho, toujours par l'intermédiaire de la p190RhoGAP (Caron, 2003; Nimmual et al., 2003).

Progressivement, ce creux transitoire d'activité de RhoA diminue et s'accompagne d'une activation, due à l'action des RhoGEFs et à l'inactivation des RhoGAPs. Les RhoGTPases et notamment RhoA sont également sous le contrôle des PTPs (Andersson et al.) telles que SHP-2 (Src homology region 2 containing PTP-2) (Inagaki et al., 2000) dont le substrat SHPS-1 est tyrosine phosphorylé par FAK et Src (Tsuda et al., 1998) ou PTP α (Su et al., 1999) qui est capable d'activer la kinase Fyn conduisant à l'activation de RhoA (von Wichert et al., 2003). De Mali et collaborateurs ont récemment décrit un modèle de régulation de l'activité de RhoA dans lequel l'inhibition initiale et transitoire de l'activité de RhoA serait dépendante de l'activité de Src/p190RhoGAP alors que la réactivation de RhoA serait le résultat de l'activation de Fyn par PTP α (DeMali and Burrridge, 2003). La protéine kinase C (PKC) α se situe également en amont de RhoA en stimulant p115RhoGEF (Holinstat et al., 2003). Par ailleurs, diverses autres études ont montré aussi que la réactivation de RhoA pouvait être due à la phosphatase LMW-PTP (pour low molecular weight protein tyrosine-phosphatase) qui régulerait négativement l'activité de la p190RhoGAP (Bucciantini et al., 1999; Chiarugi et al., 2000). D'une façon générale, il apparaît donc clairement que les effets de Rho et Rac dans de nombreux types cellulaires sont opposés.

1.2.3. Les RhoGTPases et leurs effecteurs

Dans leur état activé, les RhoGTPases peuvent interagir avec une multitude d'effecteurs en aval jouant un rôle dans la modulation de nombreuses fonctions cellulaires. Jusqu'à présent, plus de 60 protéines cibles ont déjà été identifiées en ce qui concerne les membres les mieux caractérisés des RhoGTPases, Rho, Rac et Cdc42, ce qui explique la multitude des rôles qu'ils jouent au sein d'une cellule.

1.2.3.1. Les effecteurs de Cdc42 et Rac

Les effecteurs de Cdc42 et de Rac sont habituellement classés en un seul groupe puisqu'il présentent la même séquence cible de 16 acides aminés appelée domaine CRIB (pour Cdc42/Rac-interactive binding) (Bokoch et al., 1994; Burbelo et al., 1995). Les effecteurs les plus connus des ces RhoGTPases sont notamment la PAK 1-4 (p21-activated kinase) intervenant dans la formation des lamellipodes (Abo et al., 1998; Bagrodia et al., 1999; Sells et al., 1997), WASP (pour Wiskott-Aldrich syndrome protein) qui sont les premiers médiateurs de la formation des filopodes (Miki et al., 1998; Rohatgi et al., 1999), WAVE/Scar (pour WASP like verpolin-homologous protein) qui stimule Arp2/3 nécessaire à la polymérisation de l'actine (Machesky and Insall, 1998), IQGAP qui interviendrait directement dans l'assemblage des filaments d'actine (Fukata et al., 1997; Joyal et al., 1997; Kaibuchi et al., 1999; Machesky and Insall, 1998), la PI3-kinase qui induit des réorganisations du cytosquelette (Bokoch et al., 1996; Tolia et al., 1995), CIP4 (Aspenstrom, 1997), POSH (Tapon et al., 1998), MEKK (Fanger et al., 1997), POR1 (Van Aelst et al., 1996), P67^{phox} (Diekmann et al., 1994; Nisimoto et al., 1997), p140Sra-1 (pour specific Rac1-associated protein) (Kobayashi et al., 1998), p120^{ACK} (Yang and Cerione, 1997; Yang et al., 2001), p70S6k (Barquin et al., 1996) ce qui les conduit à jouer divers rôles dans l'organisation du cytosquelette d'actine, l'apoptose, l'activation de Jnk/p38 MAP kinase, dans la progression du cycle cellulaire, dans l'activation du facteur NFκB, dans la régulation de la NADPH oxydase ou encore au niveau de l'adhésion cellulaire (Tableau 5).

Effecteurs	Type de protéine	Sélectivité			Fonction/cible
ROK α/β	Ser/Thr kinases	Rho			interaction actine/myosine
PKN, PRK1/2		Rho			non défini
Citron kinase		Rho			cytokinèse
p70 S6 kinase			Rac	Cdc42	régulation de la traduction
Mlk2/3			Rac	Cdc42	JNK
MEKK1/4			Rac	Cdc42	JNK
PAK1/2/3			Rac	Cdc42	JNK, actine
PAK4				Cdc42	actine
MRCK α/β				Cdc42	actine
Ack1/2		Tyr kinase			Cdc42
MBS	phosphatase	Rho			inactivation chaîne légère de la myosine
PI-4-P5K	lipide kinases	Rho	Rac		PIP ₂ , actine
PI3K			Rac	Cdc42	PIP3
DAG kinase		Rho	Rac		acide phosphatidique
PLD	lipases	Rho	Rac	Cdc42	acide phosphatidique
PLC- β 2			Rac	Cdc42	diacylglycérol, inositol triphosphate
Rhophiline	adaptateurs	Rho			non défini
Rhotekine		Rho			non défini
Kinectine		Rho			kinésine
mDia1/2		Rho			organisation de l'actine
WASP, N-WASP				Cdc42	organisation de l'actine
WAVE, Scar			Rac		organisation de l'actine
POSH			Rac		non défini
POR-1			Rac		organisation de l'actine
Sra-1			Rac		organisation de l'actine
p67phox			Rac		NADPH oxydase
MSE55, BORGs				Cdc42	non défini
IQGAP1/2			Rac	Cdc42	actine

Tableau 5 : Principaux effecteurs des RhoGTPases chez les mammifères (D'après Bishop et Hall, 2000).

1.2.3.2. Les effecteurs de RhoA

Ce sont Reid et collaborateurs qui ont décrit pour la première fois à partir de la protéine effectrice Rhotekine la séquence cible de RhoA d'environ 82 acides aminés, qui fut dénommée REM1 (pour Rho effector motif class1) et plus couramment appelée RBD pour Rhotekin-Binding Domain (Reid et al., 1996). Depuis, de nombreux autres effecteurs de RhoA ont été décrits, dont notamment ROCK-1 et 2, ROK α qui se situent directement en aval de RhoA dans la voie de signalisation menant à l'adhésion cellulaire et qui jouent un rôle prépondérant dans la formation des fibres de stress en stimulant la phosphorylation des chaînes de myosine (Ishizaki et al., 1996; Matsui et al., 1996; Olson, 2004), la rhotilline et la protéine kinase N (PKN) (Mukai et al., 1994; Watanabe et al., 1996), la phospholipase D (Hess et al., 1997), myr5, une forme de myosine qui joue un rôle de GAP pour RhoA (Reinhard et al., 1995), p140mDia qui joue un rôle dans la cytokinèse et la polarité cellulaire en stimulant la polymérisation de l'actine (Li and Higgs, 2003; Watanabe et al., 1997), citron (Madaule et al., 2000), citron-kinase qui intervient au niveau des cellules se divisant au cours de la mitose et qui stimule l'activité de la myosine (Madaule et al., 1998), MBS (Amano et al., 1996), PRK2 (Vincent and Settleman, 1997), la kinectine (Hotta et al., 1996), ou encore la phosphatidyl inositol 4-phosphate 5'-kinase (PIP5K), qui est responsable de la synthèse de PIP₂ impliqué dans la régulation de la polymérisation de l'actine par l'intermédiaire des protéines gelsoline et profiline (Chong et al., 1994; Machesky and Poland, 1993; Ren et al., 1996) et dans l'activation des protéines ERM (Gilmore and Burridge, 1996; Tsukita and Yonemura, 1997) (Tableau 5).

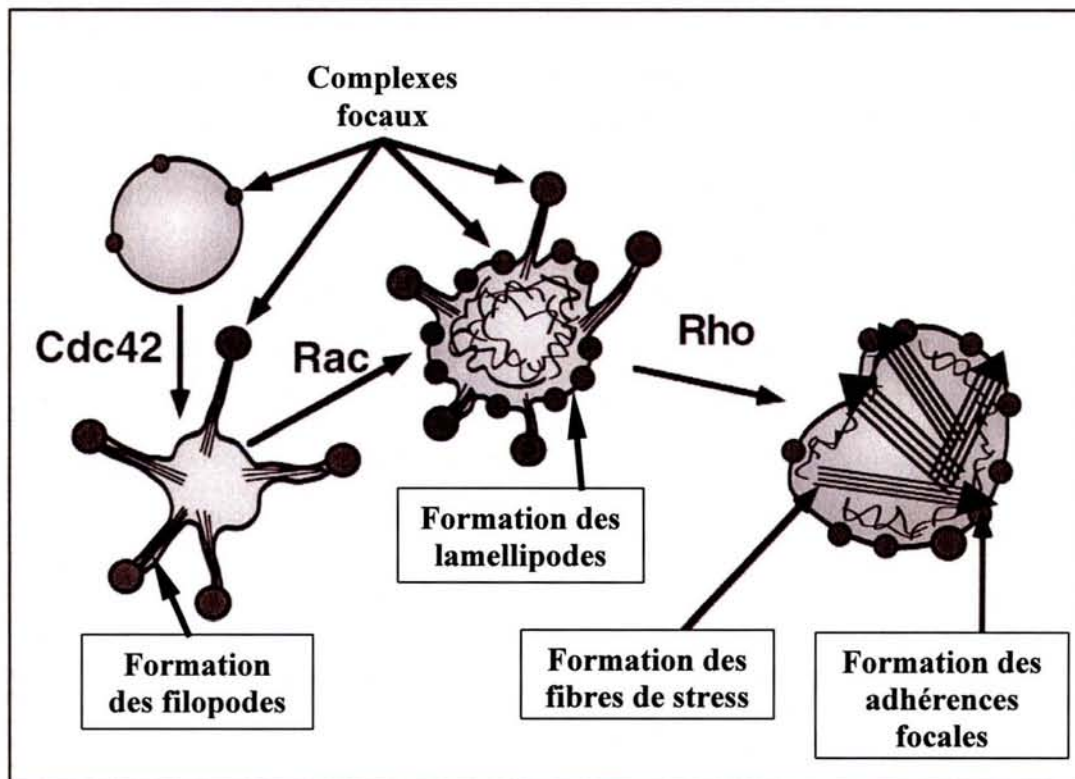


Figure 21: Représentation schématique des complexes formés par les intégrines au cours de l'activation successive des RhoGTPases Cdc42, Rac et Rho (D'après Fox, 1999).

2. Rôles physiologiques des RhoGTPases au niveau du cytosquelette

Les RhoGTPases sont au coeur de nombreuses fonctions cellulaires, ce qui coïncide entièrement avec le grand nombre de protéines effectrices identifiées à l'heure actuelle. Elles jouent un rôle primordial au niveau de la signalisation intracellulaire menant aux différents réarrangements du cytosquelette d'actine. De ce fait, elles sont à l'origine de la motilité, de la polarité et de l'adhésion cellulaires et interviennent également au niveau de la morphogenèse et de la dynamique des microtubules. Elles interviennent dans les phénomènes de sécrétion, de transport, d'endocytose, de phagocytose, de mitogénèse, d'apoptose, au niveau de la progression du cycle cellulaire, du métabolisme des phosphoinositides ou encore au niveau de la transcription de certains gènes. Au niveau des plaquettes, elles régulent principalement la formation des AF et des filaments d'actine lors de l'étalement plaquettaire sur une matrice de fg médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Leng et al., 1998; Nachmias and Golla, 1991; Savage et al., 1992)

Les RhoGTPases contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine dans toutes les cellules eucaryotes (Mackay and Hall, 1998). Les réarrangements du cytosquelette jouent un rôle crucial dans de nombreux processus mettant en jeu l'actine tels que la migration cellulaire, la phagocytose ou encore la cytokinèse, et ce sont particulièrement les RhoGTPases qui interviennent à ces niveaux. Ce sont les travaux de Ridley et Hall qui ont mis pour la première fois en évidence au niveau de fibroblastes, que l'assemblage des microfilaments contractiles d'actine et de myosine (fibres de stress) et la formation d'AF, étaient médiés par Rho, en particuliers RhoA (Ridley and Hall, 1992; Yamamoto et al., 1993).

En fait, les RhoGTPases Rho, Rac et Cdc42 sont décrites actuellement comme ayant chacune un rôle parfaitement défini. Alors que Cdc42 est responsable de la formation de longues extensions membranaires ressemblant à des doigts appelées filopodes, Rac est responsable de l'émission de protrusions membranaires plus larges et riches en actine, qu'on appelle lamellipodes (Figure 21). Enfin, Rho induit l'assemblage des fibres contractiles d'actine et de myosine à travers la cellule, connues sous le nom de fibres de stress (Barry et al., 1997; Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995; Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992). Ces 3 voies séparées

menant à l'assemblage des filaments d'actine ont été confirmées de nos jours au niveau de nombreux types de cellules de mammifères, notamment au niveau des plaquettes, ainsi que chez la levure, la drosophile et les vers (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Par ailleurs, les intégrines jouent un rôle essentiel dans l'adhésion des cellules à une matrice extracellulaire, et la compréhension des étapes mises en jeu entre l'interaction initiale d'une intégrine avec son ligand extracellulaire, et les changements de comportements cellulaires qui en découlent sont d'un intérêt capital en recherche actuellement. Des études sur les mécanismes impliqués dans la formation des complexes focaux et des AF ont démontré un rôle essentiel des RhoGTPases (Clark et al., 1998; Price et al., 1998). Les complexes focaux apparaissent au niveau des filopodes et lamellipodes en extension suite à l'activation initiale de Cdc42 puis de Rac (Figure 21). Enfin, au cours de l'étalement cellulaire, RhoA est activée et induit la formation des AF, points d'ancrage des fibres de stress (Hotchin and Hall, 1995; Machesky and Hall, 1997; Nobes and Hall, 1994; Nobes and Hall, 1995; Ridley and Hall, 1992).

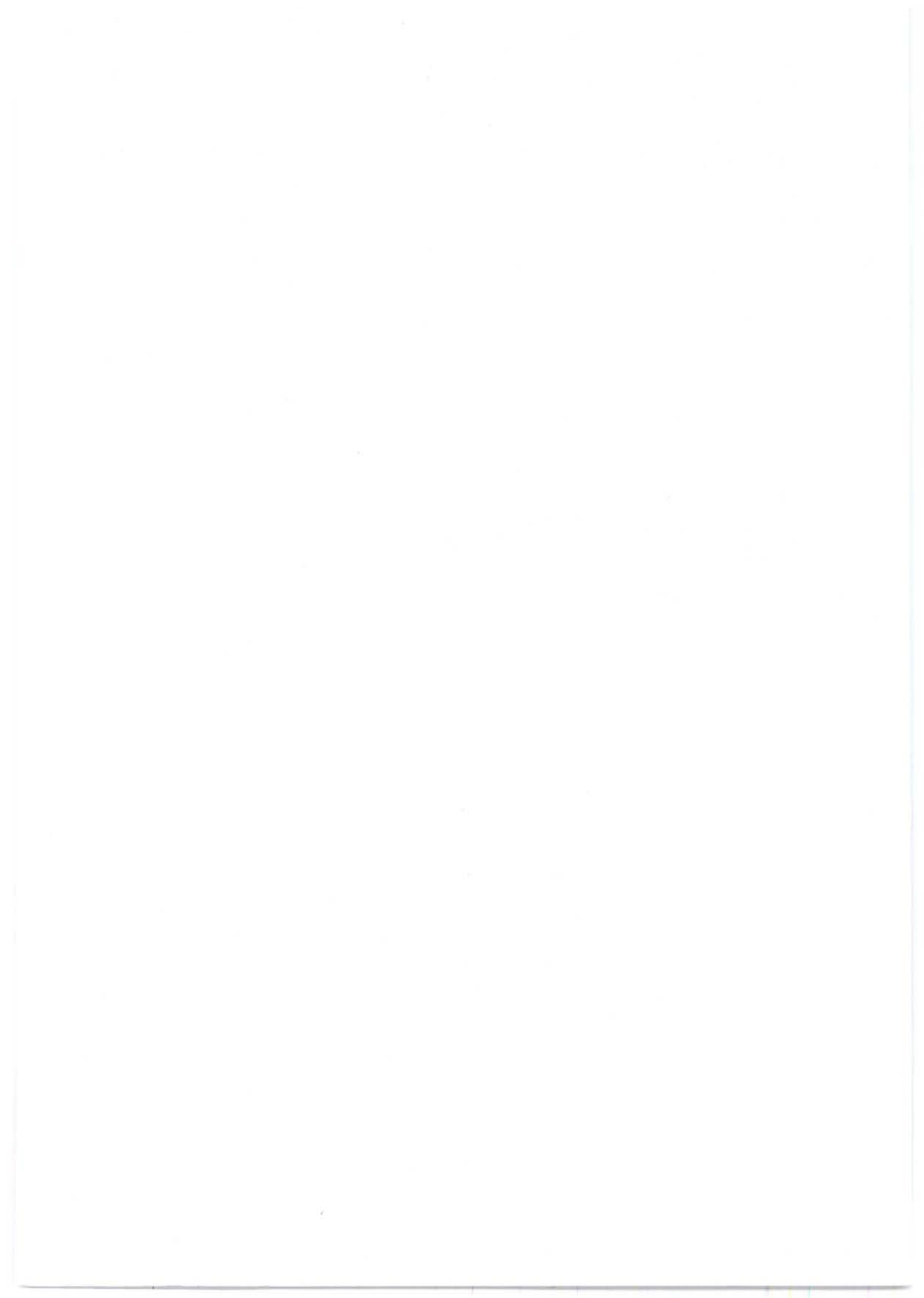
La capacité des RhoGTPases à induire la formation des complexes focaux et des AF, et de réorganiser le cytosquelette suite à une interaction intégrine-ligand, résultent de l'activation de nombreuses protéines de signalisation intracellulaires constamment en relation plus ou moins directe avec les RhoGTPases (Clark and Brugge, 1995). Considérant les molécules les mieux caractérisées, il a notamment été montré que Cdc42 interagit avec les protéines VASP au cours de la formation des filopodes (Symons, 1996), avec la PI3K qui intervient dans l'assemblage du cytosquelette (Toker et al., 1994), ou encore la p65PAK impliquée dans l'induction des protrusions membranaires (Manser et al., 1995). Rac qui, au niveau des plaquettes, peut être activée par des agonistes tels que la thrombine, joue un rôle important dans la polymérisation de l'actine en interagissant avec la PIP5K (Hartwig et al., 1995), ou le complexe SCAR/WAVE, qui active le complexe Arp2/3, permettant ainsi la formation de nouveaux filaments d'actine. Enfin, Rho active principalement la Rho kinase qui intervient dans la formation des fibres de stress en favorisant l'association de la myosine avec l'actine (Chrzanowska-Wodnicka and

Burridge, 1996). Rho stimule également la phosphorylation au niveau de résidus tyrosine de nombreuses protéines, incluant par exemple la pp125FAK, la p130Cas ou encore la paxilline, qui sont localisées au niveau des AF (Flinn and Ridley, 1996), et qui jouent donc un rôle non négligeable dans l'organisation du cytosquelette. Enfin, RhoA a également été montrée comme étant impliquée dans la régulation de l'affinité des intégrines pour leur ligand. Un inhibiteur de RhoA par exemple, la C3 exoenzyme (issue de *Clostridium botulinum* et qui ADP-rybosyle l'Asn⁴¹ de RhoA) est capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire médiée par α IIb β 3 induite par la thrombine (Morii et al., 1992). Un rôle similaire de RhoA a également pu être mis en évidence après inhibition de l'adhésion de cellules Swiss 3T3 à la suite d'une microinjection de C3 exoenzyme (Paterson et al., 1990; Ridley and Hall, 1992).

Cependant, alors que le rôle de chacune de ces RhoGTPases semble parfaitement défini, il demeure néanmoins très complexe. En effet, l'activation de Rho par exemple peut avoir des effets totalement opposés. Des cellules prenant une morphologie arrondie, soit parce qu'elles entrent en mitose soit en raison de certaines conditions expérimentales, perdent leurs fibres de stress et leurs AF, laissant penser intuitivement à une diminution de l'activité de Rho. Or c'est le contraire qui se produit, indiquant paradoxalement qu'il existe des mécanismes de désassemblage des fibres de stress qui requièrent une forte activité de Rho (Maddox and Burridge, 2003; Ren et al., 1999; Xie et al., 2005).

Compte tenu de l'importance du rôle des RhoGTPases dans de nombreuses fonctions cellulaires et en particulier leur contribution dans le contrôle de la signalisation dépendante des intégrines et de l'organisation du cytosquelette d'actine, nous avons choisi d'étudier dans un premier temps le comportement d'adhésion de cellules CHO sur fibrinogène immobilisé, et d'analyser, dans un deuxième temps, la signalisation intracellulaire correspondante mise en jeu lors de la reconnaissance du fibrinogène par son récepteur l'intégrine α IIb β 3 afin de mettre en évidence l'importance du rôle joué par les RhoGTPases Rho et Rac au cours du processus d'adhésion cellulaire médié par α IIb β 3 sur fibrinogène immobilisé.

OBJECTIFS



OBJECTIFS :

Au terme de cette introduction, il apparaît que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ établit un véritable lien physique et dynamique bidirectionnel entre son principal ligand, le fibrinogène sanguin, et les protéines plaquettaires intracellulaires de la signalisation et du cytosquelette, et ceci par 2 mécanismes distincts : i) la reconnaissance du fg immobilisé impliqué dans l'adhésion et la rétraction du caillot, ii) la reconnaissance du fg soluble lors de l'agrégation plaquettaire. Cependant, le processus de reconnaissance du fibrinogène par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ n'est pas encore totalement élucidé. En effet, au moins 2 sites distincts d'interaction ont été identifiés jusqu'à présent au niveau du fibrinogène: le motif de reconnaissance universel $^{572}\text{RGD}^{574}$ (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984) et le dodécapeptide $^{400}\text{HHLGGAKQAGDV}^{411}$ (H12) (Kloczewiak et al., 1984), la reconnaissance de chacun de ces deux sites par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dépendant de son état d'activation.

Le but de notre travail a été d'approfondir la compréhension du mode de fonctionnement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en contact avec le fg immobilisé et de déterminer les cascades de signalisation intracellulaires activées par l'interaction avec les motifs RGD et dodécapeptide. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé comme modèle expérimental, les cellules de mammifères CHO (pour Chinese hamster ovary) exprimant l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sous différentes formes d'activation. Grâce à ce modèle, nous avons pu explorer sélectivement la cascade de signalisation outside-in initiée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, indépendamment de la signalisation inside-out, deux mécanismes indissociables dans les plaquettes.

D'autre part, afin de définir le rôle de chacun des sites d'interaction du fibrinogène, nous avons choisi de comparer le processus d'adhérence des cellules CHO, sur des fragments protéolytiques du fibrinogène, le fragment D, ne présentant que le site dodécapeptide, et le fragment C, ne comprenant que le motif $^{572}\text{RGD}^{574}$, obtenus par digestion ménagée par la plasmine.



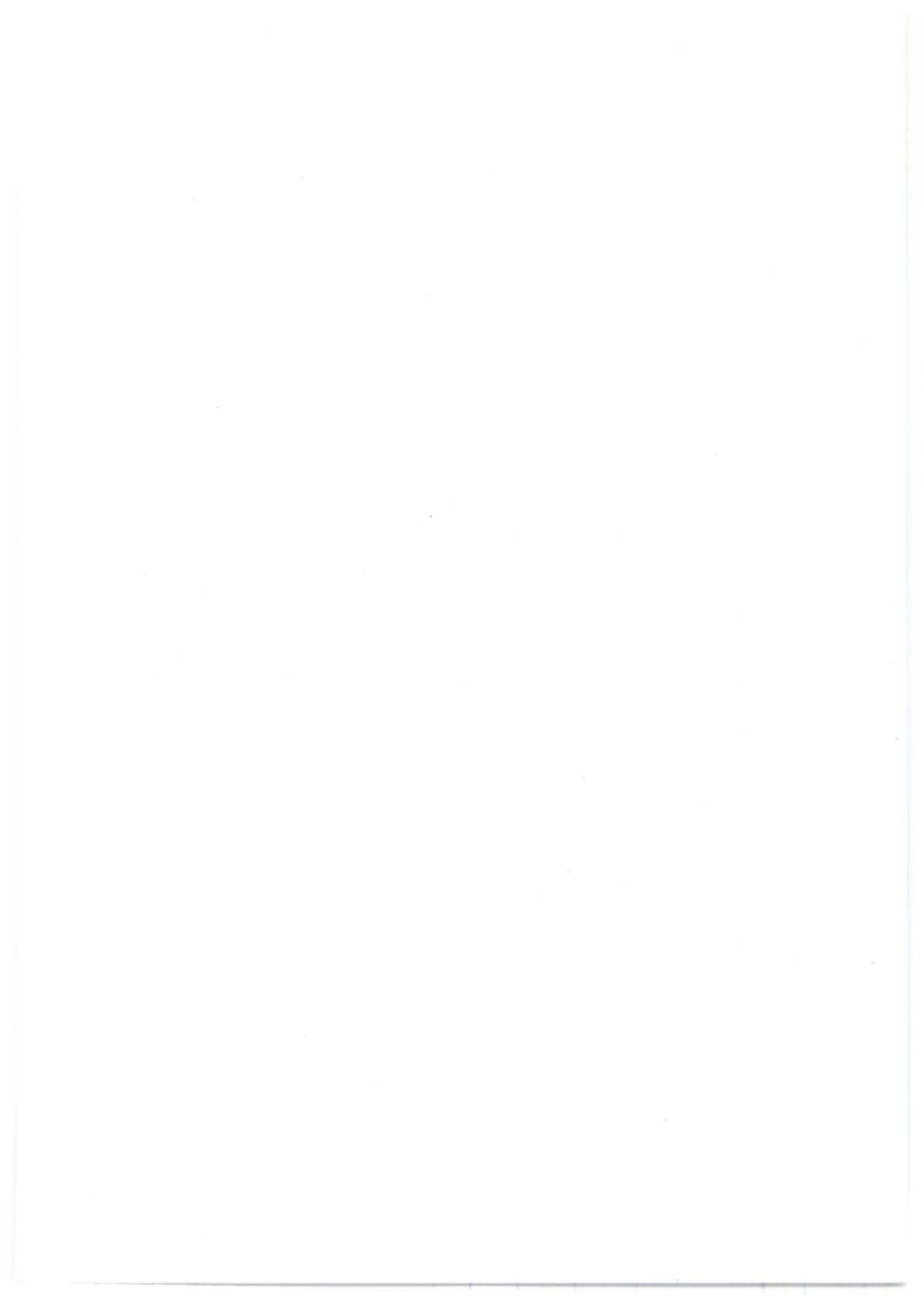
Dans une première partie du projet, nous avons cherché à mieux caractériser le rôle respectif de chacun des 2 sites de reconnaissance du fibrinogène, au cours du processus d'adhérence et d'étalement cellulaire en conditions statiques sur les différents ligands immobilisés, des cellules CHO exprimant l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ sauvage ou mutée.

Ensuite, dans le contexte de la transduction de signaux par le biais des intégrines entre les protéines de la MEC et le cytosquelette, nous nous sommes proposés d'analyser la signalisation intracellulaire induite au cours des étapes de reconnaissance du fibrinogène par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$. Nous nous sommes notamment focalisés sur l'étude du rôle de chacun des 2 sites $^{572}\text{RGD}^{574}$ et dodécapptide du fibrinogène dans l'activation de protéines cytoplasmiques, telles que la FAK, Src ou les protéines de la famille des RhoGTPases (Rac1 et RhoA), primordiales dans la voie de signalisation intracellulaire conduisant à l'étalement cellulaire.

Enfin, en dernier lieu, nous avons participé à un travail sur l'étude de l'influence des conditions de flux au niveau de l'attachement et de l'étalement cellulaires sur fg et FvW immobilisés, de cellules CHO exprimant l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ à l'état de repos ou constitutivement active. Au cours de ce projet, l'objectif a également été de caractériser le rôle joué par les 2 sites $^{572}\text{RGD}^{574}$ et dodécapeptide du fibrinogène dans l'interaction avec l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ en conditions de flux.



RÉSULTATS



CHAPITRE 1

**Un nouveau rôle fonctionnel du motif RGD du fibrinogène
en tant que commutateur moléculaire responsable de l'activation spécifique de
RhoA au cours du processus d'étalement cellulaire médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$**

ARTICLE 1

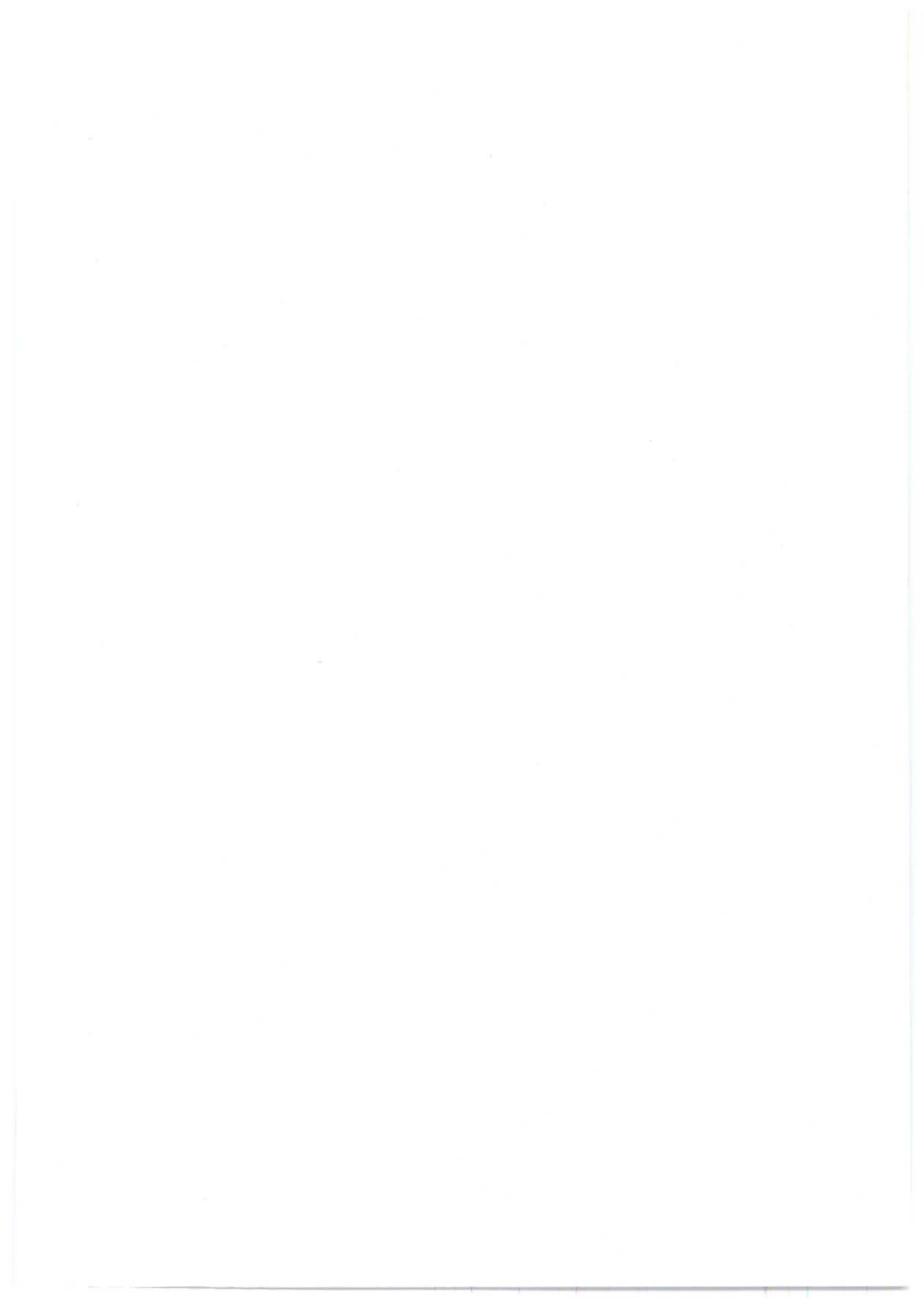
**“ A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch
that selectively triggers integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent RhoA activation
during cell spreading “**

The Journal of Biological Chemistry, 2005
(vol. 280, No. 39, p. 33610-33619)

ARTICLE 2: article de revue

“ RGD, the Rho'd to cell spreading “

European Journal of Cell Biology, 2006
(85, 3-4)



Introduction

L'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ est l'une des plus étudiées en raison de son rôle primordial dans l'hémostase (Kieffer and Phillips, 1990; Phillips et al., 1988; Phillips et al., 1991), mais aussi parce qu'elle fut l'une des premières intégrines découvertes fonctionnant selon un mécanisme allostérique (Bennett and Vilaire, 1979; Jennings and Phillips, 1982). L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ constitue le récepteur plaquettaire du fg par excellence (Bennett, 2001), et interagit avec celui-ci en reconnaissant 2 sites bien caractérisés: une courte séquence linéaire de 3 résidus, Arg-Gly-Asp (⁵⁷²RGD⁵⁷⁴) située au niveau C-terminal de la chaîne A α du fg, et découverte pour la première fois par Pierschbacher et Ruoslahti au niveau de la molécule de fibronectine (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984), et une séquence ⁴⁰⁰HHLGGAKQAGDV⁴¹¹ de 12 résidus appelée dodécapeptide, localisée à l'extrémité C-terminale de la chaîne γ du fg (Kloczewiak et al., 1984).

Initialement, certaines études suggèrent que la reconnaissance de ces 2 sites RGD et dodécapeptide par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ était mutuellement exclusive, c'est-à-dire qu'il n'existait qu'une seule poche de fixation pour le fg, ou deux sites se chevauchant, ou encore que la reconnaissance d'un premier motif du fg induisait des changements conformationnels empêchant l'interaction avec le second motif. En effet, plusieurs études ont montré que des peptides synthétiques correspondant à la séquence RGD (Lam et al., 1987; Parise et al., 1987; Ruoslahti and Pierschbacher, 1987), ou à la séquence dodécapeptide (Kloczewiak et al., 1982; Kloczewiak et al., 1984) inhibent l'interaction du fg avec $\alpha_{IIb}\beta_3$ et l'agrégation plaquettaire (Gartner and Bennett, 1985; Ginsberg et al., 1985; Plow et al., 1985). En outre, Lam et collaborateurs démontrent que le dodécapeptide et le motif RGD ont un effet identique dans le processus de reconnaissance de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, puisque l'interaction $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dodécapeptide au niveau de colonne d'affinité est inhibée par des peptides RGD, et *vice versa* (Lam et al., 1987). L'ensemble de ces résultats laisse donc penser que les 2 sites RGD et dodécapeptide partagent le même site de reconnaissance au niveau de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ces résultats furent même en accord

avec certaines données de la littérature indiquant que la présence d'un résidu acide Asp (D) au niveau des deux sites RGD et KQAGDV pourrait être l'élément commun impliqué dans la reconnaissance de l'unique poche de fixation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Ginsberg et al., 1985), d'autant plus qu'un peptide présentant le motif KGD au lieu de RGD, est également capable d'inhiber la reconnaissance du fg par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Plow et al., 1985; Scarborough et al., 1991; Scarborough et al., 1993).

Cependant, il fut montré plus tard que des peptides marqués contenant soit le motif RGD, soit la séquence dodécapeptide, se fixaient séparément au niveau des 2 sous-unités de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Santoro and Lawing, 1987; D'Souza et al., 1988; D'Souza et al., 1990). De plus, Bennett et collaborateurs montrent que l'incubation de plaquettes avec l'un ou l'autre des 2 peptides inhibent différemment la fixation d'un même anticorps (Bennett et al., 1988). Par la suite, Hu et collaborateurs, par une approche de résonance plasmonique de surface, montrèrent que le complexe $\alpha_{IIb}\beta_3$ possède effectivement deux sites de fixation distincts, un site permettant l'interaction avec le motif RGD, et un second site impliqué dans l'interaction avec le fg (Hu et al., 1999). Un résultat similaire a également été obtenu en utilisant la technique de transfert de fluorescence pour mettre en évidence la fixation simultanée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ de 2 peptides couplés à des fluorochromes distincts, cHarGD-rhodamine (mimétique du dodécapeptide) et cRGD-fluorescéine (Cierniewski et al., 1999). Plus récemment, la résolution de la structure cristalline de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en complexe avec le motif RGD, ainsi que des expériences de mutagenèse des sites potentiellement impliqués dans la reconnaissance du fibrinogène, ont permis de distinguer avec plus de précision les 2 sites d'interaction probables du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Kamata et al., 2001; Xiong et al., 2002; Xiao et al., 2004).

De plus, bien que des peptides RGD aient une plus forte affinité *in vitro* pour $\alpha_{IIb}\beta_3$ que la séquence dodécapeptide, de nombreuses études suggèrent que l'interaction de $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec le fg soluble ou immobilisé, est essentiellement réalisée par la séquence dodécapeptide (Cheresh et al., 1989; Farrell and Thiagarajan, 1994; Farrell et al., 1992; Kloczewiak et al., 1982; Kloczewiak et al., 1983; Savage et al.,

1995; Smith et al., 1990; Zaidi et al., 1996), en accord avec des images de microscopie électronique montrant $\alpha_{11b}\beta_3$ associée avec l'extrémité globulaire du fibrinogène comprenant la séquence dodécapeptide (Weisel et al., 1992) (Figure 22).

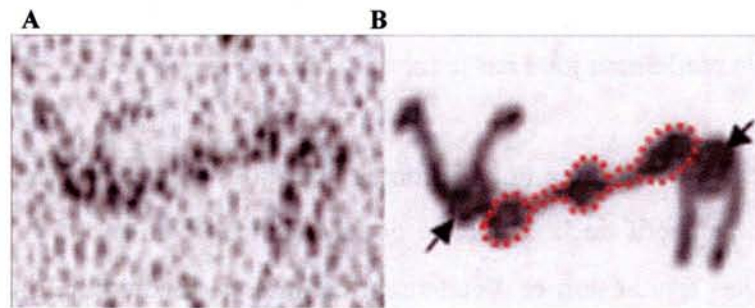


Figure 22 : Interaction de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ avec la séquence dodécapeptide située à l'extrémité C-terminale de la molécule de fibrinogène. A. Microphotographie par microscopie électronique. B. Schématisation de l'interaction. Les flèches montrent la tête globulaire de l'intégrine (D'après Weisel et al., 1992).

Ainsi, Farrell et collaborateurs ont montré que la substitution du motif $^{408}\text{AGDV}^{411}$ de la chaîne γ du fg par la séquence $^{408}\text{VRPEHPAETEYDSLYPEDDL}^{427}$ de la chaîne γ' du fg empêchait le processus d'adhésion et d'agrégation plaquettaire, dû à la disparition du motif $^{408}\text{AGDV}^{411}$, alors que le remplacement de la séquence $^{572}\text{RGDS}^{575}$ par le motif RGDE n'affectaient ni l'adhésion ni l'agrégation plaquettaire (Farrell and Thiagarajan, 1994; Farrell et al., 1992). De façon similaire, le fg délété de la séquence terminale $^{408}\text{AGDV}^{411}$ du dodécapeptide, n'est plus capable de promouvoir l'agrégation plaquettaire *in vitro* (Hettasch et al., 1992; Rooney et al., 1996) et *in vivo* (Holmback et al., 1996). De plus, des peptides contenant la séquence dodécapeptide interagissent avec les résidus 294-314 de la sous-unité α_{11b} , et un peptide correspondant aux résidus 296-306 de α_{11b} interagit directement avec le fg avec pour conséquence l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (D'Souza et al., 1991). Enfin, Cheresh et collaborateurs ont observé que l'adhésion plaquettaire sur fg entier n'était pas affectée par la reconnaissance des motifs RGD du fg par des anticorps monoclonaux (Cheresh et al., 1989). Par contre, l'utilisation d'un anticorps spécifique du motif $^{408}\text{AGDV}^{411}$ est capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire (Liu et al., 1997). A noter également que l'exposition libre du motif $^{408}\text{AGDV}^{411}$ au niveau C-terminal de la chaîne γ , est également primordiale, puisque

la simple substitution des résidus ⁴⁰⁸VRPE⁴¹¹ de la chaîne γ' par le site ⁴⁰⁸AGDV⁴¹¹ ne permet pas l'agrégation des plaquettes (Hettasch et al., 1992). L'ensemble de ces données souligne donc clairement le rôle prédominant du motif dodécapeptide, et en particulier des résidus ⁴⁰⁸AGDV⁴¹¹ au cours des processus d'adhérence cellulaire médiée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et d'agrégation plaquettaire, et soulèvent finalement la question du rôle réellement joué par le motif ⁵⁷²RGD⁵⁷⁴.

Dans cet article, nous nous sommes appliqués à caractériser de façon plus précise le rôle respectif de la séquence dodécapeptide et du motif ⁵⁷²RGD⁵⁷⁴ du fg dans le processus d'adhésion et d'étalement cellulaires, médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, au niveau de plaquettes sanguines humaines et de cellules CHO exprimant l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ humaine recombinante. En outre, nous avons basé notre étude sur l'utilisation de fibrinogène entier et de fragments protéolytiques de fibrinogène (issus d'une digestion ménagée du fg par la plasmine) ne comprenant que le dodécapeptide (fragment D) ou le site ⁵⁷²RGDS⁵⁷⁵ (fragment C) (Article 1, Figure 2).

Les plaquettes sanguines expriment à leur surface les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$. Les deux cytoadhésines partagent la même sous-unité β_3 , et fonctionnent toutes les deux comme récepteur pour le fg moléculaire, si bien que l'étude distincte de la reconnaissance du fg par chacune des 2 intégrines dans les plaquettes est complexe. De ce fait, l'utilisation de cellules CHO n'exprimant pas spontanément les intégrines β_3 , et transfectées uniquement avec l'ADN codant pour les sous-unités α_{IIb} et β_3 de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ humaine a été privilégiée, afin de porter spécifiquement nos investigations sur l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ainsi, nous avons pu transfecter dans ces cellules l'ADN codant pour la sous-unité β_3 sauvage, responsable de l'expression de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à l'état de repos, ou β_3 mutée, conduisant à l'expression d'un récepteur spontanément actif ($\alpha_{IIb}\beta_3$ T₅₆₂N) (Kashiwagi, 1999), ou non-fonctionnel ($\alpha_{IIb}\beta_3$ D₁₁₉Y). Cette mutation D₁₁₉Y, initialement identifiée chez des patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann, est localisée au niveau du site MIDAS de la sous-unité β_3 et empêche toute interaction avec le motif RGD du fg (Loftus et al., 1990). Cependant, comme les cellules CHO expriment constitutivement de façon endogène la sous-unité α_v de hamster, celle-ci peut aussi s'associer à la sous-unité β_3 humaine

et être exprimée à la surface cellulaire. Afin de ne pas prendre en considération cette intégrine $\alpha_v\beta_3$ chimérique, nous avons effectué l'ensemble de notre étude expérimentales en présence d'un inhibiteur d' $\alpha_v\beta_3$.

D'autre part, les cellules CHO constituent également un modèle expérimental intéressant dans le sens où elles sont disponibles au laboratoire, alors que l'obtention de plaquettes implique un don de sang. Enfin, en raison de la facilité de culture des cellules CHO au laboratoire et de la facilité des manipulations génétiques concernant l'expression du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$, les cellules CHO permettent de cibler spécifiquement les voies de signalisation intracellulaires directement induites par la reconnaissance du fg par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. En outre, les cellules CHO présentent un autre avantage par rapport aux plaquettes. Au cours de l'adhésion ou de l'agrégation plaquettaires, les plaquettes libèrent dans le milieu extracellulaire des constituants stockés dans les granules α et les granules denses. Ces molécules sécrétées, telles que le fibrinogène et l'ADP qui active $\alpha_{IIb}\beta_3$, empêchent finalement d'analyser et de distinguer de façon spécifique les effets dus à l'interaction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ active ou inactive, avec les sites $^{572}\text{RGDS}^{575}$ et dodécapeptide des différents fragments protéolytiques du fg. En effet, alors que certains résultats montrent que la reconnaissance du fg par les plaquettes initie la signalisation outside-in, notamment par l'activation des kinases Src et Syk, qui conduisent à la réorganisation du cytosquelette, à la formation des filopodes et donc à un changement de forme des plaquettes (Oberfell et al., 2002; Shattil, 1999; Shattil et al., 1998), la libération de l'ADP qui s'en suit, induit un flux de calcium intracellulaire et la formation de lamellipodes par des voies de signalisation inside-out notamment dépendantes de la PI3K (Heraud et al., 1998). En ce sens, l'utilisation du modèle cellulaire CHO au niveau duquel l'état d'activation est contrôlé, a donc présenté un intérêt particulier dans notre étude fonctionnelle du rôle joué par les deux sous-unités de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ au cours de l'étalement cellulaire sur fibrinogène immobilisé.

ARTICLE 1

**“ A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch
that selectively triggers integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent RhoA activation
during cell spreading “**



A New Functional Role of the Fibrinogen RGD Motif as the Molecular Switch That Selectively Triggers Integrin α IIb β 3-dependent RhoA Activation during Cell Spreading*

Received for publication, January 5, 2005, and in revised form, May 11, 2005. Published, JBC Papers in Press, June 13, 2005, DOI 10.1074/jbc.M500146200

Alexandre Salsmann^{1,2}, Elisabeth Schaffner-Reckinger¹, Fabrice Kabile, Sébastien Plançon, and Nelly Kieffer³

From the Laboratoire de Biologie et Physiologie Intégrée (CNRS/GDRE-ITI), Université du Luxembourg, 162A Avenue de la Faïencerie, L-1511 Luxembourg, Grand-Duchy of Luxembourg

A number of RGD-type integrins rely on a synergistic site in addition to the canonical RGD site for ligand binding and signaling, although it is still unclear whether these two recognition sites function independently, synergistically, or competitively. Experimental evidence has suggested that fibrinogen binding to the RGD-type integrin α IIb β 3 occurs exclusively through the synergistic $\gamma^{400-411}$ sequence, thus questioning the functional role of the RGD recognition site. Here we have investigated the respective role of the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ sequence and the RGD motif in the molecular events leading to ligand-induced α IIb β 3-dependent Chinese hamster ovary (CHO) cell or platelet spreading, by using intact fibrinogen and well characterized plasmin-generated fibrinogen fragments containing either the RGD motif (fragment C) or the $\gamma^{400-411}$ sequence (fragment D), and CHO cells expressing resting wild type (α IIb β 3wt), constitutively active (α IIb β 3T562N), or non-functional (α IIb β 3D119Y) receptors. Our data provide evidence that the $\gamma^{400-411}$ site by itself is able to initiate α IIb β 3 clustering and recruitment of intracellular proteins to early focal complexes, mediating cell attachment, FAK phosphorylation, and Rac1 activation, while the RGD motif subsequently acts as a molecular switch on the β 3 subunit to trigger cell spreading. More importantly, we show that the premier functional role of the RGD site is not to reinforce cell attachment but, rather, to imprint a conformational change on the β 3 subunit leading to maximal RhoA activation and actin cytoskeleton organization in CHO cells as well as in platelets. Finally, α IIb β 3-dependent RhoA stimulation and cell spreading, but not cell attachment, are Src-dependent and phosphoinositide 3-kinase-independent and are inhibited by the Src antagonist PP2.

Plasma fibrinogen is one of the most abundant soluble adhesion molecules present in blood vessels and serves as a ligand to a variety of vascular cells, including platelets, endothelial cells, and monocytes. Fibrinogen is primarily involved in the maintenance of hemostasis by mediating platelet aggregation, clot formation, and wound healing. In

addition, together with thrombin-converted insoluble fibrin, fibrinogen also functions as a component of the extracellular matrix in non-hemostatic normal or pathological processes promoting placenta development, angiogenesis, atherosclerosis, metastasis, as well as a variety of vascular and renal diseases (1). Both fibrinogen and fibrin expose multiple interacting sites that serve as adhesion motifs for vascular cell receptors. Undoubtedly, the first and best characterized of these binding sites are those interacting with the β 3 integrins, the platelet-specific α IIb β 3 fibrinogen receptor (2), and the α v β 3 vitronectin receptor (3).

Human fibrinogen contains three putative β 3 integrin binding sites, two RGD motifs within the A α chain, A α^{95-98} (RGDF) and A $\alpha^{572-575}$ (RGDS) (4), and a non-RGD dodecapeptide sequence in the γ chain (C-terminal $\gamma^{400-411}$) (5). Although fibrinogen binding to α v β 3 relies essentially on the A $\alpha^{572-575}$ RGDS sequence (3), binding to α IIb β 3 involves, in addition to the RGDS site, the non-RGD dodecapeptide $\gamma^{400-411}$ sequence (5). Evidence for the functional importance of these fibrinogen motifs in β 3 integrin ligand binding emerged from biochemical cross-linking and site-directed mutagenesis studies (6), as well as from genetic analysis of naturally occurring α IIb β 3 variants in patients with Glanzmann's thrombasthenia (7), characterized by complete loss of fibrinogen binding due to single point mutations within the β propeller of the α IIb subunit or the A domain of the β 3 subunit, that function as contact sites for the $\gamma^{400-411}$ sequence and the RGD motif, respectively. With the recently published crystal structure of the extracellular domains of α v β 3 (8) and α IIb β 3 (9), the precise contact sites of the RGD motif with the β 3 subunit have been defined with residue Asp ligated to a Mn²⁺ held in the metal ion-dependent adhesion site of the β A domain and stabilized by additional contacts with residues Tyr-122, Arg-214, and Asn-215 of the β A domain.

Despite the higher affinity of the RGDS peptide for α IIb β 3 as compared with the $\gamma^{400-411}$ dodecapeptide, experimental evidence has suggested that neither of the two RGD sequences in fibrinogen significantly contributes to the binding of α IIb β 3 to either surface-bound or soluble fibrinogen (10–12), whereas in contrast, binding of α v β 3 to fibrinogen appears to rely essentially on the A $\alpha^{572-575}$ RGDS sequence (3). Soluble or surface-bound fibrinogen interaction with α IIb β 3 is believed to be mediated primarily by the $\gamma^{400-411}$ sequence (3, 5, 10, 11, 13–16), consistent with electron microscopy images showing α IIb β 3 associated with the distal ends of fibrinogen comprising the $\gamma^{400-411}$ sequence (17). In addition, fibrinogen deleted of the $\gamma^{408-411}$ AGDV terminal sequence on each γ chain produced *in vitro* (18) or in transgenic mice *in vivo* (19) is unable to support platelet aggregation, in contrast to fibrinogen mutated in the A α chain RGD sites that promotes normal platelet aggregation (10). These data highlight the predominant role of the γ chain residues 408–411 in both α IIb β 3-mediated cell adhesion to surface-bound fibrinogen and α IIb β 3-mediated platelet aggregation and

* This work was supported in part by the University of Luxembourg, as well as grants from the Fonds National de la Recherche, Luxembourg, the Fondation "Aide aux Enfants atteints d'un Cancer," Luxembourg and the EC Project HPRN-CT-2002-00253, and accomplished within a CNRS-sponsored European network Groupement de Recherche Européen-Intégrines et Transfert d'Information (GDRE-ITI). Data presented here were obtained by A. S. as part of his doctoral thesis, to be submitted to the University Henry Poincaré, Nancy, France. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Luxembourg.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel: 352-466-644-440; Fax: 352-466-644-442; E-mail: nelly.kieffer@uni.lu.

New Functional Role of the RGD Motif in α IIb β 3 Signaling

question the precise functional role of the $\text{A}\alpha^{572-575}$ RGDS sequence in integrin α IIb β 3-fibrinogen recognition.

Here we have investigated the respective role of the $\gamma^{400-411}$ sequence and the $\text{A}\alpha^{572-575}$ RGDS site in the molecular events leading to α IIb β 3-dependent Chinese hamster ovary (CHO)⁴ cell or platelet spreading. Using intact fibrinogen and well characterized proteolytic fragments containing either the $\gamma^{400-411}$ site (fragment D) or the $\text{A}\alpha^{572-575}$ RGDS site (fragment C) as ligands and platelets as well as CHO cells expressing resting wild type (α IIb β 3wt), constitutively active (α IIb β 3T562N), or non-functional (α IIb β 3D119Y) receptors, we report a new functional role of the RGD motif as a molecular switch that triggers an α IIb β 3-dependent signaling cascade leading to Src-dependent RhoA activation and cell spreading.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and Reagents—The following monoclonal antibodies were generous gifts: the anti- β 3 mAbs P37 (J. Gonzalez-Rodriguez), AP5 (T. J. Kunicki), D3GP3 (L. Jennings), and MA-16N7C2 (M. Hoylaerts); anti- α IIb mAb SZ22 (C. G. Ruan), anti- α IIb β 3 mAb P12-73 (C. Kaplan), anti- α v β 3 mAb 23C6 (M. Horton), anti-fibrinogen $\gamma^{400-411}$ mAb 4A5 (G. Matsueda), and the anti-fibrinogen RGDS antibody 134B29 (Z. Ruggeri). All other monoclonal or polyclonal antibodies were purchased: blocking anti- α v β 3 (LM609) (Chemicon International, Temecula, CA); anti-FAK (C-903) and anti-RhoA (sc-418) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); anti-phosphoFAK (07-012) and anti-Rac1 (23A8) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY); anti- α IIb β 3 (PAC-1) (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-phosphotyrosine (PY-20) and anti-paxillin (P13520) (BD Transduction, Lexington, KY); anti-talin rod domain (TD 77) (Research Diagnostics, Inc., Flanders, NJ); anti-vinculin (VIN-11-5) (Sigma). Wortmannin and prostaglandin E_1 were purchased from Sigma and PP2 and PP3 from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Plasmin-generated fibrinogen fragments D and C, a gift from Dr. D. R. Phillips (COR Therapeutics, South San Francisco, CA), were generated essentially as described by Strickland *et al.* (20), and were purified by conventional size exclusion chromatography.

cDNA Constructs, Transfection, and Cell Culture—The pTG2328- β 3D119Y plasmid was obtained from Dr. F. Lanza. The cDNA construct β 3T562N was generated by PCR mutagenesis using standard procedures and pcDNA3- β 3wt as a template. Expression of wild type, α IIb β 3_{GFP}, α IIb β 3_{GFP}, and other mutant human α IIb β 3 integrins in CHO cells was performed as described previously (21, 22). CHO transfectants were cultured under standard tissue culture conditions in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 10% fetal bovine serum.

Cell Adhesion Assays—Adhesion assays were carried out as described previously (23) with minor modifications. Briefly, for each experiment, 3×10^4 washed cells were preincubated for 30 min at room temperature with or without inhibitors, then added to the ligand-coated wells (20 μ g/ml) and cell adhesion was allowed to occur at 37 °C. At given time points, the cells were microphotographed in the wells without prior washing of the plates or discharge of non-adherent cells. For all α IIb β 3-dependent cell adhesion assays, α v β 3 receptor function was blocked by the addition of 10 μ M of the α v β 3 inhibitor RO65-5233/001 (Roche Applied Science). For cell adhesion inhibition assays, the cells were either preincubated with 10 μ M wortmannin (PI3K inhibitor), 10 μ M PP2 (Src inhibitor), or 10 μ M PP3 (as a negative control for PP2), all dissolved in Me_2SO , or with Me_2SO alone, as a vehicle control (final concentration 0.1%).

⁴ The abbreviations used are: CHO, Chinese hamster ovary; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate; LIBS, ligand-induced binding site; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; mAb, monoclonal antibody; GST, glutathione S-transferase; PBS, phosphate-buffered saline; GFP, green fluorescent protein.

Immunofluorescence Microscopy and Flow Cytometry—Cells adherent on glass coverslips precoated with 20 μ g/ml fibrinogen, fragment D, or fragment C were fixed for 10 min at 4 °C with 3% paraformaldehyde, 2% sucrose in PBS, pH 7.4, rinsed twice with PBS, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS, pH 7.4, containing 0.5% heat-denatured bovine serum albumin. Immunofluorescent staining was performed using specific primary antibodies and a fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). Polymerized actin was stained with tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-phalloidin (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Microphotographs were taken using a Leica DC 300F digital camera and the Leica IM1000 1.20 software. Flow cytometry analysis of antibody binding to CHO transfectants or platelets was performed as previously described (23).

FAK Tyrosine Phosphorylation and GTPase Activity Assays—Petri dishes were coated with 20 μ g/ml of fibrinogen, fragment D, or fragment C, blocked with bovine serum albumin and finally washed twice with serum-free Iscove's modified Dulbecco's medium. CHO cells were either kept in suspension or added to the coated Petri dishes. Following incubation at 37 °C, adherent cells were chilled on ice and lysed *in situ*.

For focal adhesion kinase (FAK) tyrosine phosphorylation assays, cells were lysed in buffer containing 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 20 μ g/ml pepstatin A, 10 μ g/ml aprotinin and leupeptin, 50 μ M 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride. Phosphorylated FAK was detected by immunoblotting of cell lysates with a polyclonal antibody specific for the phosphorylated FAK residue Tyr-397. The blot was then stripped and reprobed with a FAK-specific polyclonal antibody to monitor total FAK loading. Quantification of FAK tyrosine phosphorylation was performed by densitometric scanning of the autoradiograms (HP ScanJet 5p Scanner and QuantiScan software, Biosoft).

Rho family GTPase activity determination was performed as described by Ren *et al.* (24). Briefly, adherent cells were lysed in 500 μ l of lysis buffer containing 25 mM Hepes, pH 7.3, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 4% glycerol, 20 mM β -glycerophosphate, 10 mM NaF, 5 mM dithiothreitol, and a mix of serine and cysteine protease inhibitors (Roche Applied Science), and the cell lysates were incubated for 45 min at 4 °C with glutathione-Sepharose beads coated with 20–30 μ g of bacterially expressed GST-Rhotekin RBD (25) or GST-PAK1B PBD (26) for the pull-down of GTP-bound RhoA or GTP-bound Rac1, respectively. The GST-Rhotekin RBD and GST-PAK1B PBD constructs were obtained from M. A. Schwartz and J. G. Collard, respectively. Bound Rac1-GTP and RhoA-GTP as well as total Rac1 and RhoA (70 μ g of total cell lysate) were analyzed by Western blot using mAb against Rac1 or RhoA. Quantification of GTPase activity was performed by densitometric scanning of the autoradiograms, and the relative RhoA or Rac1 activity was expressed as the percentage of the total amount of RhoA or Rac1 present in whole cell lysates.

Platelet Preparation and Adhesion Assays—Acid-citrate-dextrose-anti-coagulated blood (1:7, v/v) was obtained from healthy donors. After centrifugation at $200 \times g$ for 15 min at room temperature, the platelet-rich plasma was carefully removed, adjusted to pH 6.5 with acid-citrate-dextrose-anti-coagulated blood, and centrifuged at $1200 \times g$ for 15 min at room temperature in the presence of 1 μ M prostaglandin E_1 . Platelets were then gently resuspended and subsequently washed twice in a buffer containing 35 mM citrate acid, pH 6.5, 5 mM glucose, 1 μ M prostaglandin E_1 , 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl.

For adhesion assays, washed resting platelets or platelets stimulated for 20 min at 37 °C with either 0.5 mM MnCl_2 or D3GP3 mAb were

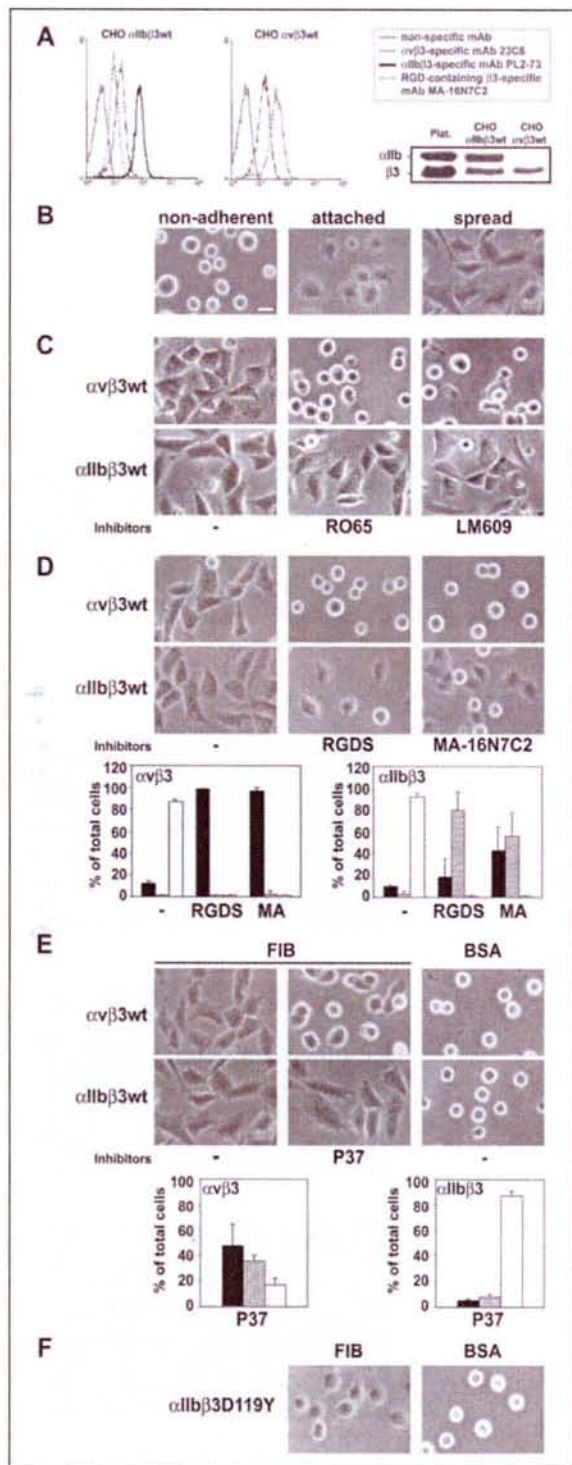
New Functional Role of the RGD Motif in α IIb β 3 Signaling

FIGURE 1. The interaction of Integrin α IIb β 3 with the fibrinogen RGDs motif is necessary for α IIb β 3-dependent CHO cell spreading on fibrinogen. A, similar expression of α IIb β 3 or α V β 3 in two selected CHO cell clones is shown by Western blot and flow cytometry analysis. The flow cytometry histograms depict α IIb β 3 (bold line) and α V β 3 (dotted line) expression and the binding of the RGD-containing β 3-specific mAb MA-16N7C2 (broken line) to CHO α V β 3wt or CHO α IIb β 3wt cells. B, microphotographs of unfixed CHO cell transfectants at various stages of cell adhesion to surface-bound fibrinogen: non-adherent cells are small, round cells with a refringent peripheral rim, attached cells are enlarged, flattened cells devoid of peripheral refringency, and spread cells

resuspended in Iscove's modified Dulbecco's medium and added to ligand-precoated glass coverslips saturated with 1% heat-denatured bovine serum albumin. Platelet adhesion was then allowed to occur at 37 °C and at given time points platelets were fixed for 15 min at 4 °C with 1% paraformaldehyde, 2% sucrose in PBS, pH 7.4. Polymerized actin filaments were visualized by phalloidin staining as described before.

RESULTS

A Two-step Mechanism Underlies α IIb β 3-dependent CHO Cell Spreading on Fibrinogen—Integrins α V β 3 and α IIb β 3 mediate cell adhesion to immobilized fibrinogen through two distinct molecular mechanisms: while α V β 3-dependent cell adhesion to fibrinogen relies essentially on the C-terminal A α ^{572–575} RGDS recognition site in the fibrinogen α chain (15), α IIb β 3-mediated cell adhesion is mediated primarily through the γ chain C-terminal γ ^{400–411} sequence (11, 15). This distinct receptor-ligand interaction could easily be demonstrated in the cell adhesion assay used here by studying the inhibitory effect of the RGDs peptide or various anti- β 3 antibodies on CHO cell clones expressing similar amounts of either α V β 3 or α IIb β 3, as demonstrated by flow cytometry and Western blot analysis (Fig. 1A). The morphology of CHO cells during cell adhesion is shown in Fig. 1B. Non-adherent cells appeared as small round cells with a refringent peripheral rim, whereas attached cells were enlarged, flattened cells with small protrusions that had lost their peripheral refringency, and fully spread cells exhibited a fibroblastoid morphology.

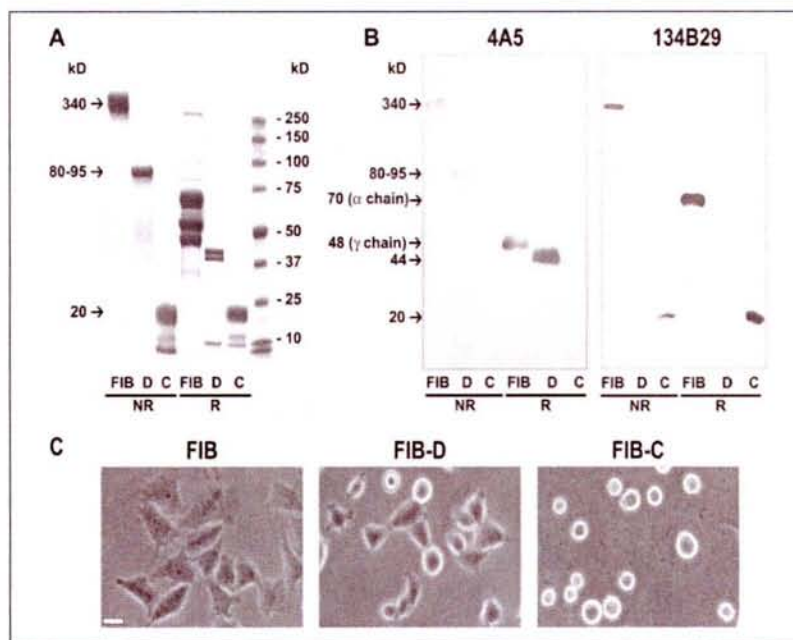
Because of the presence of a chimeric hamster α V/human β 3 integrin in CHO α IIb β 3 cells, control experiments were performed in the presence of 10 μ M RO65-5233/001, a selective inhibitor of α V β 3 and α V β 5 integrins, or in the presence of the α V β 3-blocking antibody LM609. Whereas these inhibitors completely blocked adhesion of CHO α V β 3 cells, they had no effect on CHO α IIb β 3 cell adhesion (Fig. 1C). All subsequent α IIb β 3-dependent adhesion assays were therefore performed in the presence of RO65-5233/001. The effect of the RGDs peptide or the RGD-containing mAb MA-16N7C2 on the cell morphology is shown in Fig. 1D. Pretreatment of the cells with RGDS or MA-16N7C2 totally inhibited CHO α V β 3wt cell spreading as well as cell attachment to intact fibrinogen, whereas these inhibitors prevented essentially CHO α IIb β 3wt cell spreading, but still allowed cell attachment. In addition, α V β 3-dependent cell adhesion was inhibited with antibodies directed against various epitopes of the β 3 subunit, whereas these antibodies did not impair α IIb β 3-mediated cell adhesion to fibrinogen. Shown is a representative result obtained with the anti- β 3 mAb P37, which prevented α V β 3-dependent CHO cell spreading by 80%, but had no major inhibitory effect on α IIb β 3-dependent CHO cell spreading (Fig. 1E).

Loss-of-function point mutations have been identified in the β 3 integrin subunit of Glanzmann's thrombasthenia patients that directly affect the RGD interaction with the β 3 subunit A domain. Among these, the Asp-119 \rightarrow Tyr mutation, which interferes with the β 3 metal ion-dependent adhesion site, completely inhibits fibrinogen-dependent

exhibit a fibroblastoid morphology. The bar equals 20 μ m. C, microphotographs of unfixed CHO α V β 3wt or CHO α IIb β 3wt cells plated for 2 h at 37 °C on fibrinogen in the presence or absence of the α V β 3-selective inhibitor RO65-5233/001 and the α V β 3-blocking antibody LM609. D, effect of the RGDS peptide or the RGD-containing β 3-specific mAb MA-16N7C2 on α V β 3 and α IIb β 3-dependent cell adhesion to fibrinogen. Quantification was performed for each experiment by counting on microphotographs at least 100 cells according to their morphology as non-adherent (black bars), attached (shaded bars), and spread cells (white bars). Results for each cell type were expressed as percentage of the total cell number (100%). Each bar represents the mean \pm S.D. of at least three independent experiments performed in duplicate. E, effect of the anti- β 3 mAb P37 on α V β 3- and α IIb β 3-dependent cell adhesion to fibrinogen. Quantification was performed as described under D. F, CHO α IIb β 3D119Y cells plated on fibrinogen or bovine serum albumin.

New Functional Role of the RGD Motif in α IIb β 3 Signaling

FIGURE 2. CHO α IIb β 3wt cell adhesion to native fibrinogen and plasmin-digested fibrinogen fragments D and C. A, Coomassie-stained SDS-PAGE gel showing intact fibrinogen (340 kDa), the plasmin-generated fibrinogen fragment D (FIB D, 85 kDa) or fragments C (FIB C, 10, 12, and 20 kDa) under non-reducing (NR) or reducing (R) conditions. Under reducing conditions, intact fibrinogen and fragment D are resolved into three different bands corresponding to the α , β , and γ chains of fibrinogen. B, immunoblots performed with the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ motif-specific mAb 4A5 and the anti-fibrinogen RGD5 mAb 134B29, on intact fibrinogen, fragment D, and fragment C under non-reducing (NR) and reducing (R) conditions. C, microphotographs of unfixed CHO α IIb β 3wt cells seeded for 2 h at 37 °C on immobilized fibrinogen, fragment D, or fragment C. The bar equals 20 μ m.



platelet aggregation (27). Here we have tested whether CHO cells expressing this mutant α IIb β 3D119Y receptor with a non-functional RGD recognition site were still able to interact with immobilized fibrinogen. As expected, CHO α IIb β 3D119Y mutants failed to spread on immobilized fibrinogen (28) but underwent attachment, suggesting that the initial step of cell adhesion is unaffected by this mutation and relies on the α Ib subunit interaction with the $\gamma^{400-411}$ sequence (Fig. 1F). These results provide evidence that, in contrast to α v β 3, the α IIb β 3-fibrinogen interaction is a two-step mechanism involving two distinct contact sites in fibrinogen that function independently, the first step mediating cell attachment and relying on the $\gamma^{400-411}$ sequence, and the second step leading to cell spreading, and mediated through RGD recognition.

CHO α IIb β 3wt Cells Plated on Fragment D Are Blocked at the Cell Attachment Stage—Previous studies have shown that resting α IIb β 3 in platelets is able to mediate cell adhesion to intact fibrinogen as well as plasmin-generated fibrinogen fragment D (16, 29). To determine the specific involvement of the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ recognition site in the two-step adhesion process, we have used fibrinogen fragment D, which contains the $\gamma^{400-411}$ site but is devoid of the RGD motifs, and fragment C, which corresponds to the C-terminal part of the fibrinogen α chain and only contains the A $\alpha^{572-575}$ RGDS sequence, as α IIb β 3 ligands (Fig. 2, A and B). When plated on fragment D, CHO α IIb β 3wt cells attached but were unable to spread, in contrast to cells plated on intact fibrinogen. On fragment C, the cells failed to attach and spread, indicating that resting α IIb β 3 expressed in CHO cells is unable to interact with the RGDS site exposed in fragment C in the absence of receptor activation through the α Ib- $\gamma^{400-411}$ interaction (Fig. 2C). A time-course experiment performed over a period of 4 h further showed that the cells plated on fragment D were blocked at this attachment stage (data not shown). These findings support the concept that the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ site in fragment D initiates cell attachment but cannot mediate irreversible cell spreading in the absence of the RGD site.

Attachment of CHO α IIb β 3wt Cells to Fragment D Induces α IIb β 3 Clustering and Recruitment of Intracellular Cytoskeletal and Adaptor Proteins into Focal Complexes—To determine whether CHO α IIb β 3wt

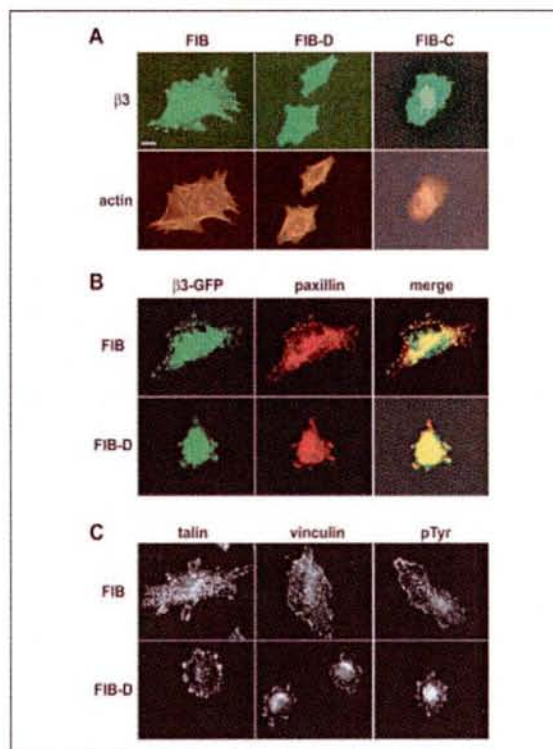
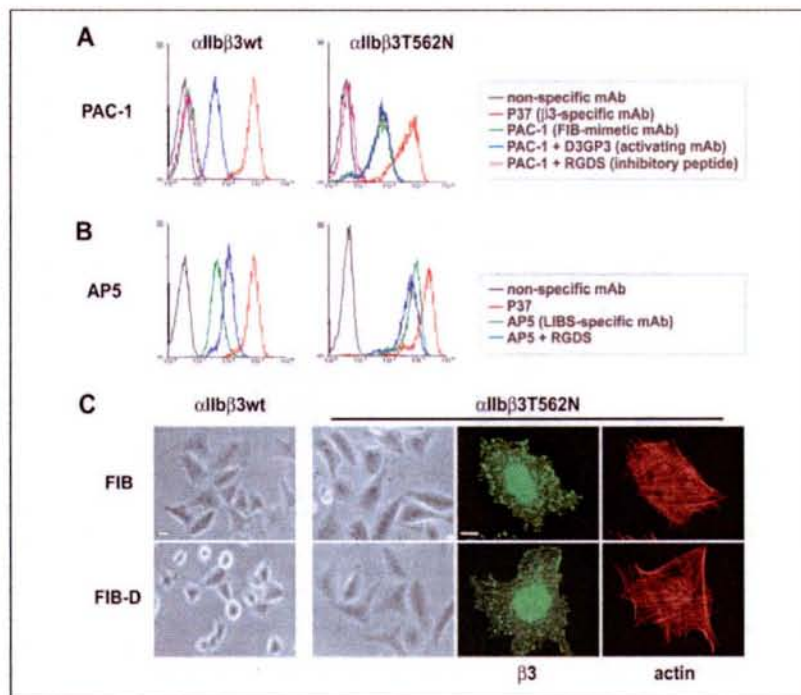


FIGURE 3. α IIb β 3-mediated cell attachment to fragment D induces the formation of α IIb β 3-containing focal complexes. A, immunolocalization of the human β 3 subunit and staining of the actin cytoskeleton in CHO α IIb β 3wt cells plated for 2 h at 37 °C on fibrinogen (FIB), fragment D (FIB-D), or fragment C (FIB-C). The microphotographs show the same cells labeled with the β 3-specific mAb P37 (β 3) and phalloidin to visualize polymerized actin (actin). The bar equals 10 μ m. B, colocalization of autofluorescent α IIb β 3_{CDP} with immunostained paxillin in CHO α IIb β 3_{CDP} cells plated for 2 h at 37 °C on fibrinogen or on fragment D. C, immunolocalization of talin, vinculin, and tyrosine-phosphorylated proteins in CHO α IIb β 3wt cells plated for 2 h at 37 °C on fibrinogen (FIB) or on fragment D (FIB-D), with specific mAbs. Phalloidin was used to visualize polymerized actin.

New Functional Role of the RGD Motif in α IIb β 3 Signaling

FIGURE 4. The constitutively active mutant α IIb β 3T562N mediates cell spreading on fragment D independent of RGD recognition. A, flow cytometry histograms depicting the binding of the ligand-mimetic mAb PAC-1 to CHO α IIb β 3wt or CHO α IIb β 3T562N cells in the absence (green) or in the presence of the activating mAb D3GP3 (blue) or in the presence of 1 mM RGDS used here as an inhibitory peptide (purple). Total β 3 expression was monitored by labeling the cells with the β 3-specific mAb P37 (red), whereas irrelevant mouse IgG was used to monitor nonspecific mAb binding (black). The ordinate depicts the number of cells per channel, and the abscissa depicts the relative fluorescence intensity in arbitrary units (log scale). B, the binding of the LIBS-specific mAb AP5 to CHO α IIb β 3wt or CHO α IIb β 3T562N cells in the presence (blue) or absence (green) of 1 mM RGDS is depicted. C, microphotographs of CHO α IIb β 3wt and CHO α IIb β 3T562N cells plated for 2 h at 37 °C on intact fibrinogen or on fragment D. The bar equals 20 μ m. Immunolocalization of human β 3 and staining of the actin cytoskeleton in CHO α IIb β 3T562N cells plated for 2 h at 37 °C on intact fibrinogen or fragment D. The microphotographs show the same cells labeled with the β 3-specific mAb P37 and phalloidin to visualize actin stress fibers. The bar equals 20 μ m.



cell attachment to fibrinogen fragment D merely corresponded to receptor-ligand interaction or whether this interaction by itself was able to initiate outside-in signaling events leading to α IIb β 3 clustering, we investigated the subcellular localization of α IIb β 3 in cells plated on fragment D or fragment C. Interestingly, in CHO α IIb β 3wt cells attached to fragment D, α IIb β 3 was already well organized in small adhesion contacts at the cell periphery, giving the cells a stellar shape morphology (Fig. 3A). However, these cells were essentially devoid of actin stress fibers and exhibited submembranous actin staining, in contrast to cells plated on intact fibrinogen that displayed a fibroblastoid morphology with well structured stress fibers connected to mature focal adhesions. When plated on fragment C, the diffuse staining of β 3 and the absence of actin filaments confirmed the absence of specific α IIb β 3-dependent adhesion structures in these cells.

We next analyzed recruitment of typical components of focal adhesions to these α IIb β 3-dependent adhesion structures generated on fibrinogen fragment D. To demonstrate that all the immunostained adhesion contacts were also positive for α IIb β 3, we used CHO cells expressing an autofluorescent α IIb β 3_{GFP} or α IIb β 3_{GFP} integrin (22). A perfect colocalization of immunostained paxillin and autofluorescent α IIb β 3_{GFP} is shown in Fig. 3B, demonstrating that on fibrinogen fragment D, only integrin α IIb β 3 is engaged in adhesion structures. An identical result was also obtained with cells expressing α IIb β 3_{GFP} (data not shown). For further experiments, CHO cells expressing wild type α IIb β 3 were used. Interestingly, the cytoskeletal proteins talin and vinculin, as well as tyrosine-phosphorylated proteins were found in these adhesion structures (Fig. 3C). These results suggest that the α IIb- γ ⁴⁰⁰⁻⁴¹¹ interaction induces first wave signaling events leading to integrin clustering and to the recruitment of cytoskeletal, scaffolding, and signaling proteins into adhesion structures that resemble focal complexes (30). However, in the absence of an RGD site, the cells are blocked at this attachment stage, suggesting that a synergistic α IIb β 3-RGD interaction is required to trigger additional signaling events allowing full cell spreading.

The Spontaneously Active α IIb β 3T562N Mutant Mediates CHO Cell Spreading on Fibrinogen Fragment D—Ligand-induced outside-in signaling relies on the long range propagation of conformational changes in the β 3 integrin subunit that are transmitted from the ligand binding pocket to the cytoplasmic tail, necessary for the formation of mature focal adhesions. These ligand-induced conformational changes can be monitored with well characterized monoclonal antibodies, which identify ligand-induced binding site (LIBS) neopeptides (31), exposed on the β 3 integrin subunit following RGD or fibrinogen binding and not present on the unoccupied resting receptor. To determine whether α IIb β 3 outside-in signaling necessary for cell spreading requires a physical interaction of the RGD recognition motif with the β 3 subunit or whether it can be brought about by a conformational change within the β 3 subunit independent of the RGD interaction, we investigated the adhesive properties of CHO cells expressing the constitutively active α IIb β 3T562N receptor (32). As shown in Fig. 4, CHO α IIb β 3T562N cells spontaneously bound the fibrinogen-mimetic mAb PAC-1 and bound the LIBS-specific anti- β 3 antibody AP5 in the absence of ligand stimulation, confirming the constitutive high affinity state of the mutant receptor and the conformational change of the β 3T562N subunit described by Kashiwagi and coworkers (32). An identical result was also obtained with two other anti-LIBS antibodies (data not shown). The most exciting observation, however, was the capacity of CHO α IIb β 3T562N cells to undergo full cell spreading on fibrinogen fragment D with the presence of α IIb β 3-containing focal adhesions and well organized actin stress fibers (Fig. 4C). A similar result was also obtained with CHO α IIb β 3wt cells following activation of α IIb β 3 with the activating mAb D3GP3 or AP5 (data not shown). Because, in the absence of the RGD site, a reinforced adhesion due to the RGD- β 3 interaction and necessary for cell spreading could be excluded, we conclude that the structural change in the β 3T562N subunit mimics the conformational change normally induced following RGD binding to the β 3 subunit and that this conformational change is sufficient to initiate

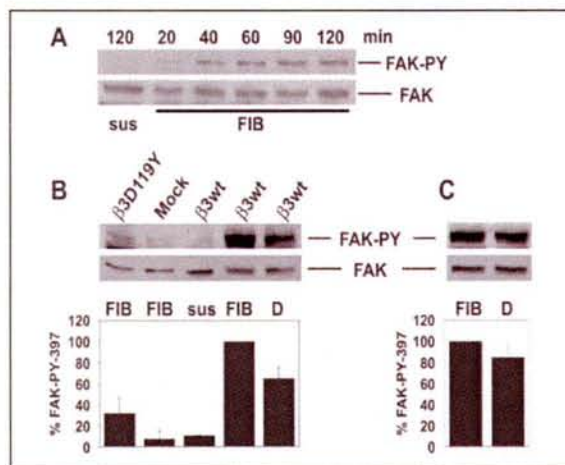
New Functional Role of the RGD Motif in α IIb β 3 Signaling

FIGURE 5. α IIb β 3wt-mediated CHO cell attachment to fragment D triggers FAK tyrosine phosphorylation. *A*, time course of FAK tyrosine phosphorylation during CHO α IIb β 3wt cell adhesion to immobilized fibrinogen. CHO α IIb β 3wt cells kept in suspension for 120 min are shown as a negative control. *B*, analysis of FAK tyrosine phosphorylation in CHO α IIb β 3D119Y cells on fibrinogen and in CHO α IIb β 3wt cells on fibrinogen or on fragment D after a 2-h incubation at 37 °C. CHO α IIb β 3wt cells kept in suspension and mock transfected CHO cells plated on fibrinogen are shown as negative controls. The ratio of phosphorylated versus total FAK for each cell clone was expressed as a percentage of the result obtained for CHO α IIb β 3wt cells plated on intact fibrinogen (100%). Each bar represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. *C*, analysis of FAK tyrosine phosphorylation in CHO α IIb β 3T562N cells plated for 2 h at 37 °C on fibrinogen or fragment D. Quantification was performed as described under *B*, and the result obtained for fragment D was expressed as a percentage of the result obtained for intact fibrinogen (100%). Each bar represents the mean \pm S.D. of three independent experiments.

intracellular signaling events leading to actin stress fiber organization and focal adhesion formation.

α IIb β 3 Clustering upon Cell Attachment to Fragment D Triggers FAK Tyrosine Phosphorylation—To determine the signaling events that occur during α IIb β 3-dependent cell attachment *versus* cell spreading, we investigated FAK tyrosine phosphorylation on residue Tyr-397 during cell adhesion using an anti-phosphoTyr-397 pAb. As shown in Fig. 5A, FAK phosphorylation increased over a time course of 2 h when CHO α IIb β 3wt cells were plated on immobilized fibrinogen, whereas only background FAK tyrosine phosphorylation was observed in CHO α IIb β 3wt cells kept in suspension. We next compared FAK tyrosine phosphorylation in CHO cells expressing α IIb β 3wt, α IIb β 3D119Y, α IIb β 3T562N, or in mock transfected cells. As shown in Fig. 5B, CHO α IIb β 3wt cells plated for 2 h on fragment D triggered FAK tyrosine phosphorylation, corresponding to ~65% of that observed when cells were plated on native fibrinogen. In addition, weak but specific FAK tyrosine phosphorylation could also be observed in CHO α IIb β 3D119Y cells attached to fibrinogen, when compared with mock transfected CHO cells plated on fibrinogen or CHO α IIb β 3wt cells kept in suspension. More importantly, when CHO α IIb β 3T562N cells were tested, the amount of phosphorylated FAK was essentially identical when cells were plated on fragment D or on intact fibrinogen, in line with the immunofluorescence data showing similar receptor clustering in the cells spread on either substrate (Fig. 5C). Altogether, these data provide evidence that clustering of α IIb β 3 upon cell attachment to fragment D is sufficient to trigger significant FAK tyrosine phosphorylation and that, under all experimental conditions investigated, FAK phosphorylation correlated closely with the extent of α IIb β 3 clustering.

RhoA, but Not Rac1 Activation, Is Dependent on the RGD Interaction with the β 3 Subunit—Previous studies have shown that cytoskeletal dynamics correlate closely with RhoA activity, with low levels of RhoA activity observed in cells with small focal complexes at the cell periphery

and devoid of actin stress fibers, in contrast to high levels of RhoA activity in cells exhibiting stress fibers and focal adhesions (24). Likewise, in human platelets RhoA activation following integrin α IIb β 3 engagement leads to actin reorganization (33). Here we have investigated the activity of the small Rho family GTPases Rac1 and RhoA during α IIb β 3-mediated cell adhesion to intact fibrinogen and fragment D. In accordance with data shown by others (24), RhoA activity increased over a time course of 2 h on intact fibrinogen, whereas high levels of Rac1 activity could already be detected at early time points (Fig. 6A). To determine whether maximal RhoA activation relied on a conformational change induced following the RGD interaction with the β 3 subunit, we next compared RhoA and Rac1 activity in CHO α IIb β 3wt or α IIb β 3T562N cells following a 2-h incubation on intact fibrinogen or fragment D. As shown in Fig. 6B, in CHO α IIb β 3wt cells plated on fragment D, the amount of precipitated active RhoA was low as compared with cells plated on intact fibrinogen. More importantly, in CHO α IIb β 3T562N cells, identical amounts of active RhoA were present on either intact fibrinogen or fragment D. On the other hand, Rac1 activity was very similar in CHO α IIb β 3wt cells attached to fragment D or spread on fibrinogen. These results demonstrate that complete RhoA activation requires an interaction of integrin α IIb β 3 with the fibrinogen RGD motif, whereas Rac1 activity is independent of such an interaction and appears to rely solely on the α IIb- γ ^{400–411} recognition. And finally, as expected, the constitutively active mutant α IIb β 3T562N was able to circumvent the requirement for an α IIb β 3-RGD interaction and to trigger maximal RhoA activity on fragment D.

Src, but Not PI3 Kinase, Is Involved in α IIb β 3-dependent Cell Spreading and RhoA Activation on Immobilized Fibrinogen—An important event in α IIb β 3-dependent outside-in signaling is the selective and dynamic recruitment of signaling molecules that ultimately lead to Rho activation and cell spreading. Among these, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (34) as well as tyrosine kinases have been shown to be directly involved (35). Specific tyrosine kinases such as members of the Src family are of particular interest, because they function in proximity of α IIb β 3 by directly interacting with the cytoplasmic tail of the β 3 subunit (36). Here we have used the pharmacological inhibitors wortmannin and PP2 to investigate the potential involvement of PI3K or Src in the α IIb β 3 signaling cascade leading to RhoA activation. As shown in Fig. 7A, α IIb β 3-dependent cell spreading, but not cell attachment, was completely blocked by the Src inhibitor PP2, and not by PP3 used as a negative control for PP2. Interestingly, the PI3K inhibitor wortmannin had no inhibitory effect. This result correlates with the strongly decreased generation of active RhoA in the cells treated with PP2, whereas RhoA activity was similar in the presence or absence of PP3 or wortmannin (Fig. 7, B and C). Surprisingly however, when CHO α IIb β 3T562N cells were tested, complete cell spreading and RhoA activation occurred despite the presence of PP2. These results demonstrate the important role of Src in the signaling cascade downstream of the RGD- β 3 interaction and necessary for RhoA activation. However, they also show that the constitutively active α IIb β 3T562N receptor can initiate cell spreading independent of active Src.

Platelets Are Able to Spread on Fibrinogen Fragment D following Activation by Mn²⁺—Finally, to further assess our concept (a) that the α IIb β 3-fibrinogen interaction is a two-step mechanism and (b) that a physical interaction of the RGD motif with the β 3 subunit, required for RhoA activation and actin stress fiber organization, can be substituted by Mn²⁺ activation of platelet α IIb β 3, we analyzed attachment and spreading as well as actin polymerization in resting and Mn²⁺-activated platelets when plated on either intact fibrinogen or fragment D. As expected, when plated on fragment D, resting platelets attached but failed to spread at early time points, whereas on native fibrinogen plate-

New Functional Role of the RGD Motif in α Ib β 3 Signaling

FIGURE 6. RhoA, but not Rac1, activation is dependent on RGD interaction with the β 3 subunit. A, time course of RhoA or Rac1 activation in CHO α Ib β 3wt cells plated on intact fibrinogen at 37 °C. Each value obtained for RhoA or Rac1 activity was expressed relative to the highest value observed and arbitrarily fixed to 100%. A representative experiment out of three is shown. B, analysis of RhoA or Rac1 activity in CHO α Ib β 3wt or CHO α Ib β 3T562N cells plated on fibrinogen or fragment D after a 2-h incubation at 37 °C. Mock transfected CHO cells incubated on fibrinogen for 2 h were used as a negative control. Each value obtained for RhoA or Rac1 activity was expressed relative to a scale fixed arbitrarily to 1 for mock transfected cells on fibrinogen and to 100 for α Ib β 3 transfected cells on fibrinogen. Each bar represents the mean \pm S.D. of three independent experiments.

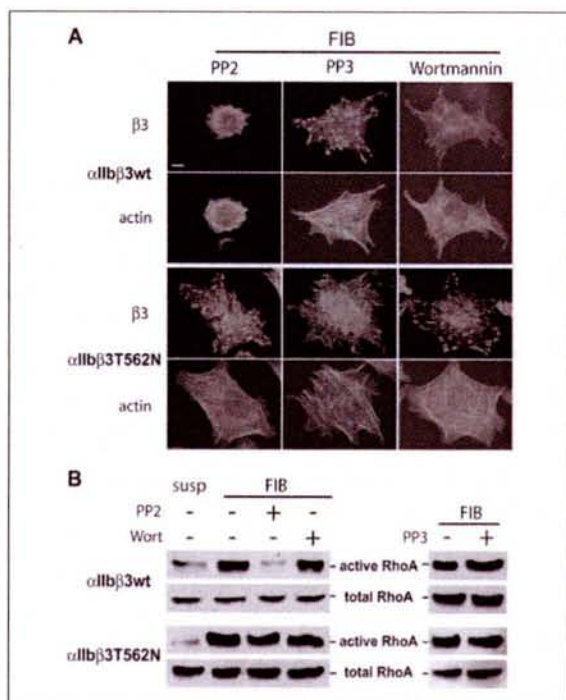
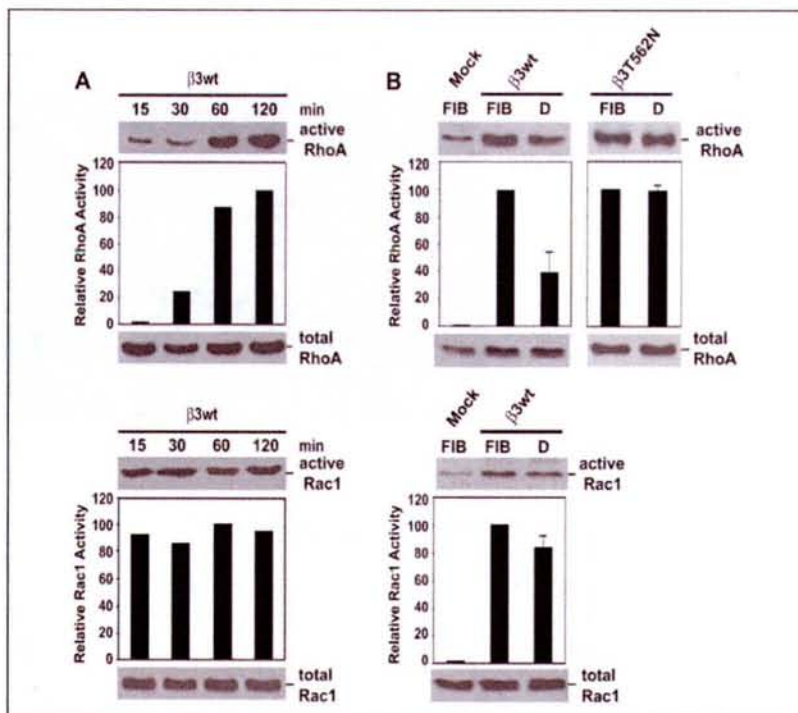


FIGURE 7. Src, but not PI3 kinase, is involved in α Ib β 3-dependent cell spreading and RhoA activation on immobilized fibrinogen. A, immunolocalization of human β 3 and staining of the actin cytoskeleton in CHO α Ib β 3wt and CHO α Ib β 3T562N cells preincubated for 30 min at room temperature with the Src kinase inhibitor PP2 (10 μ M), the negative control PP3 (10 μ M), or the PI3K inhibitor wortmannin (10 μ M) and then plated for 2 h at 37 °C on intact fibrinogen. The bar equals 10 μ m. B, analysis of RhoA activity in CHO α Ib β 3wt or CHO α Ib β 3T562N cells plated on fibrinogen or kept in suspension in the presence or absence of PP2, PP3, or wortmannin.

let spreading was rapid and almost complete after 5 min with platelets exhibiting a complete reorganized actin cytoskeleton (Fig. 8, A and B). At a later time point, however, platelet spreading on fragment D did also occur due to the release of α -granular fibrinogen and dense granule ADP, which has been shown to stimulate phosphatidylinositol 3-kinase independent of α Ib β 3 engagement (37, 38). When Mn^{2+} stimulated platelets were tested, spreading on both native fibrinogen and fragment D occurred at early time points, and this result was also obtained when platelets were treated with the α Ib β 3-activating mAb D3GP3 (data not shown). Fig. 8C shows that platelets stimulated with either Mn^{2+} or D3GP3 bound the fibrinogen-mimetic mAb PAC-1, in contrast to non-stimulated platelets, thus confirming the high affinity state of platelet integrin α Ib β 3 in stimulated platelets. All together, these results, which are in perfect agreement with our data obtained with α Ib β 3-expressing CHO cells, are also in accordance with the previously published data for the role of RhoA in α Ib β 3-dependent signaling following platelet spreading on native fibrinogen (33).

DISCUSSION

We have used intact fibrinogen and well characterized proteolytic fragments of fibrinogen containing either the $\gamma^{400-411}$ site (fragment D) or the $A\alpha^{572-575}$ RGDS site (fragment C) as ligands and platelets as well as CHO cells expressing resting wild type (α Ib β 3wt), constitutively active (α Ib β 3T562N), or non-functional (α Ib β 3D119Y) receptors, to dissect the molecular events leading to α Ib β 3-dependent cell spreading and to further determine the functional role of each of the two fibrinogen binding sites during the adhesive process. Our major findings are as follows: the initial stage of cell attachment appears to rely essentially on the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ sequence interacting with the α Ib integrin subunit, because fibrinogen fragment D, devoid of the RGD recognition sites, is able to support α Ib β 3-dependent cell attachment. This $\gamma^{400-411}$ - α Ib interaction generates preliminary signaling events, which

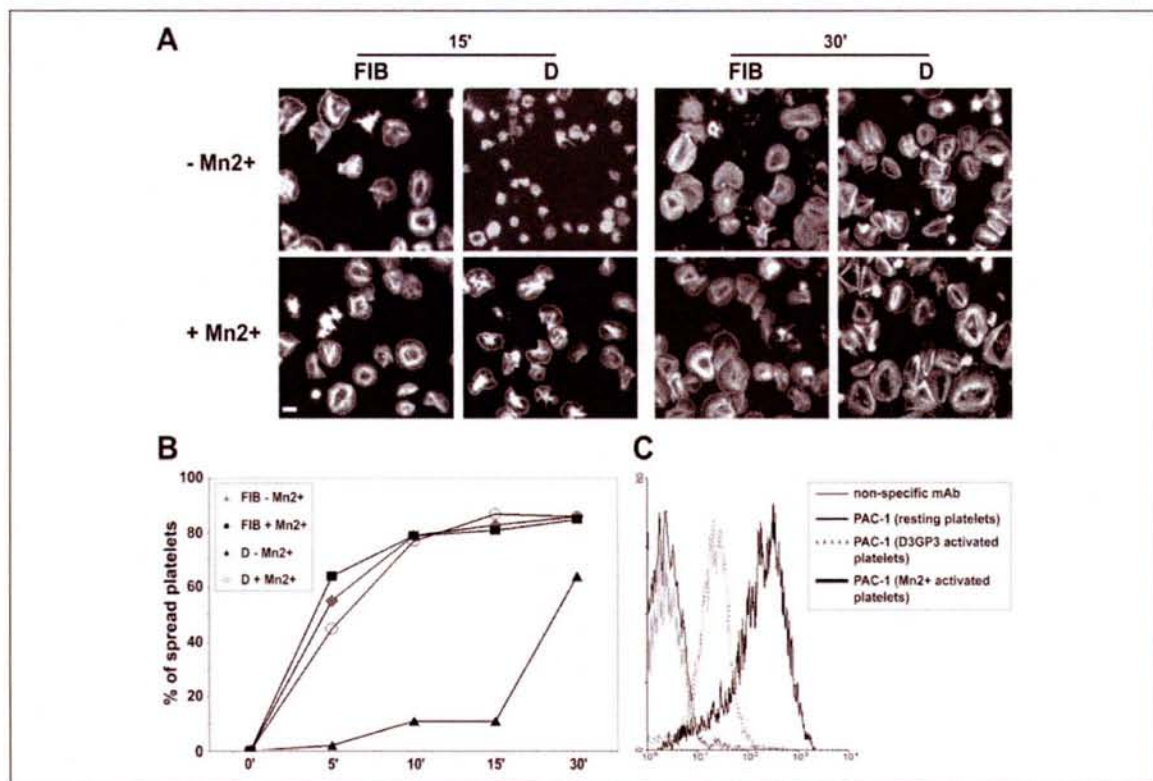
New Functional Role of the RGD Motif in α IIb β 3 Signaling

FIGURE 8. Mn^{2+} activation-dependent spreading of platelets on fibrinogen fragment D. A, washed, Mn^{2+} -activated or resting platelets were resuspended in Iscove's modified Dulbecco's medium and incubated at 37 °C for the indicated time points on coverslips precoated with native fibrinogen or fragment D. Actin reorganization was monitored following rhodamine phalloidin staining of the fixed platelets. The bar on the microphotograph equals 5 μ m. B, quantification of attached versus spread platelets on fibrinogen or fragment D was performed on microphotographs according to their morphology, and the result is expressed as the percentage of the total platelet number (100%). C, flow cytometry histograms depicting the binding of the ligand-mimetic mAb PAC-1 to resting platelets in the presence of 1 μ M prostaglandin E₁ (thin black line) or to platelets following activation with mAb D3GP3 (dotted line) or 0.5 mM Mn^{2+} (bold line).

lead to clustering of α IIb β 3 in early focal complexes, FAK tyrosine phosphorylation, as well as Rac1 activation. In the absence of the RGD binding site, α IIb β 3-mediated cell adhesion is blocked at this cell attachment stage and cannot proceed further, suggesting the requirement for a second signaling event promoting cell spreading. This second signaling event is generated through the subsequent RGDS- β 3 interaction, which relies on receptor activation necessary for fibrinogen RGD recognition. Finally, the observation that the constitutively active α IIb β 3T562N receptor, which spontaneously exposes a β 3 conformation normally induced following RGD binding, is able to mediate complete cell spreading on fibrinogen fragment D, suggests that the premier functional role of the RGD- α IIb β 3 interaction is to imprint a conformational change on the β 3 integrin subunit, necessary to initiate second wave intracellular signaling events, such as maximal RhoA activation, required for cell spreading. Finally, we show that these second wave intracellular signaling events are Src-dependent but PI3 kinase-independent. The results reported here thus support a two-step adhesion mechanism responsible for α IIb β 3-dependent cell spreading on surface-bound fibrinogen and provide evidence for a sequential interaction of the $\gamma^{400-411}$ site and the $A\alpha^{572-575}$ RGDS site with α IIb β 3 that act synergistically to promote cell spreading. Our results are in good agreement with the recently published crystal structure of α IIb β 3 (9), which clearly highlights two distinct contact sites for fibrinogen binding, the specificity determining loop of the β 3 I domain that interacts with the RGD sequence, and the α IIb cap subdomain comprising four insertions in the β -propeller, which is necessary for macromolecular recognition of fibrinogen.

The role of the α IIb-fibrinogen $\gamma^{400-411}$ interaction in mediating α IIb β 3-dependent platelet adhesion to intact fibrinogen and to fragment D has been reported by several authors (16, 39). Here we show for the first time that CHO α IIb β 3wt cells attached to fibrinogen fragment D exhibit numerous short protrusions with discrete α IIb β 3 clusters at the tips of the protrusions and colocalization of major cytoskeletal, adaptor, and signaling proteins such as talin, vinculin, or paxillin. These β 3 clusters, which also contain tyrosine-phosphorylated proteins, are similar to focal complexes previously described (30). Our data thus provide evidence that the initial α IIb-fibrinogen γ chain interaction induces intracellular signaling events, independent of RGD-mediated signaling. It has to be emphasized that these results could only be observed in a cell adhesion assay devoid of washing steps. Indeed, the rather loose and reversible cell attachment mediated through the α IIb- $\gamma^{400-411}$ interaction was disrupted in standard cell adhesion assays including washing steps (16).

Integrin α IIb β 3 is an allosteric receptor that can switch from a resting to an active ligand binding receptor (40). In platelets, resting α IIb β 3 interacts with immobilized fibrinogen (29, 41), whereas activation of α IIb β 3 is required for interaction with soluble fibrinogen (42, 43). We and others have previously shown that resting α IIb β 3 in platelets or CHO cells promotes cell adhesion to native fibrinogen and to fibrinogen fragment D, provided that the $\gamma^{400-411}$ sequence is available for interaction (16, 44). These data underscore the synergistic role of the $\gamma^{400-411}$ site in the activation process of integrin α IIb β 3, necessary for fibrinogen RGD recognition. Indeed, based on data showing that binding of a high affinity cyclic $\gamma^{400-411}$ site analog to integrin α IIb β 3 results

New Functional Role of the RGD Motif in α IIb β 3 Signaling

in increased LIBS1 antibody binding to the β 3 subunit (45), we conclude that the α IIb- $\gamma^{400-411}$ interaction most likely induces in *trans* conformational changes within the β 3 subunit, allowing its high affinity interaction with the fibrinogen RGD site. Furthermore, biochemical studies have suggested that the RGD binding site becomes more accessible upon receptor activation (46).

The most exciting result, however, concerns integrin α IIb β 3T562N-mediated cell spreading on fibrinogen fragment D, devoid of the RGD recognition site. Because it is commonly accepted that both the synergistic site and the RGD site are necessary for integrin-dependent anchorage of cells to RGD ligands, our results provide evidence that irreversible α IIb β 3-dependent cell spreading can be achieved in the absence of the RGD site, provided that α IIb β 3 is in the active state and has undergone an additional conformational change. As previously reported, introduction of the T562N mutation into the β 3 subunit induces spontaneous PAC-1 binding as well as constitutive exposure of LIBS neopeptides normally only exposed following RGD binding. By mediating CHO cell spreading on fragment D, the α IIb β 3T562N receptor circumvented the requirement for a β 3-RGDS interaction, suggesting that the conformational change introduced into the β 3 subunit by the T562N mutation most probably mimicked the conformational change normally imprinted on β 3 following RGDS binding, and required for the initiation of the second wave of signaling events responsible for stress fiber organization and focal adhesions formation.

By using platelets as a more physiological cell model relevant to hemostasis and thrombosis, we have been able to confirm the data observed with CHO transfectants. Indeed, resting platelets attached but did not spread onto fibrinogen fragment D, at an early time point, whereas antibody or Mn^{2+} activation of α IIb β 3 was sufficient to induce platelet spreading and actin reorganization. However, these results could only be observed at early time points, because the obvious platelet release of dense and α -granule constituents such as ADP and fibrinogen circumvented the signaling events initiated through α IIb β 3-fibrinogen fragment D interaction.

The CHO cell model used here thus provides an excellent tool to precisely dissect the signaling events that specifically occur during α IIb β 3-mediated cell attachment and cell spreading. Using FAK tyrosine phosphorylation assays as well as intracellular immunofluorescence labeling of phospho-FAK (data not shown), we provide evidence that FAK phosphorylation on residue Tyr-397 already occurred in the early focal complexes observed in α IIb β 3wt-expressing CHO cells attached to fragment D. These data indicate that integrin clustering is sufficient to mediate the recruitment of FAK, allowing phosphorylation of residue Tyr-397 in FAK by a transautophosphorylation mechanism, necessary for the recruitment of Src family tyrosine kinases (47, 48) and other signaling and cytoskeletal molecules. Full FAK Tyr-397 autophosphorylation was observed when cells were spread on intact fibrinogen. Thus, FAK tyrosine autophosphorylation correlated with integrin clustering, in agreement with our earlier results showing a strong correlation between the extent of mutant β 3 clustering and the level of β 3-triggered FAK tyrosine phosphorylation (21).

Integrin-dependent rearrangement of the cytoskeleton is highly influenced by the activity of the Rho family GTPases RhoA, Rac1, and Cdc42 (49). For example, RhoA promotes the formation of actin stress fibers and focal adhesions, whereas Rac1 promotes the formation of lamellipodia and membrane ruffling, and Cdc42 causes actin microspike formation and filopodia development. In contrast to Cdc42 and Rac1, the regulation of RhoA during cell adhesion is biphasic with a rapid and transient inhibition of RhoA activity upon integrin engagement, followed by a subsequent reactivation leading to the assembly of contractile actin-myosin filaments (stress fibers) associated with

mature focal adhesions (24). Although the mechanisms linking integrins to the regulation of RhoA are still not fully understood, it has been shown that the extracellular domain of the integrin β subunits is critical in stimulating RhoA activity (50, 51). In human platelets, evidence has been provided that RhoA is not required for the adhesion of resting platelets (33) but plays an important role in regulating the stability of integrin α IIb β 3 adhesion contacts under high shear stress (52). Here we show for the first time that the RGD- β 3 interaction functions as a molecular switch and triggers maximal RhoA activation, most likely by imprinting a conformational change on the β 3 integrin subunit, whereas the α IIb- $\gamma^{400-411}$ interaction mainly induces Rac1 activation. Our results further demonstrate that the signaling cascade initiated through the RGD- β 3 subunit interaction and leading to RhoA activation and cell spreading is dependent on active Src, but not PI3K, suggesting an important role of Src in the downstream activation of RhoA. These results are in line with the recent data reported by the group of Shattil, showing that Src activation occurs through its direct binding to the C-terminal part of the cytoplasmic tail of the β 3 subunit of α IIb β 3 and thus becomes a major regulator of integrin-dependent outside-in signaling (36, 53, 54). Because Src is also a known regulator of the downstream guanine nucleotide exchange factors (GEFs) of Rho, such as Vav GEFs that regulate RhoA (55), Src signaling appears to link integrins to RhoA, as shown here with the Src inhibitor PP2, which strongly reduced the generation of active RhoA in CHO α IIb β 3 cells seeded on intact fibrinogen.

Finally, based on our data, we suggest that the two-step mechanism described here for α IIb β 3-mediated cell adhesion to fibrinogen could serve as a general model applicable to RGD-type integrins that rely on a synergistic site for full receptor function: one apparent function of the synergistic site would be to allow RGD-type integrins to bind a ligand preferentially over other RGD-containing proteins (56–58) and to mediate ligand-specific attachment resulting in the activation of the receptor necessary for subsequent RGD recognition. The major functional role of the RGD site would be to initiate additional outside-in signaling events necessary for full cell spreading.

Acknowledgments—We thank Dr. D. R. Phillips for the generous gift of plasmin-generated fibrinogen fragments; Drs. J. Gonzalez-Rodriguez, M. Horton, M. Hoylaerts, L. Jennings, C. Kaplan, T. J. Kunicki, G. Matsueda, C. G. Ruan, and Z. Ruggeri for monoclonal antibodies; Drs. J. G. Collard and M. A. Schwartz for providing the GST-PAK1B PBD and GST-Rhotekin RBD plasmid constructs; Dr. F. Lanza for the pTG2328- β 3D119Y plasmid; and Dr. S. Reigner for the α v β 3 inhibitor RO65-5233/001. We are indebted to Dr. M. Aumailley and G. Chometon for their precious help with Rho family GTPase activity assays. We are also grateful to the staff of the clinical laboratory of the Centre Hospitalier of Luxembourg for their help in collecting fresh blood samples for platelet isolation.

REFERENCES

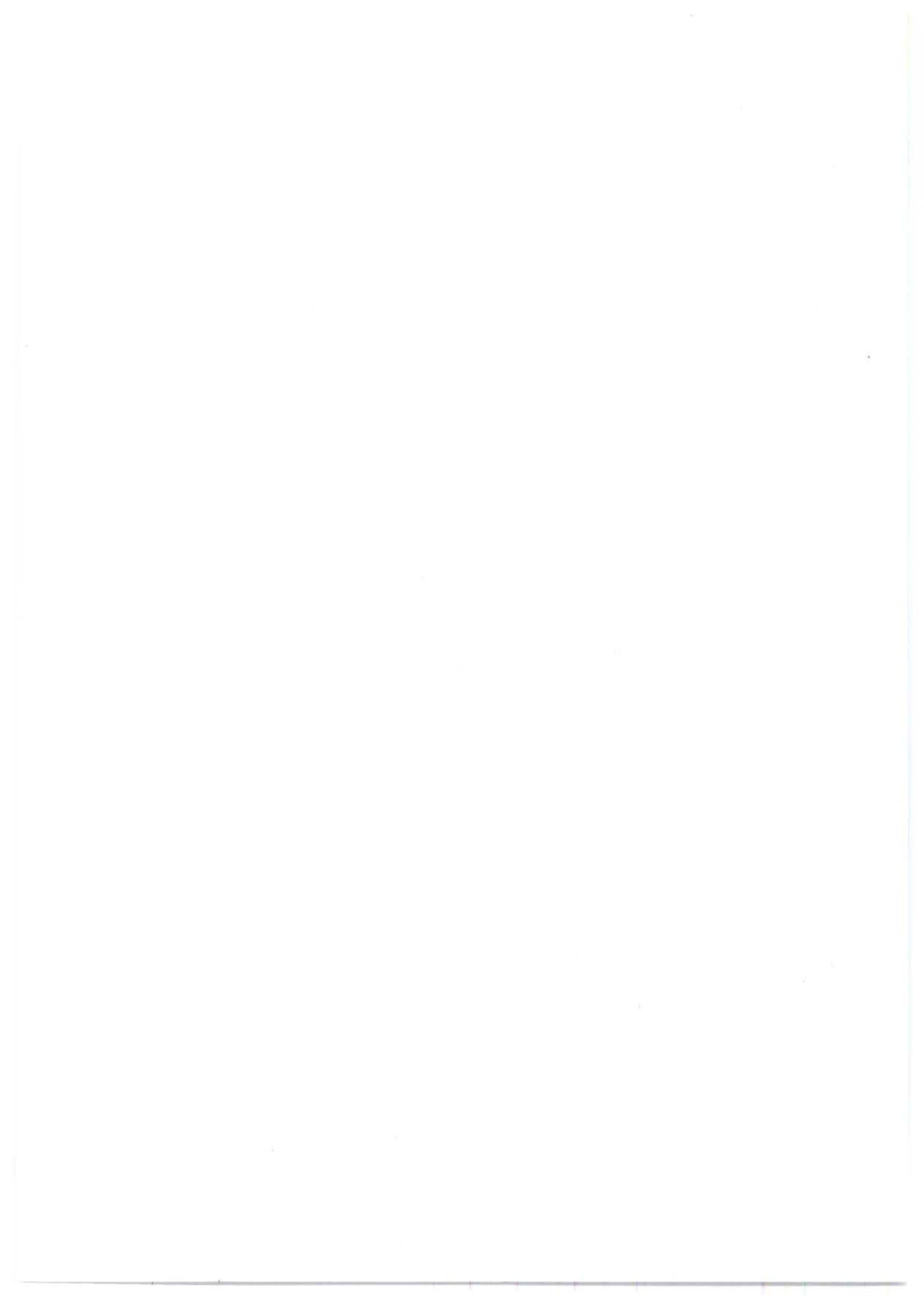
- Bini, A., Haidaris, P., and Kudryk, B. J. (2000) in *Encyclopedic Reference of Vascular Biology and Pathology* (Bikfalvi, A., ed) pp. 107–125. Springer Verlag, New York
- Bennett, J. S. (2001) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**, 340–354
- Smith, J. W., Ruggeri, Z. M., Kunicki, T. J., and Cheresh, D. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12267–12271
- Doolittle, R. F., Watt, K. W. K., Cottrell, B. A., Strong, D. D., and Riley, M. (1979) *Nature* **280**, 464–467
- Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T. J., and Hawiger, J. (1984) *Biochemistry* **23**, 1767–1774
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 21785–21788
- French, D. L., and Seligsohn, U. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 607–610
- Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., and Arnout, M. A. (2002) *Science* **296**, 151–155
- Xiao, T., Takagi, J., Collier, B. S., Wang, J. H., and Springer, T. A. (2004) *Nature* **432**, 59–67

New Functional Role of the RGD Motif in α IIb β 3 Signaling

10. Farrell, D. H., Thiagarajan, P., Chung, D. W., and Davie, E. W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10729–10732
11. Farrell, D. H., and Thiagarajan, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 226–231
12. Zaidi, T. N., McIntire, L. V., Farrell, D. H., and Thiagarajan, P. (1996) *Blood* **88**, 2967–2972
13. Kloczewiak, M., Timmons, S., and Hawiger, J. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **107**, 181–187
14. Kloczewiak, M., Timmons, S., and Hawiger, J. (1983) *Thromb. Res.* **29**, 249–255
15. Cheresch, D. A., Berliner, S. A., Vicente, V., and Ruggeri, Z. M. (1989) *Cell* **58**, 945–953
16. Savage, B., Bottini, E., and Ruggeri, Z. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 28812–28817
17. Weisel, J. W., Nagaswami, C., Vilaire, G., and Bennett, J. S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16637–16643
18. Rooney, M. M., Parise, L. V., and Lord, S. T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8553–8555
19. Holmback, K., Danton, M. J., Suh, T. T., Daugherty, C. C., and Degen, J. L. (1996) *EMBO J.* **15**, 5760–5771
20. Strickland, D. K., Morris, J. P., and Casellino, F. J. (1982) *Biochemistry* **21**, 721–728
21. Schaffner-Reckinger, E., Gouon, V., Mekchior, C., Plançon, S., and Kieffer, N. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 12623–12632
22. Plançon, S., Morel-Kopp, M., Schaffner-Reckinger, E., Chen, P., and Kieffer, N. (2001) *Biochem. J.* **357**, 529–536
23. Chen, P., Mekchior, C., Brons, N. H., Schlegel, N., Caen, I., and Kieffer, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 38628–38635
24. Ren, X.-D., Kiessens, W. B., and Schwartz, M. A. (1999) *EMBO J.* **18**, 578–585
25. Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., and Narumiya, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13556–13560
26. Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., and Collard, J. G. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 1385–1398
27. Loftus, J. C., O'Toole, T. E., Plow, E. F., Glass, A., Frelinger III, A. L., and Ginsberg, M. H. (1990) *Science* **249**, 915–918
28. Bajt, M. L., and Loftus, J. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20913–20919
29. Savage, B., and Ruggeri, Z. M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11227–11233
30. Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) *Cell* **81**, 53–62
31. Frelinger, A. L., Lam, S. C., Plow, E. F., Smith, M. A., Loftus, J. C., and Ginsberg, M. H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 12397–12402
32. Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Tadokoro, S., Honda, S., Shiraga, M., Mizutani, H., Handa, M., Kurata, Y., Matsuzawa, Y., and Shattil, S. J. (1999) *Blood* **93**, 2559–2568
33. Leng, L., Kashiwagi, H., Ren, X.-D., and Shattil, S. J. (1998) *Blood* **91**, 4206–4215
34. Payrastre, B., Missy, K., Trumel, C., Bodin, S., Plantavid, M., and Chap, H. (2000) *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1069–1074
35. Parsons, J. T. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 146–152
36. Arias-Salgado, E., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J., Ginsberg, M., and Shattil, S. J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13298–13302
37. Gironcel, D., Racaud-Sultan, C., Payrastre, B., Haricot, M., Borchert, G., Kieffer, N., Breton, M., and Chap, H. (1996) *FEBS Lett.* **389**, 253–256
38. Haimovich, B., Lipfert, L., Brugge, J. S., and Shattil, S. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15868–15877
39. Gartner, T. K., Amrani, D. L., Derrick, J. M., Kirschbaum, N. E., Matsueda, G. R., and Taylor, D. B. (1993) *Thromb. Res.* **71**, 47–60
40. Shattil, S. J., Hoxie, J. A., Cunningham, M., and Brass, L. F. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11107–11114
41. Kieffer, N., Fitzgerald, L. A., Wolf, D., Cheresch, D. A., and Phillips, D. R. (1991) *J. Cell Biol.* **113**, 451–461
42. Marguerie, G. A., Plow, E. F., and Edgington, T. S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5357–5363
43. Bennett, J. S., and Vilaire, G. (1979) *J. Clin. Invest.* **64**, 1393–1401
44. Kieffer, N., and Matsueda, G. R. (1991) *Blood* **78**, 281a
45. Ciernewski, C. S., Byzova, T., Papierak, M., Haas, T. A., Niewiarowska, J., Zhang, L., Cieslak, M., and Plow, E. F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16923–16932
46. Yan, B., and Smith, J. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 39964–39972
47. Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R., and Parsons, J. T. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14**, 1680–1688
48. Cobb, B. S., Schaller, M. D., Leu, T. H., and Parsons, J. T. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14**, 147–155
49. Hall, A. (1998) *Science* **279**, 509–514
50. Miao, H., Li, S., Hu, Y.-L., Yuan, S., Zhao, Y., Chen, B. P. C., Puzon-McLaughlin, W., Tarui, T., Shyy, J. Y.-J., Takada, Y., Usami, S., and Chien, S. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 2199–2206
51. Danen, E. H. J., Sonneveld, P., Brakebusch, C., Fässler, R., and Sonnenberg, A. (2002) *J. Cell Biol.* **159**, 1071–1086
52. Schoenwaelder, S. M., Hughan, S. C., Boniface, K., Fernando, S., Holdsworth, M., Thompson, P. E., Salem, H. H., and Jackson, S. P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 14738–14746
53. Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceno, C., Moores, S., Brugge, J., Lowell, C., and Shattil, S. (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 265–275
54. De Virgilio, M., Kiesses, W., and Shattil, S. (2004) *J. Cell Biol.* **165**, 305–311
55. Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S. (2004) *Cellular Signaling* **16**, 1–11
56. Corbett, S. A., and Schwarzbauer, J. E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20943–20948
57. Danen, E. H. J., Aota, S., van Kraats, A. A., Yamada, K. M., Ruiters, D. J., and van Muijen, G. N. P. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21612–21618
58. Sechler, J. L., Corbett, S. A., and Schwarzbauer, J. E. (1997) *Mol. Biol. Cell* **8**, 2563–2573

ARTICLE 2: article de revue

“ RGD, the Rho'd to cell spreading “



ARTICLE IN PRESS



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

European Journal of Cell Biology ■ (■■■■) ■■■–■■■

**European Journal
of Cell Biology**
www.elsevier.de/ejcb

REVIEW

RGD, the Rho'd to cell spreading

Alexandre Salsmann, Elisabeth Schaffner-Reckinger, Nelly Kieffer*

Laboratoire de Biologie et Physiologie Intégrée, (CNRS/GDRE-ITI), Université du Luxembourg, 162A, Avenue de la Faïencerie, L-1511 Luxembourg
Abstract

Some RGD-type integrins rely on a synergistic site in addition to the canonical RGD site for ligand binding. However, the precise involvement of each of these recognition sites during cell adhesion is still unclear. Here we review recent investigations on integrin α IIb β 3-mediated cell adhesion to immobilized fibrinogen providing evidence that the fibrinogen synergy $\gamma^{400-411}$ sequence by itself promotes cell attachment by initiating α IIb β 3 clustering and recruitment of intracellular proteins to focal complexes, while the RGD motif subsequently acts as a molecular switch on the β 3 subunit to induce a conformational change necessary for RhoA activation and full cell spreading.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Integrin α IIb β 3; Fibronectin binding; RGD motif; Synergy site; Rho A activation

Contents

Introduction	1
Involvement of the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ sequence and the $A\alpha^{572-575}$ RGDS site in integrin α IIb β 3-mediated cell adhesion	2
Summary	5
Acknowledgments	5
References	5

Introduction

About 20 years ago, Ruoslahti and collaborators identified the tripeptide Arg–Gly–Asp within the fibronectin molecule as the minimal amino acid sequence promoting cell adhesion (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984). With the subsequent identification of the integrin gene family of cell surface receptors mediating cell adhesion through binding to the RGD motif, an evolutionary conserved recognition system was unraveled with profound implications on cell behavior and

cell function (Ruoslahti, 1996). Today, however, it is known that the molecular mechanisms of integrin-dependent cell adhesion are far more complex, since only about one-third of the 25 integrin family members identified are RGD-type integrins. Of these, some have been shown to rely on an auxiliary binding site in addition to the canonical RGD site for ligand recognition. So far, it is still unclear whether these two recognition sites function independently, synergistically or competitively.

The best characterized integrin receptors that rely on an auxiliary recognition site are the fibronectin receptors α 5 β 1 and α 4 β 1. Besides the RGD site present in the fibronectin FN III-10 module, which binds to the β 1

*Corresponding author. Tel.: +352 4 6664 4440;

fax: +352 4 6664 4442.

 E-mail address: nelly.kieffer@uni.lu (N. Kieffer).

ARTICLE IN PRESS

2

A. Salsmann et al. / European Journal of Cell Biology ■ (■■■■) ■■■–■■■

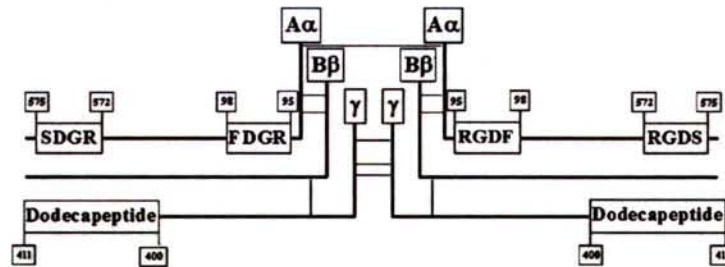


Fig. 1. Structure of the fibrinogen molecule. The two $A\alpha$ chain RGD motifs and the $\gamma^{400-411}$ dodecapeptide sequence are shown. Interchain connections represent the disulfide bonds.

subunit, integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ rely on additional binding motifs, the synergy site PHSRN within the FN III-9 module for $\alpha 5$ (Aota et al., 1994; Obara et al., 1988), and the IIICS domain for $\alpha 4$ (Guan and Hynes, 1990; Mould and Humphries, 1991). A further level of complexity comes from the fact that the ligand binding mechanism of one and the same integrin can vary according to the interacting ligand. Indeed, the binding of the vitronectin receptor $\alpha v\beta 3$ to vitronectin relies on the RGD site (Pytela et al., 1985), whereas its interaction with fibronectin requires in addition the synergy site in FN III domain 9 (Adair et al., 2005). Integrin $\alpha IIb\beta 3$ also interacts with both the RGD and the synergy site in fibronectin (Bowditch et al., 1994), while in fibrinogen it recognizes a distinct auxiliary site.

Fibrinogen is composed of two sets of three non-identical polypeptide chains termed $A\alpha$, $B\beta$ and γ (Hawiger, 1995; Henschen et al., 1983) which are extensively linked by disulfide bonds to form an elongated dimeric molecule (Fig. 1). Human fibrinogen contains three potential $\alpha IIb\beta 3$ integrin-binding sites, two RGD sequences within the $A\alpha$ chain, $A\alpha^{95-98}$ (RGDF) and $A\alpha^{572-575}$ (RGDS) (Doolittle et al., 1979), and the non-RGD auxiliary dodecapeptide sequence in the γ chain (carboxyl-terminal $\gamma^{400-411}$ HHLGGAKQAGDV) (Kloczewiak et al., 1984).

Integrin $\alpha IIb\beta 3$ functions as an allosteric receptor for fibrinogen: in its low-affinity, resting conformation, integrin $\alpha IIb\beta 3$ is unable to interact with soluble fibrinogen, but can mediate cell adhesion to immobilized fibrinogen (Kieffer et al., 1991). In contrast, activated, high-affinity $\alpha IIb\beta 3$ interacts readily with soluble fibrinogen in an RGD-dependent manner. Integrin $\alpha IIb\beta 3$ -mediated cell adhesion to immobilized fibrinogen is believed to be mediated primarily by the $\gamma^{400-411}$ sequence (Cheresh et al., 1989; Farrell and Thiagarajan, 1994; Farrell et al., 1992; Kloczewiak et al., 1984; Savage et al., 1995; Smith et al., 1990), consistent with electron microscopic images showing $\alpha IIb\beta 3$ associated with the distal ends of fibrinogen that comprise the $\gamma^{400-411}$ sequence (Weisel et al., 1992). The recently

published crystal structure of $\alpha IIb\beta 3$ clearly highlights the two distinct contact sites for fibrinogen binding, the specificity-determining loop of the $\beta 3$ subunit I domain that interacts with the RGD sequence, and the cap subdomain in the β -propeller of the αIIb subunit that is necessary for macromolecular recognition of fibrinogen (Xiao et al., 2004). In addition, fibrinogen deleted of the $\gamma^{408-411}$ AGDV terminal sequence on each γ chain produced in vitro (Rooney et al., 1996) or in transgenic mice in vivo (Holmback et al., 1996) is unable to support platelet aggregation, in contrast to fibrinogen mutated in the $A\alpha$ chain RGD sites that promotes normal platelet-platelet interactions (Farrell et al., 1992). These data highlight the predominant role of the γ chain residues 408–411 in both $\alpha IIb\beta 3$ -mediated cell adhesion to surface-bound fibrinogen and $\alpha IIb\beta 3$ -mediated platelet aggregation, and raise the question about the precise functional role of the $A\alpha^{572-575}$ RGDS sequence in integrin $\alpha IIb\beta 3$ -fibrinogen interaction.

Involvement of the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ sequence and the $A\alpha^{572-575}$ RGDS site in integrin $\alpha IIb\beta 3$ -mediated cell adhesion

We have recently investigated the involvement of the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ sequence and the $A\alpha^{572-575}$ RGDS site during integrin $\alpha IIb\beta 3$ -mediated cell adhesion to immobilized fibrinogen (Salsmann et al., 2005), using either intact fibrinogen or well-characterized plasmin-generated fragments of fibrinogen known as fragments D and C. Fragment D is a 85-kDa polypeptide composed of disulfide-linked fragments of the three subunits comprising the C-terminal $\gamma^{400-411}$ site but devoid of the RGD motifs of the α chain, while fragment C is a 20-kDa fragment corresponding exclusively to the C-terminal part of the fibrinogen $A\alpha$ chain with the $A\alpha^{572-575}$ RGDS sequence. While resting platelets are known to attach and spread on immobilized fibrinogen, we have shown that on fibrinogen fragment D, platelets

ARTICLE IN PRESS

A. Salsmann et al. / European Journal of Cell Biology ■ (■■■■) ■■■–■■■

3

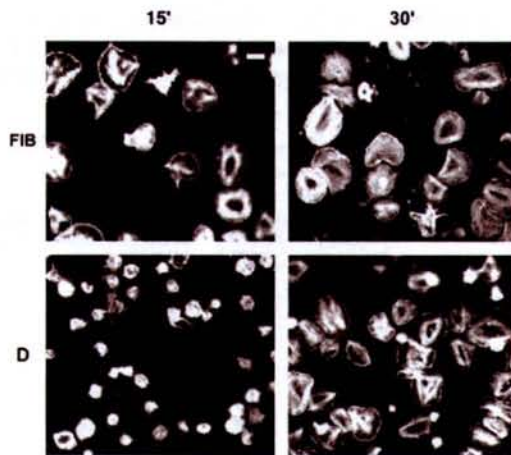


Fig. 2. Resting platelet attachment on fibrinogen fragment D. Resting platelets were incubated at 37 °C on coverslips precoated with native fibrinogen or fragment D and fixed at given time points. Actin reorganization was monitored following rhodamine phalloidin staining of the fixed platelets. Bar: 5 μ m. Adapted from Salsmann et al. (2005).

attach but fail to spread at early time points, when platelet spreading on intact fibrinogen is already complete (Fig. 2). These results suggested that the α IIB β 3–fibrinogen interaction is a two-step mechanism, involving two distinct contact sites in fibrinogen that function independently, with the first step mediating cell attachment and relying on the γ ^{400–411} sequence, and the second step leading to cell spreading and mediated through RGDS recognition.

Since selective investigation of α IIB β 3-dependent signaling in platelets is problematic, due to the release of the platelet granular content (fibrinogen, ADP, Ca²⁺), we have used CHO cells expressing recombinant α IIB β 3 in a low-affinity conformation (α IIB β 3wt) to analyze α IIB β 3-dependent outside-in signaling. Similar to platelets, CHO cells expressing α IIB β 3wt attached on fragment D, but were unable to undergo full cell spreading, in contrast to cells plated on intact fibrinogen (Fig. 3). Moreover, preincubation of the cells with a blocking anti- α IIB antibody clearly prevented cell attachment to fragment D while, in contrast, anti- β 3 antibodies had no inhibitory effect. Also, cells expressing the mutant α IIB β 3D119Y receptor with a non-functional RGD recognition site were still able to attach. On the other hand, when tested on fragment C, the cells failed to adhere, indicating that α IIB β 3 in its resting state is unable to interact with the RGDS site exposed in fragment C in the absence of prior receptor activation through the α IIB- γ ^{400–411} interaction.

Analysis of the subcellular localization of α IIB β 3 in cells attached on fragment D revealed that α IIB β 3 was

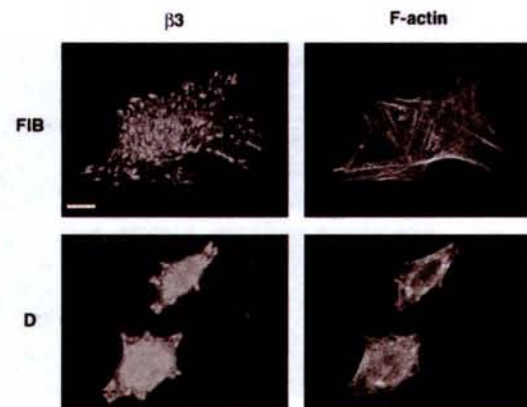


Fig. 3. Resting CHO α IIB β 3wt-mediated cell attachment to fragment D. Immunolocalization of the human β 3 subunit and staining of the actin cytoskeleton in CHO α IIB β 3wt cells plated for 2 h at 37 °C on fibrinogen (FIB) and fragment D (D). Bar: 10 μ m. Adapted from Salsmann et al. (2005).

present in small adhesion structures resembling focal complexes. Also, actin staining showed a submembranous localization, in contrast to cells plated on intact fibrinogen that displayed a fibroblastoid morphology with well-structured stress fibers connected to mature focal adhesions (Fig. 3). Thus, during cell attachment on fragment D, α IIB β 3 clustering occurs independent of the α IIB β 3–RGDS interaction. In addition, cytoskeletal and adaptor proteins such as talin, vinculin or paxillin, as well as tyrosine-phosphorylated proteins such as focal adhesion kinase (FAK) translocate to α IIB β 3 clusters, providing evidence that the α IIB- γ ^{400–411} interaction induces first wave signaling events leading to integrin clustering and to the recruitment of cytoskeletal and signaling proteins. However, in the absence of the RGD site, the cells are blocked at the attachment stage, and a synergistic α IIB β 3–RGD interaction is required to trigger additional signaling events allowing full cell spreading.

In order to determine whether outside-in signaling leading to complete cell spreading requires a conformational change within the β 3 subunit, we investigated the adhesive properties of CHO cells expressing the constitutively active α IIB β 3T562N mutant receptor (Kashiwagi et al., 1999). Interestingly, CHO α IIB β 3T562N cells were able to undergo full spreading on fibrinogen fragment D, independent of the RGD binding, with the presence of α IIB β 3-containing focal adhesions and well-organized actin stress fibers (Fig. 4). These results suggest that a structural change in the β 3 subunit, mimicking the conformational change normally induced following RGD binding to the β 3 subunit, is sufficient to promote intracellular signaling events leading to cell spreading.

ARTICLE IN PRESS

4

A. Salsmann et al. / European Journal of Cell Biology 111 (2005) 111–121

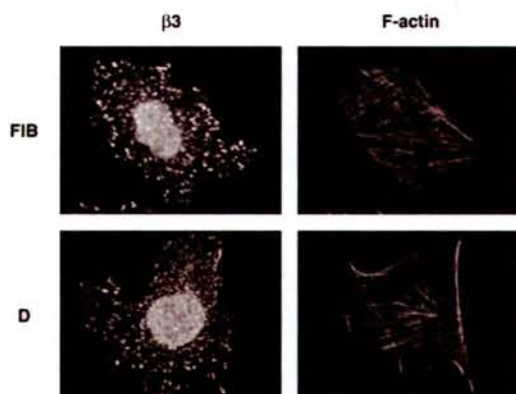


Fig. 4. α IIb β 3T562N-mediated CHO cell spreading on fragment D. Immunolocalization of the human β 3 subunit and staining of the actin cytoskeleton in CHO α IIb β 3T562N cells plated for 2 h at 37 °C on fibrinogen (FIB) and fragment D (D). Adapted from Salsmann et al. (2005).

It is now well established that the Rho family of GTPases function as critical regulators of integrin-mediated signals that control cytoskeletal dynamics involved in changes in cell morphology (Ren et al., 1999). Of the 22 currently known RhoGTPases, RhoA, Rac1 and Cdc42 are the most thoroughly characterized. While Rac1 and Cdc42 induce the formation of two types of membrane protrusions known as lamellipodia and filopodia, respectively, RhoA activation results in the formation of stress fibers corresponding to actin and myosin bundles, and their closely associated focal adhesions (Barry et al., 1997; Nobes and Hall, 1995; Ridley and Hall, 1992). The two RhoA targets Rho kinase ROCK and mDia are likely to be key players in the induction of these structures. Activation of both effectors by RhoA stimulates actin–myosin-based contractility inducing stress fiber formation (Kaibuchi et al., 1999; Watanabe et al., 1999). In addition to their structural role, focal adhesions also serve as centers for many signal transduction pathways initiated by integrins (Schoenwaelder and Burridge, 1999). However, among these, the signaling events that mediate integrin-dependent RhoA activation in response to the extracellular matrix remain still unknown.

Analysis of RhoA activity in CHO α IIb β 3wt or α IIb β 3T562N cells plated on intact fibrinogen or fragment D revealed that RhoA activity in CHO α IIb β 3wt cells attached on fragment D was weak when compared with cells plated on intact fibrinogen, suggesting that complete RhoA activation requires an interaction of integrin α IIb β 3 with the fibrinogen RGD motif (Fig. 5). More importantly, in CHO α IIb β 3T562N cells plated on either intact fibrinogen or fragment D, identical amounts of active RhoA were observed, in

accordance with the observed formation of stress fibers and complete cell spreading shown in Fig. 4. This result demonstrates that the constitutively active mutant

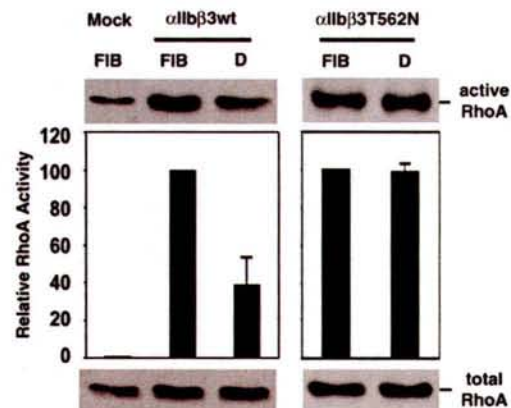


Fig. 5. RGD- β 3 subunit interaction-dependent RhoA activation. Analysis of RhoA activity in CHO α IIb β 3wt or CHO α IIb β 3T562N cells on fibrinogen or fragment D after a 2 h incubation at 37 °C. Mock transfected CHO cells incubated on fibrinogen for 2 h were used as a negative control. Each value obtained for RhoA activity was expressed relative to a scale fixed arbitrarily to 1 for mock transfected cells on fibrinogen and to 100 for α IIb β 3 transfected cells on fibrinogen. Each bar represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. Adapted from Salsmann et al. (2005).

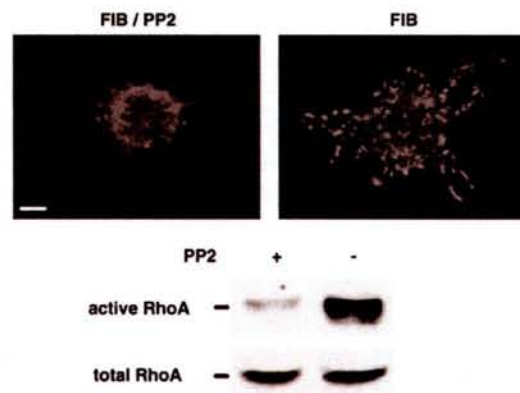


Fig. 6. Src-dependent RhoA activation and cell spreading mediated by α IIb β 3 on immobilized fibrinogen. Immunolocalization of human β 3 in CHO α IIb β 3wt cells preincubated for 30 min at room temperature with the Src kinase inhibitor PP2 (10 μ M in DMSO) or the vehicle alone, and then plated for 2 h at 37 °C on intact fibrinogen. Bar: 10 μ m. Analysis of RhoA activity in CHO α IIb β 3wt cells plated on fibrinogen in the presence or absence of PP2. Adapted from Salsmann et al. (2005).

ARTICLE IN PRESS

A. Salsmann et al. / European Journal of Cell Biology ■ (■■■■) ■■■–■■■

5

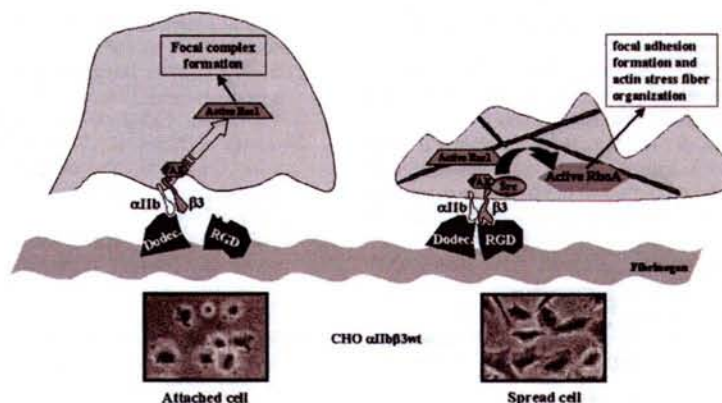


Fig. 7. Model of α IIb β 3-mediated cell adhesion on immobilized fibrinogen. Adhesion to fibrinogen regulates RhoA activity in a biphasic manner. The initial cell attachment stage relies on the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ sequence interacting with the α IIb integrin subunit, leading to clustering of α IIb β 3 in focal complexes, FAK tyrosine phosphorylation as well as Rac1 activation. In a second step, the fibrinogen RGD interaction with the β 3 integrin subunit triggers maximal RhoA activation and initiates a Src-dependent second wave of intracellular signaling events required for full cell spreading.

α IIb β 3T562N can trigger maximal RhoA activity on fragment D, independent of RGD recognition.

In platelets, Src kinase has been shown to be directly involved in the signaling pathway leading to Rho activation and cell spreading (Parsons, 1996; Payrastra et al., 2000). When CHO cells were tested, α IIb β 3-dependent cell spreading, but not cell attachment, was completely blocked by the Src inhibitor PP2 (Fig. 6). This result correlated with strongly reduced levels of active RhoA in the cells treated with PP2, thus confirming the role of Src in the outside-in signaling cascade downstream of the RGD- β 3 interaction leading to RhoA activation.

Summary

In summary, our recent results (Salsmann et al., 2005) have shown that α IIb β 3-dependent cell adhesion to immobilized fibrinogen is a two-step process (Fig. 7): the fibrinogen $\gamma^{400-411}$ sequence mediates initial cell attachment while the RGD site acts as a molecular switch imprinting a conformational change on the β 3 integrin subunit. This conformational change triggers second wave intracellular signaling events leading to Src-dependent RhoA activation required for full cell spreading. The two-step mechanism described here for α IIb β 3-mediated cell adhesion to fibrinogen could serve as a general model applicable to RGD-type integrins that rely on a synergistic site for full receptor function: one apparent function of the synergistic site would be to allow RGD-type integrins to bind a ligand preferentially over other RGD-containing proteins (Corbett and Schwarzbauer, 1999; Danen et al., 1995; Sechler et al.,

1997), and to mediate ligand-specific attachment resulting in the activation of the receptor and interaction with the RGD motif.

Acknowledgments

This work was supported by the University of Luxembourg as well as grants from the Fonds National de la Recherche, Luxembourg, the Fondation "Aide aux Enfants atteints d'un Cancer", Luxembourg, and the EC Project HPRN-CT-2002-00253, and accomplished within a CNRS-sponsored European network "Integrins and Transfer of Information" (GDRE-ITI).

References

- Adair, B.D., Xiong, J.P., Maddock, C., Goodman, S.L., Arnaout, M.A., Yeager, M., 2005. Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin $\{\alpha\}V\{\beta\}3$ in a complex with fibronectin. *J. Cell Biol.* 168, 1109–1118.
- Aota, S., Nomizu, M., Yamada, K.M., 1994. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* 269, 24756–24761.
- Barry, S.T., Flinn, H.M., Humphries, M.J., Critchley, D.R., Ridley, A.J., 1997. Requirement for Rho in integrin signalling. *Cell Adhes. Commun.* 4, 387–398.
- Bowditch, R.D., Hariharan, M., Tominna, E.F., Smith, J.W., Yamada, K.M., Getzoff, E.D., Ginsberg, M.H., 1994. Identification of a novel integrin binding site in fibronectin. Differential utilization by beta 3 integrins. *J. Biol. Chem.* 269, 10856–10863.
- Cheresh, D.A., Berliner, S.A., Vicente, V., Ruggeri, Z.M., 1989. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen

ARTICLE IN PRESS

6

A. Salsmann et al. / European Journal of Cell Biology ■ (■■■■) ■■■–■■■

- by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 58, 945–953.
- Corbett, S.A., Schwarzbauer, J.E., 1999. Requirement for $\alpha 5\beta 1$ integrin-mediated retraction of fibronectin-fibrin matrices. *J. Biol. Chem.* 274, 20943–20948.
- Danen, E.H.J., Aota, S., van Kraats, A.A., Yamada, K.M., Ruiters, D.J., van Muijen, G.N.P., 1995. Requirement for the synergy site for cell adhesion to fibronectin depends on the activation state of integrin $\alpha 5\beta 1$. *J. Biol. Chem.* 270, 21612–21618.
- Doolittle, R.F., Watt, K.W.K., Cottrell, B.A., Strong, D.D., Riley, M., 1979. The amino acid sequence of the alpha chain of human fibrinogen. *Nature* 280, 464–467.
- Farrell, D.H., Thiagarajan, P., 1994. Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J. Biol. Chem.* 269, 226–231.
- Farrell, D.H., Thiagarajan, P., Chung, D.W., Davie, E.W., 1992. Role of fibrinogen α and γ chain sites in platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10729–10732.
- Guan, J.L., Hynes, R.O., 1990. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell* 60, 53–61.
- Hawiger, J., 1995. Adhesive ends of fibrinogen and its antiadhesive peptides: the end of a saga? *Semin. Hematol.* 32, 99–109.
- Henschen, A., Lottspeich, F., Kehl, M., Southan, C., 1983. Covalent structure of fibrinogen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 408, 28–43.
- Holmback, K., Danton, M.J., Suh, T.T., Daugherty, C.C., Degen, J.L., 1996. Impaired platelet aggregation and sustained bleeding in mice lacking the fibrinogen motif bound by integrin alpha IIb beta 3. *EMBO J.* 15, 5760–5771.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., Amano, M., 1999. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 459–486.
- Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Tadokoro, S., Honda, S., Shiraga, M., Mizutani, H., Handa, M., Kurata, Y., Matsuzawa, Y., Shattil, S.J., 1999. A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the $\beta 3$ subunit activates integrins $\alpha_{IIb}\beta 3$ and $\alpha_V\beta 3$. *Blood* 93, 2559–2568.
- Kieffer, N., Fitzgerald, L.A., Wolf, D., Cheresch, D.A., Phillips, D.R., 1991. Adhesive properties of the beta 3 integrins: comparison of GP IIb-IIIa and the vitronectin receptor individually expressed in human melanoma cells. *J. Cell Biol.* 113, 451–461.
- Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T.J., Hawiger, J., 1984. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationships of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ chain. *Biochemistry* 23, 1767–1774.
- Mould, A.P., Humphries, M.J., 1991. Identification of a novel recognition sequence for the integrin alpha 4 beta 1 in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO J.* 10, 4089–4095.
- Nobes, C.D., Hall, A., 1995. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Obara, M., Kang, M.S., Yamada, K.M., 1988. Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell* 53, 649–657.
- Parsons, J.T., 1996. Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 146–152.
- Payastre, B., Missy, K., Trumel, C., Bodin, S., Plantavid, M., Chap, H., 2000. The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1069–1074.
- Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., 1984. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5985–5988.
- Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., 1985. A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5766–5770.
- Ren, X.-D., Kiesses, W.B., Schwartz, M.A., 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18, 578–585.
- Ridley, A.J., Hall, A., 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389–399.
- Rooney, M.M., Parise, L.V., Lord, S.T., 1996. Dissecting clot retraction and platelet aggregation. Clot retraction does not require an intact fibrinogen γ chain C terminus. *J. Biol. Chem.* 271, 8553–8555.
- Ruoslahti, E., 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 697–715.
- Salsmann, A., Schaffner-Reckinger, E., Kabile, F., Plançon, S., Kieffer, N., 2005. A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin alpha IIb beta 3-dependent RhoA activation during cell spreading. *J. Biol. Chem.* 280, 33610–33619.
- Savage, B., Bottini, E., Ruggeri, Z.M., 1995. Interaction of integrin $\alpha_{IIb}\beta 3$ with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion. *J. Biol. Chem.* 270, 28812–28817.
- Schoenwaelder, S.M., Burridge, K., 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 274–286.
- Sechler, J.L., Corbett, S.A., Schwarzbauer, J.E., 1997. Modulatory roles for integrin activation and the synergy site of fibronectin during matrix assembly. *Mol. Biol. Cell* 8, 2563–2573.
- Smith, J.W., Ruggeri, Z.M., Kunicki, T.J., Cheresch, D.A., 1990. Interaction of integrins $\alpha_V\beta 3$ and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 265, 12267–12271.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., Narumiya, S., 1999. Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 1, 136–143.
- Weisel, J.W., Nagaswami, C., Vilaire, G., Bennett, J.S., 1992. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 267, 16637–16643.
- Xiao, T., Takagi, J., Collier, B.S., Wang, J.H., Springer, T.A., 2004. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432, 59–67.

Discussion

Au cours de notre travail, nous avons montré que les cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt constitutivement au repos s'attachent sur le fragment D ne contenant que la séquence dodécapeptide, mais en aucun cas ne s'étaient, alors que l'étalement est total sur le fibrinogène entier. Par contre, les cellules sont incapables d'adhérer sur le fragment C ne comprenant que le site $^{572}\text{RGDS}^{575}$. Conformément aux données de la littérature, ces résultats suggèrent que l'attachement du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ nécessite la séquence dodécapeptide. D'autre part, l'absence d'étalement cellulaire laisse supposer que le site RGD joue un rôle essentiel dans ce processus d'étalement. En outre, l'attachement observé sur fibrinogène intact des cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3\text{D}_{119}\text{Y}$ présentant une sous-unité β_3 dont le site de reconnaissance du motif RGD est inactivé par mutation, confirme nos conclusions. Ces résultats indiquent que dans un premier temps, c'est la séquence dodécapeptide qui est impliquée dans l'attachement cellulaire médié par $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur fibrinogène immobilisé.

Nous avons porté ensuite nos investigations au niveau intracellulaire sur le clustering de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le recrutement des protéines cytoplasmiques. Nos résultats montrent pour la première fois qu'au cours de l'attachement cellulaire sur fragment D, $\alpha_{IIb}\beta_3$ était recrutée au niveau de complexes focaux répartis à la périphérie de la cellule, indépendamment d'une interaction $\alpha_{IIb}\beta_3$ -RGDS. En outre, nous avons également pu montrer une colocalisation dans ces complexes focaux de protéines cytosquelettiques ou adaptatrices telles que la taline, la vinculine, la paxilline, ou encore des protéines phosphorylées au niveau de résidus tyrosine. Ces résultats nous ont permis de suggérer que l'interaction α_{IIb} -dodécapeptide induit rapidement une vague de signalisation conduisant au clustering de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et au recrutement de différentes protéines au niveau de ces complexes focaux. Cependant, bien que l'ensemble de la machinerie nécessaire à l'adhésion complète des cellules soit déjà recruté, une seconde interaction synergique entre $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le motif $^{572}\text{RGDS}^{575}$ semble être requise afin de déclencher les événements de signalisation intracellulaires additionnels nécessaires à l'étalement complet des cellules

CHO $\alpha_{11b}\beta_3$ wt, caractérisé par l'organisation de l'actine en fibres de stress et la formation d'adhérences focales matures.

Dans le but de déterminer si les événements de signalisation conduisant à l'étalement cellulaire nécessitent effectivement une interaction physique entre le motif RGDS et la sous-unité β_3 , ou si cette interaction peut être mimée en provoquant un changement au niveau de la structure tertiaire de la sous-unité β_3 , indépendamment de l'interaction RGD- β_3 , nous avons étudié le comportement d'adhésion sur fibrinogène et sur fragment D, de cellules CHO exprimant le récepteur $\alpha_{11b}\beta_3$ T₅₆₂N, au niveau duquel la mutation du résidu thréonine en une asparagine active spontanément le récepteur en modifiant la conformation de β_3 (Kashiwagi et al., 1999). L'étalement complet de ces cellules sur le fragment D, associé au recrutement de β_3 au niveau d'adhérences focales matures et une organisation de l'actine en fibres de stress, nous a permis de démontrer clairement qu'une restructuration spatiale de la sous-unité β_3 , mimant le changement conformationnel normalement induit par l'interaction RGD- β_3 , était essentiel pour déclencher les événements de signalisation à l'origine de l'organisation des fibres d'actine et de la maturation des complexes focaux en adhérences focales.

L'ensemble de ces résultats obtenus avec les cellules CHO a pu être confirmé au niveau de plaquettes sanguines humaines. En effet, les plaquettes sont uniquement capables d'attachement sur le fragment D alors qu'elles s'étaient rapidement sur le fibrinogène entier. En outre, et de façon similaire aux cellules CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ T₅₆₂N, les plaquettes activées par un anticorps activateur ou par du manganèse, deviennent capables de s'étaler complètement sur le fragment D avec polymérisation complète de l'actine. Cependant, l'interprétation correcte des résultats obtenus avec les plaquettes n'a pu être réalisée qu'à des temps précoces d'adhésion (inférieurs à 30 min), du fait de la sécrétion dans le milieu extérieur des constituants des granules internes, qui faussent l'analyse des résultats correspondant théoriquement à la seule interaction de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ non activée avec la séquence dodécapeptide du fragment D.

Dans notre étude des protéines spécifiquement impliquées dans la signalisation intracellulaire induite par le récepteur $\alpha_{11b}\beta_3$, nous avons tout d'abord porté nos investigations sur l'état de phosphorylation de la protéine FAK au cours des

étapes d'adhésion cellulaire sur le fg et sur le fragment D. En effet, il a été démontré que le clustering des intégrines au niveau des adhérences focales vers lesquelles convergent les fibres de stress, en réponse à des signaux outside-in, était régulé par de nombreuses protéines intracellulaires, notamment la FAK qui joue un rôle prépondérant dans la signalisation intracellulaire au cours des étapes précoces d'adhésion cellulaire (Guan, 1991). Cette étude de l'état de trans-autophosphorylation de FAK au niveau du résidu tyrosine 397 nous a permis de mettre en évidence que l'attachement cellulaire sur le fragment D, accompagné d'un clustering des intégrines $\alpha_{11b}\beta_3$ au niveau de complexes focaux est suffisant pour déclencher la phosphorylation de FAK, et que finalement, l'état de phosphorylation de FAK est en étroite corrélation avec le stade d'adhésion cellulaire et le degré de regroupement des intégrines $\alpha_{11b}\beta_3$ au niveau des complexes focaux.

Par la suite, nous nous sommes focalisés sur l'analyse de l'activité des protéines de la famille des RhoGTPases au cours des étapes de reconnaissance du fg entier immobilisé ou du fragment D du fg dans notre modèle expérimental. Les protéines de la famille des RhoGTPases, hautement régulées par les intégrines (Ridley, 1992; Del Pozo, 2000 ; Ren, 1999 ; Chrzanowska and Burridge, 1996), sont en effet fortement impliquées dans la modulation du processus d'adhésion cellulaire (Schwartz, 1995) en contrôlant la formation du cytosquelette d'actine. Parmi ces petites RhoGTPases, nous avons concentré notre étude sur Rac1 et RhoA, qui interviennent successivement dans la formation des lamellipodes et des fibres de stress (Nobes and Hall, 1995), et notre projet consista à explorer le rôle de chacun des 2 sites RGD et dodécapeptide du fg dans l'activation de chacune de ces GTPases pendant les étapes d'adhésion cellulaire sur le fg immobilisé ou sur le fragment D, de cellules CHO exprimant le récepteur $\alpha_{11b}\beta_3$ au repos ou spontanément actif. La plupart des RhoGTPases évoluent selon un cycle entre un état actif, liées à une molécule de GTP, permettant à la GTPase d'interagir avec un effecteur, et un état inactif, liées à une molécule de GDP (Arthur et al., 2002; Ridley and Hall, 1992; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

L'état d'activation des GTPases a été mesuré selon une technique décrite initialement par Sander et collaborateurs pour l'étude de l'activité des protéines Cdc42 et Rac1 (Sander et al., 1998), puis par Ren et collaborateurs pour l'étude

spécifique de l'activité de la protéine RhoA (Ren et al., 1999). Cette technique consiste à précipiter sélectivement les GTPases sous leur forme active en utilisant leur substrat cible recombinant et couplé à la GST (glutathion S-transférase), protéine permettant la précipitation. Nous avons dans un premier temps comparé l'évolution de l'activité de Rac1 et RhoA au cours du processus d'étalement de cellules $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt. En total accord avec certaines données de la littérature (Ren et al., 1999), nous avons pu montrer qu'alors que Rac1 est activée de manière continue, le degré d'activation de la protéine RhoA est régulé de façon biphasique, qui se traduit par une inhibition transitoire de son activité correspondant au premier stade de reconnaissance du fg par l'intégrine, suivie d'une activation maximale conduisant à la polymérisation complète et à l'organisation de l'actine en fibres de stress. Par la suite, l'analyse de l'état d'activation de RhoA dans les cellules étalées sur le fg ou attachées sur le fragment D a révélé que l'attachement des cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt sur le fragment D, mais leur incapacité à s'étaler, est en corrélation étroite avec le faible niveau d'activité de RhoA observé, alors qu'une activité maximale de RhoA est observée pour les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt étalées sur le fg et les cellules $\alpha_{IIb}\beta_3$ T₅₆₂N étalées sur le fg et le fragment D. Ces résultats indiquent que l'interaction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec le motif RGD, ou un changement conformationnel de la sous-unité β_3 mimant une telle interaction, sont nécessaires à l'activation complète de RhoA, responsable de l'étalement cellulaire. Finalement, nous démontrons ici que l'interaction α_{IIb} -dodécapeptide joue un rôle primordial dans la fixation du fg, alors que l'interaction β_3 -RGD ne semble intervenir qu'en tant que commutateur moléculaire permettant de poursuivre et de finaliser l'activation des protéines de signalisation essentielles à l'étalement cellulaire complet, caractérisé par la formation d'adhérences focales matures et l'organisation de l'actine en fibres de stress, et au cours duquel RhoA joue un rôle central.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la protéine Src, qui fonctionne en tant que régulateur indirect de l'activité de RhoA, de part son association étroite avec une molécule spécifiquement inhibitrice de RhoA, la p190RhoGAP (Arthur et al., 2000; Arthur et Burridge, 2001). De plus, du fait de son association constitutive avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β_3 (Arias-Salgado et al., 2003), et de son rôle dans l'activation de la FAK, la protéine tyrosine kinase Src est impliquée directement

dans les voies de transduction de signaux suite à l'engagement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (De Virgilio et al., 2004; Shattil, 2005). Au niveau plaquettaire, l'activation de Src est considérée comme l'évènement biochimique le plus rapidement détecté après la fixation du fibrinogène, et joue un rôle déterminant dans la réorganisation du cytosquelette conduisant à l'étalement cellulaire (Obergfell et al., 2002). Un modèle d'activation de Src et de la cascade de signalisation en aval est même établi (Arias-Salgado et al., 2003). Au cours de notre étude, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de Src, PP2, pour analyser le rôle de Src au cours du mécanisme d'adhésion sur fg médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. En présence de l'inhibiteur, les cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt furent bloquées au stade de l'attachement sur fg, démontrant le rôle crucial de Src dans l'initiation de la signalisation conduisant à l'étalement cellulaire. Ces résultats sont d'ailleurs en parfait accord avec ceux obtenus récemment par Arias-Salgado et collaborateurs, qui montrent que la substitution des 3 derniers résidus C-terminaux de la sous-unité β_3 , responsables de la fixation de Src, par leurs homologues de la sous-unité β_1 , n'interagissant pas avec Src, empêche l'étalement cellulaire sur le fg (Arias-Salgado et al., 2005). De plus, nous avons pu montrer que cet attachement cellulaire en absence d'activité de Src corrélait tout à fait avec la faible activité de RhoA, en accord également avec d'autres études montrant l'implication directe de Src dans la signalisation outside-in responsable de l'activation de RhoA et de l'étalement cellulaire (Arthur et al., 2000; Parsons, 1996). Par contre, les cellules exprimant le récepteur constitutivement actif s'étalèrent sur fg indépendamment de Src, laissant suggérer que dans ce cas, le changement conformationnel induit par la mutation T₅₆₂N permettrait de court-circuiter le recrutement de Src normalement nécessaire à l'étalement cellulaire.

Parmi les protéines recrutées au cours de la signalisation conduisant à l'étalement cellulaire, la PI3K a également été impliquée, bien qu'il lui ait également été assigné un rôle primordial dans la régulation de l'activation de l'intégrine (Payraastre et al., 2000). En effet, alors que la PI3K intervient dans la stimulation de la PLC γ 2 conduisant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ au cours de la signalisation plaquettaire inside-out (Gratacap et al., 1998; Pasquet et al., 1999), la PI3K est également impliquée dans la signalisation outside-in responsable de la réorganisation du cytosquelette (Guinebault et al., 1995). Cependant, dans notre cas, la PI3K ne semble pas être déterminante puisque les cellules CHO exprimant le récepteur au

repos ou actif furent capables de s'étaler normalement en présence de wortmannine, un inhibiteur de la PI3K, laissant penser que la voie induite directement par Src joue un rôle plus important au niveau du processus d'adhésion des cellules CHO sur fg, et est indépendante de l'activité de la PI3K.

Toutefois, la cascade de signalisations initiée par l'engagement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et conduisant à l'activation de RhoA et à l'étalement cellulaire n'est pas encore tout à fait claire. Il est certain que les protéines FAK et Src jouent un rôle prédominant à la fois dans l'initiation et la régulation de cette voie de signalisation RhoA-dépendante (Arthur and Burridge, 2001; Ren et al., 2000), et que les RhoGTPases Cdc42, Rac1 et RhoA sont à la base du mécanisme d'adhésion cellulaire (Nobes and Hall, 1995; Ridley et al., 1992). Mais il reste encore à déterminer les relations exactes entre ces protéines et l'ensemble des autres protéines intervenant dans cette signalisation, afin de mettre en place un modèle de fonctionnement et d'activation cohérent de ces protéines. Le lien moléculaire entre les protéines Src et FAK d'une part, et les RhoGTPases n'est par exemple par encore clairement établi. De récentes études suggèrent que les membres de la famille des protéines Vav pourraient être impliqués (Abe et al., 2000; Hornstein et al., 2003), puisqu'on a démontré leur rôle dans les changements de morphologie plaquettaire (Cichowski et al., 1996), et dans l'étalement cellulaire par régulation des RhoGTPases (Gakidis et al., 2004; Liu and Burridge, 2000; Marignani and Carpenter, 2001). D'autres protéines candidates à l'activation des RhoGTPases en réponse à l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines sont entre autres les protéines Pix associée à la paxilline, et DOCK180 associé à la p130Cas localisées au niveau des adhérences focales (Petch et al., 1995; Turner, 2000). La régulation de RhoA conduisant à l'étalement cellulaire est donc infiniment complexe, et les voies de signalisation initiées suite à l'engagement respectif des séquences dodécapeptide et RGDS avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ restent à être élucidées.

En effet, nos résultats pourraient laisser penser que le stade d'attachement observé avec les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt sur le fragment D, dû à l'interaction α_{IIb} -dodécapeptide, pourrait être débloqué par la simple activation artificielle de RhoA. Or, nos résultats ont montré que l'utilisation de dominant actif de RhoA dans ce cas ne conduit pas à la poursuite du processus d'adhésion cellulaire sur le fragment D, du

fait d'une hyper-polymérisation de l'actine qui aboutit plutôt à une contraction des cellules. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec certaines données de la littérature qui montrent qu'une hyperactivation de RhoA joue un rôle antagoniste sur l'étalement cellulaire, et atténue la dynamique membranaire des cellules adhérentes (Arthur et Burridge, 2001; Cox et al., 2001).

Finalement, nos résultats suggèrent deux rôles distincts des sites ⁵⁷²RGDS⁵⁷⁵ et dodécapeptide dans l'interaction de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ avec le fg. L'interaction du dodécapeptide avec la sous-unité α_{11b} est responsable de l'attachement des cellules à la matrice de fg, alors que l'interaction β_3 -RGD semble jouer un rôle de commutateur moléculaire permettant l'induction d'un signal conduisant à l'étalement cellulaire complet, par l'intermédiaire de l'activation maximale de la GTPase RhoA, permettant de stabiliser l'étalement cellulaire par l'organisation de l'actine en fibres de stress.

Bien que les mécanismes moléculaires mis en place lors de la reconnaissance du fg par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, et lors de la signalisation outside-in conduisant à l'étalement cellulaire ne soient pas encore complètement élucidés, nous proposons ici un modèle hypothétique de fonctionnement de ce processus, sur la base de nos résultats et de ceux rapportés dans la littérature (Figure 23). Ainsi, nous montrons que l'adhésion au fg immobilisé de cellules exprimant le récepteur $\alpha_{11b}\beta_3$ se déroule chronologiquement selon un mécanisme de reconnaissance et de signalisation en 2 étapes. En effet, dans un premier temps, l'attachement cellulaire repose sur l'interaction de la sous-unité α_{11b} avec la séquence dodécapeptide du fg, conduisant à un changement conformationnel et au clustering des intégrines $\alpha_{11b}\beta_3$ en complexes focaux. Ce phénomène est à l'origine d'une première vague de signalisation intracellulaire correspondant à l'activation de la FAK et des petites GTPases Cdc42 et Rac1, et à une inactivation transitoire de RhoA. D'après les connaissances actuelles, il semblerait qu'à ce stade, Src intervienne dans l'activation de la FAK par phosphorylation notamment au niveau des résidus Tyr⁵⁷⁶ et Tyr⁵⁷⁷ (Schaller et al., 1999; Westhoff et al., 2004), ainsi que dans l'inactivation transitoire de RhoA par l'intermédiaire de l'inhibiteur intracellulaire p190RhoGAP (Arthur and Burridge, 2001). Nos résultats montrent que l'inhibition de l'activation de Src empêche

l'étalement des cellules CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ wt sur le fg entier, mais en aucun cas l'attachement, en accord avec l'étude récente publiée par Arias-Salgado et collaborateurs (Arias-Salgado et al., 2005). Il semblerait donc que même en absence d'activation de Src, l'interaction α_{11b} -dodécapeptide permette encore l'attachement cellulaire. Ceci suggère que bien que constitutivement associé à la sous-unité β_3 (Arias-Salgado et al., 2003; Shattil, 2005), Src ne jouerait qu'un rôle tardif dans le processus d'adhésion cellulaire sur le fg. Or la FAK, qui occupe une position clé dans l'initiation de cette voie, et qui est dans un premier temps trans-autophosphorylée suite à l'engagement de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, est ensuite complètement activée par phosphorylation au niveau de ses diverses tyrosines par la protéine Src activée. Ceci met par conséquent en évidence l'existence d'un autre mécanisme d'activation de la FAK indépendant de Src. En outre, lors de cette expérience, nous avons pu observer également une faible activité de RhoA. Or, Src étant inhibée, l'inactivation transitoire de RhoA ne peut être due à l'action de la p190RhoGAP. Nos résultats laissent donc supposer qu'en absence de Src activée, RhoA pourrait être inactivée par un autre processus. Des résultats publiés par Sander et collaborateurs indiquent que Cdc42 et Rac1 régulent négativement l'activité de RhoA (Sander et al., 1999), ce qui serait une explication probable de nos résultats. Une autre possibilité serait l'augmentation du taux d'AMPc suite à l'attachement cellulaire (Laudanna et al., 1997), ou même l'activation de la p190RhoGAP par un procédé indépendant de Src comme la production de radicaux libres oxygénés (Caron, 2003; Nimmual et al., 2003).

Dans une seconde étape, l'interaction de la sous-unité β_3 avec le motif RGD est responsable d'un changement conformationnel de β_3 , qui déclenche une seconde vague d'évènements de signalisation intracellulaire conduisant à une activation maximale de RhoA, à la formation d'adhérences focales matures, à l'organisation de l'actine en fibres de stress et à l'étalement cellulaire (Figure 23). A noter que cette seconde étape est dépendante de l'état d'activation de Src, puisque son inhibition empêche tout étalement cellulaire sur fg. Nous montrons de plus que l'activation de Src est primordiale dans la réactivation de RhoA. Cependant le mécanisme moléculaire précis par lequel RhoA est activée n'est pas encore élucidé. Il semblerait

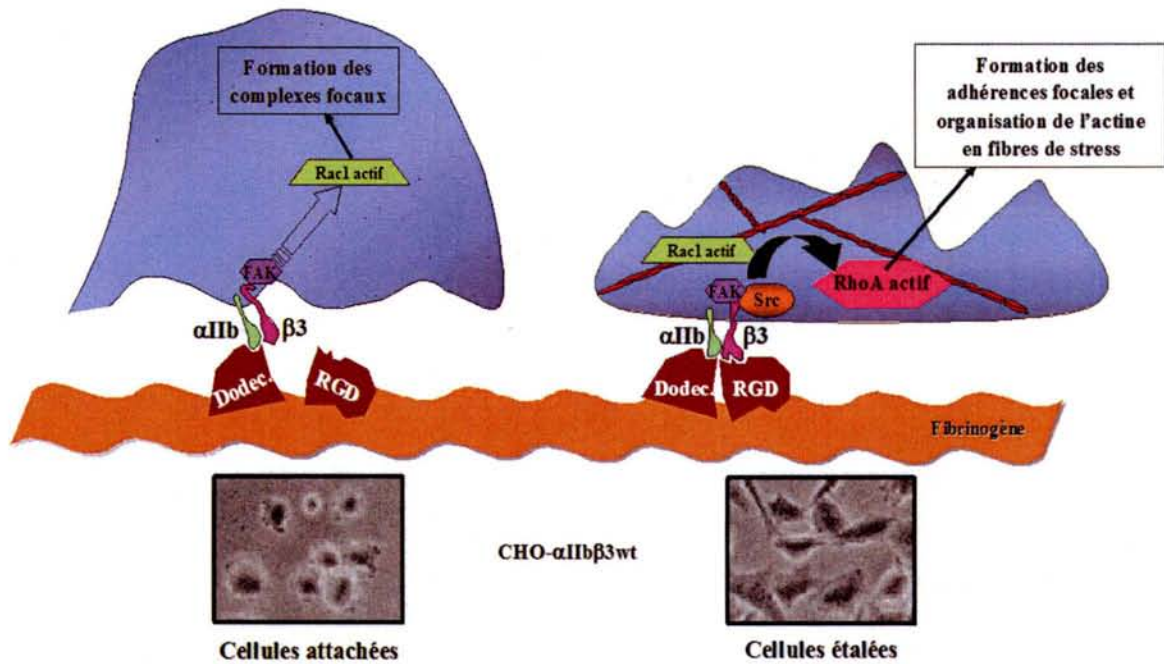


Figure 23 : Modèle d'adhésion cellulaire sur fg immobilisé médié par $\alpha_{IIb}\beta_3$.

toutefois que les phosphatases jouent un rôle notoire au cours de cette réactivation de RhoA, en empêchant l'action inhibitrice de certains facteurs GAP tels que la p190RhoGAP dans le cas de la LMW-PTP (Bucciantini et al., 1999; Chiarugi et al., 2000), ou au contraire en activant des protéines activatrices de RhoA telles que la tyrosine kinase Fyn dans le cas de PTP α (DeMali et al., 2003; Su et al., 1999; von Wichert et al., 2003). Enfin, il est probable que les protéines Vav ou DOCK180 jouent également un rôle non-négligeable (Hornstein et al., 2003; Petch et al., 1995).



CHAPITRE 2

Influence des conditions de flux au niveau de l'attachement et de l'étalement cellulaire sur fibrinogène et facteur von Willebrand immobilisés, de cellules CHO exprimant l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à l'état de repos ou constitutivement activée

ARTICLE 3

“ CHO cells expressing the high affinity $\alpha_{IIb}\beta_3 T_{562}N$ integrin demonstrate enhanced adhesion under shear “

Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006

(4, p. 236-246)



Introduction

L'adhésion et l'agrégation plaquettaires au niveau des sites endommagés de l'endothélium vasculaire constituent une étape initiale déterminante dans le processus conduisant à l'arrêt du saignement. Les 2 principaux ligands mis en jeu, le FvW et le fg, jouent un rôle complémentaire dans ce mécanisme (Alevriadou et al., 1993; Ikeda et al., 1991). En effet, au niveau d'une brèche vasculaire, l'adhésion plaquettaire est initiée par la reconnaissance du FvW du sous-endothélium par le récepteur GPIb/V/IX, permettant de diminuer la vitesse des plaquettes et conduisant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Ruggeri et al., 1999a; Savage et al., 1996). Cette étape est suivie de l'interaction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ activée avec le FvW, et/ou de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ ou de la GPVI avec le collagène, conduisant à l'arrêt définitif et une adhérence stable des plaquettes (Savage et al., 1996). En outre, certains résultats indiquent qu'en fonction de la force de cisaillement du flux sanguin, le rôle joué par les différents récepteurs diffère, puisque la contribution de la GPIb/V/IX par rapport à $\alpha_{IIb}\beta_3$ devient progressivement plus importante au fur et à mesure de l'accroissement du flux (Ikeda et al., 1991; Jackson et al., 2003). Par la suite, l'activation des plaquettes les conduit à former un thrombus caractérisé par l'engagement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ activée avec le fg plasmatique circulant, qui fonctionne en tant que pont moléculaire entre plaquettes activées adjacentes, contribuant ainsi à la formation et à la stabilisation de l'agrégat plaquettaire (Ni et al., 2000; Tsuji et al., 1999). A noter que l'expression membranaire de FvW ainsi que le FvW plasmatique reconnus à la fois par la GPIb/V/IX et $\alpha_{IIb}\beta_3$ activée (Kulkarni et al., 2000), contribue également dans une moindre mesure à la formation du thrombus.

Il est clairement établi que l'interaction des plaquettes avec le fg soluble requiert l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et l'exposition d'un état de haute affinité pour le fg (Savage et al., 1992; Savage et al., 1995). Cependant, dans les vaisseaux sanguins, des plaquettes circulantes peuvent également adhérer à des molécules de fg immobilisées au niveau des premières plaquettes adhérentes, par l'intermédiaire d'intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ non encore activées, et donc contribuer à la croissance du thrombus

plaquettaire indépendamment de l'activation plaquettaire initiale (Savage and Ruggeri, 1991; Ni et al., 2000). Ce phénomène est d'ailleurs particulièrement vrai lorsque le flux sanguin est faible. Dans ce cas, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ne devient activée qu'à la suite de la reconnaissance du fg, et conduit à une réorganisation des éléments du cytosquelette, responsable de l'étalement plaquettaire, si bien que la signalisation outside-in médiée par $\alpha_{IIb}\beta_3$ joue un rôle prépondérant lors de ce mécanisme (Haimovich et al., 1993; Haimovich et al., 1996).

Au cours de ce travail, l'influence de l'état d'affinité du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ lors du mécanisme d'adhérence cellulaire sur le fg et le FvW immobilisés, a été examiné en conditions de flux par vidéomicroscopie en temps réel. Afin de restreindre notre étude à la seule signalisation outside-in médiée par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et de ne pas prendre en considération la sécrétion du contenu des granules plaquettaires rendant difficile l'étude distincte du rôle joué par le récepteur au repos ou activé, les cellules CHO exprimant constitutivement l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt non activée ou $\alpha_{IIb}\beta_3$ T₅₆₂N active, ont été utilisées.

ORIGINAL ARTICLE

CHO cells expressing the high affinity $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear

P. LEGENDRE,* A. SALSMANN,† J. RAYES,* O. TRASSARD,‡ N. KIEFFER† and D. BARUCH*

*INSERM U143, Le Kremlin-Bicetre, France; †Laboratoire de Biologie et Physiologie Intégrée (CNRS/GDRE-ITI), Université du Luxembourg, Luxembourg; and ‡IFR93, Le Kremlin-Bicetre, France

To cite this article: Legendre P, Salsmann A, Rayes J, Trassard O, Kieffer N, Baruch D. CHO cells expressing the high affinity $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 236–46.

Summary. *Background:* $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated platelet adhesive interactions in the vasculature, which are dependent on the functional state of this receptor, may be sensitive to shear forces. *Objectives:* To evaluate the influence of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ affinity state on cell attachment under flow, we compared Chinese hamster ovary cells expressing the low affinity $\alpha_{IIb}\beta_3$ wild-type (wt) receptor to those expressing the high affinity $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N receptor. *Materials and methods:* We designed a real-time videomicroscopy adhesion assay for von Willebrand factor (VWF) or fibrinogen under flow conditions. *Results:* At 50 s⁻¹, $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N supported higher cell adhesion to fibrinogen (63.3 ± 2.9 cells/field) than $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt (38.7 ± 2.4 cells/field, *P* < 0.0001). At 100 s⁻¹, $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N mediated cell adhesion (40.5 ± 3.8 cells/field), while $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt did not (5.3 ± 1.4 cells/field, *P* < 0.001), allowing to discriminate the efficiency of each receptor. Similar findings were observed for adhesion to VWF. Complete inhibition of cell adhesion to fibrinogen was achieved with 800 μM fibrinogen γ-chain dodecapeptide [HHLGGAK-QAGDV (H12)], while Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide (10–1000 μM) induced a dose-dependent cell detachment. These results suggest that the H12 motif allows initial attachment, in contrast to the RGDS site, which strengthens the stability of adhesion. Interestingly, compared with wt, a 10-fold lower concentration of RGDS was required to reach a similar reduction of cell adhesion mediated by $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N. *Conclusions:* Our data show that $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation is associated with a stabilization of integrin binding to fibrinogen or VWF under shear.

Keywords: $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, adhesion, fibrinogen, platelet, shear.

Correspondence: Dominique Baruch, INSERM U143, 80 rue du General Leclerc 94270 Le Kremlin-Bicetre, France. Tel.: +33 1 49 59 56 28; fax: +33 1 46 71 94 72; e-mail: baruch@kb.inserm.fr

Received 21 February 2005, accepted 5 September 2005

Introduction

Efficient platelet function is necessary for hemostasis. Plaque rupture and/or endothelial damage lead to the exposure of collagens and von Willebrand factor (VWF) and the adhesion of circulating platelets to the damaged vessel wall through the concerted participation of several receptors. With blood flow conditions ranging from low (< 200 s⁻¹) to high shear rates (> 1500 s⁻¹), the initial transient arrest of platelets on the vessel wall requires VWF acting as a bridge between collagen and the glycoprotein (GP) Ib-V-IX complex. The GPIb complex is essential for the initiation of the first adhesive platelet contact with the collagen-rich matrix. Collagen binds to VWF A3 domain, and immobilized VWF binds via its A1 domain to the GPIb complex. This interaction is relatively weak and short in duration, resulting in a slowing of platelet motion and platelet rolling on the thrombogenic surface [1]. The binding of VWF to platelet GPIb complex induces transduction of signals leading to activation of platelet receptors, primarily of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ [2,3]. The latter can undergo activation-dependent increase in affinity/avidity for its ligand, fibrinogen, VWF, or fibronectin.

Resistance to detachment by high shear rates has been previously shown in platelets or Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing GPIb in combination with $\alpha_{IIb}\beta_3$ [4,5]. As inhibitors of $\alpha_{IIb}\beta_3$ result in a loss of stable adhesion and sustained platelet aggregation, a key question relevant for antithrombotic therapy without affecting normal hemostasis is a better understanding of the sequence of events that follow initial adhesion in conditions of flowing blood.

Shear forces may increase the sensitivity of adhesive interactions as demonstrated by the shear-dependent increase of adhesion of CHO cells expressing the Pl^{A2} polymorphism of $\alpha_{IIb}\beta_3$ [6]. In a model of metastatic tumor cells, the functional state of the $\alpha_v\beta_3$ integrin seems to be important for cell adhesion to VWF or fibrinogen under flow conditions, as Mn²⁺-induced activation of the receptor was required for melanoma cell adhesion under shear conditions [7]. Using cells not expressing GPIb, in an $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent adhesion model to immobilized VWF, we have previously shown that activation of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptor was absolutely required for cell resistance to detachment under increasing shear rates (50–1600 s⁻¹). In

contrast, we found that $\alpha_{11b}\beta_3$ activation was not a prerequisite for cells already adherent and spread on fibrinogen to withstand high shear rates [8].

In the present study, we addressed the influence of $\alpha_{11b}\beta_3$ activation on the ability of cells to attach stably and spread on a VWF or a fibrinogen matrix under flow conditions. To this end, we designed a real-time videomicroscopy study under dynamic flow conditions to evaluate the attachment and detachment of cells subjected to increasing shear forces. To address the effect of $\alpha_{11b}\beta_3$ activation, we compared CHO cells expressing the low affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ wild-type (wt) receptor to those expressing the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant. In addition, we determined the effect of the dodecapeptide and the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) sequences of fibrinogen on $\alpha_{11b}\beta_3$ -mediated cell attachment and stable adhesion in flow conditions.

Materials and methods

Proteins, peptides, and monoclonal antibodies

Human VWF and fibrinogen were purified and depleted of contaminant fibronectin and respectively, of fibrinogen and VWF [9]. Monoclonal antibody (mAb) P37 directed toward β_3 was a gift of Dr Gonzalez-Rodriguez (CSIC, Madrid, Spain) [10]. The mAb LM609, which binds to a conformational epitope on human integrin $\alpha_v\beta_3$, was purchased from Chemicon International (Temecula, CA, USA). The $\alpha_{11b}\beta_3$ complex-specific mAb AP2 was a generous gift from Dr T. J. Kunicki (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). The epitope for AP2 has been localized to the Glu171–Glu174 sequence of β_3 [11]. The mAb pl-55 reacting specifically with activated $\alpha_{11b}\beta_3$ [12] and the Ro 65-5233/001 peptidomimetic directed against the ligand binding sites of $\alpha_v\beta_3$ [13] were a kind gift of Dr S. Meyer-Reigner (Pharma Division, F. Hoffman-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). The mAb 130, which recognizes the β_3 subunit was produced in our laboratory [14]. Isotypic control antibodies were purified from non-immune mouse ascites. RGDS peptide was from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). The dodecapeptide sequence $\gamma^{400-411}$ of the fibrinogen γ -chain (HHLGGAKQAGDV, abbreviated H12 in this study) was purchased from Neosystem (Strasbourg, France). Fragment D of fibrinogen, containing the H12 sequence, but devoid of the RGDS sequence, was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA).

CHO cell clones and cell culture

The CHO cells expressing either the low affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ wt receptor or the high affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant and those expressing the $\alpha_v\beta_3$ complex have been previously described [13,15]. The single amino-acid substitution in the cysteine-rich, extracellular portion of β_3 (T562N) is responsible for receptor activation, as shown by the constitutive binding of the mAb PAC-1 [16]. The cells were grown to confluence in Iscove's modified Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (IMDM) (Eurobio, les Ulis, France) supplemented

with 10% fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France), and routinely passaged after detachment by 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid in 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.1 M KH_2PO_4 buffer pH 7.4 (PBS). In some experiments, cells were stimulated with 10 mM dithiothreitol (DTT) [8,9]. Flow cytometry was performed in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) as previously reported [8].

Cell adhesion assay in static conditions

Adhesion assays were carried out on glass coverslips coated overnight at 4 °C with VWF or fibrinogen (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) diluted in Tris-buffered saline 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, for 20 min or 2 h as described [17].

Cell adhesion assay under shear flow conditions

Cell adhesion and resistance to detachment were quantitated by real-time videomicroscopy. The flow chamber was assembled and inserted in its holding device as described [8]. The bottom of the chamber was a glass coverslip precoated with VWF or fibrinogen (usually 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as aforementioned. The coverslip was assembled in the chamber filled with IMDM. The CHO $\alpha_{11b}\beta_3$ or $\alpha_v\beta_3$ cells in suspension in IMDM at a concentration of 1.2×10^6 cells mL^{-1} were aspirated in a 2-mL plastic syringe (Terumo CML, Nemours, France) connected to the chamber with silicone tubing of 1 mm diameter (VWR International; Strasbourg, France). The perfusion chamber was set on the stage of an inverted microscope (Axiovert 135; Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a 10 \times Hoffman Modulation Contrast objective. Controlled flow rates from 50 to 3200 $\mu\text{L min}^{-1}$ were applied with an electric pump (PHD 2000; Harvard Apparatus, les Ulis, France) to generate wall shear rates from 25 to 1600 s^{-1} . These levels of shear rates relate to physiologic levels found *in vivo* in the venous and arterial systems [18]. A charged-coupled-device camera (Sony, Tokyo, Japan) allowed visualization of cell adhesion and detachment. Continuous recording for 12 min, 20 min or 2 h was performed with an S-VHS videotape recorder (SVO-9500MDP, Sony) connected to a video-timer (VTG, Tokyo, Japan). Counting the cells in contact with the surface was performed for a period of 12 min using Histolab software (Microvision Instruments, Evry, France). Digital images were recorded using Histolab.

For real-time quantitation of adhesion, cells were perfused continuously at a constant shear rate, usually 50 s^{-1} (25–200 s^{-1}) over a cell-free coverslip. All experiments were performed at 22 °C. In some experiments, cells were preincubated with peptides or antibodies 30 min prior to perfusion. Attachment was defined as the number of cells contacting the surface during the first 12 min. Secondary detachment was defined as the number of attached cells that moved by two cell diameters on the surface or were removed from the surface during this period. Adhesion was defined as the number of cells present on the surface after 12 min, i.e. attached cells minus detached cells.

238 P. Legendre et al

In some experiments, fibrinogen conjugated to AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) at a tracer concentration ($2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), was brought into contact with cells prior to their perfusion at 50 s^{-1} . The cell-bound fibrinogen was visualized using a $32\times$ objective coupled to a silicon-intensified tube camera (C2400; Hamamatsu, Middlesex, NJ, USA).

To monitor spreading under shear conditions, the cells were first perfused for 12 min at 50 s^{-1} followed by a 2-h perfusion at 50 s^{-1} of adherent cells with IMDM only. Resistance to detachment of adherent cells was assessed by perfusion of IMDM through the chamber at different flow rates, which were increased twofold every 5 min up to a maximum of $3200 \mu\text{L min}^{-1}$ (1600 s^{-1}) as previously described [8].

Immunofluorescence staining and confocal microscopy

Adherent cells onto fibrinogen-coated coverslips were fixed with 2% paraformaldehyde (Carlo Erba, Val de Reuil, France) in PBS for 30 min and stored at 4°C . For immunofluorescent staining, the cells were permeabilized for 5 min in 0.1% Triton X-100 in PBS, then incubated for 30 min with the anti- β_3 integrin mAb P37 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ in PBS), washed and incubated with $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of secondary antibody conjugated to Alexa-Fluor 546 (Molecular Probes). A negative control was performed using purified immunoglobulin G from mouse ascites at the same protein concentration. For actin labeling, permeabilized cells were incubated at room temperature for 30 min with $50 \mu\text{L}$ of 30 nM AlexaFluor 488-phalloidin (Molecular Probes) in PBS containing 3% (w/v) bovine serum albumin (Calbiochem). Coverslips were then washed twice and mounted in mounting solution containing glycerol in PBS (9:1 v/v). AlexaFluor 488/AlexaFluor 546 staining were analysed with a Zeiss LSM510 confocal microscope system on an inverted microscope Axiovert 200M using a 100 (na:1.4) plan-apochromat objective (Carl Zeiss). Fluorescence excitation was obtained using a 488-nm Ar-ion laser line and a 543-nm HeNe laser line respectively.

Statistics

Data were analyzed using StatView statistical software package (version 5; SAS Institute, Cary, NC). Cell adhesion mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N was compared with Student's unpaired *t*-test for continuous variables. $P < 0.05$ was considered statistically significant. All data are presented as mean and SEM.

Results

The high affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N integrin mutant mediates CHO cell adhesion at higher shear rates than the low affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ wt receptor

To investigate the influence of the affinity state of integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ in mediating cell adhesion under flow conditions, we

used CHO cell clones stably transfected with either the low affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ wt receptor or the high affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant [13,16]. Both cell clones have similar expression levels of the $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor as demonstrated by FACS analysis using mAbs 130 directed to the β_3 subunit and AP2 directed to the $\alpha_{11b}\beta_3$ complex. In addition, the increased binding of mAb pl-55 confirmed the constitutive expression of activated $\alpha_{11b}\beta_3$ by $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N-expressing cells, in contrast to cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ wt (Fig. 1).

We used a quantitative approach to determine whether cells expressing the gain-of-function $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N receptor would adhere more strongly to immobilized VWF or fibrinogen, compared with cells expressing the low affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ wt receptor. Attachment of $\alpha_{11b}\beta_3$ wt-expressing cells to VWF or fibrinogen was measured under flow conditions as a function of time. An increasing number of cells was recruited to the surface as a function of time, tending to a plateau at 10–12 min (Fig. 2). We observed that the number of cells detaching from VWF was significantly higher than the number of cells detaching from fibrinogen: at 25 s^{-1} , the difference was 14.2 ± 4.1 vs. 4.2 ± 0.6 ($P < 0.05$) and at 50 s^{-1} , 8.2 ± 1.6 vs. 2.4 ± 0.5 ($P < 0.01$). When compared at the same shear rate, the number of adherent cells, calculated by subtracting the number of detached cells, did not differ significantly between the two adhesive surfaces. All following figures indicate the number of firmly adherent cells at 12 min. Increasing the shear rate from 25 to 50 s^{-1} resulted in a twofold decrease in cell adhesion both on fibrinogen (from 68.5 ± 2.8 to 30.4 ± 2.8 cells), and on VWF (from 72.2 ± 7.4 to 39.8 ± 6.1 cells). Furthermore, at a higher shear rate of 100 s^{-1} , cells expressing the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt receptor were unable to adhere to fibrinogen (5.3 ± 1.4 cells) or to VWF (4.3 ± 1.2 cells). Cell adhesion was dependent on the presence of $\alpha_{11b}\beta_3$, because non-transfected CHO cells attached poorly at 25 s^{-1} (15 cells to VWF and three cells to fibrinogen), and adhesion was abolished at 50 s^{-1} (data not shown).

Compared with cells expressing the wt receptor, adhesion of cells expressing the mutant receptor was of particular interest at a shear rate of 50 s^{-1} , because significantly more CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N cells (63.3 ± 2.9) adhered to fibrinogen ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) than did CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ wt cells (38.7 ± 2.4 , $P < 0.0001$, Fig. 3A). At 100 s^{-1} , the difference between the two cell clones was even more striking, as adhesion of $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N cell clone reached 40.5 ± 3.8 cells/field while only 5.3 ± 1.7 cells/field were found for the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt cell clone ($P < 0.001$). Finally, at 200 s^{-1} , $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N-expressing cells were unable to adhere. Similar findings were observed at a higher fibrinogen concentration (Fig. 3A). In addition, adhesion of CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N cells to fibrinogen at 25 s^{-1} was 68.4 ± 5.8 cells/field, not significantly different from adhesion at 50 s^{-1} (data not shown). Significant differences between the two cell clones were also found when comparing the number of adherent cells to VWF (Fig. 3B), e.g. adhesion to VWF ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 50 s^{-1} was 56.3 ± 4 CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N cells vs. 41 ± 4.6

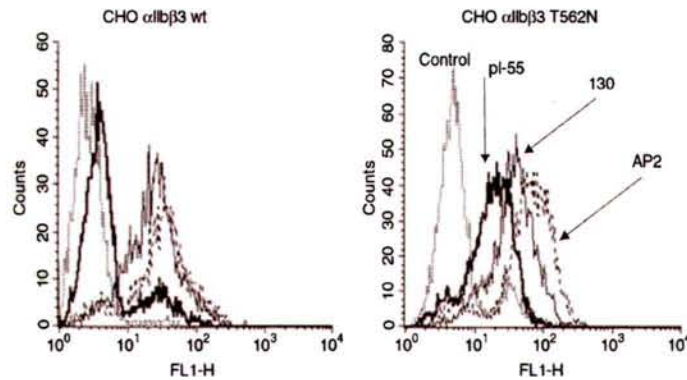


Fig. 1. Flow cytometry analysis of $\alpha_{11b}\beta_3$ expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with human $\alpha_{11b}\beta_3$ wt (wild-type) or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N. CHO cells expressing the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt receptor (left panel) or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant (right panel) were suspended in Iscove's modified Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (IMDM) and labeled with saturating amounts of a primary antibody to human β_3 [monoclonal antibody (mAb) 130, plain thin line], to the $\alpha_{11b}\beta_3$ complex (mAb AP2, hatched line), or to the activated form of the $\alpha_{11b}\beta_3$ complex (mAb pi-55, thick line). The isotypic control is shown as the dotted line. The ordinate depicts the number of cells per channel and the abscissa depicts the relative fluorescence intensity in arbitrary units.

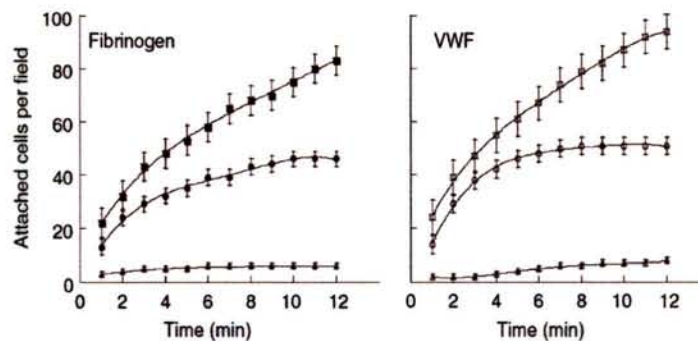


Fig. 2. Time course of cell adhesion mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ wt to fibrinogen, or von Willebrand factor (VWF). Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing the low affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ wt (wild-type) receptor were suspended in Iscove's modified Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (IMDM) at 1.2×10^6 cells mL^{-1} and perfused continuously at a constant shear rate of 25 s^{-1} (\blacksquare , \square), 50 s^{-1} (\bullet , \circ), or 100 s^{-1} (\blacktriangle , \triangle) on a coverslip coated with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ fibrinogen (closed symbols) or VWF (open symbols). Cells attaching on the surface were counted using Histolab software (mean \pm SEM of three experiments).

CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ wt cells ($P < 0.05$) and at 100 s^{-1} , 37.9 ± 5.2 vs. 4.3 ± 1.2 cells ($P < 0.01$). These findings confirm that 50 s^{-1} is a minimal shear rate to discriminate between the cells expressing the wt and the activated receptor. Under the different shear conditions, surface attachment of $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N-expressing cells was always irreversible, without secondary detachment. Within the range of shear rates examined in this study ($25\text{--}200 \text{ s}^{-1}$), we selected 50 s^{-1} as the most appropriate condition to compare cell adhesion mediated either by wt or mutant receptor.

To confirm the involvement of the constitutively active receptor, we performed binding experiments under flow conditions, using the property of soluble fibrinogen to bind to the active $\alpha_{11b}\beta_3$, whereas it is unable to bind to the resting receptor [19]. To this end, cells were preincubated with fibrinogen conjugated to AlexaFluor 488 prior to the perfusion at 50 s^{-1} . Adherent cell expressing the activated $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor

($\alpha_{11b}\beta_3$ T562N or DTT-treated $\alpha_{11b}\beta_3$ wt) were fluorescent, reflecting their ability to bind soluble fibrinogen, whereas adherent cells expressing the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant preincubated with RGDS, or expressing the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt, were unable to bind soluble fibrinogen (Fig. 4). These data clearly show that the increase in cell adhesion measured for $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N cells, when compared with $\alpha_{11b}\beta_3$ wt cells, is dependent on the activation state of the $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor.

Cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N receptor undergo cytoskeletal rearrangement under continuous shear flow conditions

To investigate whether under continuous shear rates, attached cells could undergo ligand-induced outside-in signaling leading to cell spreading, we compared the morphology of adherent cells expressing either the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt

240 P. Legendre et al

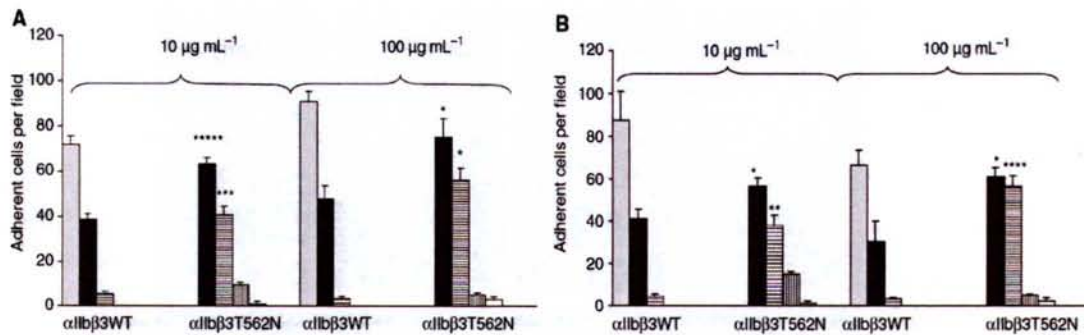


Fig. 3. Effect of shear rate on cell adhesion mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ wt (wild-type) or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N to fibrinogen, or von Willebrand factor (VWF). Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N were perfused at increasing shear rates over fibrinogen (A) or VWF (B) at 10 or 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cell attachment to the surface at 12 min decreases as a function of shear rate: 25 s^{-1} (gray bars), 50 s^{-1} (black bars), 100 s^{-1} (horizontal lines), 150 s^{-1} (vertical lines), and 200 s^{-1} (white bars) (mean \pm SEM of three experiments). Asterisks depicts *P*-values of Student's *t*-test for unpaired samples of cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ wt vs. those expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N: *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; ****, *P* < 0.005; *****, *P* < 0.0001.

or the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N receptor. In one series of experiments, the shear rate was maintained constant at 50 s^{-1} for different periods of time until full spreading occurred. Cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N underwent time-dependent cytoskeletal rearrangements, with flattening of the cells after 20 min and full spreading after 2 h (Fig. 5, panels A–D). Interestingly, under shear conditions, the cell shape and morphology were more homogenous than seen for cells under static conditions (not shown). In a different set of experiments, cells were first perfused for 12 min at 50 s^{-1} , the cell suspension was then replaced by IMDM alone. The shear rates were then increased stepwise (50, 100, 200, 400, 800, and 1600 s^{-1}) every 5 min to measure cell detachment. We found that during IMDM perfusion, both wt and mutant receptors supported irreversible cell adhesion to fibrinogen, as shown by the absence of cell detachment even at the high shear rate of 1600 s^{-1} (Fig. 5, panels E–G).

We used immunofluorescence and confocal microscopy to visualize focal adhesions and actin filaments (Fig. 6). After 120 min, fully spread cells expressing either $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N displayed an elongated shape with well-structured stress fibers connected to focal adhesions and colocalization of β_3 at the tips of stress fibers. Compared with static conditions, no difference was found in the distribution of actin and β_3 staining (Fig. 6). At an earlier time of 20 min, adherent cells under shear conditions were devoid of actin stress fibers, but presented subcortical actin staining and some organization of actin fibers. Clusters of β_3 were also visible (Fig. 6). These characteristics were also seen with cells that adhered under static conditions (data not shown). These findings indicate that continuous shear flow did not disrupt the interaction of cells with fibrinogen and that cytoskeleton reorganization and actin polymerization occurred similarly when cells were plated on the substrate under static conditions. This comparison between static and flow conditions did not rule out a contribution of endogenous $\alpha_v\beta_3$ in mediating outside-in signaling.

Adhesion to fibrinogen of CHO cells expressing the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant does not involve the $\alpha_v\beta_3$ receptor under continuous shear flow conditions

It has been previously reported that the $\alpha_v\beta_3$ integrin is involved in melanoma cell adhesion to fibrinogen or to VWF under shear conditions [7]. As CHO cells transfected with human β_3 cDNA express the chimeric α_v (hamster) β_3 (human) receptor, we tested its potential involvement in supporting cell adhesion under flow conditions. We, therefore, measured CHO cell adhesion at 50 s^{-1} in the presence of two $\alpha_v\beta_3$ -selective inhibitors, the blocking anti- $\alpha_v\beta_3$ mAb LM609 and the $\alpha_v\beta_3$ -specific antagonist Ro65-5233/001 [13]. Both inhibitors completely blocked adhesion of CHO cells expressing only the chimeric α_v (hamster) β_3 (human) receptor, while in contrast, they had no inhibitory effect on cell adhesion to fibrinogen mediated by the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N receptor (Fig. 7). Interestingly, at a shear rate of 25 s^{-1} , both $\alpha_v\beta_3$ -specific antagonists inhibited adhesion to VWF of cells expressing the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt receptor (*P* < 0.01), but not the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant (Table 1). Therefore, cell adhesion to fibrinogen mediated by either $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N occurred independently of $\alpha_v\beta_3$. As adhesion to fibrinogen was specific for $\alpha_{11b}\beta_3$ under shear conditions, subsequent experiments were performed in the absence of $\alpha_v\beta_3$ inhibitor.

Inhibition by fibrinogen derived peptides: a different temporal involvement of the γ -chain dodecapeptide HHLGGAKQAGDV and RGDS

We have recently shown that the $\alpha_{11b}\beta_3$ -fibrinogen interaction during cell adhesion is a two-step mechanism relying on two distinct contact sites in fibrinogen that function independently, with the first step consisting of an interaction of α_{11b} with the γ -chain dodecapeptide sequence (H12) mediating cell attachment independently of RGDS involvement, and the second step leading to cell spreading, which is mediated through

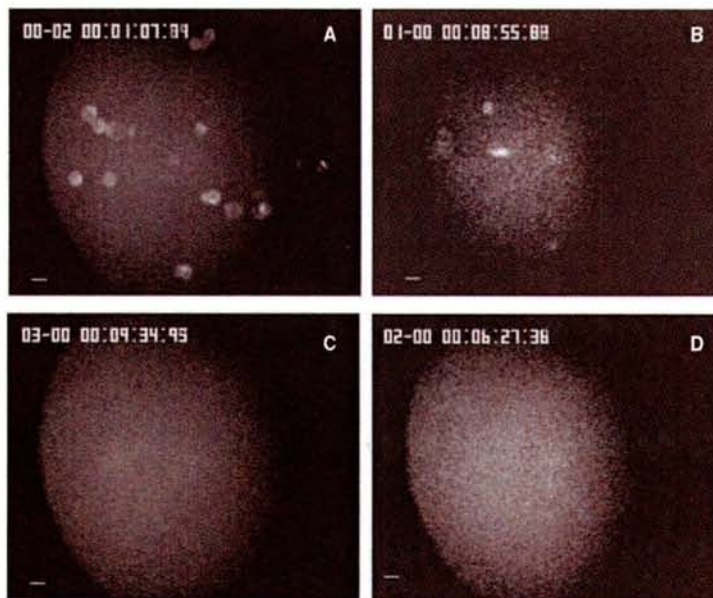


Fig. 4. Direct binding of fibrinogen to cells adhering to solid-phase fibrinogen. Fibrinogen labeled with Alexa488 was preincubated prior to the perfusion at 50 s^{-1} with cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N (panels A and C), or $\alpha_{11b}\beta_3$ wt (wild-type) (panels B and D). Chinese hamster ovary (CHO)- $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N were pretreated with Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) (panel C) or not treated (panel A). Cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ wt were activated with dithiothreitol (DTT) (panel B) or not treated (panel D). Only cells expressing the activated $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor were able to bind soluble fibrinogen (panels A and B), while inactivated cells did not (panels C and D). Images were recorded with a Hamamatsu camera. Bar is $10\ \mu\text{m}$.

RGDS recognition by the β_3 chain [13]. To investigate this mechanism under shear conditions, we studied the inhibitory effect of a synthetic peptide corresponding to the H12 or the RGDS motifs, on cell attachment to fibrinogen at 50 s^{-1} . Figure 8A shows that the H12 peptide dose-dependently inhibited cell adhesion to fibrinogen mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ wt or $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N with 50% inhibition achieved in the presence of 240 and $190\ \mu\text{M}$, respectively, and complete inhibition in the presence of $800\ \mu\text{M}$ H12.

The effect of the RGDS peptide (10 – $1000\ \mu\text{M}$) was different, because it increased the proportion of reversibly adhering cells over total adherent cells (Fig. 8B,C). At higher concentrations of RGDS, initial contact was also inhibited. Interestingly, these effects were observed on cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N in the presence of 10-fold lower concentrations of peptide than those required for inhibition of $\alpha_{11b}\beta_3$ wt cells. The observation in real-time clearly indicated that the H12 motif inhibited initial attachment, but did not influence the stability of adhesion; whereas in the presence of RGDS, the cells adhered reversibly in two ways, either they detached following their initial attachment or they translocated on the surface (see supplementary material). These results suggest that the H12 motif allows initial adhesion, in contrast to the RGDS site, which strengthens the stability of adhesion. Finally, we demonstrated that the fibrinogen fragment D, devoid of an RGD sequence, was able to support adhesion of cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ wt at 50 s^{-1} in a reversible manner. In contrast, cells expressing $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N were able to adhere to fragment D at 50 or 100 s^{-1} in an irreversible manner (data not shown), suggesting that adhesion mediated by the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant occurs

without the synergistic role of the RGDS sequence in outside-in signaling.

Discussion

Increased interaction between the mutant receptor and its ligand

Our findings indicated that the mutant receptor mediated higher cell adhesion at 50 or 100 s^{-1} than the low affinity receptor. At 50 s^{-1} , we observed that the high affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N receptor supported a 1.6-fold higher adhesion than that mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ wt, in agreement with the 1.6-fold higher cell adhesion mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ Pro33 (i.e. PI^{A2}), than by $\alpha_{11b}\beta_3$ Leu33 (i.e. PI^{A1} or $\alpha_{11b}\beta_3$ wt) [6]. However, at 100 s^{-1} , $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N-mediated adhesion was sevenfold higher than that mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ wt, while at 125 s^{-1} , adhesion mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ Pro33 was 2.6-fold that mediated by wt. There may be at least two reasons for the different strength of cell adhesion at the highest shear rate used in our study (100 s^{-1}) vs. that (125 s^{-1}) reported in [6]. First, we found a consistent effect of increasing shear rates, resulting in decreased adhesion mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$. In contrast, adhesion unexpectedly increased between 25 – 50 s^{-1} and decreased between 50 and 125 s^{-1} [6]. More importantly, in contrast to PI^{A2} , the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N mutant causes spontaneous binding to fibrinogen and PAC-1 [16], as well as to ligand-induced binding sites (LIBS)-specific anti- β_3 antibodies [13]. As the receptors displayed similar density and accessibility on the cell surface [13], the differences of cell adhesion under shear are likely to involve the activation state of

242 P. Legendre et al

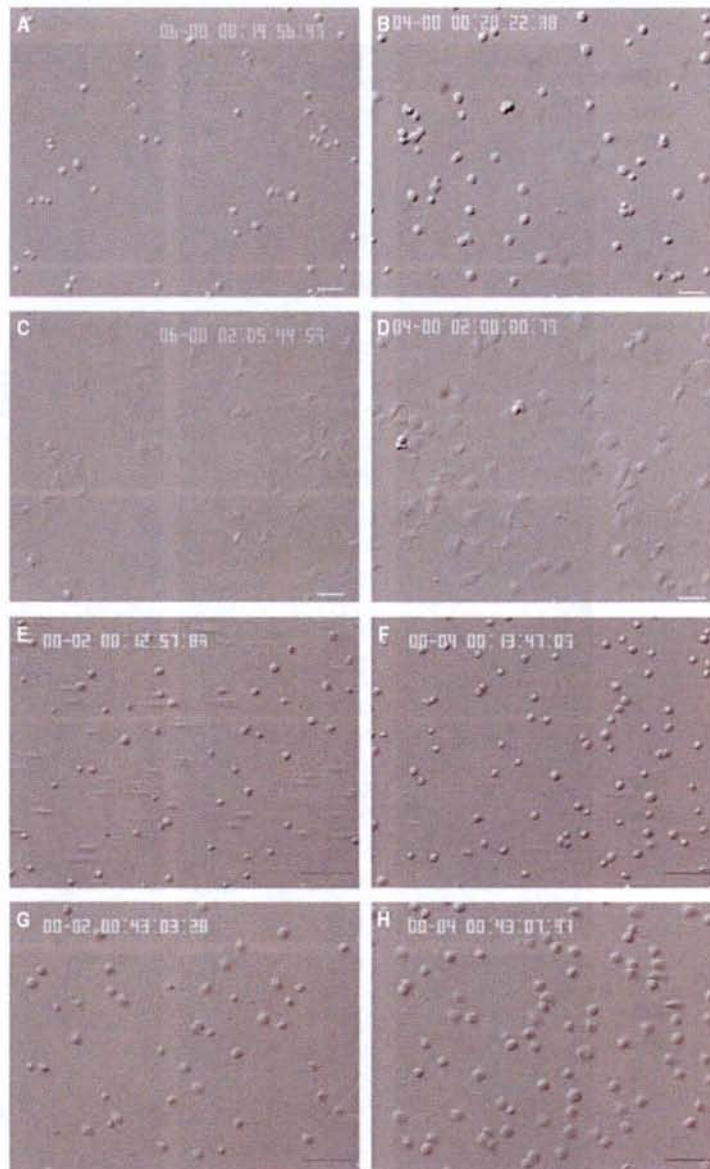


Fig. 5. Morphology of cells adherent and spread onto fibrinogen under varying shear rates. Cells expressing the $\alpha_{11b}\beta_3$ wt (wild-type) receptor (panels A, C, E, and G) or the $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N receptor (panel B, D, F, H) were perfused for 12 min at 50 s^{-1} before the cell suspension was replaced by Iscove's modified Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (IMDM). Buffer was then perfused at the same shear rate of 50 s^{-1} for either 8 min (panels A and B) or 2 h (panels C and D). Alternatively, after 12 min, adherent cells shown on panels E and F were submitted to IMDM perfusion at shear rates increasing twofold every 5 min up to a maximum of 1600 s^{-1} . Panels G and H depict images recorded after 45 min showing that cells were spread and were not displaced (note their corresponding position between panels E and G, and panels F and H). Bar = $50\text{ }\mu\text{m}$.

the $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor expressed on the cell surface. This was confirmed by showing in flow conditions that adherent cells expressing the activated $\alpha_{11b}\beta_3$ were labeled with soluble fibrinogen. The flow results in disruption of non-covalent bonds between non-activated integrins and their ligand, and the strengthening of attachment occurs rapidly after the formation of receptor-mediated bonds with its ligand, by a so-called fitting process, which involves both passive physical processes and active cell reorganization and precedes the process of cell

spreading [20]. Among these parameters, the traction force exerted on cells could be influenced by the cell diameter. Surprisingly, comparison of adherent cells at 50 s^{-1} indicated a larger diameter ($15.4 \pm 0.4\text{ }\mu\text{m}$) of $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N-expressing cells than that of $\alpha_{11b}\beta_3$ wt cells ($13.1 \pm 0.2\text{ }\mu\text{m}$). However, the resulting traction force on the smaller (wt) arrested cells would be 72% of that exerted on the mutant; thus, it is unlikely that the size would account for the difference between the number of cells adhering at this shear rate.

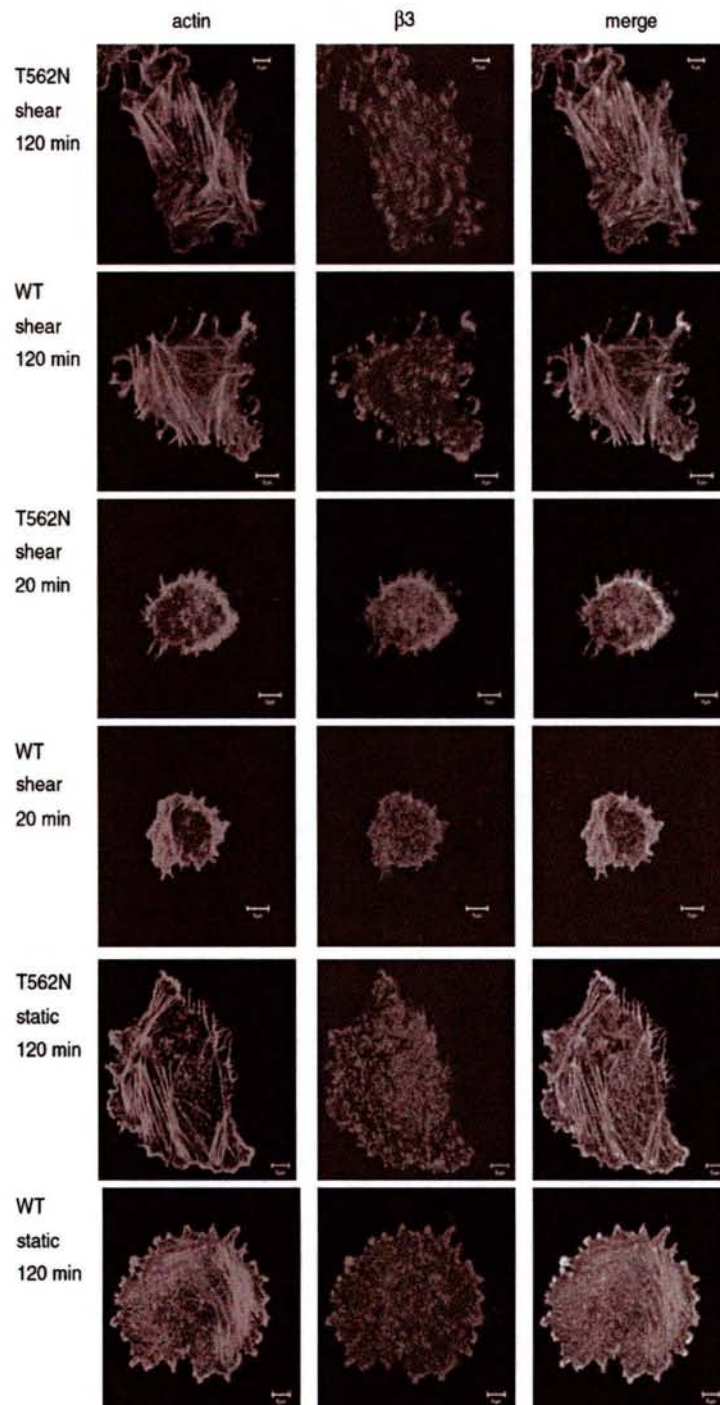


Fig. 6. Immunofluorescence analysis of the intracellular localization of actin and recombinant $\alpha_{11b}\beta_3$;wt (wild-type) or $\alpha_{11b}\beta_3$;T562N expressed by cells adherent to fibrinogen under shear or in static conditions. Cells were allowed to adhere and spread under continuous shear of 50 s^{-1} or under static conditions. Adherent cells were fixed and permeabilized before staining with AlexaFluor 488-phalloidin for actin and with anti- β_3 P37 monoclonal antibody (mAB) as primary antibody and AlexaFluor546-conjugated secondary antibody. AlexaFluor 488/AlexaFluor 546 staining were analysed with a Zeiss LSM510 confocal microscope system. Bar = $5 \mu\text{m}$.

244 P. Legendre et al

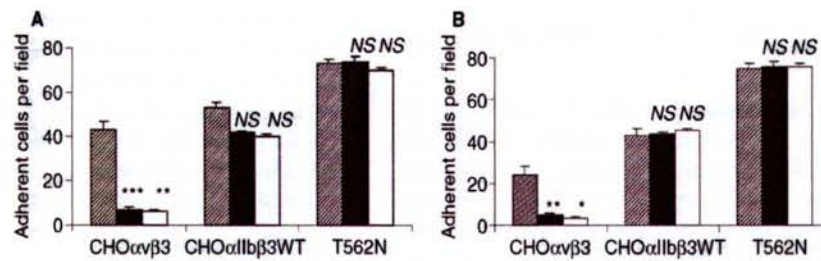


Fig. 7. Effect of $\alpha_{IIb}\beta_3$ -selective inhibitors on cell adhesion to von Willebrand factor (VWF), or fibrinogen at 50 s^{-1} . Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with human β_3 cDNA alone and expressing the chimeric $\alpha_{IIb}(\text{hamster})\beta_3(\text{human})$ receptor, or transfected with human $\alpha_{IIb}\beta_3$ (wild-type) or $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N were preincubated for 30 min with buffer (hatched bar) or with $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ monoclonal antibody (mAb) LM609 (black bar) or $10\text{ }\mu\text{M}$ $\alpha_{IIb}\beta_3$ -specific antagonist Ro65-5233/001 peptidomimetic (white bar). Adhesion to (A) VWF, or (B) fibrinogen was measured after 12 min as described in the legend to Fig. 3 (mean \pm SEM of three experiments).

Table 1. Effect of $\alpha_{IIb}\beta_3$ -selective inhibitors on cell adhesion to VWF or fibrinogen at different shear rates

Substrate	Shear rate (s^{-1})	Wild-type			T562N		
		None	LM609	Ro65	None	LM609	Ro65
Fibrinogen	25	74 ± 5.8	59 ± 5.8	57 ± 4.4	50.3 ± 7.3	41.3 ± 9	42.3 ± 7.6
Fibrinogen	50	67 ± 1.5	67.7 ± 13.1	64.3 ± 4.2	78 ± 7.1	77.7 ± 13.7	67 ± 25
Fibrinogen	100	NA	NA	NA	33 ± 3.2	15 ± 8.1	19 ± 4.7
VWF	25	60 ± 3.8	$27.3 \pm 5.7^*$	$26.3 \pm 6.3^*$	41.7 ± 15.2	25.3 ± 6.7	26.7 ± 6.2
VWF	50	59 ± 6.2	50.6 ± 8.2	49 ± 6.4	72.7 ± 16.6	89.3 ± 14.3	67.3 ± 12.8
VWF	100	NA	NA	NA	22.6 ± 2.4	15 ± 1.5	22.3 ± 2.9

CHO cells transfected with human $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt or $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N were preincubated for 30 min with buffer, mAb LM609 or Ro65-5233/001 peptidomimetic, as described in the legend to Fig. 7.

VWF, von Willebrand factor; CHO, Chinese hamster ovary; mAb, monoclonal antibody; wt, wild-type; NA, not applicable.

The values represent mean \pm SEM of three experiments; *, $P < 0.01$; Student's t -test for unpaired samples of cell adhesion in the absence of inhibitor vs. in the presence of inhibitor. Other values are non-significant.

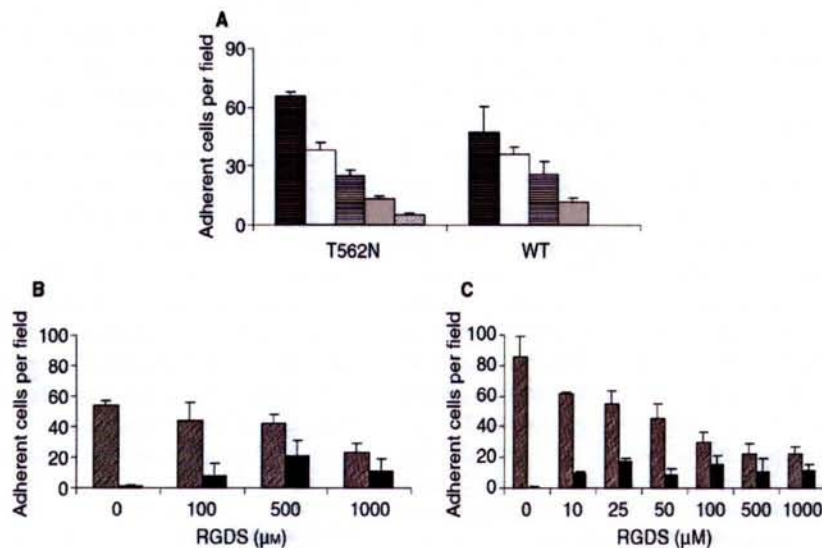


Fig. 8. Effect of fibrinogen-derived peptides on cell adhesion to fibrinogen at 50 s^{-1} . (A) Cells expressing $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt (wild-type) or $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N were preincubated for 30 min with increasing concentrations of the blocking anti- α_{IIb} γ -chain dodecapeptide sequence (H12), as indicated: white lines, no peptide; white bar, $100\text{ }\mu\text{M}$; horizontal black bar, $200\text{ }\mu\text{M}$; gray bar, $400\text{ }\mu\text{M}$; black dots, $800\text{ }\mu\text{M}$. (B) Effects of Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide on adhesion of $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt, or (C) $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N were measured. In addition to counting the total number of cells adherent on the surface after 12 min (hatched bar), reversible adhesion was also determined (black bar).

Comparison of $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N or $\alpha_{11b}\beta_3$ wt integrin activation and downstream signaling

The $\alpha_{11b}\beta_3$ integrin has served as a model to understand the mechanism of outside-in signaling in integrin activation [21]. Fibrinogen binding becomes progressively irreversible and promotes integrin clustering and further conformational changes transmitted to the cytoplasmic tails. This results in the recruitment of effectors to form integrin-based signaling complexes. Within the time frame of the experiment, we have observed several responses known to require the activation of integrins by their specific ligands: once adherent to their substrate, both the wt and mutant receptors mediated irreversible cell adhesion to fibrinogen, as shown by the absence of cell detachment even at the high shear rate of 1600 s^{-1} . In addition, we observed that a continuous shear rate of 50 s^{-1} applied for prolonged periods of time, initiated cytoskeleton reorganization and focal adhesion, and resulted in a more homogenous morphology of cells than in the absence of shear stress. This result is in agreement with the hypothesis that integrin–ligand interaction and integrin activation are necessary to balance the shear force acting on the cell. The range of shear rates that we have studied is compatible with the one reported for integrin activation and downstream signaling central to the endothelial-specific shear stress response [22]. Both $\text{PI}^{\text{A}2}$ and $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N receptors mediate an increased outside-in signaling response upon cell adhesion to fibrinogen consisting of pp125FAK phosphorylation, activation of mitogen-activated protein kinase, myosin light chain kinase, serine/threonine phosphatases, or RhoA [13,23–25].

Synergistic role of the two adhesion sequences of fibrinogen

It has been established that both the γ -chain dodecapeptide motif and the RGDS sequence interact with $\alpha_{11b}\beta_3$ in a two-step mechanism, both sequentially and synergistically, to promote cell spreading [26,27]. In the present study, real-time observation confirmed these data, by showing that the two fibrinogen binding sequences play a synergistic role: while the dodecapeptide motif is absolutely necessary for the initial attachment of either wt or mutant $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N, the RGDS sequence is involved in the stability of adhesion and the resistance to detachment. This was confirmed by the fact that at 50 s^{-1} , fibrinogen fragment D supported adhesion mediated by both receptors, while at 100 s^{-1} , fragment D supported adhesion mediated only by mutant $\alpha_{11b}\beta_3$, which could be abrogated by the dodecapeptide sequence (data not shown). In the presence of RGDS, we observed that adhesion became reversible. Interestingly, compared with wt, a 10-fold lower concentration of RGDS was required to reach a similar reduction of cell adhesion to fibrinogen mediated by $\alpha_{11b}\beta_3$ T562N, suggesting that molecular changes in the β_3 subunit induced by the T562N mutation are capable of inducing outside-in signaling independent of the RGD-induced conformational changes normally necessary for this signaling. This finding strengthens the argument that

RGD is unable to support irreversible adhesion in shear conditions. This agrees with our previous findings that the functional role of the RGD site is not in cell attachment, but is to imprint a conformational change on the β_3 subunit required for additional outside-in signaling events including RhoA activation, actin stress fiber organization, and focal adhesion plaque formation [26,27].

Adhesion of $\alpha_{11b}\beta_3$ -expressing CHO cells to fibrinogen is independent of the chimeric hamster(α_v)-human(β_3) receptor

The chimeric receptor $\alpha_v(\text{hamster})\beta_3(\text{human})$ expressed on CHO cells together with the human $\alpha_{11b}\beta_3$ wt did not contribute to cell adhesion to fibrinogen but participated in adhesion to VWF at 25 s^{-1} , as shown by the distinct inhibitory effect of mAB LM609 or specific $\alpha_v\beta_3$ peptide. In contrast, $\alpha_v\beta_3$ inhibitors did not modify adhesion of cells expressing the high affinity $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor, despite the fact that the T562N mutation resulted in activating both $\alpha_{11b}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$ at the cell surface [16]. Indeed, cells expressing β_3 T562N mutant associated to endogenous α_v had the ability to bind soluble fibrinogen, and to expose constitutively some LIBS epitopes that were absent from cells expressing β_3 wt [16].

Implications for platelet interactions to fibrinogen or VWF at high shear rates

We demonstrate that activation of the $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor is associated with stabilization of integrin binding to fibrinogen under force. It was shown that at 50 s^{-1} , adhesion and spreading on fibrinogen was seen only in platelets that could be activated via the inside-out signaling, while these functions were abolished by pretreatment of platelets with prostaglandin E1 (PGE1) [19]. Thus, it is interesting to comment upon our findings in the context of platelet adhesion in high shear conditions, where following the initial contact of GPIb with the A1 domain of VWF, platelet stabilization requires the activation of $\alpha_{11b}\beta_3$. Several groups have demonstrated that platelets rolling on a VWF surface have the ability to undergo a GPIb-mediated activation of the $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor at high shear rates [28–30]. Thus, we demonstrated that while both inactive and activated $\alpha_{11b}\beta_3$ support platelet adhesion to VWF under static or very low shear rates (for CHO cells in the range of $<25\text{ s}^{-1}$), only activated $\alpha_{11b}\beta_3$ supported cell adhesion at higher shear conditions. Therefore, rolling and translocation of platelets on VWF would be replaced by firm adhesion and spreading only when either of two conditions occurs first: the flow rate drops to zero or the $\alpha_{11b}\beta_3$ receptor becomes activated.

Acknowledgements

The study was supported by an EU Research Training network HPRN-CT-2002-253 (DB, NK). For the gift of mABs and peptides, we thank Dr S. Meyer-Reigner (Pharma Division, F. Hoffman-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) for mAB pl-55 and the $\alpha_v\beta_3$ antagonist Ro 65-5233/001,

246 P. Legendre et al

Dr J. Gonzalez-Rodriguez (CSIC, Madrid, Spain) for mAB P37, Dr T.J. Kunicki (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) for mAB AP2, Dr D. Tsoukatos (Department of Chemistry, University of Ioannina, Greece) for dodecapeptide $\gamma^{400-411}$, and Dr J.P. Girma (INSERM Unit 143, Paris) for mAB 130.

We would also like to thank Dr E. Moehlhoffer for her extensive contribution to this study.

Supplementary material

The following material is available online at <http://www.blackwell-synergy.com/doi/jth>:

Supplemental Figure 1. Real-time adhesion of CHO cells expressing $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N to fibrinogen in the absence or the presence of fibrinogen dodecapeptide (400 μ M) or RGDA (100 μ M).

References

- Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 611–6.
- Yap CL, Anderson KE, Hughan SC, Dopheide SM, Salem HH, Jackson SP. Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear-dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/V/IX and integrin α (IIb) β (3). *Blood* 2002; **99**: 151–8.
- Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, Goncalves I, Dopheide SM, Yap CL, Harper IS, Salem HH, Jackson SP. Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin α (IIb) β (3)-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J Biol Chem* 2002; **277**: 2965–72.
- Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin α (IIb) β (3)) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1992; **267**: 11300–6.
- Yap CL, Hughan SC, Cranmer SL, Nesbitt WS, Rooney MM, Giuliano S, Kulkarni S, Dopheide SM, Yuan Y, Salem HH, Jackson SP. Synergistic adhesive interactions and signaling mechanisms operating between platelet glycoprotein Ib/IX and integrin α (IIb) β (3). Studies in human platelets and transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 41377–88.
- Vijayan KV, Huang TC, Liu Y, Bernardo A, Dong JF, Goldschmidt-Clermont PJ, Alevriadou BR, Bray PF. Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin β 3. *FEBS Lett* 2003; **540**: 41–6.
- Pilch J, Habermann R, Felding-Habermann B. Unique ability of integrin α (v) β (3) to support tumor cell arrest under dynamic flow conditions. *J Biol Chem* 2002; **277**: 21930–8.
- Mekrache M, Legendre P, Kieffer N, Baruch D. Activation of integrin α (IIb) β (3) expressed in Chinese hamster ovary cells is required for interaction with solid-phase von Willebrand factor. *Br J Haematol* 2002; **119**: 1024–32.
- Mekrache M, Kieffer N, Baruch D. Activation of recombinant α (IIb) β (3) expressed in Chinese hamster ovary cells exposes different binding sites for fibrinogen or von Willebrand factor: evidence using monoclonal antibodies to α (IIb) β (3). *Br J Haematol* 2002; **116**: 636–44.
- Calzada MJ, Alvarez MV, Gonzalez-Rodriguez J. Agonist-specific structural rearrangements of integrin α (IIb) β (3). Confirmation of the bent conformation in platelets at rest and after activation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 39899–908.
- Puzon-McLaughlin W, Kamata T, Takada Y. Multiple discontinuous ligand-mimetic antibody binding sites define a ligand binding pocket in integrin α (IIb) β (3). *J Biol Chem* 2000; **275**: 7795–802.
- Steiner B, Trzeciak A, Pfenninger G, Kouns WC. Peptides derived from a sequence within β 3 integrin bind to platelet α (IIb) β (3) (GPIIb-IIIa) and inhibit ligand binding. *J Biol Chem* 1993; **268**: 6870–3.
- Salsmann A, Schaffner-Reckinger E, Kabile F, Plancon S, Kieffer N. A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin α (IIb) β (3)-dependent RhoA activation during cell spreading. *J Biol Chem* 2005; **280**: 33610–9.
- Veyradier A, Jumilly AL, Ribba AS, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. New assay for measuring binding of platelet glycoprotein IIb/IIIa to unpurified von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 134–9.
- Schaffner-Reckinger E, Gouon V, Melchior C, Plancon S, Kieffer N. Distinct involvement of β 3 integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 759 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signaling. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12623–32.
- Kashiwagi H, Tomiyama Y, Tadokoro S, Honda S, Shiraga M, Mizutani H, Handa M, Kurata Y, Matsuzawa Y, Shattil SJ. A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the β 3 subunit activates integrins α (IIb) β (3) and α (V) β (3). *Blood* 1999; **93**: 2559–68.
- Perrault C, Lankhof H, Pidard D, Kerbirou-Nabias D, Sixma JJ, Meyer D, Baruch D. Relative importance of the glycoprotein Ib-binding domain and the RGD sequence of von Willebrand factor for its interaction with endothelial cells. *Blood* 1997; **90**: 2335–44.
- Sakariassen KS, Hanson SR, Cadroy Y. Methods and models to evaluate shear-dependent and surface reactivity-dependent anti-thrombotic efficacy. *Thromb Res* 2001; **104**: 149–74.
- Savage B, Bottini E, Ruggeri ZM. Interaction of integrin α (IIb) β (3) with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion. *J Biol Chem* 1995; **270**: 28812–7.
- Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Cell fitting to adhesive surfaces: a prerequisite to firm attachment and subsequent events. *Eur Cell Mater* 2002; **3**: 31–45.
- Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004; **104**: 1606–15.
- Jalali S, del Pozo MA, Chen K-D, Miao H, Li Y-S, Schwartz MA, Shyy JY-J, Chien S. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 1042–6.
- Sajid M, Vijayan KV, Souza S, Bray PF. PLA polymorphism of integrin β 3 differentially modulates cellular migration on extracellular matrix proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 1984–9.
- Vijayan KV, Liu Y, Dong J-F, Bray PF. Enhanced activation of mitogen-activated protein kinase and myosin light chain kinase by the Pro33 polymorphism of integrin β 3. *J Biol Chem* 2003; **278**: 3860–7.
- Vijayan KV, Liu Y, Sun W, Ito M, Bray PF. The Pro33 isoform of integrin β 3 enhances outside-in signaling in human platelets by regulating the activation of serine/threonine phosphatases. *J Biol Chem* 2005; **280**: 21756–62.
- Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, Timmons S. Platelet receptor recognition domains on the α chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry* 1989; **28**: 2909–14.
- Farrell DH, Thiagarajan P. Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J Biol Chem* 1994; **269**: 226–31.
- Goto S, Ikeda Y, Sakdivar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* 1998; **101**: 479–86.
- Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1602–12.
- Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Signaling through GP Ib-IX-V activates α (IIb) β (3) independently of other receptors. *Blood* 2004; **103**: 3403–11.



Discussion

Les résultats présentés dans cet article ont permis de montrer dans un premier temps, que les cellules CHO exprimant le récepteur muté $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3\text{T}_{562\text{N}}$ spontanément actif sont capables d'adhérer au fg et au FvW, et de résister à des conditions de flux plus importantes, par rapport aux cellules exprimant le récepteur $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3\text{wt}$ à l'état de repos. En effet, dans des conditions de flux de 100 s^{-1} , seules les cellules exprimant le récepteur actif adhèrent au fg avec un nombre de cellules de l'ordre de $40,5 \pm 3,8$ cellules par champ, alors que les cellules exprimant l'intégrine $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3\text{wt}$ n'adhèrent pratiquement pas ($5,3 \pm 1,7$ cellules par champ). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Goncalves et collaborateurs qui ont démontré qu'en conditions de flux, l'adhésion ferme des plaquettes au fg immobilisé est dépendante de l'état d'activation de l'intégrine $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ (Goncalves et al., 2003), bien que certains résultats indiquent que des inhibiteurs de l'activation plaquettaire n'ont pas d'effet sur la capacité des plaquettes à former des interactions stables avec une matrice de fg en conditions de flux (Savage et al., 1995; Savage et al., 1996). Cependant, il est intéressant de noter que les conditions expérimentales de flux utilisées au cours de cette étude, entre 25 s^{-1} et 200 s^{-1} , correspondent à des forces de cisaillement qualifiées de faibles en raison d'un flux peu important caractéristique des veines (Kroll et al., 1996; Kulkarni et al., 2000). A l'inverse, il est généralement admis que les forces de cisaillement intermédiaires et élevées sont induites lors de conditions de flux plus importantes, respectivement de l'ordre de 600 s^{-1} (correspondant aux artères) et supérieures à 1600 s^{-1} (retrouvées au niveau des artérioles).

D'autre part, alors que la capacité d'adhérence des plaquettes lors de différentes conditions de flux est un élément primordial dans la formation du thrombus, la résistance au détachement induit par la force du flux est également déterminante. Goncalves et collaborateurs suggèrent qu'au niveau plaquettaire, le maintien de l'interaction $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ -fg sous flux est médié par des signaux calciques initiés par des membres de la familles des Src kinases, notamment Src, et liés à l'activation de la PLC γ 2. Or, nous avons montré que les cellules CHO- $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3\text{T}_{562\text{N}}$

exprimant le récepteur spontanément actif, sont capables de s'étaler complètement sur fg immobilisé en absence d'activation de Src, en conditions statiques (Article 1, Figure 7). Compte-tenu de ce résultat, il serait donc intéressant d'analyser en conditions de flux, le rôle potentiel de Src dans la fermeté de l'engagement $\alpha_{11b}\beta_3$ T₅₆₂N-fg au cours de cet étalement. Il est très probable que les observations réalisées lors d'une telle expérience soient similaires à celles obtenues en conditions statiques, amenant à conclure que par le changement de conformation induit au niveau de la sous-unité β_3 , non seulement la mutation β_3 T₅₆₂N court-circuite l'interaction β_3 -RGD au niveau extracellulaire, mais permettrait également d'initier la cascade de signalisation intracellulaire conduisant à un étalement cellulaire complet et une adhérence stable, indépendamment de l'état d'activation de Src.

En outre, alors que dans nos conditions expérimentales, l'utilisation du modèle cellulaire CHO permet uniquement de considérer les événements de signalisation outside-in mis en jeu, les résultats de Goncalves et collaborateurs indiquent que la libération d'ADP joue également un rôle majeur dans la stabilisation de l'étalement des plaquettes sur le fg immobilisé (Goncalves et al., 2003). Or, nous montrons que les cellules CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ wt et CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ T₅₆₂N attachées sur une matrice de fg, résistent au détachement, même sous conditions de flux élevé (1600 s⁻¹). De plus, la formation des adhérences focales, ainsi que l'organisation de l'actine en fibres de stress, sont similaires aux structures obtenues lors de l'étalement complet en conditions statiques. L'ensemble de nos résultats suggère donc que l'interaction du fg immobilisé avec l'une ou l'autre forme de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ est suffisante pour permettre un étalement cellulaire complet et stable en conditions de flux, indépendamment de voies secondaires de signalisation inside-out.

Une seconde partie de ce travail consista à étudier le rôle joué par les sites RGD et dodécapeptide au cours du processus d'adhérence cellulaire médié par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ sur fg immobilisé en conditions de flux, et à le rapporter aux résultats obtenus en conditions statiques. Dans ce but, nous avons analysé l'effet inhibiteur potentiel de peptides synthétiques correspondant aux deux sites de reconnaissance du fg. Nos résultats montrent dans un premier temps que le peptide correspondant au site dodécapeptide est effectivement capable d'inhiber l'adhérence cellulaire à la fois médiée par le récepteur $\alpha_{11b}\beta_3$ wt et $\alpha_{11b}\beta_3$ T₅₆₂N, et ceci de façon

dose-dépendante. Alors que nous avons montré précédemment en conditions statiques que c'est l'interaction de cette séquence dodécapeptide avec la sous-unité α_{11b} qui est responsable de l'attachement initial de la cellule à la matrice de fg, cette nouvelle observation confirme nos résultats. En outre, nous nous attendions à un effet différent du peptide RGDS, puisque nous proposons un modèle selon lequel l'interaction RGD- β_3 ne jouerait un rôle que dans la signalisation conduisant à l'étalement cellulaire complet. Les résultats obtenus avec le peptide RGDS coïncident également avec notre modèle, puisqu'ils montrent qu'en présence du peptide RGDS, l'adhérence cellulaire au fg n'est plus irréversible. Ces investigations permettent finalement de suggérer que l'attachement initial médié par la reconnaissance du site dodécapeptide correspond à une phase d'adhérence réversible en condition de flux, alors que l'engagement du motif RGD conduit à un étalement cellulaire complet synonyme de stabilité de l'adhérence et de résistance au détachement.

Enfin, l'utilisation en conditions de flux du fragment D de fg ne contenant que la séquence d'attachement dodécapeptide a permis de vérifier l'ensemble de nos résultats, puisque les cellules CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ wt furent capables d'adhérer de façon réversible, alors que l'adhérence des cellules CHO- $\alpha_{11b}\beta_3T_{562}N$ fut irréversible, confirmant la capacité de la mutation $\beta_3T_{562}N$ à mimer l'interaction synergique β_3 -RGD.

DISCUSSION
ET
CONCLUSIONS



Au cours de notre travail, nous avons étudié le mode de fonctionnement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ lors de son interaction avec le fibrinogène. Nous avons notamment cherché à dissocier le rôle précis joué par chacun des deux sites $^{572}\text{RGD}^{574}$ et dodécapeptide de reconnaissance du fg au cours du processus d'adhérence cellulaire médié par $\alpha_{IIb}\beta_3$. Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi une approche expérimentale basée sur l'utilisation d'un modèle cellulaire, les cellules CHO exprimant l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sauvage ou mutée, ainsi que sur l'utilisation de fragments protéolytiques du fg ne contenant que l'un ou l'autre des deux sites d'interaction.

L'ensemble de notre étude nous a permis de décrire un modèle de reconnaissance du fg immobilisé par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ce modèle, basé sur un mode de fonctionnement en 2 étapes, montre que c'est en premier lieu la séquence synergique dodécapeptide qui permet la reconnaissance spécifique du fg par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et l'attachement cellulaire. Cette première étape autoriserait alors l'interaction avec le motif $^{572}\text{RGD}^{574}$, conduisant à l'étalement cellulaire complet, si bien que nous proposons que le rôle fonctionnel majeur de ce site RGD serait uniquement de permettre d'achever la cascade de signalisation outside-in responsable de l'étalement complet et stable des cellules.

L'état d'activation de l'intégrine joue un rôle majeur dans la reconnaissance du ligand. En effet, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ n'interagit avec le fg plasmatique soluble que sous sa forme de haute affinité. Cependant, au niveau du fg immobilisé, l'engagement de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ne requiert pas l'activation du récepteur, suggérant dans ce cas que c'est la reconnaissance du fg et le clustering des intégrines qui conduirait à l'activation du récepteur. Alors qu'au niveau plaquettaire, le processus d'activation est initié par des signaux intracellulaires spécifiques de la signalisation inside-out, l'utilisation des cellules CHO exprimant l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante humaine nous a permis de cibler notre étude sur la signalisation outside-in. Ainsi, nous avons pu montrer qu'en conditions statiques, les cellules CHO exprimant le récepteur actif ou non-actif s'étaient de façon similaire sur le fg, alors qu'en conditions de flux, l'activation du récepteur permet d'adhérer au fg sous un flux plus important, si bien

qu'au niveau vasculaire, les voies de signalisations conduisant à l'activation du récepteur sont primordiales dans l'interaction avec le fg. En outre, nous montrons qu'en absence du site $^{572}\text{RGD}^{574}$, les cellules exprimant l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3\text{T}_{562}\text{N}$ constitutivement active sont capables de s'étaler complètement, alors que les cellules présentant le récepteur $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3\text{wt}$ à l'état de repos sont bloquées au stade de l'attachement. Ces résultats suggèrent que la reconnaissance de la séquence dodécapeptide ainsi que l'activation de l'intégrine, de manière artificielle ou suite à la reconnaissance du motif RGD, sont nécessaires à l'étalement cellulaire sur le fg. Selon notre modèle expérimental, ces conclusions présupposent que l'unique reconnaissance de la séquence dodécapeptide du fg ou au niveau du fragment D de fg n'est pas suffisante pour conduire à l'activation complète de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3\text{wt}$. Cependant, cette interaction initiale avec le dodécapeptide pourrait conduire à un état d'activation intermédiaire tel que le décrivent Xiao et collaborateurs (Xiao et al., 2004). En effet, alors que de nombreux résultats suggèrent que l'activation du récepteur serait initié par des signaux intracellulaires conduisant à une séparation des parties cytoplasmiques de l'intégrine puis des domaines transmembranaires, se propageant au niveau extracellulaire jusqu'au dépliement de l'intégrine, le processus d'activation de l'intégrine induit par la reconnaissance d'un ligand semble différent, et pourrait consister en premier lieu en une séparation des sous-unités de l'intégrine au niveau extracellulaire, puis à la séparation plus tardive des domaines transmembranaires et cytoplasmiques responsable d'un état d'activation maximal (Figure 24).

Ainsi, la première étape de reconnaissance du fg par l'intermédiaire du

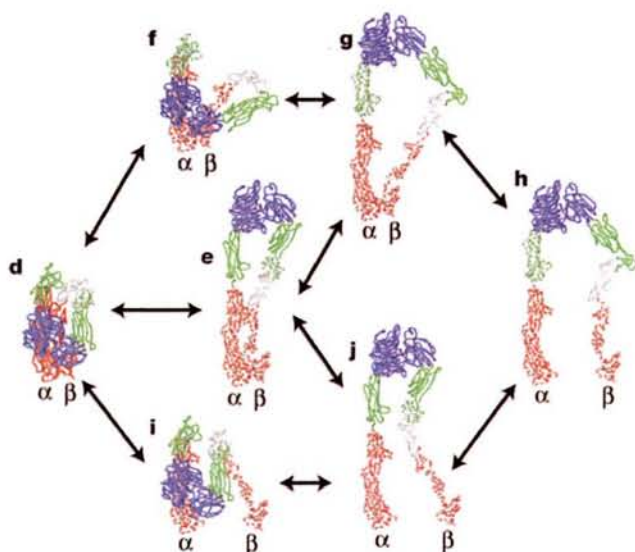


Figure 24: Modèles de réarrangements quaternaires intermédiaires des parties extracellulaires de l'intégrine correspondant à différents stades d'activation. La voie supérieure correspondrait à une activation induite par la reconnaissance d'un ligand. La voie inférieure pourrait être induite par une signalisation provenant de l'intérieure de la cellule (D'après Xiao et al., 2004).

dodécapeptide serait probablement à l'origine de changements conformationnels au niveau extracellulaire du récepteur, permettant l'exposition du site de reconnaissance du motif RGD. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les travaux récents effectués par Arias-Salgado et collaborateurs visant également à étudier le processus d'adhérence cellulaire médié par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ sur fg immobilisé (Arias-Salgado et al., 2005). En effet, ils observent que sans activation du récepteur, les cellules s'attachent mais ne s'étalent pas, alors que l'activation artificielle par un anticorps activateur anti-LIBS6 conduit à l'étalement cellulaire total.

Dans le cadre de la signalisation outside-in, l'étude de l'implication de la protéine tyrosine kinase Src dans la cascade de signalisation conduisant à l'étalement cellulaire sur le fg, a permis de mettre en évidence un rôle évident en aval de la reconnaissance du motif $^{572}\text{RGD}^{574}$, puisque l'inhibition de l'activation de Src n'empêche pas la phase de reconnaissance de la séquence dodécapeptide et l'attachement cellulaire, alors que l'étalement cellulaire complet caractérisé par une activation maximale de RhoA n'est pas observé. Cependant, Src étant l'une des premières protéines recrutées lors de la signalisation outside-in correspondant à la phase d'étalement cellulaire sur fg médiée par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, du fait de son association constitutive avec la sous-unité β_3 (Arias-Salgado et al., 2003), il semble donc anormal qu'en présence d'un inhibiteur de Src, les cellules CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ wt soient tout de même capables d'initier la cascade de signalisation correspondant notamment à l'activation successive des protéines FAK, Cdc42 et Rac1, et conduisant à l'attachement cellulaire sur le fg. La dissociation en deux étapes du premier mécanisme menant à l'attachement cellulaire pourrait fournir un élément de réponse. En effet, dans le cas où la protéine Src est inactivée, la simple interaction physique entre la sous-unité α_{11b} et la séquence dodécapeptide pourrait immédiatement se manifester par un premier stade d'attachement cellulaire et l'apparition de premiers changements conformationnels au niveau des domaines extracellulaires de l'intégrine (Figure 22), sans mise en jeu des protéines de signalisation intracellulaire. L'attachement des cellules CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ wt sur fragment D serait alors plus tardif et plus ferme que celui observé lorsque Src est inactivée. De plus, nos résultats montrent une inactivation quasi-totale de la GTPase RhoA en présence de l'inhibiteur de Src

(Article 1, Figure 7), alors qu'au niveau des cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt attachées sur le fragment D (Article 1, Figure 6), nous observons un niveau d'activation de RhoA de l'ordre de 20 à 40% par rapport à l'activité maximale observée pour les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt étalées sur le fg. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait de ce fait important d'étudier l'état d'activation des protéines situées directement en aval de Src, notamment FAK, Cdc42 et Rac1, lorsque l'activation de Src est inhibée.

D'autre part, nous montrons que les cellules CHO exprimant le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ T₅₆₂N spontanément actif sont capables de s'étaler complètement sur le fg en l'absence d'activation de Src, ainsi que sur le fragment D, suggérant que la mutation β_3 T₅₆₂N provoque un changement conformationnel permettant de court-circuiter le recrutement et le rôle de Src. De ce fait, il apparaît que le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ T₅₆₂N ne nécessiterait que l'interaction initiale avec la séquence dodécapeptide pour initier la signalisation intracellulaire conduisant à l'étalement cellulaire. Il est intéressant de noter que nos observations sont en accord avec les résultats de Wonerow et collaborateurs qui montrent que des plaquettes au repos au niveau desquelles Src est inactivée, sont capables de s'attacher faiblement sur fg immobilisé, alors que l'activation des plaquettes par l'ADP conduit à l'étalement total (Wonerow et al., 2003). Par ailleurs, le processus conduisant à l'étalement des cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ T₅₆₂N étant indépendant de la reconnaissance du motif RGD et n'impliquant pas certaines protéines de signalisation nécessaires au fonctionnement normal du récepteur sauvage, ces résultats expliqueraient la capacité des cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ T₅₆₂N à adhérer au fg sous des conditions de flux plus importantes par rapport aux cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt, en raison d'une reconnaissance du ligand et d'une mise en jeu plus rapide de la machinerie intracellulaire. Cependant, nos résultats diffèrent de certaines données de la littérature, quant à la capacité du récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ actif à médier l'étalement cellulaire indépendamment de l'activation de Src. En effet, en utilisant des cellules exprimant un récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ muté incapable d'activer Src en raison de la substitution du site de fixation de Src au niveau de la sous-unité β_3 , Arias-Salgado et collaborateurs montrent que ces cellules ne peuvent pas s'étaler sur le fg, même après une activation par l'anticorps activateur anti-LIBS6 (Arias-Salgado et al.,

2005). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les changements conformationnels induits par l'anticorps ou la mutation $\beta_3T_{562}N$ sont différents, bien que tous les deux soient responsables de l'activation de l'intégrine. Il est envisageable notamment que la mutation activatrice entraîne des réarrangements structuraux profonds touchant la partie C-terminale transmembranaire et cytoplasmique de β_3 , alors que l'anticorps anti-LIBS6 ne provoquerait que des modifications quaternaires intermédiaires au niveau des domaines extracellulaires du récepteur.

La régulation de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ constitue donc un processus primordial dans la reconnaissance du fg, si bien que l'ensemble des réarrangements tertiaires et quaternaires subis par l'intégrine est actuellement soumis à de très nombreuses investigations. Le rôle de la taline en tant que médiateur indispensable à l'activation du récepteur est notamment particulièrement étudié, d'autant plus que la taline interagit avec la partie cytoplasmique des chaînes β de la plupart des intégrines (Calderwood et al., 2002). Selon le modèle proposé par Calderwood et collaborateurs, le domaine globulaire de la taline induirait l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par rupture du pont salin entre les résidus $\alpha_{IIb}\text{-Arg}^{995}$ et $\beta_3\text{-Asp}^{723}$ (Calderwood et al., 2002; Calderwood et al., 1999; Vinogradova et al., 2002), conduisant à une séparation spatiale des parties cytoplasmiques et transmembranaires de l'intégrine (Ginsberg et al., 2005; Kim et al., 2003). Cependant, alors que de nombreux modèles suggèrent une telle séparation des parties cytoplasmiques, ainsi que l'extension et le dépliement de la partie extracellulaire de l'intégrine, la transmission du signal d'activation inside-out se propageant à travers la membrane plasmique, est sujette à discussions. En effet, certains auteurs sont en faveur d'un modèle de fonctionnement en piston conduisant à un raccourcissement du domaine transmembranaire (Armulik et al., 1999; Partridge et al., 2005; Stefansson et al., 2004), alors que d'autres résultats proposent un mouvement vers l'extérieur des hélices périmembranaires, suite à la fixation de la taline (Vinogradova et al., 2004). En outre, l'élucidation du rôle joué par les interactions entre certains résidus des domaines transmembranaires nécessite de plus amples travaux afin de vérifier le modèle actuellement émis par Ginsberg et collaborateurs, selon lequel les hélices transmembranaires seraient enchevêtrées à l'état de repos, et se sépareraient lors de l'activation, impliquant un raccourcissement

de la partie ancrée dans la membrane (Figure 25) (Ginsberg et al., 2005). Finalement, l'ensemble de ce processus d'activation conduit à l'exposition de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ selon une configuration spatiale permettant la reconnaissance de son ligand spécifique, le fg.

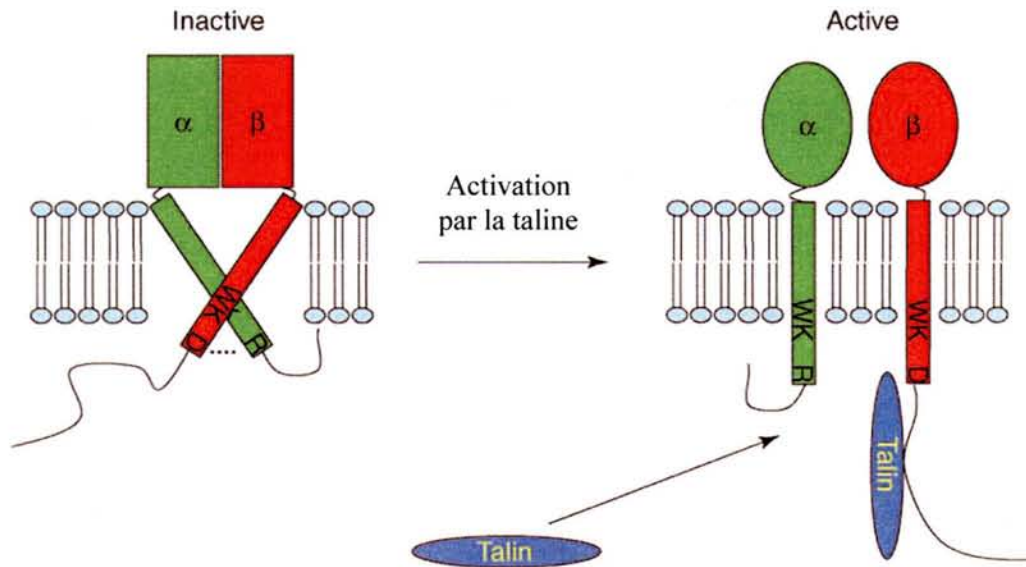


Figure 25: Modélisation du mécanisme d'activation des intégrines médiée par la taline (D'après Ginsberg et al., 2005)

Au niveau du domaine globulaire extracellulaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, la reconnaissance du fg constitue une étape importante au cours de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire. Alors que chacun des deux sites $^{572}\text{RGD}^{574}$ et dodécapeptide du fg est de mieux en mieux caractérisé, l'existence de deux sites distincts spécifiques de reconnaissance du fg au niveau de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ reste à être confirmée au niveau moléculaire. En effet, bien que des études structurales montrent la conformation spatiale adoptée par le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface membranaire, et notamment sa tête globulaire (Xiao et al., 2004), et définissent à un niveau atomique la localisation précise du site d'interaction avec le motif RGD (Xiong et al., 2002), le mode de reconnaissance de la séquence dodécapeptide au niveau du récepteur et le rôle fonctionnel de cette interaction ne sont pas encore définis. En effet, plusieurs idées s'opposent. Au cours des années, il a été suggéré que les motifs RGD et KQAGDV de la séquence dodécapeptide se fixaient à un seul et

même site (Lam et al., 1987), à deux sites liés de manière allostérique (Hu et al., 1999), ou à deux sites distincts (Santoro and Lawing, 1987; Bennett et al., 1988; D'Souza et al., 1990; Cierniewski et al., 1999). Néanmoins, bien que certains auteurs prônent toujours en faveur d'une seule et même région de reconnaissance située à l'interface entre les deux sous-unités, avec les résidus R du motif RGD et K du motif KQAGDV de la séquence dodécapeptide se fixant au niveau de la sous-unité α_{IIb} et les résidus D au niveau de β_3 (Arnaout et al., 2002), il semblerait que l'hélice β de la sous-unité α_{IIb} soit spécifiquement impliquée dans la reconnaissance du dodécapeptide (D'Souza et al., 1990; D'Souza et al., 1991; Weisel et al., 1992; Cierniewski et al., 1999). Mais la définition précise du domaine éventuellement mis en jeu n'est pas claire. Xiao et collaborateurs montrent grâce à la résolution par cristallisation de la structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qu'il existe une boucle Cap située au niveau des segments 2 et 3 de l'hélice β de la sous-unité α_{IIb} , qui jouerait un rôle dans la reconnaissance macromoléculaire de la molécule de fg (Xiao et al., 2004), et qui est absente de la sous-unité α_v de l'intégrine RGD-dépendante $\alpha_v\beta_3$. En outre, d'autres études indiquent que les segments 4 à 5 de l'hélice β , éloignés du domaine Cap, seraient également impliqués dans la fixation du fg (D'Souza et al., 1990; Gidwitz et al., 2004; Kamata et al., 2001). De ce fait, l'ensemble de ces résultats laisse penser que l'existence au niveau de la sous-unité α_{IIb} d'un second site de reconnaissance de la molécule de fg au niveau de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est tout à fait concevable.

Nos travaux décrivent pour la première fois un modèle qui permet d'étudier l'interaction $\alpha_{IIb}\beta_3$ -fg responsable de l'adhérence cellulaire. Les résultats obtenus au cours de notre étude nous permettent de définir deux rôles fonctionnels distincts des sites dodécapeptide et RGD lors de la reconnaissance du fg immobilisé par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$: un rôle du dodécapeptide dans l'attachement cellulaire initial et un rôle synergique du motif RGD dans les voies de signalisation outside-in conduisant à un étalement cellulaire stable. En outre, nous avons observé une absence d'adhésion des cellules CHO- $\alpha_v\beta_3$ wt sur le fragment D alors que les cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ wt ainsi que les cellules CHO- $\alpha_{IIb}\beta_3$ D₁₁₉Y dont le site de reconnaissance au niveau de β_3 est inactivé, sont capables de s'attacher, ce qui permet de renforcer l'idée actuelle d'un

site d'interaction du dodécapeptide au niveau de la sous-unité α_{11b} . D'autre part, le fait que les cellules CHO- $\alpha_{11b}\beta_3$ wt soient bloquées au stade de l'attachement sur le fragment D montre que l'intégrine doit nécessairement interagir avec les deux motifs du fg pour que le processus d'adhésion et d'étalement soit complet, réfutant ainsi l'existence d'un seul et même site d'interaction de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ avec le fg.

Le modèle de reconnaissance du fg immobilisé par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ que nous proposons, pourrait également être applicable à d'autres intégrines dont la reconnaissance du ligand repose sur l'interaction avec un site RGD et un site synergique. En effet, parmi les nombreuses intégrines de type RGD-dépendante, certaines, notamment les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$, nécessitent tout comme l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, l'interaction avec un second site appelé site de synergie. Au niveau de la molécule de fibronectine, il a été montré qu'en plus du site RGD présent dans le module III-10, la reconnaissance par $\alpha_5\beta_1$ de la séquence PHSRN du module de synergie III-9, ou l'interaction de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ avec le domaine IIICS, jouent un rôle non-négligeable dans l'engagement du récepteur, en permettant notamment d'augmenter l'affinité de l'interaction (Obara et al., 1988; Guan and Hynes, 1990; Mould and Humphries, 1991; Mould et al., 1991; Aota et al., 1994; Leahy et al., 1996; Altroff et al., 2001; Adair et al., 2005). Actuellement, certains modèles structuraux (Figure 26) décrivent d'ailleurs l'implication potentielle des 2 modules de reconnaissance III-9 et III-10 de la fibronectine, selon un mécanisme qui ressemble à celui décrit pour l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, avec l'interaction du motif RGD au niveau de l'interface entre l'hélice β de la sous-unité α et le domaine I putatif de la sous-unité β , et un recrutement du module III-9 au niveau de la sous-unité α . Cependant, alors que l'interaction du motif RGD avec les intégrines $\alpha_5\beta_1$ ou $\alpha_v\beta_3$ semble établie, l'existence de contacts directs impliquant le module de synergie du module III-9 demande à être confirmée (Takagi et al., 2003; Adair et al., 2005). Par contre, au niveau de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, il a été montré de façon certaine une implication du domaine 2 synergique de VCAM-1 dans l'interaction avec l'hélice β de la sous-unité α_4 (Kamata et al., 1995).

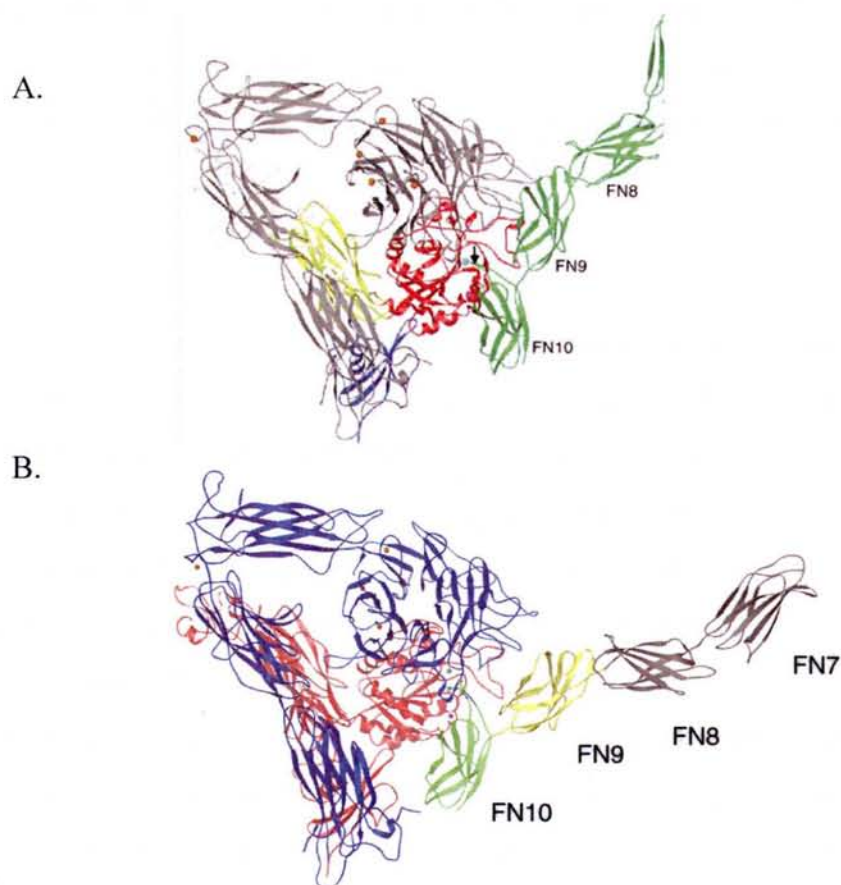


Figure 26: Représentation structurale des intégrines $\alpha_5\beta_1$ (A) et $\alpha_v\beta_3$ (B) en complexe avec les domaines modulaires FN9 et FN10 de la molécule de fibronectine (D'après Xiong et al., 2003 et Adair et al., 2005).

Alors que nos résultats indiquent qu'au niveau du fg, la séquence dodécapeptide joue un rôle dans l'attachement cellulaire initial médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, et que l'interaction avec le site RGD a un effet synergique conduisant à l'étalement cellulaire complet, de nombreuses études montrent que le module III-9 seul de la fibronectine ne permet pas l'attachement cellulaire médié par l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. A l'inverse de notre modèle, c'est le motif RGD du module III-10 qui est impliqué dans l'attachement alors que la séquence PHSRN du module III-9 constitue le site synergique (Aota et al., 1994; Mardon and Grant, 1994; Mould et al., 1997). En outre, Danen et collaborateurs montrent que la nécessité d'interaction avec ce site synergique PHSRN est dépendant de l'état d'activation de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Danen et al., 1995). Ces résultats confirment d'ailleurs nos observations à propos de l'étalement

sur le fragment D de fg, indépendamment de la présence du site RGD, des cellules CHO exprimant le récepteur $\alpha_{11b}\beta_3T_{562}N$ constitutivement actif, dans le sens où l'interaction avec le site synergique RGD n'est pas nécessaire lorsque l'intégrine est activée.

D'autre part, la distance entre les deux sites de reconnaissance du ligand au niveau des intégrines RGD-dépendantes nécessitant la présence d'un site synergique, joue un rôle déterminant dans le processus d'interaction avec le récepteur. Au niveau du domaine globulaire extracellulaire de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, d'un diamètre compris entre 8 et 12 nm (Bennett, 2001; Carrell et al., 1985), les deux sites de reconnaissance du fg sont espacés d'environ 6,1 nm (Cierniewski et al., 1999). Cette distance implique que les sites dodécapeptide et RGD du fg soient également espacés de cette même distance pour que l'interaction soit correcte. Au niveau du fg immobilisé, la séquence dodécapeptide est fixe alors que l'extrémité C-terminale de la chaîne α contenant le motif $^{572}RGD^{574}$ est flexible, ce qui permet aux deux motifs d'être suffisamment proches pour être reconnus par l'intégrine. De plus, cette flexibilité spatiale du motif $^{572}RGD^{574}$ en position C-terminale du fg indique que c'est le seul motif RGD impliqué dans l'interaction avec l'intégrine, puisque le second motif $^{95}RGD^{97}$ du fg est fixe et situé au niveau N-terminal du fg à une distance trop importante du dodécapeptide, une demi-molécule de fg mesurant environ 24 nm. Au niveau de la molécule de fibronectine complètement immobilisée, les sites RGD et PHSRN sont localisés chacun au niveau d'une boucle assez flexible de leurs modules respectifs, exposés sur la même face (Aota et al., 1994; Johansson et al., 1997; Leahy et al., 1996; Leahy et al., 1992), et séparés d'environ 3,5 nm (Bowditch et al., 1994; Krammer et al., 2002; Leahy et al., 1996) (Figure 27). Bien que cette distance soit faible par rapport à l'espace entre les deux sites d'interaction de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, il a été montré que l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ pouvait également interagir avec ces deux sites des modules III-9 et III-10, de la même façon que l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Bowditch et al., 1994). De plus, les deux modules sont flexibles entre eux, et certaines études indiquent que la force de l'interaction de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ avec la fibronectine augmente selon la position spatiale relative des deux modules, pouvant conduire à une distance de 5,5

nm entre les deux sites RGD et PHSRN (Grant et al., 1997; Garcia et al., 1999; Kramer et al., 2002).

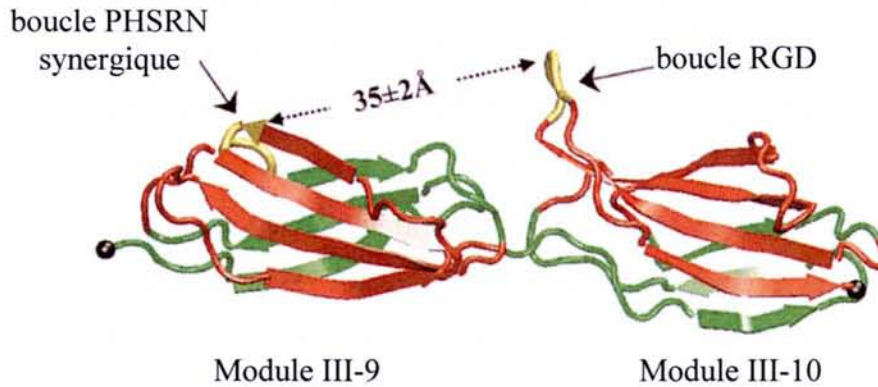


Figure 27 : Représentation en ruban des modules III-9 et III-10 de la fibronectine (D'après Kramer et al., 2002).

De ce fait, chaque ligand naturel tel que le fg ou la fibronectine, constitue une surface fonctionnelle uniforme, présentant les motifs de reconnaissance cellulaire distribués de façon régulière. Au cours de notre travail, nous avons observé que les cellules CHO exprimant le récepteur $\alpha_{11b}\beta_3$ wt s'étalent totalement sur le fg immobilisé, alors qu'elles ne sont capables que d'attachement sur le fragment D. Afin de montrer que le motif RGD est impliquée de façon synergique dans l'étalement des cellules médié par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, nous avons voulu savoir si une surface recouverte avec les deux fragments de fg, à la fois le fragment D contenant le dodécapeptide, et le fragment C comprenant le motif RGD, pouvait à nouveau conduire à un étalement des cellules. Or, les cellules furent incapables de s'étaler complètement. Ce résultat suggère que les distances entre les différents sites de reconnaissance varient par rapport au fg naturel, et indique de façon générale que non seulement la composition, mais aussi l'organisation spatiale de l'environnement extracellulaire influencent le processus de reconnaissance du ligand et l'adhérence cellulaire (Cavalcanti-Adam et al, 2006).

Enfin, l'utilisation de notre modèle cellulaire a permis d'analyser spécifiquement certains événements de signalisation outside-in initiés suite à la reconnaissance des différents motifs d'interaction du fg. Nous avons notamment ciblé nos investigations sur l'étude de l'état d'activation des protéines FAK, Src, Rac1 et RhoA impliquées dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine (Figure 28) lors du processus d'étalement cellulaire médié par l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ sur le fg. Notre étude montre qu'au niveau de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$, l'interaction de la sous-unité α_{11b} avec la séquence dodécapeptide conduit à l'activation des protéines FAK et Rac1, alors que la reconnaissance de façon synergique du motif RGD est à l'origine de l'activation maximale de la GTPase RhoA. Ces résultats pourraient également représenter un mécanisme moléculaire général décrivant les voies de signalisation induites par la reconnaissance d'un ligand multi-domaine par une intégrine. Les travaux de Hotchin et collaborateurs vont d'ailleurs dans ce sens, puisqu'ils montrent que les modules III-9 et III-10 de la fibronectine déclenchent des événements de signalisation distincts impliqués dans l'adhérence cellulaire (Hotchin et al., 1999). En effet, leurs résultats indiquent qu'au cours du processus d'adhérence des fibroblastes sur la fibronectine, le domaine III-9 serait impliqué spécifiquement dans la phosphorylation de FAK et dans l'activation de Rac, alors que l'activation de Rho serait médiée par la reconnaissance du module III-10 contenant le motif RGD.

Par conséquent, de nombreux éléments, tant au niveau de l'interaction extracellulaire avec le ligand, qu'au niveau des événements de signalisation engendrés suite à l'engagement de l'intégrine, laissent supposer que le modèle de fonctionnement de l'intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ que nous proposons représente une stratégie générale des intégrines. En outre, le recrutement des protéines de la cascade de signalisation conduisant à l'étalement cellulaire n'est pas un processus isolé spécifique des intégrines, puisqu'il existe de nombreuses inter-connexions avec d'autres voies de signalisation comme par exemple celles engendrées par les facteurs de croissance ou les cytokines (Figure 28).

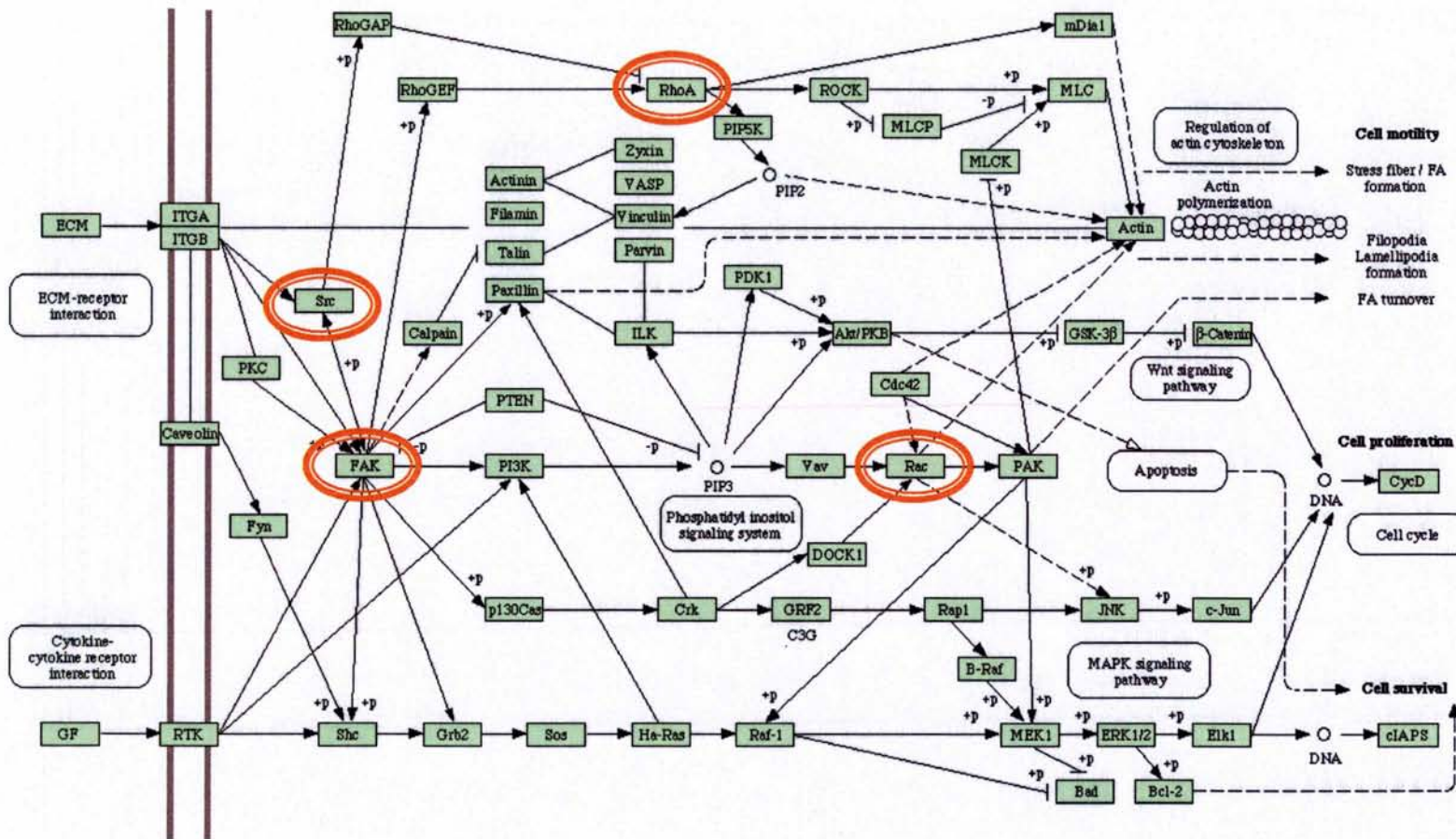


Figure 28 : Complexité des voies de signalisation intracellulaire. Les protéines FAK, Src, RhoA et Rac étudiées au cours de notre travail sont entourées (D'après <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/hsa/hsa045110.gif>).



RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



- Abe, K., K.L. Rossman, B. Liu, K.D. Ritola, D. Chiang, S.L. Campbell, K. Burrige, and C.J. Der. 2000. Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J Biol Chem.* 275:10141-9.
- Abo, A., E. Pick, A. Hall, N. Totty, C.G. Teahan, and A.W. Segal. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* 353:668-70.
- Abo, A., J. Qu, M.S. Cammarano, C. Dan, A. Fritsch, V. Baud, B. Belisle, and A. Minden. 1998. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *Embo J.* 17:6527-40.
- Adair, B.D., J.P. Xiong, C. Maddock, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, and M. Yeager. 2005. Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin $\{\alpha\}V\{\beta\}3$ in a complex with fibronectin. *J Cell Biol.* 168:1109-18.
- Adair, B.D., and M. Yeager. 2002. Three-dimensional model of the human platelet integrin α IIb β 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14059-64.
- Adra, C.N., D. Manor, J.L. Ko, S. Zhu, T. Horiuchi, L. Van Aelst, R.A. Cerione, and B. Lim. 1997. RhoGDI γ : a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4279-84.
- Agnel, M., L. Roder, C. Vola, and R. Griffin-Shea. 1992. A Drosophila rotund transcript expressed during spermatogenesis and imaginal disc morphogenesis encodes a protein which is similar to human Rac GTPase-activating (racGAP) proteins. *Mol Cell Biol.* 12:5111-22.
- Agrez, M., A. Chen, R.I. Cone, R. Pytela, and D. Sheppard. 1994. The α v β 6 integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the β 6 cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* 127:547-56.
- Albigès-Rizo, C., P. Frachet, and M.R. Block. 1995. Down regulation of talin alters cell adhesion and the processing of the α 5 β 1 integrin. *J Cell Sci.* 108:3317-29.
- Aleman, M., E. Concord, J. Garin, M. Vincon, A. Giles, G. Marguerie, and D. Gulino. 1996. Sequence 274-368 in the β 3-subunit of the integrin α IIb β 3 provides a ligand recognition and binding domain for the γ -chain of fibrinogen that is independent of platelet activation. *Blood.* 87:592-601.
- Alevriadou, B.R., J.L. Moake, N.A. Turner, Z.M. Ruggeri, B.J. Folie, M.D. Phillips, A.B. Schreiber, M.E. Hrinda, and L.V. McIntire. 1993. Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood.* 81:1263-76.
- Altieri, D.C., A. Duperray, J. Plescia, G.B. Thornton, and L.R. Languino. 1995. Structural recognition of a novel fibrinogen γ chain sequence (117-133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J Biol Chem.* 270:696-9.
- Altieri, D.C., J. Plescia, and E.F. Plow. 1993. The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen γ chain interacts with CD11b/CD18 integrin (α M β 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J Biol Chem.* 268:1847-53.
- Altroff, H., C.F. van der Walle, J. Asselin, R. Fairless, I.D. Campbell, and H.J. Mardon. 2001. The eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin α 5 β 1 binding via stabilization of the ninth FIII domain. *J Biol Chem.* 276:38885-92.
- Amano, M., H. Mukai, Y. Ono, K. Chihara, T. Matsui, Y. Hamajima, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science.* 271:648-50.
- Ambo, H., T. Kamata, M. Handa, M. Taki, M. Kuwajima, Y. Kawai, A. Oda, M. Murata, Y. Takada, K. Watanabe, and Y. Ikeda. 1998. Three novel integrin β 3 subunit missense mutations (H280P, C560F, and G579S) in thrombasthenia, including one (H280P) prevalent in Japanese patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 251:763-8.
- Andersson, K., K.E. Magnusson, M. Majeed, O. Stendahl, and M. Fallman. 1999. Yersinia pseudotuberculosis-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect Immun.* 67:2567-74.
- Aota, S., M. Nomizu, and K.M. Yamada. 1994. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem.* 269:24756-61.
- Arias-Salgado, E.G., S. Lizano, S. Sarkar, J.S. Brugge, M.H. Ginsberg, and S.J. Shattil. 2003. Src kinase activation by direct interaction with the integrin β cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13298-302.
- Arias-Salgado, E.G., S. Lizano, S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg. 2005. Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin β cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 280:29699-707.
- Armulik, A., I. Nilsson, G. von Heijne, and S. Johansson. 1999. Determination of the border between the transmembrane and cytoplasmic domains of human integrin subunits. *J Biol Chem.* 274:37030-4.
- Arnaout, M.A. 2002. Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion. *Immunological Reviews.* 186:125-140.
- Arnaout, M.A., S.L. Goodman, and J.P. Xiong. 2002. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr Opin Cell Biol.* 14:641-51.
- Arnaout, M.A., B. Mahalingam, and J.P. Xiong. 2005. Integrin Structure, Allostery, And Bidirectional Signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:381-410.

- Arthur, W.T., L.A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol.* 10:719-22.
- Arthur, W.T., and K. Burridge. 2001. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell.* 12:2711-20.
- Arthur, W.T., N.K. Noren, and K. Burridge. 2002. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res.* 35:239-46.
- Aspenstrom, P. 1997. A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr Biol.* 7:479-87.
- Backer, J.M., G.G. Schroeder, C.R. Kahn, M.G. Myers, Jr., P.A. Wilden, D.A. Cahill, and M.F. White. 1992. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation. *J Biol Chem.* 267:1367-74.
- Bagrodia, S., D. Bailey, Z. Lenard, M. Hart, J.L. Guan, R.T. Premont, S.J. Taylor, and R.A. Cerione. 1999. A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem.* 274:22393-400.
- Bajt, M.L., M.H. Ginsberg, A.L. Frelinger, 3rd, M.C. Berndt, and J.C. Loftus. 1992. A spontaneous mutation of integrin alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb-IIIa) helps define a ligand binding site. *J Biol Chem.* 267:3789-94.
- Bajt, M.L., and J.C. Loftus. 1994. Mutation of a ligand binding domain of beta 3 integrin. Integral role of oxygenated residues in alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) receptor function. *J Biol Chem.* 269:20913-9.
- Ballestrem, C., B. Hinz, B.A. Imhof, and B. Wehrle-Haller. 2001. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 155:1319-32.
- Bansal, A., and L.M. Gierasch. 1991. The NPXY internalization signal of the LDL receptor adopts a reverse-turn conformation. *Cell.* 67:1195-201.
- Barberis, L., K.K. Wary, G. Fiucci, F. Liu, E. Hirsch, M. Brancaccio, F. Altruda, G. Tarone, and F.G. Giancotti. 2000. Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem.* 275:36532-40.
- Barquin, N., P. Chou, C. Ramos, M. Montano, A. Pardo, and M. Selman. 1996. Increased expression of intercellular adhesion molecule 1, CD11/CD18 cell surface adhesion glycoproteins and alpha 4 beta 1 integrin in a rat model of chronic interstitial lung fibrosis. *Pathobiology.* 64:187-92.
- Barry, S.T., H.M. Flinn, M.J. Humphries, D.R. Critchley, and A.J. Ridley. 1997. Requirement for Rho in integrin signalling. *Cell Adhes Commun.* 4:387-98.
- Barry, W.T., C. Boudignon-Proudhon, D.D. Shock, A. McFadden, J.M. Weiss, J. Sondek, and L.V. Parise. 2002. Molecular basis of CIB binding to the integrin alpha IIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 277:28877-83.
- Barsukov, I.L., A. Prescott, N. Bate, B. Patel, D.N. Floyd, N. Bhanji, C.R. Bagshaw, K. Letinic, G. Di Paolo, P. De Camilli, G.C. Roberts, and D.R. Critchley. 2003. Phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma and beta1-integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *J Biol Chem.* 278:31202-9.
- Basani, R.B., D.L. French, G. Vilaire, D.L. Brown, F. Chen, B.S. Coller, J.M. Derrick, T.K. Gartner, J.S. Bennett, and M. Poncz. 2000. A naturally occurring mutation near the amino terminus of alphaIIb defines a new region involved in ligand binding to alphaIIb beta3. *Blood.* 95:180-8.
- Beglova, N., S.C. Blacklow, J. Takagi, and T.A. Springer. 2002. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol.* 9:282-7.
- Belkin, A.M., G. Tsurupa, E. Zemskov, Y. Veklich, J.W. Weisel, and L. Medved. 2005. Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) alphaC domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling. *Blood.* 105:3561-8.
- Bellanger, J.M., C. Astier, C. Sardet, Y. Ohta, T.P. Stossel, and A. Debant. 2000. The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol.* 2:888-92.
- Benian, G.M., X. Tang, and T.L. Tinley. 1996. Twitchin and related giant Ig superfamily members of *C. elegans* and other invertebrates. *Adv Biophys.* 33:183-98.
- Bennett, J.S., and G. Vilaire. 1979. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest.* 64:1393-1401.
- Bennett, J.S., S.J. Shattil, J.W. Power, and T.K. Gartner. 1988. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. Differential effects of alpha and gamma chain fibrinogen peptides on the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem.* 263:12948-12953.
- Bennett, J.S., M.A. Kolodziej, G. Vilaire, and M. Poncz. 1993. Determinants of the intracellular fate of truncated forms of the platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J Biol Chem.* 268:3580-5.
- Bennett, J.S. 2001. Platelet-Fibrinogen Interactions. *Ann NY Acad Sci.* 936:340-354.
- Berman, C.L., E.L. Yeo, J.D. Wencel-Drake, B.C. Furie, M.H. Ginsberg, and B. Furie. 1986. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest.* 78:130-7.
- Biris, N., M. Abatzis, J.V. Mitsios, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, D. Tsoukatos, A.D. Tselepis, L. Michalis, D. Sideris, G. Konidou, K. Soteriadou, and V. Tsikaris. 2003. Mapping the binding domains of the alpha(IIb) subunit. A study performed on the activated form of the platelet integrin alpha(IIb)beta(3). *Eur J Biochem.* 270:3760-7.

- Bishop, A.L., and A. Hall. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 348 Pt 2:241-55.
- Blockmans, D., H. Deckmyn, and J. Vermeylen. 1995. Platelet activation. *Blood Rev.* 9:143-56.
- Blombäck, B., B. Hessel, D. Hogg, and L. Therkildsen. 1978. A two-step fibrinogen--fibrin transition in blood coagulation. *Nature.* 275:501-5.
- Blombäck, B. 1996. Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* 83:1-75.
- Boguski, M.S., and F. McCormick. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature.* 366:643-54.
- Bokoch, G.M., B.P. Bohl, and T.H. Chuang. 1994. Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *J Biol Chem.* 269:31674-9.
- Bokoch, G.M., C.J. Vlahos, Y. Wang, U.G. Knaus, and A.E. Traynor-Kaplan. 1996. Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J.* 315 (Pt 3):775-9.
- Bork, P., T. Doerks, T.A. Springer, and B. Snel. 1999. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci.* 24:261-3.
- Borowsky, M.L., and H.R. O. 1998. Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type localized in membrane ruffles. *J Cell Biol.* 143:429-42.
- Bouvard, D., L. Vignoud, S. Dupe-Manet, N. Abed, H.N. Fournier, C. Vincent-Monegat, S.F. Retta, R. Fassler, and M.R. Block. 2003. Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem.* 278:6567-74.
- Bowditch, R.D., M. Hariharan, E.F. Tominna, J.W. Smith, K.M. Yamada, E.D. Getzoff, and M.H. Ginsberg. 1994. Identification of a novel integrin binding site in fibronectin. Differential utilization by beta 3 integrins. *J Biol Chem.* 269:10856-63.
- Braga, V.M. 2002. Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 14:546-56.
- Bray, P.F., J.P. Rosa, V.R. Lingappa, Y.W. Kan, R.P. McEver, and M.A. Shuman. 1986. Biogenesis of the platelet receptor for fibrinogen: evidence for separate precursors for glycoproteins IIb and IIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:1480-4.
- Bray, P.F., G. Barsh, J.P. Rosa, X.Y. Luo, E. Magenis, and M.A. Shuman. 1988. Physical linkage of the genes for platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:8683-7.
- Bray, P.F. 1994. Inherited diseases of platelet glycoproteins: considerations for rapid molecular characterization. *Thromb Haemost.* 72:492-502.
- Brown, M.C., J.A. Perrotta, and C.E. Turner. 1996. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol.* 135:1109-23.
- Brugnera, E., L. Haney, C. Grimsley, M. Lu, S.F. Walk, A.C. Tosello-Trampont, I.G. Macara, H. Madhani, G.R. Fink, and K.S. Ravichandran. 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol.* 4:574-82.
- Bucciantini, M., P. Chiarugi, P. Cirri, L. Taddei, M. Stefani, G. Raugei, P. Nordlund, and G. Ramponi. 1999. The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131 or Tyr132 by Src kinase. *FEBS Lett.* 456:73-8.
- Buensuceso, C., M.d. Virgilio, and S.J. Shattil. 2003. Detection of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ clustering in living cells. *J Biol Chem.* 278:15217-15224.
- Buensuceso, C.S., E.G. Arias-Salgado, and S.J. Shattil. 2004. Protein-protein interactions in platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ signaling. *Semin Thromb Hemost.* 30:427-39.
- Burbelo, P.D., D. Drechsel, and A. Hall. 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem.* 270:29071-4.
- Burridge, K., and P. Mangeat. 1984. An interaction between vinculin and talin. *Nature.* 308:744-6.
- Bustelo, X.R. 2000. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol.* 20:1461-77.
- Butta, N., E.G. Arias-Salgado, C. Gonzalez-Manchon, M. Ferrer, S. Larrucea, M.S. Ayuso, and R. Parrilla. 2003. Disruption of the beta3 663-687 disulfide bridge confers constitutive activity to beta3 integrins. *Blood.* 102:2491-7.
- Caen, J., Z. Sinakos, Y. Sultan, H. Vainer, and J. Bernard. 1966. [Disorders of platelet function in chronic myeloid leukemias]. *Nouv Rev Fr Hematol.* 6:719-26.
- Calderwood, D.A., R. Zent, R. Grant, D.J. Rees, R.O. Hynes, and M.H. Ginsberg. 1999. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem.* 274:28071-4.
- Calderwood, D.A., A. Huttenlocher, W.B. Kiosses, D.M. Rose, D.G. Woodside, M.A. Schwartz, and M.H. Ginsberg. 2001. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol.* 3:1060-8.
- Calderwood, D.A., B. Yan, J.M. de Pereda, B.G. Alvarez, Y. Fujioka, R.C. Liddington, and M.H. Ginsberg. 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem.* 277:21749-58.
- Calderwood, D.A., Y. Fujioka, J.M. de Pereda, B. Garcia-Alvarez, T. Nakamoto, B. Margolis, C.J. McGlade, R.C. Liddington, and M.H. Ginsberg. 2003. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2272-7.
- Calderwood, D.A., and M.H. Ginsberg. 2003. Talin forges the link between integrins and actin. *Nat Cell Biol.* 5:694-7.
- Calderwood, D.A. 2004. Integrin activation. *J Cell Sci.* 117:657-66.

- Calvete, J.J., and J. Gonzalez-Rodriguez. 1986. Isolation and biochemical characterization of the alpha- and beta-subunits of glycoprotein IIb of human platelet plasma membrane. *Biochem J.* 240:155-61.
- Calvete, J.J., M.V. Alvarez, G. Rivas, C.L. Hew, A. Henschen, and J. Gonzalez-Rodriguez. 1989. Interchain and intrachain disulphide bonds in human platelet glycoprotein IIb. Localization of the epitopes for several monoclonal antibodies. *Biochem J.* 261:551-60.
- Calvete, J.J., A. Henschen, and J. Gonzalez-Rodriguez. 1991. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIb. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem J.* 274:63-71.
- Calvete, J.J. 1995. On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med.* 208:346-60.
- Campbell, I.D., and M.H. Ginsberg. 2004. The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground. *Trends Biochem Sci.* 29:429-35.
- Caron, E. 2003. Rac signalling: a radical view. *Nat Cell Biol.* 5:185-7.
- Carrell, N.A., L.A. Fitzgerald, B. Steiner, H.P. Erickson, and D.R. Phillips. 1985. Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem.* 260:1743-9.
- Cavalcanti-Adam, E.A., A. Micoulet, J. Blümmel, J. Auernheimer, H. Kessler, and J.P. Spatz. 2006. Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *E J Cell Biology.* 85 (3-4).
- Cerione, R.A., and Y. Zheng. 1996. The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol.* 8:216-22.
- Chang, D.D., B.Q. Hoang, J. Liu, and T.A. Springer. 2002. Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J Biol Chem.* 277:8140-5.
- Chang, J.H., L.K. Wilson, J.S. Moyers, K. Zhang, and S.J. Parsons. 1993. Increased levels of p21ras-GTP and enhanced DNA synthesis accompany elevated tyrosyl phosphorylation of GAP-associated proteins, p190 and p62, in c-src overexpressors. *Oncogene.* 8:959-67.
- Charo, I.F., L. Nannizzi, D.R. Phillips, M.A. Hsu, and R.M. Scarborough. 1991. Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. *J Biol Chem.* 266:1415-1421.
- Chen, H.C., P.A. Appeddu, J.T. Parsons, J.D. Hildebrand, M.D. Schaller, and J.L. Guan. 1995. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem.* 270:16995-9.
- Chen, H.C., P.A. Appeddu, H. Isoda, and J.L. Guan. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 271:26329-34.
- Chen, J., A. Salas, and T.A. Springer. 2003. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nat Struct Biol.* 10:995-1001.
- Chen, P., C. Melchior, N.H. Brons, N. Schlegel, J. Caen, and N. Kieffer. 2001. Probing conformational changes in the I-like domain and the cysteine-rich repeat of human beta 3 integrins following disulfide bond disruption by cysteine mutations: identification of cysteine 598 involved in alpha IIb beta 3 activation. *J. Biol. Chem.* 276:38628-38635.
- Chen, W.J., J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 265:3116-23.
- Chen, Y.P., T.E. O'Toole, J. Ylanne, J.P. Rosa, and M.H. Ginsberg. 1994. A point mutation in the integrin beta 3 cytoplasmic domain (S752-->P) impairs bidirectional signaling through alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb-IIIa). *Blood.* 84:1857-65.
- Cheresh, D.A., S.A. Berliner, V. Vicente, and Z.M. Ruggeri. 1989. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell.* 58:945-53.
- Chiarugi, P., P. Cirri, L. Taddei, E. Giannoni, G. Camici, G. Manao, G. Raugei, and G. Ramponi. 2000. The low M(r) protein-tyrosine phosphatase is involved in Rho-mediated cytoskeleton rearrangement after integrin and platelet-derived growth factor stimulation. *J Biol Chem.* 275:4640-6.
- Chikumi, H., S. Fukuhara, and J.S. Gutkind. 2002. Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 277:12463-73.
- Chong, L.D., A. Traynor-Kaplan, G.M. Bokoch, and M.A. Schwartz. 1994. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell.* 79:507-13.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol.* 133:1403-15.
- Chung, D.W., and E.W. Davie. 1984. gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry.* 23:4232-6.
- Cichowski, K., J.S. Brugge, and L.F. Brass. 1996. Thrombin receptor activation and integrin engagement stimulate tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product, p95vav, in platelets. *J Biol Chem.* 271:7544-50.
- Cierniewski, C.S., T. Byzova, M. Papierak, T.A. Haas, J. Niewiarowska, L. Zhang, M. Cieslak, and E.F. Plow. 1999. Peptide ligands can bind to distinct sites in integrin alpha IIb beta 3 and elicit different functional responses. *J Biol Chem.* 274:16923-16932.
- Clark, E.A., and J.S. Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 268:233-9.
- Clark, E.A., S.J. Shattil, M.H. Ginsberg, J. Bolen, and J.S. Brugge. 1994. Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem.* 269:28859-64.
- Clark, E.A., W.G. King, J.S. Brugge, M. Symons, and R.O. Hynes. 1998. Integrin-mediated signals regulated by members of the Rho family GTPases. *J Cell Biol.* 142:573-586.

- Coller, B.S., U. Seligsohn, S.M. West, L.E. Scudder, and K.J. Norton. 1991. Platelet fibrinogen and vitronectin in Glanzmann thrombasthenia: evidence consistent with specific roles for glycoprotein IIb/IIIa and alpha v beta 3 integrins in platelet protein trafficking. *Blood*. 78:2603-10.
- Collet, J.P., C. Nagaswami, D.H. Farrell, G. Montalescot, and J.W. Weisel. 2004. Influence of gamma' fibrinogen splice variant on fibrin physical properties and fibrinolysis rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:382-6.
- Colombatti, A., P. Bonaldo, and R. Doliana. 1993. Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix*. 13:297-306.
- Cong, N.V., G. Uzan, M.S. Gross, C. Jegou-Foubert, P. Frachet, C. Boucheix, G. Marguerie, and J. Frezal. 1988. Assignment of human platelet GP2B (GPIIb) gene to chromosome 17, region q21.1-q21.3. *Hum Genet*. 80:389-92.
- Coppolino, M., C. Leung-Hagesteijn, S. Dedhar, and J. Wilkins. 1995. Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem*. 270:23132-8.
- Coutts, A.S., E. MacKenzie, E. Griffith, and D.M. Black. 2002. TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J Cell Sci*. 116:897-906.
- Cowan, K.J., D.A. Law, and D.R. Phillips. 2000. Identification of shc as the primary protein binding to the tyrosine-phosphorylated beta 3 subunit of alpha IIb beta 3 during outside-in integrin platelet signaling. *J Biol Chem*. 275:36423-9.
- Cox, E.A., S.K. Sastry, and A. Huttenlocher. 2001. Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell*. 12:265-77.
- Cram, E.J., S.G. Clark, and J.E. Schwarzbauer. 2003. Talin loss-of-function uncovers roles in cell contractility and migration in *C. elegans*. *J Cell Sci*. 116:3871-8.
- Crespo, P., K.E. Schuebel, A.A. Ostrom, J.S. Gutkind, and X.R. Bustelo. 1997. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature*. 385:169-72.
- Critchley, D.R. 2000. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol*. 12:133-9.
- Danen, E.H.J., S. Aota, A.A. van Kraats, K.M. Yamada, D.J. Ruiter, and G.N.P. van Muijen. 1995. Requirement for the synergy site for cell adhesion to fibronectin depends on the activation state of integrin $\alpha 5\beta 1$. *J Biol Chem*. 270:21612-21618.
- De Melker, A.A., D. Kramer, I. Kuikman, and A. Sonnenberg. 1997. The two phenylalanines in the GFFKR motif of the integrin alpha6A subunit are essential for heterodimerization. *Biochem J*. 328 (Pt 2):529-37.
- De Melker, A.A., and A. Sonnenberg. 1999. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays*. 21:499-509.
- De Virgilio, M., W. Kiosses, and S. Shattil. 2004. Proximal, selective, and dynamic interactions between integrin alphaIIb beta3 and protein tyrosine kinases in living cells. *J Cell Biol*. 165:305-311.
- Dedhar, S., and G.E. Hannigan. 1996. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 8:657-69.
- Dedhar, S., B. Williams, and G. Hannigan. 1999. Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signalling. *Trends Cell Biol*. 9:319-23.
- Dedhar, S. 2000. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol*. 12:250-6.
- Del Pozo, M.A., W.B. Kiosses, N.B. Alderson, N. Meller, K.M. Hahn, and M.A. Schwartz. 2002. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol*. 4:232-9.
- Del Pozo, M.A., M.A. Schwartz, J. Hu, W.B. Kiosses, A. Altman, and M. Villalba. 2003. Guanine exchange-dependent and -independent effects of Vav1 on integrin-induced T cell spreading. *J Immunol*. 170:41-7.
- DeMali, K.A., C.A. Barlow, and K. Burridge. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol*. 159:881-91.
- DeMali, K.A., and K. Burridge. 2003. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci*. 116:2389-97.
- DeMali, K.A., K. Wennerberg, and K. Burridge. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 15:572-82.
- Di Paolo, G., L. Pellegrini, K. Letinic, G. Cestra, R. Zoncu, S. Voronov, S. Chang, J. Guo, M.R. Wenk, and P. De Camilli. 2002. Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature*. 420:85-9.
- Diamond, M.S., J. Garcia-Aguilar, J.K. Bickford, A.L. Corbi, and T.A. Springer. 1993. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol*. 120:1031-43.
- Diekmann, D., A. Abo, C. Johnston, A.W. Segal, and A. Hall. 1994. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science*. 265:531-3.
- Diekmann, D., S. Brill, M.D. Garrett, N. Totty, J. Hsuan, C. Monfries, C. Hall, L. Lim, and A. Hall. 1991. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*. 351:400-2.
- Doolittle, R.F., R. Chen, and F. Lau. 1971. Hybrid fibrin: proof of the intermolecular nature of - crosslinking units. *Biochem Biophys Res Commun*. 44:94-100.
- Doolittle, R.F., S.J. Everse, and G. Spraggon. 1996. Human fibrinogen: anticipating a 3-dimensional structure. *Faseb J*. 10:1464-70.
- D'Souza-Schorey, C. 2005. Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. *Trends Cell Biol*. 15:19-26.

- D'Souza, S.E., M.H. Ginsberg, T.A. Burke, S.C.-T. Lam, and E.F. Plow. 1988. Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science*. 242:91-93.
- D'Souza, S.E., M.H. Ginsberg, T.A. Burke, and E.F. Plow. 1990. The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its α subunit. *J Biol Chem*. 265:3440-3446.
- D'Souza, S.E., M.H. Ginsberg, G.R. Matsueda, and E.F. Plow. 1991. A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition. *Nature*. 350:66-8.
- D'Souza, S.E., T.A. Haas, R.S. Piotrowicz, V. Byers-Ward, D.E. McGrath, H.R. Soule, C. Cierniewski, E.F. Plow, and J.W. Smith. 1994. Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the integrin beta 3 subunit: cation displacement is involved in ligand binding. *Cell*. 79:659-67.
- Duperray, A., R. Berthier, E. Chagnon, J.J. Ryckewaert, M. Ginsberg, E. Plow, and G. Marguerie. 1987. Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *J Cell Biol*. 104:1665-73.
- Duperray, A., A. Troesch, R. Berthier, E. Chagnon, P. Frachet, G. Uzan, and G. Marguerie. 1989. Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface. *Blood*. 74:1603-11.
- Eigenthaler, M., C. Nolte, M. Halbrugge, and U. Walter. 1992. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem*. 205:471-81.
- Eigenthaler, M., L. Hofferer, S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg. 1997. A conserved sequence motif in the integrin beta3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with beta3-endonexin. *J Biol Chem*. 272:7693-8.
- Ellerbroek, S.M., K. Wennerberg, and K. Burridge. 2003. Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem*. 278:19023-31.
- Essex, D.W., and M. Li. 1999. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol*. 104:448-54.
- Essex, D.W., and M. Li. 2003. Redox control of platelet aggregation. *Biochemistry*. 42:129-36.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629-35.
- Everse, S.J., G. Spraggon, L. Veerapandian, M. Riley, and R.F. Doolittle. 1998. Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*. 37:8637-42.
- Falls, L.A., and D.H. Farrell. 1997. Resistance of gammaA/gamma' fibrin clots to fibrinolysis. *J Biol Chem*. 272:14251-6.
- Fanger, G.R., N.L. Johnson, and G.L. Johnson. 1997. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *Embo J*. 16:4961-72.
- Farrell, D.H., P. Thiagarajan, D.W. Chung, and E.W. Davie. 1992. Role of fibrinogen α and γ chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:10729-10732.
- Farrell, D.H., and P. Thiagarajan. 1994. Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J Biol Chem*. 269:226-31.
- Farrell, D.H. 2004. Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain. *Curr Opin Hematol*. 11:151-5.
- Feoktistov, I., A.E. Goldstein, and I. Biaggioni. 2000. Cyclic AMP and protein kinase A stimulate Cdc42: role of A(2) adenosine receptors in human mast cells. *Mol Pharmacol*. 58:903-10.
- Fernandez, C., K. Clark, L. Burrows, N.R. Schofield, and M.J. Humphries. 1998. Regulation of the extracellular ligand binding activity of integrins. *Front Biosci*. 3:d684-700.
- Fitzgerald, L.A., B. Steiner, S.C. Rall, Jr., S.S. Lo, and D.R. Phillips. 1987. Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J Biol Chem*. 262:3936-9.
- Flinn, H.M., and A.J. Ridley. 1996. Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J Cell Sci*. 109 (Pt 5):1133-41.
- Folkman, J., and A. Moscona. 1978. Role of cell shape in growth control. *Nature*. 273:345-9.
- Forman-Kay, J.D., and T. Pawson. 1999. Diversity in protein recognition by PTB domains. *Curr Opin Struct Biol*. 9:690-5.
- Fox, J.E. 1999. On the role of calpain and Rho proteins in regulating integrin-induced signaling. *Thromb Haemost*. 82:385-91.
- Fralely, T.S., C.B. Pereira, T.C. Tran, C. Singleton, and J.A. Greenwood. 2005. Phosphoinositide binding regulates alpha-actinin dynamics: mechanism for modulating cytoskeletal remodeling. *J Biol Chem*. 280:15479-82.
- Fransson, A., A. Ruusala, and P. Aspenstrom. 2003. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem*. 278:6495-502.
- Frisch, S.M., and H. Francis. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*. 124:619-26.
- Fu, Y., and G. Grieninger. 1994. Fib420: a normal human variant of fibrinogen with two extended alpha chains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:2625-8.
- Fujisawa, K., P. Tani, T.E. O'Toole, M.H. Ginsberg, and R. McMillan. 1992. Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GPIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 79:1441-6.

- Fukata, M., S. Kuroda, K. Fujii, T. Nakamura, I. Shoji, Y. Matsuura, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 1997. Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J Biol Chem.* 272:29579-83.
- Fukumoto, Y., K. Kaibuchi, Y. Hori, H. Fujioka, S. Araki, T. Ueda, A. Kikuchi, and Y. Takai. 1990. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene.* 5:1321-8.
- Fullard, J.F. 2004. The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Curr Pharm Des.* 10:1567-76.
- Gachet, C. 2001. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost.* 86:222-32.
- Gakidis, M.A., X. Cullere, T. Olson, J.L. Wilsbacher, B. Zhang, S.L. Moores, K. Ley, W. Swat, T. Mayadas, and J.S. Brugge. 2004. Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J Cell Biol.* 166:273-82.
- Garcia-Alvarez, B., J.M. de Pereda, D.A. Calderwood, T.S. Ulmer, D. Critchley, I.D. Campbell, M.H. Ginsberg, and R.C. Liddington. 2003. Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell.* 11:49-58.
- Garcia, A.J., M.D. Vega, and D. Boettiger. 1999. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol Biol Cell.* 10:785-98.
- Gartner, T.K., and J.S. Bennett. 1985. The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *J Biol Chem.* 260:11891-4.
- Gartner, T.K., and D.B. Taylor. 1990. The amino acid sequence Gly-Ala-Pro-Leu appears to be a fibrinogen binding site in the platelet integrin, glycoprotein IIb. *Thromb Res.* 60:291-309.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:793-805.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science.* 285:1028-32.
- Giancotti, F.G., and G. Tarone. 2003. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:173-206.
- Gidwitz, S., B. Temple, and G.C. White, 2nd. 2004. Mutations in and near the second calcium-binding domain of integrin alphaIIb affect the structure and function of integrin alphaIIbbeta3. *Biochem J.* 379:449-59.
- Gilbert, H.F. 1997. Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J Biol Chem.* 272:29399-402.
- Gilmore, A.P., C. Wood, V. Ohanian, P. Jackson, B. Patel, D.J. Rees, R.O. Hynes, and D.R. Critchley. 1993. The cytoskeletal protein talin contains at least two distinct vinculin binding domains. *J Cell Biol.* 122:337-47.
- Gilmore, A.P., and K. Burridge. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature.* 381:531-5.
- Gingras, A.R., W.H. Ziegler, R. Frank, I.L. Barsukov, G.C. Roberts, D.R. Critchley, and J. Emsley. 2005. Mapping and consensus sequence identification for multiple vinculin binding sites within the talin rod. *J Biol Chem.* 280:37217-24.
- Ginsberg, M., M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. Marguerie, and E. Plow. 1985. Inhibition of fibronectin binding to platelets by proteolytic fragments and synthetic peptides which support fibroblast adhesion. *J Biol Chem.* 260:3931-6.
- Ginsberg, M.H., J.C. Loftus, and E.F. Plow. 1988. Cytoadhesins, integrins, and platelets. *Thromb Haemost.* 59:1-6.
- Ginsberg, M.H., A. Partridge, and S.J. Shattil. 2005. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 17:509-16.
- Gironcel, D., C. Racaud-Sultan, B. Payrastre, M. Haricot, G. Borchert, N. Kieffer, M. Breton, and H. Chap. 1996. alphaIIb beta 3-integrin mediated adhesion of human platelets to a fibrinogen matrix triggers phospholipase C activation and phosphatidylinositol 3',4'-biphosphate accumulation. *FEBS Lett.* 389:253-6.
- Goldmann, W.H. 2000. Kinetic determination of focal adhesion protein formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 271:553-7.
- Goncalves, I., S.C. Hughan, S.M. Schoenwaelder, C.L. Yap, Y. Yuan, and S.P. Jackson. 2003. Integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals regulate platelet-fibrinogen interactions under flow. Involvement of phospholipase C gamma 2. *J Biol Chem.* 278:34812-22.
- Gotoh, T., S. Hattori, S. Nakamura, H. Kitayama, M. Noda, Y. Takai, K. Kaibuchi, H. Matsui, O. Hatase, H. Takahashi, and et al. 1995. Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Mol Cell Biol.* 15:6746-53.
- Gottschalk, K.E., and H. Kessler. 2002. The structures of integrins and integrin-ligand complexes: implications for drug design and signal transduction. *Angew Chem Int Ed Engl.* 41:3767-74.
- Grant, R.P., C. Spitzfaden, H. Altmann, I.D. Campbell, and H.J. Mardon. 1997. Structural requirements for biological activity of the ninth and tenth FIII domains of human fibronectin. *J Biol Chem.* 272:6159-66.
- Gratacap, M.P., B. Payrastre, C. Viala, G. Mauco, M. Plantavid, and H. Chap. 1998. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in FcgammaRIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem.* 273:24314-21.
- Grimaldi, C.M., F. Chen, C. Wu, H.J. Weiss, B.S. Coller, and D.H. French. 1998. Glycoprotein IIb Leu214Pro mutation produces Glanzmann thrombasthenia with both quantitative and qualitative abnormalities in GPIIb/IIIa. *Blood.* 91:1562-1571.
- Guan, J.L., and R.O. Hynes. 1990. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell.* 60:53-61.

- Guinebault, C., B. Payrastra, C. Racaud-Sultan, H. Mazarguil, M. Breton, G. Mauco, M. Plantavid, and H. Chap. 1995. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* 129:831-42.
- Gulino, D., C. Boudignon, L.Y. Zhang, E. Concord, M.J. Rabiet, and G. Marguerie. 1992. Ca²⁺-binding properties of the platelet glycoprotein IIb ligand-interacting domain. *J Biol Chem.* 267:1001-7.
- Haas, T.A., and E.F. Plow. 1996. The cytoplasmic domain of alphaIIb beta3. A ternary complex of the integrin alpha and beta subunits and a divalent cation. *J Biol Chem.* 271:6017-26.
- Haimovich, B., L. Lipfert, J.S. Brugge, and S.J. Shattil. 1993. Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal reorganization in platelets are triggered by interaction of integrin receptors with their immobilized ligands. *J Biol Chem.* 268:15868-77.
- Haimovich, B., N. Kaneshiki, and P. Ji. 1996. Protein kinase C regulates tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets adherent to fibrinogen. *Blood.* 87:152-61.
- Hakoshima, T., T. Shimizu, and R. Maesaki. 2003. Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J Biochem (Tokyo).* 134:327-31.
- Hall, A. 1990. ras and GAP--who's controlling whom? *Cell.* 61:921-3.
- Hamaguchi, M., L.A. Bunce, L.A. Sporn, and C.W. Francis. 1993. Spreading of platelets on fibrin is mediated by the amino terminus of the beta chain including peptide beta 15-42. *Blood.* 81:2348-56.
- Han, J., B. Das, W. Wei, L. Van Aelst, R.D. Mosteller, R. Khosravi-Far, J.K. Westwick, C.J. Der, and D. Broek. 1997. Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol Cell Biol.* 17:1346-53.
- Harfenist, E.J., M.A. Packham, and J.F. Mustard. 1984. Effects of variant gamma chains and sialic acid content of fibrinogen upon its interactions with ADP-stimulated human and rabbit platelets. *Blood.* 64:1163-8.
- Harrison, S.C. 2003. Variation on an Src-like theme. *Cell.* 112:737-40.
- Hart, M.J., Y. Maru, D. Leonard, O.N. Witte, T. Evans, and R.A. Cerione. 1992. A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs. *Science.* 258:812-5.
- Hartwig, J.H., G.M. Bokoch, C.L. Carpenter, P.A. Janmey, L.A. Taylor, A. Toker, and T.P. Stossel. 1995. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell.* 82:643-53.
- Hato, T., N. Pampori, and S.J. Shattil. 1998. Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3. *J Cell Biol.* 141:1685-95.
- Hechler, B., C. Leon, C. Vial, P. Vigne, C. Frelin, J.P. Cazenave, and C. Gachet. 1998. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood.* 92:152-9.
- Heidenreich, R., R. Eisman, S. Surrey, K. Delgrosso, J.S. Bennett, E. Schwartz, and M. Poncz. 1990. Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb. *Biochemistry.* 29:1232-44.
- Hemler, M.E., C. Huang, and L. Schwarz. 1987. The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit. *J Biol Chem.* 262:3300-9.
- Hemmings, L., D.J. Rees, V. Ohanian, S.J. Bolton, A.P. Gilmore, B. Patel, H. Priddle, J.E. Trevithick, R.O. Hynes, and D.R. Critchley. 1996. Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J Cell Sci.* 109:2715-26.
- Heraud, J.M., C. Racaud-Sultan, D. Gironcel, C. Albiges-Rizo, T. Giacomini, S. Roques, V. Martel, M. Breton-Douillon, B. Perret, and H. Chap. 1998. Lipid products of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidylinositol 4',5'-bisphosphate are both required for ADP-dependent platelet spreading. *J Biol Chem.* 273:17817-23.
- Herrick, S., O. Blanc-Brude, A. Gray, and G. Laurent. 1999. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:741-6.
- Hess, J.A., A.H. Ross, R.G. Qiu, M. Symons, and J.H. Exton. 1997. Role of Rho family proteins in phospholipase D activation by growth factors. *J Biol Chem.* 272:1615-20.
- Hettasch, J.M., M.G. Bolyard, and S.T. Lord. 1992. The residues AGDV of recombinant gamma chains of human fibrinogen must be carboxy-terminal to support human platelet aggregation. *Thromb Haemost.* 68:701-6.
- Hibbs, M.L., S. Jakes, S.A. Stacker, R.W. Wallace, and T.A. Springer. 1991. The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J Exp Med.* 174:1227-38.
- Hildebrand, J.D., M.D. Schaller, and J.T. Parsons. 1993. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol.* 123:993-1005.
- Holinstat, M., D. Mehta, T. Kozasa, R.D. Minshall, and A.B. Malik. 2003. Protein kinase Calpha-induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement. *J Biol Chem.* 278:28793-8.
- Holmback, K., M.J. Danton, T.T. Suh, C.C. Daugherty, and J.L. Degen. 1996. Impaired platelet aggregation and sustained bleeding in mice lacking the fibrinogen motif bound by integrin alpha IIb beta 3. *EMBO J.* 15:5760-5771.
- Honda, S., Y. Tomiyama, M. Shiraga, S. Tadokoro, J. Takamatsu, H. Saito, Y. Kurata, and Y. Matsuzawa. 1998. A two-amino acid insertion in the Cys146- Cys167 loop of the alphaIIb subunit is associated with a variant of Glanzmann thrombasthenia. Critical role of Asp163 in ligand binding. *J Clin Invest.* 102:1183-92.

- Hornstein, I., E. Pikarsky, M. Groysman, G. Amir, N. Peylan-Ramu, and S. Katzav. 2003. The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas. *J Pathol.* 199:526-33.
- Horwitz, A., K. Duggan, C. Buck, M.C. Beckerle, and K. Burridge. 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature.* 320:531-3.
- Hotchin, N.A., and A. Hall. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol.* 131:1857-65.
- Hotchin, N.A., A.G. Kidd, H. Altroff, and H.J. Mardon. 1999. Differential activation of focal adhesion kinase, Rho and Rac by the ninth and tenth FIII domains of fibronectin. *J Cell Sci.* 112 (Pt 17):2937-46.
- Hotta, K., K. Tanaka, A. Mino, H. Kohno, and Y. Takai. 1996. Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor. *Biochem Biophys Res Commun.* 225:69-74.
- Hu, D.H., C.A. White, S. Panzer-Knodle, J.D. Page, N. Nicholson, and J.W. Smith. 1999. A new model of dual interacting ligand binding sites on integrin α IIb β 3. *J Biol Chem.* 274:4633-4639.
- Huang, C., and T.A. Springer. 1997. Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3162-7.
- Hughes, P.E., F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J.A. McDonald, S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg. 1996. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem.* 271:6571-4.
- Humphries, M.J. 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 28:311-39.
- Humphries, M.J., E.J. Symonds, and A.P. Mould. 2003. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr Opin Struct Biol.* 13:236-43.
- Huttelmaier, S., P. Bubeck, M. Rudiger, and B.M. Jockusch. 1997. Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur J Biochem.* 247:1136-42.
- Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48:549-54.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Hynes, R.O. 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9:M33-7.
- Hynes, R.O., and Q. Zhao. 2000. The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol.* 150:F89-96.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Ikeda, Y., M. Handa, K. Kawano, T. Kamata, M. Murata, Y. Araki, H. Anbo, Y. Kawai, K. Watanabe, I. Itagaki, and et al. 1991. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest.* 87:1234-40.
- Inagaki, K., T. Yamao, T. Noguchi, T. Matozaki, K. Fukunaga, T. Takada, T. Hosooka, S. Akira, and M. Kasuga. 2000. SHPS-1 regulates integrin-mediated cytoskeletal reorganization and cell motility. *Embo J.* 19:6721-31.
- Ishizaki, T., M. Maekawa, K. Fujisawa, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Fujita, N. Watanabe, Y. Saito, A. Kakizuka, N. Morii, and S. Narumiya. 1996. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J.* 15:1885-93.
- Iwamoto, S., E. Nishiumi, E. Kajii, and S. Ikemoto. 1994. An exon 28 mutation resulting in alternative splicing of the glycoprotein IIb transcript and Glanzmann's thrombasthenia. *Blood.* 83:1017-23.
- Izaguirre, G., L. Aguirre, Y.P. Hu, H.Y. Lee, D.D. Schlaepfer, B.J. Aneskievich, and B. Haimovich. 2001. The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 276:28676-85.
- Jackson, D.E., M.M. White, L.K. Jennings, and P.J. Newman. 1998. A Ser162-->Leu mutation within glycoprotein (GP) IIIa (integrin beta3) results in an unstable alphaIIb beta3 complex that retains partial function in a novel form of type II Glanzmann thrombasthenia. *Thromb Haemost.* 80:42-8.
- Jackson, S.P., W.S. Nesbitt, and S. Kulkarni. 2003. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 1:1602-12.
- Jenkins, A.L., L. Nannizzi-Alaimo, D. Silver, J.R. Sellers, M.H. Ginsberg, D.A. Law, and D.R. Phillips. 1998. Tyrosine phosphorylation of the beta3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. *J Biol Chem.* 273:13878-85.
- Jennings, L.K., and D.R. Phillips. 1982. Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. *J Biol Chem.* 257:10458-66.
- Jockusch, B.M., and M. Rudiger. 1996. Crosstalk between cell adhesion molecules: vinculin as a paradigm for regulation by conformation. *Trends Cell Biol.* 6:311-5.
- Johansson, S., G. Svineng, K. Wennerberg, A. Armulik, and L. Lohikangas. 1997. Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci.* 2:d126-46.
- Joyal, J.L., R.S. Annan, Y.D. Ho, M.E. Huddleston, S.A. Carr, M.J. Hart, and D.B. Sacks. 1997. Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J Biol Chem.* 272:15419-25.
- Judd, B.A., P.S. Myung, A. Obergfell, E.E. Myers, A.M. Cheng, S.P. Watson, W.S. Pear, D. Allman, S.J. Shattil, and G.A. Koretzky. 2002. Differential requirement for LAT and SLP-76 in GPVI versus T cell receptor signaling. *J Exp Med.* 195:705-17.
- Juliano, R.L., and S. Haskill. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 120:577-85.
- Kahn, M.J., T. Kieber-Emmons, G. Vilaire, R. Murali, M. Poncz, and J.S. Bennett. 1996. Effect of mutagenesis of GPIIb amino acid 273 on the expression and conformation of the platelet integrin GPIIb-IIIa. *Biochemistry.* 35:14304-11.

- Kahn, M.L., Y.W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R.V. Farese, Jr., C. Tam, and S.R. Coughlin. 1998. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 394:690-4.
- Kaibuchi, K., S. Kuroda, and M. Amano. 1999. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*. 68:459-86.
- Kajiji, S., R.N. Tamura, and V. Quaranta. 1989. A novel integrin (alpha E beta 4) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *Embo J*. 8:673-80.
- Kamata, T., W. Puzon, and Y. Takada. 1995. Identification of putative ligand-binding sites of the integrin alpha 4 beta 1 (VLA-4, CD49d/CD29). *Biochem J*. 305 (Pt 3):945-51.
- Kamata, T., A. Irie, M. Tokuhira, and Y. Takada. 1996. Critical residues of integrin alphaIIb subunit for binding of alphaIIb beta3 (glycoprotein IIb-IIIa) to fibrinogen and ligand-mimetic antibodies (PAC-1, OP-G2, and LJ-CP3). *J Biol Chem*. 271:18610-5.
- Kamata, T., K.K. Tieu, A. Irie, T.A. Springer, and Y. Takada. 2001. Amino acid residues in the α_{IIb} subunit that are critical for ligand binding to Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ are clustered in the b-propeller model. *J Biol Chem*. 276:44275-44283.
- Kamata, T., K.K. Tieu, T. Tarui, W. Puzon-McLaughlin, N. Hogg, and Y. Takada. 2002. The role of the CPNKEKEK sequence in the beta(2) subunit I domain in regulation of integrin alpha(L)beta(2) (LFA-1). *J Immunol*. 168:2296-301.
- Kamata, T., H. Ambo, W. Puzon-McLaughlin, K.K. Tieu, M. Handa, Y. Ikeda, and Y. Takada. 2004. Critical cysteine residues for regulation of integrin alphaIIb beta3 are clustered in the epidermal growth factor domains of the beta3 subunit. *Biochem J*. 378:1079-82.
- Kashiwagi, H., M.A. Schwartz, M. Eigenthaler, K.A. Davis, M.H. Ginsberg, and S.J. Shattil. 1997. Affinity modulation of platelet integrin alphaIIb beta3 by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. *J Cell Biol*. 137:1433-43.
- Kashiwagi, H., Y. Tomiyama, S. Tadokoro, S. Honda, M. Shiraga, H. Mizutani, M. Handa, Y. Kurata, Y. Matsuzawa, and S.J. Shattil. 1999. A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the β_3 subunit activates integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_V\beta_3$. *Blood*. 93:2559-2568.
- Kato, A., N. Kawamata, K. Tamayose, M. Egashira, R. Miura, T. Fujimura, K. Murayama, and K. Oshimi. 2002. Ancient ubiquitous protein I binds to the conserved membrane-proximal sequence of the cytoplasmic tail of the integrin alpha subunits that plays a crucial role in the inside-out signaling of alpha IIb beta 3. *J Biol Chem*. 277:28934-41.
- Keely, P.J., and L.V. Parise. 1996. The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J Biol Chem*. 271:26668-76.
- Khyrul, W.A., D.P. LaLonde, M.C. Brown, H. Levinson, and C.E. Turner. 2004. The integrin-linked kinase regulates cell morphology and motility in a rho-associated kinase-dependent manner. *J Biol Chem*. 279:54131-9.
- Kieffer, N., and D.R. Phillips. 1990. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol*. 6:329-57.
- Kieffer, N., L.A. Fitzgerald, D. Wolf, D.A. Cheresh, and D.R. Phillips. 1991. Adhesive properties of the β_3 integrins: comparison of GP IIb-IIIa and the vitronectin receptor individually expressed in human melanoma cells. *J Cell Biol*. 113:451-461.
- Kim, M., C.V. Carman, and T.A. Springer. 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*. 301:1720-5.
- Kioka, N., S. Sakata, T. Kawauchi, T. Amachi, S.K. Akiyama, K. Okazaki, C. Yaen, K.M. Yamada, and S. Aota. 1999. Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol*. 144:59-69.
- Kirchhofer, D., J. Grzesiak, and M.D. Pierschbacher. 1991. Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*. 266:4471-7.
- Kishimoto, T.K., K. O'Connor, A. Lee, T.M. Roberts, and T.A. Springer. 1987. Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell*. 48:681-90.
- Klein, S., A.R. de Fougères, P. Blaikie, L. Khan, A. Pepe, C.D. Green, V. Kotliansky, and F.G. Giancotti. 2002. Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol Cell Biol*. 22:5912-22.
- Kloczewiak, M., S. Timmons, and J. Hawiger. 1982. Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen γ chain. *Biochem Biophys Res Comm*. 107:181-187.
- Kloczewiak, M., S. Timmons, and J. Hawiger. 1983. Recognition site for the platelet receptor is present on the 15-residue carboxy-terminal fragment of the gamma chain of human fibrinogen and is not involved in the fibrin polymerization reaction. *Thromb Res*. 29:249-255.
- Kloczewiak, M., S. Timmons, T.J. Lukas, and J. Hawiger. 1984. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationships of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ chain. *Biochemistry*. 23:1767-1774.
- Knezevic, I., T.M. Leisner, and S.C. Lam. 1996. Direct binding of the platelet integrin alphaIIb beta3 (GP IIb-IIIa) to talin. Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both alphaIIb and beta3. *J Biol Chem*. 271:16416-21.

- Kobayashi, K., S. Kuroda, M. Fukata, T. Nakamura, T. Nagase, N. Nomura, Y. Matsuura, N. Yoshida-Kubomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1998. p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem.* 273:291-5.
- Koivunen, E., D.A. Gay, and E. Ruoslahti. 1993. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. *J Biol Chem.* 268:20205-10.
- Kolanus, W., W. Nagel, B. Schiller, L. Zeitlmann, S. Godar, H. Stockinger, and B. Seed. 1996. Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell.* 86:233-42.
- Kouns, W.C., C.D. Wall, M.M. White, C.F. Fox, and L.K. Jennings. 1990. A conformation-dependant epitope of human platelet glycoprotein IIIa. *J Biol Chem.* 265:20594-601.
- Kouns, W.C., B. Steiner, T.J. Kunicki, S. Moog, J. Jutzi, L.K. Jennings, J.P. Cazenave, and F. Lanza. 1994. Activation of the fibrinogen binding site on platelets isolated from a patient with the Strasbourg I variant of Glanzmann's thrombasthenia. *Blood.* 84:1108-15.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best, and L. Lim. 1995. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 15:1942-52.
- Krammer, A., D. Craig, W.E. Thomas, K. Schulten, and V. Vogel. 2002. A structural model for force regulated integrin binding to fibronectin's RGD-synergy site. *Matrix Biol.* 21:139-47.
- Kretsinger, R.H., and C.E. Nockolds. 1973. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem.* 248:3313-26.
- Kretsinger, R.H. 1976. Calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem.* 45:239-66.
- Kroemker, M., A.H. Rudiger, B.M. Jockusch, and M. Rudiger. 1994. Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett.* 355:259-62.
- Kroll, M.H., J.D. Hellums, L.V. McIntire, A.I. Schafer, and J.L. Moake. 1996. Platelets and shear stress. *Blood.* 88:1525-41.
- Kulkarni, S., S.M. Dopheide, C.L. Yap, C. Ravanat, M. Freund, P. Mangin, K.A. Heel, A. Street, I.S. Harper, F. Lanza, and S.P. Jackson. 2000. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest.* 105:783-91.
- Kunapuli, S.P. 1998. Multiple P2 receptor subtypes on platelets: a new interpretation of their function. *Trends Pharmacol Sci.* 19:391-4.
- Kunicki, T.J., D. Pidard, J.P. Cazenave, A.T. Nurden, and J.P. Caen. 1981. Inheritance of the human platelet alloantigen, P1A1, in type I Glanzmann's thrombasthenia. *J Clin Invest.* 67:717-24.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lahav, J., N. Gofer-Dadosh, J. Luboshitz, O. Hess, and M. Shaklai. 2000. Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Lett.* 475:89-92.
- Lahav, J., K. Jurk, O. Hess, M.J. Barnes, R.W. Farndale, J. Luboshitz, and B.E. Kehrel. 2002. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood.* 100:2472-8.
- Lam, S.C.-T., E.F. Plow, M.A. Smith, A. Andrieux, J.-J. Ryckwaert, G. Marguerie, and M.H. Ginsberg. 1987. Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and fibrinogen γ chain peptides share a common binding site on platelets. *J Biol Chem.* 262:947-950.
- Lamarche, N., and A. Hall. 1994. GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* 10:436-40.
- Lane, D.A., B. Cuddigan, M. VanRoss, and V.V. Kakkar. 1980. Dysfibrinogenaemia characterized by abnormal fibrin monomer polymerization and normal fibrinopeptide A release. *Br J Haematol.* 44:483-94.
- Languino, L.R., J. Plescia, A. Duperray, A.A. Brian, E.F. Plow, J.E. Geltosky, and D.C. Altieri. 1993. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell.* 73:1423-34.
- Lanza, F., A. Stierlé, D. Fournier, M. Morales, G. André, A.T. Nurden, and C. J.-P. 1992. A new variant of Glanzmann's thrombasthenia (Strasbourg I). *J Clin Invest.* 89:1995-2004.
- Laudanna, C., J.J. Campbell, and E.C. Butcher. 1997. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem.* 272:24141-4.
- Laudano, A.P., and R.F. Doolittle. 1978. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:3085-9.
- Law, D.A., L. Nannizzi-Alaimo, and D.R. Phillips. 1996. Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3 (GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem.* 271:10811-5.
- Law, D.A., F.R. DeGuzman, P. Heiser, K. Ministri-Madrid, N. Killeen, and D.R. Phillips. 1999. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIbbeta3 signalling and platelet function. *Nature.* 401:808-11.
- Leahy, D.J., W.A. Hendrickson, I. Aukhil, and H.P. Erickson. 1992. Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science.* 258:987-91.
- Leahy, D.J., I. Aukhil, and H.P. Erickson. 1996. 2.0 Å crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell.* 84:155-64.
- Lee, J.O., P. Rieu, M.A. Arnaout, and R. Liddington. 1995. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell.* 80:631-8.
- Lee, S.B., A.K. Rao, K.H. Lee, X. Yang, Y.S. Bae, and S.G. Rhee. 1996. Decreased expression of phospholipase C-beta 2 isozyme in human platelets with impaired function. *Blood.* 88:1684-91.

- Leisner, T.M., J.D. Wencel-Drake, W. Wang, and S.C. Lam. 1999. Bidirectional transmembrane modulation of integrin alphaIIb beta3 conformations. *J Biol Chem.* 274:12945-9.
- Leitinger, B., and N. Hogg. 1999. Integrin I domains and their function. *Biochem Soc Trans.* 27:826-32.
- Lelias, J.M., C.N. Adra, G.M. Wulf, J.C. Guillemot, M. Khagad, D. Caput, and B. Lim. 1993. cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:1479-83.
- Lemmon, M.A., J.M. Flanagan, H.R. Treutlein, J. Zhang, and D.M. Engelman. 1992. Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. *Biochemistry.* 31:12719-25.
- Leng, L., H. Kashiwagi, X.D. Ren, and S.J. Shattil. 1998. RhoA and the function of platelet integrin alphaIIb beta3. *Blood.* 91:4206-15.
- Lenter, M., and D. Vestweber. 1994. The integrin chains beta 1 and alpha 6 associate with the chaperone calnexin prior to integrin assembly. *J Biol Chem.* 269:12263-8.
- Leonard, D., M.J. Hart, J.V. Platko, A. Eva, W. Henzel, T. Evans, and R.A. Cerione. 1992. The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem.* 267:22860-8.
- Li, F., and H.N. Higgs. 2003. The mouse Formin mDial is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol.* 13:1335-40.
- Li, R., C.R. Babu, J.D. Lear, A.J. Wand, J.S. Bennett, and W.F. DeGrado. 2001. Oligomerization of the integrin alphaIIb beta3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:12462-7.
- Li, R., N. Mitra, H. Gratkowski, G. Vilaire, R. Litvinov, C. Nagasami, J.W. Weisel, J.D. Lear, W.F. DeGrado, and J.S. Bennett. 2003. Activation of integrin alphaIIb beta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science.* 300:795-8.
- Li, R., R. Gorelik, V. Nanda, P.B. Law, J.D. Lear, W.F. DeGrado, and J.S. Bennett. 2004. Dimerization of the transmembrane domain of Integrin alphaIIb subunit in cell membranes. *J Biol Chem.* 279:26666-73.
- Li, W., D.G. Metcalf, R. Gorelik, R. Li, N. Mitra, V. Nanda, P.B. Law, J.D. Lear, W.F. DeGrado, and J.S. Bennett. 2005. A push-pull mechanism for regulating integrin function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:1424-9.
- Liddington, R., and L. Bankston. 1998. The integrin I domain: crystals, metals and related artefacts. *Structure.* 6:937-8.
- Liddington, R.C., and M.H. Ginsberg. 2002. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol.* 158:833-9.
- Linder, S., and M. Aepfelbacher. 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13:376-85.
- Ling, K., R.L. Doughman, A.J. Firestone, M.W. Bunce, and R.A. Anderson. 2002. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature.* 420:89-93.
- Ling, K., R.L. Doughman, V.V. Iyer, A.J. Firestone, S.F. Bairstow, D.F. Mosher, M.D. Schaller, and R.A. Anderson. 2003. Tyrosine phosphorylation of type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase by Src regulates an integrin-talin switch. *J Cell Biol.* 163:1339-49.
- Lipfert, L., B. Haimovich, M.D. Schaller, B.S. Cobb, J.T. Parsons, and J.S. Brugge. 1992. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol.* 119:905-12.
- Litjens, P.E., G. Gorter, J. Ylanne, J.W. Akkerman, and G. van Willigen. 2003. Involvement of the beta3 E749ATSTFTN756 region in stabilizing integrin alphaIIb beta3-ligand interaction. *J Thromb Haemost.* 1:2216-24.
- Liu, B.P., and K. Burridge. 2000. Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta1 integrins. *Mol Cell Biol.* 20:7160-9.
- Liu, Q., G. Matsueda, E. Brown, and M. Frojmovic. 1997. The AGDV residues on the gamma chain carboxyl terminus of platelet-bound fibrinogen are needed for platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta.* 1343:316-26.
- Liu, S., D.A. Calderwood, and M.H. Ginsberg. 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci.* 113 (Pt 20):3563-71.
- Loftus, J.C., T.E. O'Toole, E.F. Plow, A. Glass, A.L. Frelinger, 3rd, and M.H. Ginsberg. 1990. A beta 3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science.* 249:915-8.
- Loh, E., W. Qi, G. Vilaire, and J.S. Bennett. 1996. Effect of cytoplasmic domain mutations on the agonist-stimulated ligand binding activity of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Biol Chem.* 271:30233-41.
- Lu, C., J. Takagi, and T.A. Springer. 2001. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem.* 276:14642-8.
- Luo, B.H., T.A. Springer, and J. Takagi. 2004. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol.* 2:e153.
- Luo, B.H., C.V. Carman, J. Takagi, and T.A. Springer. 2005. Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:3679-84.
- Lyman, S., A. Gilmore, K. Burridge, S. Gidwitz, and G.C. White, 2nd. 1997. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is independent of focal adhesion formation or integrin activation. Studies with activated and inhibitory beta3 cytoplasmic domain mutants. *J Biol Chem.* 272:22538-47.

- Machesky, L.M., and A. Hall. 1997. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol.* 138:913-26.
- Machesky, L.M., and R.H. Insall. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol.* 8:1347-56.
- Machesky, L.M., and T.D. Poland. 1993. Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends Cell Biol.* 3:381-5.
- Mackay, D.J., and A. Hall. 1998. Rho GTPases. *J Biol Chem.* 273:20685-8.
- Mackinnon, A.C., H. Qadota, K.R. Norman, D.G. Moerman, and B.D. Williams. 2002. C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol.* 12:787-97.
- Madaule, P., M. Eda, N. Watanabe, K. Fujisawa, T. Matsuoka, H. Bito, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 1998. Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature.* 394:491-4.
- Madaule, P., T. Furuyashiki, M. Eda, H. Bito, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 2000. Citron, a Rho target that affects contractility during cytokinesis. *Microsc Res Tech.* 49:123-6.
- Maddox, A.S., and K. Burridge. 2003. RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J Cell Biol.* 160:255-65.
- Mandai, K., H. Nakanishi, A. Satoh, K. Takahashi, K. Satoh, H. Nishioka, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. Ponsin/SH3P12: an I-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J Cell Biol.* 144:1001-17.
- Manganello, J.M., J.S. Huang, T. Kozasa, T.A. Voyno-Yasenetskaya, and G.C. Le Breton. 2003. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the G α 13 switch I region alters the G α 13-G protein-coupled receptor complex and inhibits Rho activation. *J Biol Chem.* 278:124-30.
- Manser, E., C. Chong, Z.S. Zhao, T. Leung, G. Michael, C. Hall, and L. Lim. 1995. Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem.* 270:25070-8.
- Marchisio, P.C., O. Capasso, L. Nitsch, R. Cancedda, and E. Gionti. 1984. Cytoskeleton and adhesion patterns of cultured chick embryo chondrocytes during cell spreading and Rous sarcoma virus transformation. *Exp Cell Res.* 151:332-43.
- Mardon, H.J., and K.E. Grant. 1994. The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion. *FEBS Lett.* 340:197-201.
- Margolis, B., J.P. Borg, S. Straight, and D. Meyer. 1999. The function of PTB domain proteins. *Kidney Int.* 56:1230-7.
- Marignani, P.A., and C.L. Carpenter. 2001. Vav2 is required for cell spreading. *J Cell Biol.* 154:177-86.
- Marsden, B.J., G.S. Shaw, and B.D. Sykes. 1990. Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. *Biochem Cell Biol.* 68:587-601.
- Martin, K.H., J.K. Slack, S.A. Boerner, C.C. Martin, and J.T. Parsons. 2002a. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science.* 296:1652-3.
- Martin, K.H., S.A. Boerner, and J.T. Parsons. 2002b. Regulation of focal adhesion targeting and inhibitory functions of the FAK related protein FRNK using a novel estrogen receptor "switch". *Cell Motil Cytoskeleton.* 51:76-88.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J.* 15:2208-16.
- McCann, R.O., and S.W. Craig. 1997. The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5679-84.
- McLean, J.W., D.J. Vestal, D.A. Cheresch, and S.C. Bodary. 1990. cDNA sequence of the human integrin beta 5 subunit. *J Biol Chem.* 265:17126-31.
- Medved, L.V., O.V. Gorkun, V.F. Manyakov, and V.A. Belitser. 1985. The role of fibrinogen alpha C-domains in the fibrin assembly process. *FEBS Lett.* 181:109-12.
- Medved, L.V., S.V. Litvinovich, T.P. Ugarova, N.I. Lukinova, V.N. Kalikhevich, and Z.A. Ardemasova. 1993. Localization of a fibrin polymerization site complementary to Gly-His-Arg sequence. *FEBS Lett.* 320:239-42.
- Meh, D.A., K.R. Siebenlist, S.O. Brennan, T. Holyst, and M.W. Mosesson. 2001. The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding. *Thromb Haemost.* 85:470-4.
- Mekrache, M., P. Legendre, N. Kieffer, and D. Baruch. 2002. Activation of integrin α 11 β 3 expressed in Chinese hamster ovary cells is required for interaction with solid-phase von Willebrand factor. *Br J Haematol.* 119:1024-32.
- Meredith, J.E., Jr., B. Fazeli, and M.A. Schwartz. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 4:953-61.
- Meredith, J.E., Jr., S. Winitz, J.M. Lewis, S. Hess, X.D. Ren, M.W. Renshaw, and M.A. Schwartz. 1996. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev.* 17:207-20.
- Michishita, M., V. Videm, and M.A. Arnaout. 1993. A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell.* 72:857-67.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. 1998. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J.* 17:6932-41.

- Miranti, C.K., L. Leng, P. Maschberger, J.S. Brugge, and S.J. Shattil. 1998. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol.* 8:1289-99.
- Miranti, C.K., and J.S. Brugge. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol.* 4:E83-90.
- Mitsios, J.V., A.P. Tambaki, M. Abatzis, N. Biris, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, K. Soteriadou, J. Goudevenos, M. Elisaf, D. Tsoukatos, V. Tsikaris, and A.D. Tselepis. 2004. Effect of synthetic peptides corresponding to residues 313-332 of the alphaIIb subunit on platelet activation and fibrinogen binding to alphaIIbbeta3. *Eur J Biochem.* 271:855-62.
- Moon, S.Y., and Y. Zheng. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* 13:13-22.
- Morii, N., T. Teru-uchi, T. Tominaga, N. Kumagai, S. Kozaki, F. Ushikubi, and S. Narumiya. 1992. A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *J Biol Chem.* 267:20921-6.
- Mosesson, M.W., J.S. Finlayson, and R.A. Umfleet. 1972. Human fibrinogen heterogeneities. 3. Identification of chain variants. *J Biol Chem.* 247:5223-7.
- Mosesson, M.W. 1983. Fibrinogen heterogeneity. *Ann N Y Acad Sci.* 408:97-113.
- Mosesson, M.W., K.R. Siebenlist, J.P. DiOrio, M. Matsuda, J.F. Hainfeld, and J.S. Wall. 1995. The role of fibrinogen D domain intermolecular association sites in the polymerization of fibrin and fibrinogen Tokyo II (gamma 275 Arg-->Cys). *J Clin Invest.* 96:1053-8.
- Mosesson, M.W. 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 3:1894-904.
- Mould, A.P., and M.J. Humphries. 1991. Identification of a novel recognition sequence for the integrin alpha 4 beta 1 in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Embo J.* 10:4089-95.
- Mould, A.P., A. Komoriya, K.M. Yamada, and M.J. Humphries. 1991. The CS5 peptide is a second site in the IIICS region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues. *J Biol Chem.* 266:3579-85.
- Mould, A.P., J.A. Askari, S. Aota, K.M. Yamada, A. Irie, Y. Takada, H.J. Mardon, and M.J. Humphries. 1997. Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit. *J Biol Chem.* 272:17283-17292.
- Mould, A.P., J.A. Askari, and M.J. Humphries. 2000. Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha 5beta 1. I. Specificity of ligand binding is determined by amino acid sequences in the second and third NH2-terminal repeats of the alpha subunit. *J Biol Chem.* 275:20324-36.
- Mould, A.P., S.E. J., P.A. Buckley, J.G. Grossmann, P.A. McEwan, S.J. Barton, J.A. Askari, S.E. Craig, J. Bella, and M.J. Humphries. 2003. Structure of an integrin-ligand complex deduced from solution x-ray scattering and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 278:39993-39999.
- Moyle, M., M.A. Napier, and J.W. McLean. 1991. Cloning and expression of a divergent integrin subunit beta 8. *J Biol Chem.* 266:19650-8.
- Mukai, H., M. Kitagawa, H. Shibata, H. Takanaga, K. Mori, M. Shimakawa, M. Miyahara, K. Hirao, and Y. Ono. 1994. Activation of PKN, a novel 120-kDa protein kinase with leucine zipper-like sequences, by unsaturated fatty acids and by limited proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 204:348-56.
- Nachmias, V.T., and R. Golla. 1991. Vinculin in relation to stress fibers in spread platelets. *Cell Motil Cytoskeleton.* 20:190-202.
- Nagel, W., L. Zeitlmann, P. Schilcher, C. Geiger, J. Kolanus, and W. Kolanus. 1998. Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem.* 273:14853-61.
- Naik, U.P., and M.U. Naik. 2003a. Association of CIB with GPIIb/IIIa during outside-in signaling is required for platelet spreading on fibrinogen. *Blood.* 102:1355-62.
- Naik, M.U., and U.P. Naik. 2003b. Calcium-and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen. *Blood.* 102:3629-36.
- Naik, U.P., P.M. Patel, and L.V. Parise. 1997. Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 272:4651-4.
- Neerman-Arbez, M., P. de Moerloose, C. Bridel, A. Honsberger, A. Schonborner, C. Rossier, K. Peerlinck, S. Claeysens, D. Di Michele, R. d'Oiron, M. Dreyfus, M. Laubriat-Bianchin, J. Dieval, S.E. Antonarakis, and M.A. Morris. 2000. Mutations in the fibrinogen alpha gene account for the majority of cases of congenital afibrinogenemia. *Blood.* 96:149-52.
- Ni, H., C.V. Denis, S. Subbarao, J.L. Degen, T.N. Sato, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 2000. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest.* 106:385-92.
- Nikolopoulos, S.N., and C.E. Turner. 2000. Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J Cell Biol.* 151:1435-48.
- Nikolopoulos, S.N., and C.E. Turner. 2001. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem.* 276:23499-505.
- Nimnual, A.S., L.J. Taylor, and D. Bar-Sagi. 2003. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol.* 5:236-41.

- Nisimoto, Y., J.L. Freeman, S.A. Motalebi, M. Hirshberg, and J.D. Lambeth. 1997. Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem.* 272:18834-41.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1994. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev.* 4:77-81.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Nurden, A.T., and J.P. Caen. 1974. An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol.* 28:253-60.
- Obara, M., M.S. Kang, and K.M. Yamada. 1988. Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell.* 53:649-57.
- Obergfell, A., B.A. Judd, M.A. del Pozo, M.A. Schwartz, G.A. Koretzky, and S.J. Shattil. 2001. The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIb beta3 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 276:5916-23.
- Obergfell, A., K. Eto, A. Mocsai, C. Buensuceso, S. Moores, J. Brugge, C. Lowell, and S. Shattil. 2002. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with alphaIIb beta3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 157:265-275.
- O'Connor, K.L., and A.M. Mercurio. 2001. Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *J Biol Chem.* 276:47895-900.
- Ohba, Y., K. Ikuta, A. Ogura, J. Matsuda, N. Mochizuki, K. Nagashima, K. Kurokawa, B.J. Mayer, K. Maki, J. Miyazaki, and M. Matsuda. 2001. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *Embo J.* 20:3333-41.
- Ohta, Y., N. Suzuki, S. Nakamura, J.H. Hartwig, and T.P. Stossel. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2122-8.
- Olofsson, B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* 11:545-54.
- Olson, M.F., N.G. Pasteris, J.L. Gorski, and A. Hall. 1996. Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr Biol.* 6:1628-33.
- Olson, M.F. 2004. Contraction reaction: mechanical regulation of Rho GTPase. *Trends Cell Biol.* 14:111-4.
- O'Neill, S., A. Robinson, A. Deering, M. Ryan, D.J. Fitzgerald, and N. Moran. 2000a. The platelet integrin alpha IIb beta 3 has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem.* 275:36984-90.
- O'Neill, G.M., S.J. Fashena, and E.A. Golemis. 2000b. Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage. *Trends Cell Biol.* 10:111-9.
- O'Toole, T.E., J.C. Loftus, E.F. Plow, A.A. Glass, J.R. Harper, and M.H. Ginsberg. 1989. Efficient surface expression of platelet GPIIb-IIIa requires both subunits. *Blood.* 74:14-8.
- O'Toole, T.E., J.C. Loftus, X.P. Du, A.A. Glass, Z.M. Ruggeri, S.J. Shattil, E.F. Plow, and M.H. Ginsberg. 1990. Affinity modulation of the alpha IIb beta 3 integrin (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul.* 1:883-93.
- O'Toole, T.E., Y. Katagiri, R.J. Faull, K. Peter, R. Tamura, V. Quaranta, J.C. Loftus, S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol.* 124:1047-59.
- O'Toole, T.E., J. Ylanne, and B.M. Culley. 1995. Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 270:8553-8.
- Paddison, P.J., A.A. Caudy, E. Bernstein, G.J. Hannon, and D.S. Conklin. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16:948-58.
- Parise, L.V., S.L. Helgerson, B. Steiner, L. Nannizzi, and D.R. Phillips. 1987. Synthetic peptides derived from fibrinogen and fibronectin change the conformation of purified platelet glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem.* 262:12597-602.
- Parise, L.V., A.B. Criss, L. Nannizzi, and M.R. Wardell. 1990. Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. *Blood.* 75:2363-8.
- Parsons, J.T. 1996. Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr Opin. Cell Biol.* 8:146-152.
- Parsons, J.T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* 116:1409-16.
- Partridge, A.W., S. Liu, S. Kim, J.U. Bowie, and M.H. Ginsberg. 2005. Transmembrane domain helix packing stabilizes integrin alphaIIb beta3 in the low affinity state. *J Biol Chem.* 280:7294-300.
- Pasquet, J.M., R. Bobe, B. Gross, M.P. Gratacap, M.G. Tomlinson, B. Payrastre, and S.P. Watson. 1999. A collagen-related peptide regulates phospholipase C gamma2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets. *Biochem J.* 342 (Pt 1):171-7.
- Paterson, H.F., A.J. Self, M.D. Garrett, I. Just, K. Aktories, and A. Hall. 1990. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol.* 111:1001-7.
- Payrastre, B., K. Missy, C. Trumel, S. Bodin, M. Plantavid, and H. Chap. 2000. The integrin alphaIIb/beta3 in human platelet signal transduction. *Biochem. Pharmacol.* 60:1069-1074.
- Peerschke, E.I., C.W. Francis, and V.J. Marder. 1986. Fibrinogen binding to human blood platelets: effect of gamma chain carboxyterminal structure and length. *Blood.* 67:385-90.
- Peerschke, E.I. 1995. Regulation of platelet aggregation by post-fibrinogen binding events. Insights provided by dithiothreitol-treated platelets. *Thromb Haemost.* 73:862-7.

- Petch, L.A., S.M. Bockholt, A. Bouton, J.T. Parsons, and K. Burridge. 1995. Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 src substrate. *J Cell Sci.* 108 (Pt 4):1371-9.
- Peter, K., and C. Bode. 1996. A deletion in the alpha subunit locks platelet integrin alpha IIb beta 3 into a high affinity state. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 7:233-6.
- Pfaff, M., S. Liu, D.J. Erle, and M.H. Ginsberg. 1998. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem.* 273:6104-9.
- Pfaff, M., X. Du, and M.H. Ginsberg. 1999. Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains. *FEBS Lett.* 460:17-22.
- Phillips, D.R., and P.P. Agin. 1977a. Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *J Clin Invest.* 60:535-45.
- Phillips, D.R., and P.P. Agin. 1977b. Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 252:2121-6.
- Phillips, D.R., I.F. Charo, L.V. Parise, and L.A. Fitzgerald. 1988. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood.* 71:831-43.
- Phillips, D.R., I.F. Charo, and R.M. Scarborough. 1991. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell.* 65:359-62.
- Phillips, D.R., L. Nannizzi-Alaimo, and K.S. Prasad. 2001. Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIb beta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost.* 86:246-58.
- Pierschbacher, M.D., and E. Ruoslahti. 1984. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci.* 81:5985-5988.
- Plow, E.F., M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G.A. Marguerie, and M.H. Ginsberg. 1985. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:8057-61.
- Plow, E.F., J.C. Loftus, E.G. Levin, D.S. Fair, D. Dixon, J. Forsyth, and M.H. Ginsberg. 1986. Immunologic relationship between platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa and cell surface molecules expressed by a variety of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:6002-6.
- Plow, E.F., and M.H. Ginsberg. 1989. Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog Hemost Thromb.* 9:117-56.
- Podolnikova, N.P., V.P. Yakubenko, G.L. Volkov, and E.F. Plow. 2003. Identification of a novel binding site for platelet integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) and $\alpha_5\beta_1$ in the γ C-domain of fibrinogen. *J Biol Chem.* 278:32251-32258.
- Prandini, M.H., E. Denarier, P. Frachet, G. Uzan, and G. Marguerie. 1988. Isolation of the human platelet glycoprotein IIb gene and characterization of the 5' flanking region. *Biochem Biophys Res Commun.* 156:595-601.
- Pratt, K.P., H.C. Cote, D.W. Chung, R.E. Stenkamp, and E.W. Davie. 1997. The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal gamma chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:7176-81.
- Prévost, N., D.S. Woulfe, H. Jiang, T.J. Stalker, P. Marchese, Z.M. Ruggeri, and L.F. Brass. 2005. Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9820-5.
- Price, L.S., J. Leng, M.A. Schwartz, and G.M. Bokoch. 1998. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell.* 9:1863-1871.
- Puzon-McLaughlin, W., T. Kamata, and Y. Takada. 2000. Multiple discontinuous ligand-mimetic antibody binding sites define a ligand binding pocket in integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem.* 275:7795-802.
- Qu, A., and D.J. Leahy. 1996. The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin. *Structure.* 4:931-42.
- Quinn, M., A. Deering, M. Stewart, D. Cox, B. Foley, and D. Fitzgerald. 1999. Quantifying GPIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies: discriminating abciximab and small molecular weight antagonists. *Circulation.* 99:2231-8.
- Rajagopalan, M., J.L. Neidigh, and D.A. McClain. 1991. Amino acid sequences Gly-Pro-Leu-Tyr and Asn-Pro-Glu-Tyr in the submembranous domain of the insulin receptor are required for normal endocytosis. *J Biol Chem.* 266:23068-73.
- Ratnikov, B.I., A.W. Partridge, and M.H. Ginsberg. 2005. Integrin activation by talin. *J Thromb Haemost.* 3:1783-90.
- Reddy, K.B., P. Gascard, M.G. Price, E.V. Negrescu, and J.E. Fox. 1998. Identification of an interaction between the m-band protein skelemin and beta-integrin subunits. Colocalization of a skelemin-like protein with beta1- and beta3-integrins in non-muscle cells. *J Biol Chem.* 273:35039-47.
- Rees, D.J., S.E. Ades, S.J. Singer, and R.O. Hynes. 1990. Sequence and domain structure of talin. *Nature.* 347:685-9.
- Reid, T., T. Furuyashiki, T. Ishizaki, G. Watanabe, N. Watanabe, K. Fujisawa, N. Morii, P. Madaule, and S. Narumiya. 1996. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and Rhoophilin in the Rho-binding domain. *J Biol Chem.* 271:13556-13560.
- Reinhard, J., A.A. Scheel, D. Diekmann, A. Hall, C. Ruppert, and M. Bahler. 1995. A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *Embo J.* 14:697-704.
- Reiske, H.R., S.C. Kao, L.A. Cary, J.L. Guan, J.F. Lai, and H.C. Chen. 1999. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem.* 274:12361-6.

- Remijn, J.A., I.J. MJ, and P.G. De Groot. 2003. Role of the fibrinogen gamma-chain sequence gamma316-322 in platelet-mediated clot retraction. *J Thromb Haemost.* 1:2245-6.
- Ren, X.D., G.M. Bokoch, A. Traynor-Kaplan, G.H. Jenkins, R.A. Anderson, and M.A. Schwartz. 1996. Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Mol Biol Cell.* 7:435-42.
- Ren, X.-D., W.B. Kiosses, and M.A. Schwartz. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18:578-585.
- Ren, X.D., W.B. Kiosses, D.J. Sieg, C.A. Otey, D.D. Schlaepfer, and M.A. Schwartz. 2000. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J Cell Sci.* 113 (Pt 20):3673-8.
- Reszka, A.A., Y. Hayashi, and A.F. Horwitz. 1992. Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. *J Cell Biol.* 117:1321-30.
- Ridley, A.J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70:389-99.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-10.
- Rittenhouse, S.E. 1996. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood.* 88:4401-14.
- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M.W. Kirschner. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell.* 97:221-31.
- Rooney, M.M., L.V. Parise, and S.T. Lord. 1996. Dissecting clot retraction and platelet aggregation. Clot retraction does not require an intact fibrinogen γ chain C terminus. *J Biol Chem.* 271:8553-8555.
- Rooney, M.M., D.H. Farrell, B.M. van Hemel, P.G. de Groot, and S.T. Lord. 1998. The contribution of the three hypothesized integrin-binding sites in fibrinogen to platelet-mediated clot retraction. *Blood.* 92:2374-81.
- Rosa, J.P., P.F. Bray, O. Gayet, G.I. Johnston, R.G. Cook, K.W. Jackson, M.A. Shuman, and R.P. McEver. 1988. Cloning of glycoprotein IIIa cDNA from human erythroleukemia cells and localization of the gene to chromosome 17. *Blood.* 72:593-600.
- Rosa, J.P., and R.P. McEver. 1989. Processing and assembly of the integrin, glycoprotein IIb-IIIa, in HEL cells. *J Biol Chem.* 264:12596-603.
- Rosales, C., V. O'Brien, L. Kornberg, and R. Juliano. 1995. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1242:77-98.
- Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:167-80.
- Rüegg, C., A.A. Postigo, E.E. Sikorski, E.C. Butcher, R. Pytela, and D.J. Erle. 1992. Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J Cell Biol.* 117:179-89.
- Ruggeri, Z.M., J.A. Dent, and E. Saldivar. 1999a. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood.* 94:172-8.
- Ruggeri, Z.M. 1999b. Fibrinogen/fibrin. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins.* Second edition. Edited by T. Kreis and R. Vale. 417-421.
- Ruiz, C., C.Y. Liu, Q.H. Sun, M. Sigaud-Fiks, E. Fressinaud, J.Y. Muller, P. Nurden, A.T. Nurden, P.J. Newman, and N. Valentin. 2001. A homozygous $\beta 3$ Cys 560 Arg mutation results in the expression of an α IIb $\beta 3$ receptor locked in a high affinity state and spontaneous fibrinogen binding in a patient with a bleeding syndrome. *Thromb. Haemost.* Suppl:OC88.
- Ruoslahti, E., and M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238:491-7.
- Ruoslahti, E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:697-715.
- Sabe, H., A. Hata, M. Okada, H. Nakagawa, and H. Hanafusa. 1994. Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3984-8.
- Saci, A., F. Rendu, and C. Bachelot-Loza. 2000. Platelet alpha IIb-beta 3 integrin engagement induces the tyrosine phosphorylation of Cbl and its association with phosphoinositide 3-kinase and Syk. *Biochem J.* 351 Pt 3:669-76.
- Sakai, T., S. Li, D. Docheva, C. Grashoff, K. Sakai, G. Kostka, A. Braun, A. Pfeifer, P.D. Yurchenco, and R. Fassler. 2003. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev.* 17:926-40.
- Salgia, R., S. Avraham, E. Pisick, J.L. Li, S. Raja, E.A. Greenfield, M. Sattler, H. Avraham, and J.D. Griffin. 1996. The related adhesion focal tyrosine kinase forms a complex with paxillin in hematopoietic cells. *J Biol Chem.* 271:31222-6.
- Sampath, R., P.J. Gallagher, and F.M. Pavalko. 1998. Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem.* 273:33588-94.
- Sander, E.E., S. van Delft, J.P. ten Klooster, T. Reid, R.A. van der Kammen, F. Michiels, and J.G. Collard. 1998. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol.* 143:1385-1398.

- Sander, E.E., J.P. ten Klooster, S. van Delft, R.A. van der Kammen, and J.G. Collard. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 147:1009-22.
- Santoro, S.A., and W.J. Lawing, Jr. 1987. Competition for related but nonidentical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. *Cell.* 48:867-73.
- Savage, B., and Z.M. Ruggeri. 1991. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem.* 266:11227-11233.
- Savage, B., S.J. Shattil, and Z.M. Ruggeri. 1992. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 267:11300-6.
- Savage, B., E. Bottini, and Z.M. Ruggeri. 1995. Interaction of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion. *J Biol Chem.* 270:28812-28817.
- Savage, B., E. Saldivar, and Z.M. Ruggeri. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 84:289-97.
- Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri. 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 94:657-66.
- Scarborough, R.M., J.W. Rose, M.A. Hsu, D.R. Phillips, V.A. Fried, A.M. Campbell, L. Nannizzi, and I.F. Charo. 1991. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. *J Biol Chem.* 266:9359-62.
- Scarborough, R.M., J.W. Rose, M.A. Naughton, D.R. Phillips, L. Nannizzi, A. Arfsten, A.M. Campbell, and I.F. Charo. 1993. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *J Biol Chem.* 268:1058-65.
- Schaffner-Reckinger, E., V. Gouon, C. Melchior, S. Plancon, and N. Kieffer. 1998. Distinct involvement of beta3 integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 759 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signaling. *J Biol Chem.* 273:12623-32.
- Schaller, M.D., and J.T. Parsons. 1994. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 6:705-10.
- Schaller, M.D., J.D. Hildebrand, and J.T. Parsons. 1999. Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol Biol Cell.* 10:3489-505.
- Schaller, M.D. 2001. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1540:1-21.
- Scheraga, H.A. 1958. Thrombin and its interaction with fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci.* 75:189-94.
- Schlaepfer, D.D., and T. Hunter. 1997. Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem.* 272:13189-95.
- Schlaepfer, D.D., and T. Hunter. 1998. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8:151-7.
- Schmeichel, K.L., and M.C. Beckerle. 1994. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell.* 79:211-9.
- Schmidt, A., M. Bickle, T. Beck, and M.N. Hall. 1997. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell.* 88:531-42.
- Schmidt, A., T. Schmelzle, and M.N. Hall. 2002. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 45:1433-41.
- Schneeberger, E.E., and R.D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C1213-28.
- Schwartz, M.A., M.D. Schaller, and M.H. Ginsberg. 1995. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:549-99.
- Schwartz, M.A. 1997. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *J Cell Biol.* 139:575-8.
- Sells, M.A., U.G. Knaus, S. Bagrodia, D.M. Ambrose, G.M. Bokoch, and J. Chernoff. 1997. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol.* 7:202-10.
- Shainoff, J.R., and B.N. Dardik. 1983. Fibrinopeptide B in fibrin assembly and metabolism: physiologic significance in delayed release of the peptide. *Ann N Y Acad Sci.* 408:254-68.
- Shattil, S.J., J.A. Hoxie, M. Cunningham, and L.F. Brass. 1985. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 260:11107-11114.
- Shattil, S.J., and L.F. Brass. 1987. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem.* 262:992-1000.
- Shattil, S.J., M.H. Ginsberg, and J.S. Brugge. 1994. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol.* 6:695-704.
- Shattil, S.J., T. O'Toole, M. Eigenthaler, V. Thon, M. Williams, B.M. Babior, and M.H. Ginsberg. 1995. Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol.* 131:807-16.
- Shattil, S.J., H. Kashiwagi, and N. Pampori. 1998. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 91:2645-57.
- Shattil, S.J. 1999. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost.* 82:318-25.
- Shattil, S.J., and P.J. Newman. 2004. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood.* 104:1606-15.

- Shattil, S.J. 2005. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. *Trends Cell Biol.* 15:399-403.
- Shaw, S.K., K.L. Cepek, E.A. Murphy, G.J. Russell, M.B. Brenner, and C.M. Parker. 1994. Molecular cloning of the human mucosal lymphocyte integrin alpha E subunit. Unusual structure and restricted RNA distribution. *J Biol Chem.* 269:6016-25.
- Sheppard, D., C. Rozzo, L. Starr, V. Quaranta, D.J. Erle, and R. Pytela. 1990. Complete amino acid sequence of a novel integrin beta subunit (beta 6) identified in epithelial cells using the polymerase chain reaction. *J Biol Chem.* 265:11502-7.
- Shimaoka, M., J. Takagi, and T.A. Springer. 2002. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 31:485-516.
- Shimizu, A., G.M. Nagel, and R.F. Doolittle. 1992. Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: isolation and characterization of a labeled cyanogen bromide fragment corresponding to gamma-chain residues 337-379. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:2888-92.
- Siebenlist, K.R., D.A. Meh, and M.W. Mosesson. 1996. Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing gamma chains. *Biochemistry.* 35:10448-53.
- Siebenlist, K.R., D.A. Meh, and M.W. Mosesson. 2001. Protransglutaminase (factor XIII) mediated crosslinking of fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost.* 86:1221-8.
- Smith, J.W., Z.M. Ruggeri, T.J. Kunicki, and D.A. Cheresh. 1990. Interaction of integrins $\alpha_v\beta_3$ and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. *J Biol Chem.* 265:12267-12271.
- Smith, R.A., M.W. Mosesson, M.M. Rooney, S.T. Lord, A.U. Daniels, and T.K. Gartner. 1997. The role of putative fibrinogen Aalpha-, Bbeta-, and GammaA-chain integrin binding sites in endothelial cell-mediated clot retraction. *J Biol Chem.* 272:22080-5.
- Sone, M. 1997. Still life, a protein in synaptic terminals of Drosophila homologous to GDP-GTP exchangers. *Science.* 275:1405.
- Sosnoski, D.M., B.S. Emanuel, A.L. Hawkins, P. van Tuinen, D.H. Ledbetter, R.L. Nussbaum, F.T. Kaos, E. Schwartz, D. Phillips, J.S. Bennett, and et al. 1988. Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J Clin Invest.* 81:1993-8.
- Springer, T.A. 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:65-72.
- Stefansson, A., A. Armulik, I. Nilsson, G. von Heijne, and S. Johansson. 2004. Determination of N- and C-terminal borders of the transmembrane domain of integrin subunits. *J Biol Chem.* 279:21200-5.
- Steiner, B., A. Trześciak, G. Pfenninger, and W.C. Kouns. 1993. Peptides derived from a sequence within β_3 integrin bind to platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ and inhibit ligand binding. *J Biol Chem.* 268:6870-6873.
- Stevenson, B.J., B. Ferguson, C. De Virgilio, E. Bi, J.R. Pringle, G. Ammerer, and G.F. Sprague, Jr. 1995. Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 9:2949-63.
- Stossel, T.P., J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher, and S.S. Shapiro. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:138-45.
- Su, J., M. Muranjan, and J. Sap. 1999. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts. *Curr Biol.* 9:505-11.
- Suehiro, K., J. Gailit, and E.F. Plow. 1997. Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells. *J Biol Chem.* 272:5360-6.
- Sun, Q.H., C.Y. Liu, R. Wang, C. Paddock, and P.J. Newman. 2002. Disruption of the long-range GPIIIa Cys(5)-Cys(435) disulfide bond results in the production of constitutively active GPIIb-IIIa (alpha(IIb)beta(3)) integrin complexes. *Blood.* 100:2094-101.
- Symons, M. 1996. Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci.* 21:178-81.
- Tadokoro, S., S.J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R.C. Liddington, J.M. de Pereda, M.H. Ginsberg, and D.A. Calderwood. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science.* 302:103-6.
- Takada, Y., M.J. Elices, C. Crouse, and M.E. Hemler. 1989. The primary structure of the alpha 4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function. *Embo J.* 8:1361-8.
- Takagi, J., N. Beglova, P. Yalanchili, S.C. Blacklow, and T.A. Springer. 2001a. Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11175-80.
- Takagi, J., H.P. Erickson, and T.A. Springer. 2001b. C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1. *Nat Struct Biol.* 8:412-6.
- Takagi, J., D.P. DeBottis, H.P. Erickson, and T.A. Springer. 2002a. The role of the specificity-determining loop of the integrin beta subunit I-like domain in autonomous expression, association with the alpha subunit, and ligand binding. *Biochemistry.* 41:4339-47.
- Takagi, J., B.M. Petre, T. Walz, and T.A. Springer. 2002b. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell.* 110:599-11.
- Takagi, J., K. Strokovich, S.T. A., and T. Walz. 2003. Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin. *EMBO J.* 22:4607-4615.
- Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takaishi, T. Kameyama, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem.* 272:23371-5.

- Takai, Y., T. Sasaki, K. Tanaka, and H. Nakanishi. 1995. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci.* 20:227-31.
- Tamkun, J.W., D.W. DeSimone, D. Fonda, R.S. Patel, C. Buck, A.F. Horwitz, and R.O. Hynes. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell.* 46:271-82.
- Tamura, T., T. Hato, J. Yamanouchi, and S. Fujita. 2004. Critical residues for ligand binding in blade 2 of the propeller domain of the integrin alphaIIb subunit. *Thromb Haemost.* 91:111-8.
- Tapon, N., K. Nagata, N. Lamarche, and A. Hall. 1998. A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways. *Embo J.* 17:1395-404.
- Taylor, D.B., and T.K. Gartner. 1992. A peptide corresponding to GPIIb alpha 300-312, a presumptive fibrinogen gamma-chain binding site on the platelet integrin GPIIb/IIIa, inhibits the adhesion of platelets to at least four adhesive ligands. *J Biol Chem.* 267:11729-33.
- Thomas, S.M., and J.S. Brugge. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:513-609.
- Tigges, U., B. Koch, J. Wissing, B.M. Jockusch, and W.H. Ziegler. 2003. The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha. *J Biol Chem.* 278:23561-9.
- Toker, A., M. Meyer, K.K. Reddy, J.R. Falck, R. Aneja, S. Aneja, A. Parra, D.J. Burns, L.M. Ballas, and L.C. Cantley. 1994. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem.* 269:32358-67.
- Tolias, K.F., L.C. Cantley, and C.L. Carpenter. 1995. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem.* 270:17656-9.
- Tozer, E.C., E.K. Baker, M.H. Ginsberg, and J.C. Loftus. 1999. A mutation in the alpha subunit of the platelet integrin alphaIIb beta3 identifies a novel region important for ligand binding. *Blood.* 93:918-24.
- Tozer, E.C., P.E. Hughes, and J.C. Loftus. 1996a. Ligand binding and affinity modulation of integrins. *Biochem Cell Biol.* 74:785-98.
- Tozer, E.C., R.C. Liddington, M.J. Sutcliffe, A.H. Smeeton, and J.C. Loftus. 1996b. Ligand binding to integrin alphaIIb beta3 is dependent on a MIDAS-like domain in the beta3 subunit. *J Biol Chem.* 271:21978-84.
- Tremuth, L., S. Kreis, C. Melchior, J. Hoebeke, P. Ronde, S. Plancon, K. Takeda, and N. Kieffer. 2004. A fluorescence cell biology approach to map the second integrin-binding site of talin to a 130-amino acid sequence within the rod domain. *J Biol Chem.* 279:22258-66.
- Trub, T., W.E. Choi, G. Wolf, E. Ottinger, Y. Chen, M. Weiss, and S.E. Shoelson. 1995. Specificity of the PTB domain of Shc for beta turn-forming pentapeptide motifs amino-terminal to phosphotyrosine. *J Biol Chem.* 270:18205-8.
- Tsuboi, S. 2002. Calcium integrin-binding protein activates platelet integrin alpha IIbeta 3. *J Biol Chem.* 277:1919-23.
- Tsubouchi, A., J. Sakakura, R. Yagi, Y. Mazaki, E. Schaefer, H. Yano, and H. Sabe. 2002. Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol.* 159:673-83.
- Tsuda, M., T. Matozaki, K. Fukunaga, Y. Fujioka, A. Imamoto, T. Noguchi, T. Takada, T. Yamao, H. Takeda, F. Ochi, T. Yamamoto, and M. Kasuga. 1998. Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP-2. Roles of Fak and Src family kinases. *J Biol Chem.* 273:13223-9.
- Tsuji, S., M. Sugimoto, S. Miyata, M. Kuwahara, S. Kinoshita, and A. Yoshioka. 1999. Real-time analysis of mural thrombus formation in various platelet aggregation disorders: distinct shear-dependent roles of platelet receptors and adhesive proteins under flow. *Blood.* 94:968-75.
- Tsukita, S., and S. Yonemura. 1997. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 9:70-5.
- Tu, Y., F. Li, S. Goicoechea, and C. Wu. 1999. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol.* 19:2425-34.
- Tuckwell, D.S., A. Brass, and M.J. Humphries. 1992. Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site. *Biochem J.* 285 (Pt 1):325-31.
- Tuckwell, D.S., and M.J. Humphries. 1997. A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. *FEBS Lett.* 400:297-303.
- Turner, C.E., J.R. Glenney, Jr., and K. Burridge. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol.* 111:1059-68.
- Turner, C.E., and J.T. Miller. 1994. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J Cell Sci.* 107 (Pt 6):1583-91.
- Turner, C.E., M.C. Brown, J.A. Perrotta, M.C. Riedy, S.N. Nikolopoulos, A.R. McDonald, S. Bagrodia, S. Thomas, and P.S. Leventhal. 1999. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol.* 145:851-63.
- Turner, C.E. 2000. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol.* 2:E231-6.
- Ueda, H., S. Uno, J. Harada, I. Kobayashi, T. Katada, M. Ui, and M. Satoh. 1990. Evidence for receptor-mediated inhibition of intrinsic activity of GTP-binding protein, Gi1 and Gi2, but not G0 in reconstitution experiments. *FEBS Lett.* 266:178-82.

- Ugarova, T.P., D.A. Solovjov, L. Zhang, D.I. Loukinov, V.C. Yee, L.V. Medved, and E.F. Plow. 1998. Identification of a novel recognition sequence for integrin alphaM beta2 within the gamma-chain of fibrinogen. *J Biol Chem.* 273:22519-27.
- Ulmer, T.S., B. Yaspan, M.H. Ginsberg, and I.D. Campbell. 2001. NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin alpha IIb beta 3 in aqueous solution. *Biochemistry.* 40:7498-508.
- Vallar, L., C. Melchior, S. Plancon, H. Drobecq, G. Lippens, V. Regnault, and N. Kieffer. 1999. Divalent cations differentially regulate integrin alphaIIb cytoplasmic tail binding to beta3 and to calcium- and integrin-binding protein. *J Biol Chem.* 274:17257-66.
- Van Aelst, L., T. Joneson, and D. Bar-Sagi. 1996. Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *Embo J.* 15:3778-86.
- Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11:2295-322.
- van Willigen, G., and J.W. Akkerman. 1991. Protein kinase C and cyclic AMP regulate reversible exposure of binding sites for fibrinogen on the glycoprotein IIB-IIIa complex of human platelets. *Biochem J.* 273(Pt 1):115-20.
- van Willigen, G., I. Hers, G. Gorter, and J.W. Akkerman. 1996. Exposure of ligand-binding sites on platelet integrin alpha IIb/beta 3 by phosphorylation of the beta 3 subunit. *Biochem J.* 314 (Pt 3):769-79.
- van Willigen, and J.W. Akkerman. 1997. Phosphorylation reactions and the affinity state of platelet integrin alphaIIb3. *Platelets.* 8:225-34.
- Vetter, I.R., and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science.* 294:1299-304.
- Vincent, S., and J. Settleman. 1997. The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol.* 17:2247-56.
- Vinogradova, O., T. Haas, E.F. Plow, and J. Qin. 2000. A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1450-5.
- Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow, and J. Qin. 2002. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell.* 110:587-97.
- Vinogradova, O., J. Vaynberg, X. Kong, T.A. Haas, E.F. Plow, and J. Qin. 2004. Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4094-9.
- von Wichert, G., B. Haimovich, G.S. Feng, and M.P. Sheetz. 2003. Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *Embo J.* 22:5023-35.
- Vouret-Craviari, V., C. Bourcier, E. Boulter, and E. Van Obberghen-Schilling. 2002. Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci.* 115:2475-2484.
- Walsh, G.M., D. Sheehan, A. Kinsella, N. Moran, and S. O'Neill. 2004. Redox modulation of integrin [correction of integin] alpha IIb beta 3 involves a novel allosteric regulation of its thiol isomerase activity. *Biochemistry.* 43:473-80.
- Wary, K.K., A. Mariotti, C. Zurzolo, and F.G. Giancotti. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell.* 94:625-34.
- Watanabe, G., Y. Saito, P. Madaule, T. Ishizaki, K. Fujisawa, N. Morii, H. Mukai, Y. Ono, A. Kakizuka, and S. Narumiya. 1996. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhotillin as targets of small GTPase Rho. *Science.* 271:645-8.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B.M. Jockusch, and S. Narumiya. 1997. p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J.* 16:3044-56.
- Weekes, J., S.T. Barry, and D.R. Critchley. 1996. Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem J.* 314 (Pt 3):827-32.
- Wehrle-Haller, B., and B.A. Imhof. 2003. Integrin-dependent pathologies. *J Pathol.* 200:481-7.
- Weisel, J.W., C. Nagaswami, G. Vilaire, and J.S. Bennett. 1992. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem.* 267:16637-16643.
- Weljie, A.M., P.M. Hwang, and H.J. Vogel. 2002. Solution structures of the cytoplasmic tail complex from platelet integrin alpha IIb- and beta 3-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:5878-83.
- Westhoff, M.A., B. Serrels, V.J. Fincham, M.C. Frame, and N.O. Carragher. 2004. SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol Cell Biol.* 24:8113-33.
- Wilhide, C.C., Y. Jin, Q. Guo, L. Li, S.X. Li, E. Rubin, and P.F. Bray. 1997. The human integrin beta3 gene is 63 kb and contains a 5'-UTR sequence regulating expression. *Blood.* 90:3951-61.
- Williams, M.J., P.E. Hughes, T.E. O'Toole, and M.H. Ginsberg. 1994. The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol.* 4:109-12.
- Williamson, D., I. Pikovski, S.L. Cranmer, P. Mangin, N. Mistry, T. Domagala, S. Chehab, F. Lanza, H.H. Salem, and S.P. Jackson. 2002. Interaction between platelet glycoprotein Ibalpha and filamin-1 is essential for glycoprotein Ib/IX receptor anchorage at high shear. *J Biol Chem.* 277:2151-9.

- Wonerow, P., A. Obergfell, J.I. Wilde, R. Bobe, N. Asazuma, T. Brdicka, A. Leo, B. Schraven, V. Horejsi, S.J. Shattil, and S.P. Watson. 2002. Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase Cgamma2 regulation in platelets. *Biochem J.* 364:755-65.
- Wonerow, P., A.C. Pearce, D.J. Vaux, and S.P. Watson. 2003. A critical role for phospholipase Cgamma2 in alphaIIb beta3-mediated platelet spreading. *J Biol Chem.* 278:37520-9.
- Woodside, D.G., A. Obergfell, L. Leng, J.L. Wilsbacher, C.K. Miranti, J.S. Brugge, S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg. 2001. Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol.* 11:1799-804.
- Woodside, D.G., A. Obergfell, A. Talapatra, D.A. Calderwood, S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg. 2002. The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem.* 277:39401-8.
- Xiao, T., J. Takagi, B.S. Collier, J.H. Wang, and T.A. Springer. 2004. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature.* 432:59-67.
- Xie, X., S.W. Chang, T. Tatsumoto, A.M. Chan, and T. Miki. 2005. TIM, a Dbl-related protein, regulates cell shape and cytoskeletal organization in a Rho-dependent manner. *Cell Signal.* 17:461-71.
- Xing, B., A. Jedsadayamata, and S.C. Lam. 2001. Localization of an integrin binding site to the C terminus of talin. *J Biol Chem.* 276:44373-8.
- Xiong, J.P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaVbeta3. *Science.* 294:319-317.
- Xiong, J.-P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaVbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science.* 296:151-155.
- Xiong, J.P., T. Stehle, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2003. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost.* 1:1642-54.
- Xiong, J.P., T. Stehle, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2004. A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *J Biol Chem.* 279:40252-4.
- Yamada, K.M., and S. Miyamoto. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol.* 7:681-9.
- Yamaji, S., A. Suzuki, H. Kanamori, W. Mishima, M. Takabayashi, K. Fujimaki, N. Tomita, S. Fujisawa, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo. 2002. Possible role of ILK-affixin complex in integrin-cytoskeleton linkage during platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun.* 297:1324-31.
- Yamamoto, M., N. Marui, T. Sakai, N. Morii, S. Kozaki, K. Ikai, S. Imamura, and S. Narumiya. 1993. ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene.* 8:1449-55.
- Yamanouchi, J., T. Hato, T. Tamura, and S. Fujita. 2002. Identification of critical residues for ligand binding in the integrin beta3 I-domain by site-directed mutagenesis. *Thromb Haemost.* 87:756-62.
- Yan, B., and J.W. Smith. 2000. A redox site involved in integrin activation. *J Biol Chem.* 275:39964-39972.
- Yan, B., and J.W. Smith. 2001. Mechanism of integrin activation by disulfide bond reduction. *Biochemistry.* 40:8861-7.
- Yan, B., D.A. Calderwood, B. Yaspan, and M.H. Ginsberg. 2001. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 276:28164-70.
- Yang, W., and R.A. Cerione. 1997. Cloning and characterization of a novel Cdc42-associated tyrosine kinase, ACK-2, from bovine brain. *J Biol Chem.* 272:24819-24.
- Yang, W., C.G. Lo, T. Dispenza, and R.A. Cerione. 2001. The Cdc42 target ACK2 directly interacts with clathrin and influences clathrin assembly. *J Biol Chem.* 276:17468-73.
- Yin, T., and K.J. Green. 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol.* 15:665-77.
- Ylänne, J., Y. Chen, T.E. O'Toole, J.C. Loftus, Y. Takada, and M.H. Ginsberg. 1993. Distinct functions of integrin alpha and beta subunit cytoplasmic domains in cell spreading and formation of focal adhesions. *J Cell Biol.* 122:223-33.
- Ylänne, J., J. Huuskonen, T.E. O'Toole, M.H. Ginsberg, I. Virtanen, and C.G. Gahmberg. 1995. Mutation of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. Differential effects on cell spreading, recruitment to adhesion plaques, endocytosis, and phagocytosis. *J Biol Chem.* 270:9550-7.
- Yokosaki, Y., N. Matsuura, S. Higashiyama, I. Murakami, M. Obara, M. Yamakido, N. Shigeto, J. Chen, and D. Sheppard. 1998. Identification of the ligand binding site for the integrin alpha9 beta1 in the third fibronectin type III repeat of tenascin-C. *J Biol Chem.* 273:11423-8.
- Yokoyama, K., X.P. Zhang, L. Medved, and Y. Takada. 1999. Specific binding of integrin alpha v beta 3 to the fibrinogen gamma and alpha E chain C-terminal domains. *Biochemistry.* 38:5872-7.
- Yuan, Q.A., W.M. Jiang, G.W. Krissansen, and J.D. Watson. 1990. Cloning and sequence analysis of a novel beta 2-related integrin transcript from T lymphocytes: homology of integrin cysteine-rich repeats to domain III of laminin B chains. *Int Immunol.* 2:1097-108.
- Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 116:4605-13.
- Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans.* 32:416-20.

- Zaidi, T.N., L.V. McIntire, D.H. Farrell, and P. Thiagarajan. 1996. Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow. *Blood*. 88:2967-2972.
- Zamir, E., B.Z. Katz, S. Aota, K.M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 112 (Pt 11):1655-69.
- Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K.M. Yamada, B.Z. Katz, S. Lin, D.C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, and B. Geiger. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 2:191-6.
- Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 114:3583-90.
- Zang, Q., and T.A. Springer. 2001. Amino acid residues in the PSI domain and cysteine-rich repeats of the integrin beta2 subunit that restrain activation of the integrin alpha(X)beta(2). *J Biol Chem*. 276:6922-9.
- Zervas, C.G., S.L. Gregory, and N.H. Brown. 2001. Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol*. 152:1007-18.
- Zhai, J., H. Lin, Z. Nie, J. Wu, R. Canete-Soler, W.W. Schlaepfer, and D.D. Schlaepfer. 2003. Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *J Biol Chem*. 278:24865-73.
- Zhang, Z., K. Vuori, H. Wang, J.C. Reed, and E. Ruoslahti. 1996. Integrin activation by R-ras. *Cell*. 85:61-9.
- Zheng, Y., S. Bagrodia, and R.A. Cerione. 1994. Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol Chem*. 269:18727-30.
- Zheng, Y., M.J. Hart, and R.A. Cerione. 1995. Guanine nucleotide exchange catalyzed by dbl oncogene product. *Methods Enzymol*. 256:77-84.
- Zheng, Y., D.J. Fischer, M.F. Santos, G. Tigyi, N.G. Pasteris, J.L. Gorski, and Y. Xu. 1996. The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*. 271:33169-72.
- Zheng, Y. 2001. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci*. 26:724-32.
- Zucker, M.B., and N.C. Masiello. 1984. Platelet aggregation caused by dithiothreitol. *Thromb Haemost*. 51:119-24.



ANNEXE

MATÉRIEL

et

MÉTHODES



Méthodes de Biologie Cellulaire

1. Culture cellulaire

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) (ATCC 9096), n'exprimant pas les intégrines β_3 , sont cultivées en monocouche dans une étuve à 37°C, en atmosphère saturée d'eau, et en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé est l'IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium – Biowhittaker) additionné de 10 % de SVF (Sérum de Veau Fœtal – GibcoBRL), de L-glutamine à une concentration finale de 2 mM, de pénicilline et de streptomycine aux concentrations finales respectives de 100 U/mL et 100 µg/mL. Ce milieu complété est appelé milieu IMDM complet.

Les cellules sont détachées par une courte incubation de 10-15 minutes à 37°C dans du tampon « Versène » (NaCl 126 mM, KCl 5 mM, EDTA 1 mM, Hépès 50 mM, pH 7,4), lavées en milieu IMDM ou tampon PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4), puis resuspendues à la concentration cellulaire requise.

2. Tests d'adhésion cellulaire

Le test d'adhésion cellulaire permet de suivre au cours du temps l'adhésion et l'étalement des cellules sur des substrats immobilisés définis (vitronectine, fibronectine, fibrinogène, facteur von Willebrand...). Brièvement, les puits d'une plaque 96 puits ont été recouverts avec différents substrats, fibrinogène, fragments D et C de fibrinogène, à raison de 20 µg/mL, et BSA à 100 µg/mL en milieu IMDM sans sérum. Les cellules CHO détachées et lavées sont resuspendues à raison de 3.10⁴ cellules/100µL. La numération des cellules est réalisée à l'aide d'une cellule de comptage de « Neubauer », et en présence de bleu de trypan (0,2%), un colorant spécifique des cellules mortes. Les cellules sont déposées dans les puits ou préincubées auparavant pendant 30 min à température ambiante avec un peptide ou un anticorps inhibiteur. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C, puis directement observées en contraste de phase sous microscope inversé (grossissement 200x), photographiées (Nikon, Ilford HP5 Plus 400) et comptées après différents temps d'incubation. Afin de distinguer les cellules non-adhérentes, les cellules faiblement attachées et les cellules complètement étalées, les observations et comptages des cellules sont réalisés sans lavages préalables des puits.

3. Congélation des cellules CHO

Les cellules CHO détachées sont lavées en milieu IMDM. Le culot cellulaire est repris dans un volume de 300-500µL de milieu de congélation (SVF 90%, DMSO

10%) et transféré dans un cryotube. Les cellules sont conservées pendant quelques jours à -80°C , puis stockées en azote liquide à -160°C .

4. Transfection d'un gène eucaryote par la lipofectamine

La lipofection est une méthode de transfection très efficace qui fait usage de lipides cationiques, ici la lipofectamine (Life Technologies, Inc.) qui possède des chaînes aliphatiques et des groupements amine chargés positivement capables d'interagir avec les groupements phosphate chargés négativement de l'ADN. Grâce à ces chaînes aliphatiques, les complexes lipofectamine/ADNc peuvent passer à travers la membrane plasmique des cellules et l'ADNc est intégré dans le génome des cellules transfectées.

Les cellules CHO (10^6 cellules) sont mises en culture dans des boîtes de Pétri de 10cm de diamètre dans du milieu IMDM complet et la transfection est effectuée lorsque les cellules ont atteint 40-50% de confluence. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du milieu IMDM. Puis, un mélange composé de l'ADN plasmidique portant l'ADNc codant pour la sous-unité αIIb ou $\beta 3$ mutée ($2\mu\text{g}$ dans un volume de $100\mu\text{L}$), préalablement incubé pendant 15-45 min avec la lipofectamine ($20\mu\text{L}$ dans un volume de $100\mu\text{L}$), est distribué de façon homogène sur les cellules, et complété de 2 mL de milieu IMDM. Après 5h d'incubation à 37°C , 1,5mL du milieu IMDM sont rajoutés et les cellules sont incubées pendant la nuit à 37°C . Après 24h, 3,5 mL de milieu IMDM complet deux fois concentré en SVF sont ajoutés, et 48 heures après la transfection, les cellules sont cultivées en milieu de sélection qui diffère selon le type de gène de résistance transfecté (milieu contenant soit la néomycine à $0,7\text{ mg/mL}$ ou la zéocine à $0,5\text{ mg/mL}$). Après 6-8 jours de culture, les cellules qui ont incorporé dans leur génome le plasmide contenant le gène d'intérêt et le gène de résistance à l'antibiotique de sélection vont former des colonies cellulaires, qui seront prélevées individuellement à l'aide de cylindres de clonage en verre, puis amplifiées.

5. Sous-clonage des cellules par dilution limite

Le sous-clonage des colonies par dilution limite permet l'obtention d'une population cellulaire monoclonale, c.-à-d. issue d'une seule cellule. Les cellules sont comptées sous le microscope et diluées de manière à obtenir une suspension cellulaire de moins de 10 cellules par mL, puis cette suspension est distribuée dans une plaque de culture de 96 puits à raison de $100\mu\text{L}$ /puits. Les cellules des puits ne contenant qu'une seule colonie sont amplifiées puis analysées pour déterminer l'expression du gène transfecté.

6. Immunofluorescence indirecte sur cellules adhérentes.

La technique de l'immunofluorescence indirecte permet la mise en évidence d'une protéine particulière reconnue par un anticorps spécifique. La fixation de cet

anticorps est révélée par un anticorps secondaire couplé à un marqueur fluorescent tel que la R-phycoérythrine ou l'isothiocyanate de fluorescéine.

Des lamelles de verre ont été préalablement recouvertes de fibrinogène, fragment D ou fragment C à une concentration de 20µg/mL. Les cellules sont déposées sur le ligand et incubées à 37°C pendant 2 heures, puis sont fixées par une incubation de 15 min. à 4°C dans 300µL de tampon fixateur (PBS 1x pH 7,4 ; PFA 3% ; sucrose 2%). Les puits sont ensuite lavés 3 x 5 minutes avec un tampon de lavage perméabilisant (PBS 1x pH 7,4 ; BSA 0,5% ; Triton X-100 0,5%), permettant de saturer en BSA les sites non-spécifiques et de rendre le cytosquelette accessible au marquage grâce à la perméabilisation de la membrane plasmique par le Triton. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire pendant 40 minutes à température ambiante. Après 3 lavages, les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome. Selon l'étude, l'actine est marquée par addition de TRITC-phalloïdine. Les contrôles négatifs correspondent aux lamelles non incubées avec l'anticorps primaire. Après 3 nouveaux lavages, les cellules sont montées entre lame et lamelle en Mowiol 4088/Dabco (Sigma) qui permet la conservation de la fluorescence. L'observation du marquage fluorescent se fait après polymérisation du Mowiol (pendant la nuit à 4°C et à l'obscurité) au microscope à fluorescence Leica-DMRD en lumière monochromatique aux longueurs d'onde correspondant aux fluorochromes utilisés, à l'aide d'un objectif à immersion (à grossissement 63x, grossissement total 630x). Les photographies sont prises par caméra numérique (LEICA DC 300F).

7. Cytométrie en flux

L'analyse par cytométrie en flux permet de quantifier l'intensité de fluorescence qui est en corrélation directe avec le nombre d'anticorps fixés aux cellules CHO. Les cellules CHO sont détachées, lavées deux fois dans du milieu IMDM, comptées, et remises en suspension à raison de $7,5 \cdot 10^5$ cellules / 50µL d'IMDM. Les 50µL de suspension cellulaire sont déposées dans les puits d'une plaque de 96 puits et l'expression membranaire des intégrines est mesurée en incubant les cellules pendant 30 minutes à 4°C ou à température ambiante avec un anticorps primaire. L'excès d'anticorps primaire est alors éliminé par lavage des cellules en milieu IMDM (1000rpm, 4°C, 10 min.). Le culot est repris dans 150µL d'une solution d'anticorps secondaire couplé au FITC ou à la Phycoérythrine (1/150^{ème} final), et les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Finalement, les cellules sont déposées dans des tubes pour cytométrie de 1,2mL et lavées dans 1mL de tampon d'incubation XL (NaCl 137mM ; KCl 5mM ; Hepes 50mM ; Glucose 1mg/mL, pH 7,4). Le culot cellulaire est repris dans 50µL de tampon XL. L'ADN des cellules mortes est marqué avec 400µL de 7-AAD (7-Aminoactinomycine D, (Molecular Probes)) à 2.5 µL/mL. La fluorescence de 7500 cellules par échantillon est finalement mesurée à l'aide d'un cytomètre en flux de type Coulter Epics XL (Beckman Coulter Company), équipé d'un laser argon opérant à 488 nm. L'intensité de fluorescence est mesurée par des détecteurs équipés de filtres spécifiques des spectres d'émission des marqueurs utilisés.

8. Préparation et adhésion des plaquettes sanguines humaines

Le sang (50mL) de donneurs sains est prélevé dans un tube de polypropylène contenant comme anti-coagulant une solution d'acide-citrate-dextrose (acide citrique 38mM ; citrate trisodique 62mM ; dextrose 135mM) (1 :7, v/v). Les plaquettes sont ensuite isolées par centrifugation différentielle. Dans un premier temps, le sang est centrifugé à 200 x g pendant 15 min à température ambiante, et le surnageant, correspondant au plasma riche en plaquettes (PRP) est récupéré soigneusement. Il est ajusté à pH 6,5 avec la solution anti-coagulante, puis est centrifugé à 1200 x g pendant 15 min à température ambiante en présence de 1 μ M de PGE1 (prostaglandine E1) afin de prévenir toute activation des plaquettes. Le culot de plaquettes est alors resuspendu doucement, et lavé deux fois avec un tampon de lavage (acide citrique 35mM ; glucose 5mM ; PGE1 1 μ M ; KCl 2mM ; CaCl₂ 2 mM ; MgCl₂ 1mM ; NaCl 100mM ; pH 6,5).

Les tests d'adhésion sont effectués en utilisant les plaquettes au repos, ou préalablement activées pendant 20 min à 37°C avec une solution de MnCl₂ à 0,5mM ou l'anticorps activateur D3GP3. Les plaquettes sont ensuite resuspendues à la concentration adéquate en milieu IMDM, et déposées sur lamelles de verre recouvertes avec un ligand et saturées avec 1% de BSA (albumine de sérum bovin). L'adhésion a lieu à 37°C, et aux temps définis, les plaquettes sont fixées pendant 10 min avec un tampon de fixation à 1% en PFA (PBS 1x pH 7,4 ; PFA 1% ; sucrose 2%), et traitées pour être analysées par immunofluorescence indirecte.

Méthodes de Biochimie

1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Cette technique électrophorétique en présence de SDS (Laemmli, 1970) permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire (PM) apparent, indépendamment de leur charge. Brièvement, l'échantillon protéique est obtenu à partir de cellules préalablement détachées et lavées avec du PBS, resuspendues dans un tampon de lyse (Tris 10mM ; pH 7,5 ; NaCl 150mM ; Triton X-100 1% ; AEBSF (pour 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl-fluoride) 50 μ M), puis vortexées et incubées pendant 30 min sur glace. Après centrifugation à 10000 x g pendant 10 min à 4°C, l'échantillon protéique (50 μ g) correspondant au surnageant, est dilué dans du tampon de migration Laemmli concentré 3x (Tris-HCl 125mM pH 6,8 ; SDS 4,6% ; glycérol 20% ; bleu de bromophénol 0,02%). Pour les échantillons réduits, les ponts disulfures sont dissociés par ajout de β -mercaptoéthanol 1,4M, alors que pour les échantillons non-réduits, les groupements SH libres sont bloqués avec du NEM 6mM. Les échantillons sont ensuite dénaturés pendant 5-10 min à 95°C, et déposés sur gel en présence d'un marqueur protéique de référence (Precision Protein Standards, Bio Rad). La migration électrophorétique des échantillons s'effectue à 80-100 Volts.

2. Immunodétection par la technique de l'immunoempreinte (Western Blotting)

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont électrotransférées (Trans blot.SD.Semidry transfer cell - Bio.Rad) pendant 45 min à 12 Volts et 200mA du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose (HybondTM-C, optimized for protein transfer, Amersham Life Science) préalablement équilibrée dans du tampon de transfert (Tris 25mM ; glycine 192 mM ; méthanol 20%). Après le transfert, la membrane est saturée en protéines non-spécifiques pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation dans du tampon de saturation (TBS : Tris-HCl 20mM ; NaCl 137mM pH 7,4 ; Tween-20 0,1% ; poudre de lait écrémé 5% p/v, ou BSA 1% p/v). La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure sous agitation en présence d'anticorps primaires. Après 3 lavages de 15 min dans du tampon de saturation, la fixation de ces anticorps primaires est révélée par incubation pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (Amersham Pharmacia Biotech). Avant d'être révélée, la membrane est encore soumise à 2 lavages de 10 min dans du tampon de saturation, 2 lavages de 10 min dans du TBS-Tween-20 0,1%, puis 2 lavages de 10 min dans du TBS. L'anticorps secondaire fixé est révélé à l'aide d'un kit de détection de chemiluminescence « Super-Signal West pico chemiluminescent Substrate » de Pierce (Rockford, IL, Etats-Unis), non-radioactif qui permet la détection d'anticorps conjugués à la peroxydase immobilisés sur une membrane. La membrane est incubée

pendant 10 minutes dans le noir avec une solution contenant du luminol et du peroxyde d'hydrogène selon le protocole indiqué par Pierce. Ainsi, la peroxydase couplée à l'anticorps, va catalyser la réaction d'oxydo-réduction du peroxyde d'hydrogène pour former le radical libre O_2^{2-} ; ce dianion peut alors interagir avec le luminol qui émet un signal lumineux permettant d'impressionner les films autoradiographiques (Hyper film ECL, High Performance Chemiluminescence Film, Amersham Pharmacia Biotech) pendant des temps variables.

3. Technique de déhybridation/ rehybridation de la membrane de nitrocellulose

Le complexe antigène-anticorps au niveau de la membrane de nitrocellulose peut être dissocié en incubant la membrane pendant 30 min à 50°C en présence de 50mL de tampon de déhybridation (Tris-HCl 62,5mM ; pH 6,7 ; SDS 2% ; β -mercaptoéthanol 100mM) et sous agitation occasionnelle. Après plusieurs lavages en tampon TBS, la membrane est saturée en protéines pendant la nuit à 4°C avec le tampon de saturation précédemment décrit dans le paragraphe 2. La membrane est alors prête pour être testée avec un nouvel anticorps non sensible à la dénaturation des protéines par le β -mercaptoéthanol, nécessaire pour la déhybridation.

4. Étude de l'état de phosphorylation de la FAK

Les cellules adhérentes sont lysées dans 350 μ L de tampon de lyse (SDS 2% ; Tris-HCl 50mM ; pH 7,4 ; NaCl 150mM ; EDTA pH 8,0 5mM ; NaF 10mM ; Na_3VO_4 2 mM ; 4-(2-aminoéthyl) benzenesulfonyl fluoride 50 μ M ; pepstatine 20 μ g/mL ; aprotinine et leupeptine 10 μ g/mL). Après migration électrophorétique et transfert des protéines du lysat cellulaire sur membrane de nitrocellulose, la FAK phosphorylée est détectée par un anticorps polyclonal spécifique du résidu Tyr397 phosphorylé. La membrane est ensuite déhybridée et rehybridée avec un anticorps anti-FAK total. La quantification de l'état de phosphorylation de la FAK est effectuée par ordinateur par analyse densitométrique des bandes des autoradiogrammes (Quantiscan, Biosoft). Les valeurs obtenues pour chaque condition correspondent au rapport entre l'intensité de la bande mesurée pour la FAK phosphorylée et l'intensité de la bande mesurée pour la FAK totale, et sont normalisées par rapport à la valeur maximale obtenue, correspondant à 100% d'étalement cellulaire.

5. Analyse de l'état d'activation des protéines de la famille des RhoGTPases

Cette technique décrite par Sander, Ren et collaborateurs, permet de détecter et d'analyser l'état d'activation des petites RhoGTPases Cdc42, Rac1 (Sander, 1998) et RhoA (Ren, 1999). Elle repose sur le principe que les RhoGTPases peuvent être précipitées spécifiquement sous leur forme active en utilisant leur substrat naturel

sous forme recombinante fusionnée à la GST (pour glutathion S-transférase). Pour la précipitation de RhoA actif, le motif RBD (pour Rho Binding Domain) de 82 aa de la rotekine (Reid, 1996) a été fusionné à GST afin d'obtenir la protéine recombinante GST-RBD. Pour la précipitation de Cdc42 et Rac1, le domaine CRIB (pour Cdc42–Rac1 Interacting Domain) de 85aa de PAK1 (pour protein activated kinase 1) (Knaus and Bokoch, 1998) a été fusionné avec GST pour obtenir la protéine recombinante CRIB-GST. Les RhoGTPases dans leur état actif sont ensuite précipitées à l'aide de billes de sépharose-glutathion préalablement recouvertes des protéines de fusion-GST.

5. 1. Production des protéines recombinantes GST-RBD et CRIB-GST, et préparation des billes de sépharose-glutathion

Des bactéries *E. Coli* BL21 ont été transformées avec les plasmides pGEX2T-RBD ou pGEX2TK-PAK-CD. La veille, une colonie bactérienne est incubée sous agitation à 37°C pendant la nuit dans un volume de 8mL de milieu LB. Les bactéries sont ensuite mises en culture en milieu LB dans un volume de 200mL pendant environ 2 h jusqu'à ce que la D.O. 600nm = 0,7- 0,8. L'expression des protéines de fusion GST-RBD ou CRIB-GST est alors induite par l'ajout d'IPTG 500µM, et les bactéries sont incubées pendant 2h à 32°C pour l'induction de GST-RBD, et à 37°C pour l'induction de CRIB-GST. Puis les bactéries sont sédimentées par centrifugation à 4 000g/4°C pendant 15 min, et sont lysées sur glace dans 25mL de tampon de lyse (Tris-HCl 50mM ; pH 7,5 ; Triton X-100 1% ; NaCl 150mM ; MgCl₂ 5mM ; DTT 1mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases) pour 1,6L de culture bactérienne. Le lysat est ensuite soniqué selon 4 cycles de (5x 2sec) (ampl. 80 ; cycle 0,8), et centrifugé à 10 000g/4°C pendant 10 min. Le surnageant est alors stocké à –20°C par échantillon de 7mL environ, ou incubé sur roue à 4°C pendant 1h avec des billes de sépharose recouvertes de glutathion (Glutathione-sépharose 4B, Amersham) préalablement lavées avec un tampon de lavage (Tris-HCl 50mM ; pH 7,5 ; Triton X-100 0,5% ; NaCl 150mM ; MgCl₂ 5mM ; DTT 1mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases) dans un rapport de 7mL de lysat pour 300µL de billes. Les billes sont alors lavées plusieurs fois par centrifugation de 1 min à 1 500g/4°C, avant d'être reprises dans 1mL de tampon de lavage.

5. 2. Détermination de l'activité des RhoGTPases par la technique de « pulldown »

La détermination de l'activité des RhoGTPases dans les cellules CHO adhérentes a été réalisée d'après le protocole décrit par Vouret-Craviari et collaborateurs (Vouret-Craviari et al., 2002). Les cellules adhérentes sont lysées dans 500µL de tampon de lyse (HEPES 25mM ; pH 7,3 ; NaCl 150mM ; MgCl₂ 5mM ; EGTA 0,5mM ; Triton X-100 0,5% ; glycérol 4% ; beta-glycérophosphate 20mM ; NaF 10mM ; DTT 5mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche)). Le lysat cellulaire est ensuite clarifié par centrifugation et incubé pendant 45min à 4°C avec des billes de sépharose-glutathion fraîchement recouvertes avec 20-30µg de GST-

RBD ou de CRIB-GST pour les coimmunoprécipitations (pulldown) respectives de RhoA-GTP ou de Rac1- et Cdc42-GTP. La quantité de Cdc42-GTP, Rac1-GTP et RhoA-GTP ainsi que la quantité totale des 3 GTPases (70µg du lysat cellulaire total) est ensuite analysée par Western Blotting en utilisant des anticorps anti-Cdc42, -Rac1 et -RhoA. La quantification de l'activité des GTPases est effectuée par analyse densitométrique des bandes des autoradiogrammes (Quantiscan, Biosoft), et l'activité relative des GTPases est exprimée en pourcentage de la quantité totale de GTPases présentes dans le lysat cellulaire total.

Méthodes de Biologie Moléculaire

1. Restriction enzymatique d'un fragment d'ADN et contrôle par électrophorèse en gel d'agarose

Cette technique est utilisée pour couper l'ADN afin de préparer des fragments pour un clonage ultérieur. Les enzymes de restriction sont des endonucléases bactériennes qui clivent l'ADN double brin au niveau de séquences très spécifiques de type palindromique ; la réaction a lieu dans un volume final de 50 μ L, en présence d'ADN plasmidique (3-5 μ g), d'enzyme de restriction 10U et dans un milieu tamponné caractéristique de chaque enzyme pendant une heure et demie à 37°C.

ADN plasmidique	3-5 μ g
+ tampon de restriction 10x	5 μ L
+ Enzyme de restriction 10 U/ μ L	1 μ L
+ H ₂ Od. stérile	<u>total</u> : 50 μ L
→ Incubation 1h30, 37°C	

Le produit de restriction est ensuite contrôlé par migration électrophorétique en gel d'agarose (Agar dissoute à chaud en tampon TBE (Tris 89mM ; acide borique 89mM ; EDTA 2,5mM ; pH 8,4)) de concentrations variant de 0,6 à 2% en fonction de la taille des fragments à analyser, et additionné de bromure d'éthidium (0,5 μ g/mL) qui s'intercale dans la double hélice d'ADN et permet ainsi la localisation des bandes d'ADN sous lumière ultraviolette ($\lambda=312$ nm). La taille des fragments d'ADN est estimée à l'aide d'un mélange de marqueurs de taille (1kb DNA ladder, GIBCO Brl).

2. Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est réalisée dans le but de faire de la mutagenèse dirigée. En effet, l'une des amorces utilisée, sens ou anti-sens, contient la mutation souhaitée, si bien que cette mutation se retrouvera dans le fragment d'ADN amplifié par la PCR. D'autre part, cette amorce contient également un site de restriction pour permettre un échange de cassette grâce à un deuxième site de coupure situé sur le fragment amplifié. Le plasmide pBJ 1- β 3wt a été utilisé comme matrice d'ADN double brin. Les amorces sens et anti-sens s'hybrident à la matrice préalablement dénaturée et permettent la synthèse d'un fragment d'ADN complémentaire simple brin par l'intermédiaire de la Taq polymérase ADN-dépendante (Takara Biomedicals). Pour effectuer cette réaction, l'échantillon présenté dans le tableau ci-dessous est préparé dans chaque tube de PCR. Un mélange témoin dans lequel l'enzyme n'est pas ajoutée est de plus réalisé. La réaction est réalisée à l'aide d'un appareil de type Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) selon

le protocole décrit dans le second tableau. L'efficacité de la réaction est évaluée sur un aliquot de 5µL par électrophorèse en gel d'agarose.

DNA template pBJ 1-β3 wt.	0,5 µg
tampon PCR 10x (100mM Tris-HCL pH 8,3; 500mM KCl ; 15mM MgCl ₂)	10 µL
mélange de dNTP (2,5mM de chacun)	8µL
Amorce sens	20pmol
Amorce anti-sens	20pmol
Taq DNA polymerase (5U/µL)	1µL
H ₂ Od. stérile	qsp. 100 µL

	Pré-dénaturation	95°C	5min
40 CYCLES }	Dénaturation	95°C	1min
	Hybridation	53°C	1min
	Elongation	72°C	1min
	Post-élongation	72°C	7min
	stockage	4°C	∞

3. Purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Pour réaliser cette opération, le kit d'extraction « QIAquick Gel Extraction » (QIAGEN) a été employé. Il permet d'extraire l'ADN de l'agarose et de le purifier pour des fragments allant de 70 pb à 10 kb environ. Le principe repose sur la fixation spécifique de l'ADN sur une colonne d'affinité avec une membrane en gel de silicate lors de pH inférieur à 7,5 et de forte concentration en sels. L'ADN contenu dans le gel d'agarose est dissout dans un tampon de solubilisation très salin par chauffage à 50°C pendant 10min puis déposé sur la colonne. Après plusieurs lavages permettant d'évacuer les contaminants, l'ADN est élué avec de l'eau.

4. Déphosphorylation des extrémités 5' d'un fragment d'ADN

La déphosphorylation d'un fragment d'ADN est effectuée lorsqu'on veut éviter une religation du fragment d'ADN ayant des extrémités cohésives (coupure avec la même enzyme de restriction). La phosphatase extraite de l'intestin de veau (*CIP* - Biolabs) est l'enzyme utilisée pour cliver les groupements phosphate en position 5' du fragment d'ADN à déphosphoryler. L'activité enzymatique de la *CIP* nécessite la présence d'ions Zn²⁺ et elle est inactivée par addition d'un chélateur des ions divalents tel que l'EDTA. La réaction fut réalisée dans un volume de 50µL sur 1-3µg d'ADN en présence de tampon 10X 5µL et de phosphatase 10U. La réaction est

ensuite arrêtée avec 2 μ L de tampon EDTA 0,5M, afin d'empêcher toute dégradation potentielle du vecteur.

Fragment d'ADN	1-3 μ g
+ tampon 10x n°3 (Gibco BRL)	5 μ L
+ CIP 10 U/ μ L	1 μ L
+ H ₂ Od. stérile	4 μ L
→ Incubation 1heure, 37°C	<u>total</u> : 50 μ L

5. Ligation d'un insert dans un vecteur d'expression.

La ligation consiste en la formation de liaisons phosphodiester entre les extrémités 5'-phosphate et 3'-OH de 2 fragments d'ADN. Elle est réalisée pendant la nuit à 4°C dans un volume final de 20 μ L avec de préférence 3 ratios vecteur/insert différents (1/1, 1/2, 1/4) et en présence de tampon de ligation 10X (2 μ L) et de l'enzyme ADN ligase extraite du bactériophage T4 (Biolabs).

Insert	50-300ng
Vecteur déphosphorylé	100-200ng
Tampon T4 DNA ligase 10x (50mM Tris-HCl ; MgCl ₂ 10mM ; DTT 10mM ; ATP 1mM ; BSA 25 μ g/mL ; pH 7,5)	2 μ L
T4 ligase 1U/ μ L	1 μ L
H ₂ Od. stérile	qsp. 20 μ L
→ Incubation 18h, 16°C	

6. Préparation et transformation de bactéries *E. COLI* compétentes

Les souches bactériennes *Escherichia Coli* utilisées sont de trois types :

- DH5 α F' : F', *endAI*, *hsdR17* (*r_K*⁻, *m_K*⁺), *supE44*, *thi-1*, λ ⁻, *recAI*, *gyrA*, *relAI*, Φ 80*dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169
- JM109 : *endAI*, *recAI*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*r_K*⁻, *m_K*⁺), *relAI*, *supE44*, λ ⁻, Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q Δ M15]
- BL21(DE3) : [F' *omp T*, *hsd S*, (*rB*⁻, *mB*⁻) gal] pLysS

Les bactéries adéquates sont mises en culture à 37°C sous agitation dans du milieu LB (tryptone 10 g/L ; Extrait de levure 5 g/L ; NaCl 5g/L ; pH 7,2). Lorsque la densité optique à 600 nm (D.O.₆₀₀) atteint la valeur de 0,3/0,5 (correspondant à la phase exponentielle de croissance des bactéries), le culot bactérien est récupéré en centrifugeant 10 minutes à 5000 rpm et à 4°C, et est repris dans un volume de 5 mL de tampon TSS froid (tryptone 10g/L ; extrait de levure 0,05 g/L ; NaCl 0,05 g/L ; PEG-3350 100 g/L ; DMSO-99,5% 5% ; MgCl₂ 0,05M, pH 6,5) pour perméabiliser la

membrane bactérienne et rendre les bactéries compétentes. La transformation est réalisée ensuite en incubant 10 μL de chaque produit de ligation (500ng d'ADN environ) avec 300 μL de bactéries compétentes pendant 30 min sur glace. Après un choc thermique au bain-marie à 42°C pendant 90 sec, 1mL de milieu LB est ajouté. La résistance à l'antibiotique chez les bactéries ayant intégré le plasmide est induite par incubation pendant 1 h sous agitation à 37°C. Après 2 courtes centrifugations, le culot est repris dans 50 μL de LB et est étalé stérilement sur boîte de pétri contenant du LB gélosé (15 g/L de bacto-agar), additionné de l'antibiotique de sélection (ampicilline 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ou kanamycine 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Les boîtes sont incubées pendant la nuit à 37°C. Le lendemain, seules les bactéries ayant incorporé l'ADN plasmidique et exprimant par conséquent la résistance à l'antibiotique de sélection, auront formé des colonies visibles sur la boîte.

7. PCR sur colonies.

Elle permet la détection des bactéries qui ont intégré le vecteur recombinant lors de l'étape de transformation. Une fraction de chacune des colonies transformées est prélevée et est soumise à une PCR dans un volume final de 50 μL en présence de tampon PCR 10X (5 μL), dNTP mix (2 μL), amorces sens et anti-sens 20pmol, et Taq DNA polymerase (2,5U).

Une fraction de chacune des colonies transformées est prélevée et déposée dans un tube PCR	
PCR buffer x10 (100mM Tris-HCL pH 8,3; 500mM KCl ; 15mM MgCl2)	5 μL
mélange de dNTP (2,5mM de chacun)	2 μL
Amorce sens	20pmol
Amorce anti-sens	20pmol
Taq DNA polymerase (5U/ μL)	0,5 μL
H ₂ Od. stérile	qsp. 50 μL

	Pré-dénaturation	95°C	5min
20 CYCLES }	Dénaturation	95°C	45sec
	Hybridation	55°C	45sec
	Elongation	72°C	1min
	Post-élongation	72°C	7min
	stockage	4°C	∞

10 μL de chaque produit de PCR est ensuite analysé par électrophorèse en gel d'agarose.

8. Préparation de petites quantités d'ADN plasmidique (minipreps).

Une colonie bactérienne ayant acquis le vecteur recombinant est ensemencée dans 2mL de milieu LB additionné de kanamycine ou d'ampicilline, et incubée à 37°C sous agitation durant la nuit. La culture est ensuite homogénéisée et transférée dans des tubes Eppendorf. Après centrifugation pendant 3 minutes à 12 000g, le culot est repris dans 300µL de tampon d'extraction (NaOH 0,1M ; SDS 0,5% ; EDTA 1mM) qui permet la lyse des bactéries. Cette lyse en milieu alcalin libère l'ADN chromosomique et l'ADN plasmidique, alors que la présence de SDS dénature les protéines. Après 30 sec d'agitation, la solution est neutralisée avec 110 µL d'acétate de sodium 3M pH 5,2. Ceci a pour effet de faire précipiter les débris extracellulaires, les protéines dénaturées ainsi que l'ADN chromosomique. En revanche, l'ADN plasmidique ne précipite pas. Le précipité est éliminé par centrifugation pendant 5 min à 13 000g et le surnageant est récupéré. L'ADN plasmidique est ensuite précipité avec 1 mL d'éthanol 100% à -20°C. Après 15 minutes de centrifugation à 12 000g /4°C, le culot est lavé dans 500µL d'éthanol 70%, centrifugé à nouveau pendant 5min et enfin séché sous vide (speedwak-Univapo Appligene). Le culot est repris dans 29 µL d'eau stérile additionnée d'1µL de RNaseA et incubé 15 minutes à 37°C afin de digérer l'ARN précipité en même temps que l'ADN plasmidique. L'ADN plasmidique obtenu est ensuite contrôlé par digestion enzymatique suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose.

9. Préparation de grandes quantités d'ADN plasmidique (maxipreps).

La préparation d'ADN à partir d'un clone de bactéries transformées est réalisée à l'aide d'un kit QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) basé sur le principe de la séparation de l'ADN plasmidique de l'ADN génomique par lyse alcaline combinée à une chromatographie échangeuse d'anions, permettant de purifier l'ADN plasmidique de l'ARN et contaminants protéiques cellulaires éventuels. Une culture saturée de bactéries (400 mL) est centrifugée pendant 15 min à 5 000g /4°C. Le culot est repris dans 10 mL de tampon de resuspension froid (« Buffer P1 » : tris-HCl 50mM ; pH 8,0 ; EDTA 10mM ; RNase A 100 µg/mL), puis additionné de 10 mL de tampon de lyse (« Buffer P2 » : NaOH 200mM ; SDS 1%). Après agitation, le tube est incubé pendant 5 min à température ambiante. Le mélange est alors neutralisé par l'ajout de 10 mL de tampon de neutralisation froid (« Buffer P3 » : Acétate de Potassium 3,0 M, pH 5,5), mélangé doucement par inversion des tubes puis introduit dans le réservoir d'une seringue et incubé pendant 10 min à température ambiante. L'ADN plasmidique du lysat est alors filtré, à travers la seringue qui va retenir tous les débris cellulaires ainsi que l'ADN génomique, et est déposé dans le réservoir d'une nouvelle seringue équilibrée par 10mL de tampon d'équilibration (« Buffer QBT » : NaCl 750mM ; MOPS 50mM, pH 7,0 ; isopropanol 15% ; Triton X-100 0,15%). Cette dernière va retenir sur un filtre spécial l'ADN plasmidique d'intérêt. Cette solution pénètre la résine puis 2 lavages consécutifs de ce filtre sont réalisés avec 30mL de tampon de lavage (« Buffer QC » : NaCl 1M ; MOPS 50mM, pH7,0 ;

isopropanol 15%) afin d'éliminer la majeure partie des contaminants d'une préparation plasmidique. L'ADN est ensuite élué avec 15mL de tampon d'éluion (« Buffer QF » : NaCl 1,25M ; tris-HCl 50mM, pH 8,5 ; isopropanol 15%) et collecté dans un tube Corex. Il est alors précipité par addition de 10,5mL d'isopropanol puis centrifugé pendant 40 min à 9 000g /4°C. Le culot obtenu est alors lavé avec 5 mL d'éthanol 70%, centrifugé 30 min à 9 000g /4°C puis séché à l'air libre. Finalement, l'ADN est remis en solution dans 1,6mL d'eau distillée stérile, puis précipité à nouveau par addition d'1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M pH 5,3 et de 1mL d'EtOH 100% froid. L'ADN est ensuite centrifugé pendant 20 min à 13 000g, puis le culot est resolubilisé dans 500µL d'EtOH 70% froid, et centrifugé à nouveau à 13 000g pendant 5 min. Le culot est ensuite séché au maximum en utilisant le speed-vac puis resolubilisé dans 100µL d'eau stérile. La concentration de l'ADN ainsi obtenu est mesurée au spectromètre par absorption dans l'ultraviolet en admettant qu'une unité de DO à 260nm correspond à 50µg/mL. La pureté de l'ADN est estimée à partir du rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ qui doit être compris entre 1,8 et 2.

10. Séquençage d'ADN selon la méthode de Sanger

Le séquençage, permettant de vérifier précisément les constructions réalisées, a été effectué à l'aide d'un séquenceur automatique. La réaction de Sanger est néanmoins réalisée auparavant dans un volume de 20µL, avec 0,5µg d'ADN plasmidique, 8µL d'une solution de terminaison diluée 3 fois (BigDye Terminator Ready Reaction, Applied Biosystems), et 3,2pmol d'amorce. Le mélange réactionnel subit alors une PCR pendant 25 cycles (Cf. tableau ci-dessous). Puis, 30µL d'H₂O, 5µL d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol froid 100% sont ajoutés au produit de PCR afin de précipiter l'ADN. Après centrifugation pendant 20 min à 10 000g, le culot est séché. 12,5µL de TSR (Template Suppression Reagent) dénaturant l'ADN sont ensuite ajoutés au culot. Après chauffage pendant 2 min à 95°C, puis refroidissement sur glace, les échantillons sont déposés dans le séquenceur (ABI Prism 310 Genetic Analyser Applied Biosystems). Les séquences obtenues sont finalement analysées à l'aide du logiciel Chromas v1.45 (Technelysium).

25 CYCLES }	Dénaturation	96°C	10 sec
	Hybridation	50°C	5 sec
	Elongation	60°C	4min
	stockage	4°C	∞

Service de la Scolarité

Affaire suivie par : Georges BILLANT

AVIS DU JURY SUR LA REPRODUCTION DE LA THESE SOUTENUE

Ecole Doctorale

... Biologie... Santé... Environnement.....

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I en

... Biologie.. Moléculaire.. et.. Cellulaire.....

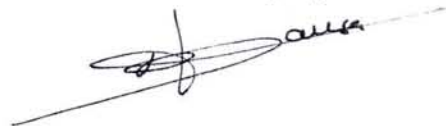
Nom et prénom de l'auteur : Monsieur Alexandre SALSMANN
Date de la soutenance : 23 janvier 2006

Président du Jury - Nom, Prénom : Michel MAUGA (I.R.).
Membres du Jury - Nom, Prénom :

M. Bernard FAYRASTRE (I.R.).
Mme. Ellen VAN OBBERGHEM-SCHILLING (I.R.).
Mme Monique AUMAILLEY (I.R.).
M. François LANZA (I.R.).
Mme. Nelly KIEFFER (I.R.).

- Thèse pouvant être reproduite en l'état
 Thèse pouvant être reproduite après corrections suggérées au cours de la soutenance
 Thèse ne pouvant être reproduite

Le 23 janvier 2006
Le Président du Jury





RÉSUMÉ

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ des plaquettes, principal récepteur du fibrinogène, joue un rôle prépondérant dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, en établissant un lien physique et dynamique entre le fibrinogène sanguin et les protéines plaquettaires intracellulaires de la signalisation et du cytosquelette. Le processus de reconnaissance du fibrinogène par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est complexe puisqu'au moins 2 sites distincts d'interaction ont été identifiés jusqu'à présent: le site universel de reconnaissance $^{572}\text{RGD}^{574}$ (Arg-Gly-Asp) et une séquence dodécapeptide $^{400}\text{HHLGGAKQAGDV}^{411}$ (H12). Cependant, il n'est pas encore clairement défini si ces 2 sites de reconnaissance fonctionnent indépendamment, de façon synergique ou par compétition.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons examiné au niveau moléculaire le rôle respectif des motifs dodécapeptide et $^{572}\text{RGD}^{574}$ du fibrinogène dans le processus d'étalement cellulaire médié par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, au niveau de plaquettes sanguines humaines et de cellules CHO exprimant soit le récepteur recombinant sauvage $\alpha_{IIb}\beta_3\text{wt}$, soit le récepteur constitutivement actif $\alpha_{IIb}\beta_3\text{T}_{562}\text{N}$ ou non-fonctionnel $\alpha_{IIb}\beta_3\text{D}_{119}\text{Y}$, et en utilisant le fibrinogène entier ou des fragments protéolytiques de fibrinogène, le fragment D ne contenant que la séquence dodécapeptide, et le fragment C ne présentant que le motif $^{572}\text{RGD}^{574}$.

Nos résultats mettent pour la première fois en évidence 2 voies de signalisation indépendantes mais synergiques, la première voie initiée par le site dodécapeptide du fibrinogène reconnu par la sous-unité α_{IIb} , et conduisant à un attachement cellulaire, à la formation de complexes focaux, à la phosphorylation de FAK et à l'activation de Rac1, et la seconde voie impliquant le motif $^{572}\text{RGD}^{574}$ qui joue un rôle de commutateur moléculaire au niveau de la sous-unité β_3 , entraînant l'activation maximale de RhoA, la polymérisation et l'organisation de l'actine en fibres de stress, la formation d'adhérences focales matures et l'étalement cellulaire complet.

Mots clés : intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ - cellules CHO - plaquettes sanguines - fibrinogène - fragments de fibrinogène - RGD - dodécapeptide - fibres de stress - RhoA GTPases.