



**HAL**  
open science

## **SERCA3 calcium pump: discovery of a new calcium signalling pathway that triggers platelet activation**

Miao Feng, Jean-philippe Rosa, Regis Bobe

### ► **To cite this version:**

Miao Feng, Jean-philippe Rosa, Regis Bobe. SERCA3 calcium pump: discovery of a new calcium signalling pathway that triggers platelet activation. *Revue Francophone d'Hémostase et Thrombose*, 2021, 3 (1), pp.41-6. <hal-04453801>

**HAL Id: hal-04453801**

**<https://hal.science/hal-04453801v1>**

Submitted on 13 Feb 2024

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.



HAL Authorization

# **Les pompes à calcium SERCA3 : à la découverte d'une nouvelle voie de signalisation calcique potentialisant l'activation plaquettaire**

*SERCA3 calcium pump: discovery of a new calcium signalling pathway that triggers platelet activation*

**Miao FENG, Jean-Philippe ROSA, Regis BOBE**

Hémostase Inflammation Thrombose, INSERM, UMR\_S1176, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Courriel : [regis.bobe@inserm.fr](mailto:regis.bobe@inserm.fr)

## **RÉSUMÉ**

La signalisation calcique, correspondant à la variation de concentration cellulaire en ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), est l'un des plus importants mécanismes ubiquitaires de communication inter- et intracellulaire. Celle-ci est finement régulée conduisant à des messages précis dans le temps et dans l'espace subcellulaire. Les mécanismes impliqués et les messages créés représentent aujourd'hui un défi technique et scientifique pour être décodés et corrigés en cas de nécessité. L'activation plaquettaire via le collagène ou la thrombine conduit à la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  depuis des réserves intracellulaires. Cette augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  est nécessaire à la sécrétion des activateurs secondaires tels que le thromboxane ou l'ADP des granules denses. Notre équipe s'intéresse en particulier aux pompes à  $\text{Ca}^{2+}$  appelées *Sarco/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase* (SERCA) permettant la création de ces réserves intracellulaires de calcium. Nos travaux ont montré que, dans les plaquettes, les 2 isoformes (SERCA2b et SERCA3) sont impliquées dans des voies de signalisation distinctes, et ont mis en évidence une nouvelle voie engageant la mobilisation des réserves spécifiquement contrôlées par SERCA3 par le *Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate* (NAADP). Cette mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  permet l'activation plaquettaire en réponse à de faibles doses d'activateur en induisant une sécrétion rapide d'ADP qui vient renforcer la voie de signalisation classique nécessitant la mobilisation des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes de SERCA2b par l'inositol trisphosphate (IP3).

**Mots clés** : SERCA, sécrétion plaquettaire, signalisation calcique.

## ABSTRACT

Variations in cell  $\text{Ca}^{2+}$  concentration form the calcium signalling, one of the most important ubiquitous mechanisms for inter- and intracellular communication. It is finely tuned, both in time and in the subcellular space, leading to very accurate messages with high temporo-spatial distribution. To date, the mechanisms involved and these messages represent a technical and scientific challenge to be decoded and corrected when necessary. Platelet activation via collagen or thrombin leads to  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation from intracellular stores. This increase in  $\text{Ca}^{2+}$  is necessary for secretion of secondary activators such as thromboxane or ADP from dense granules. Our team is particularly interested in  $\text{Ca}^{2+}$  pumps called Sarco/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase (SERCA) which regulate these intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. Our work showed that in platelets, the 2 isoforms (namely SERCA2b and SERCA3) are involved in distinct signalling pathways, and led to the discovery of a new pathway involving  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation from stores specifically controlled by SERCA3, via Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). This  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation allows platelet activation at low doses of activator by inducing rapid ADP secretion which triggers the classical signalling pathway requiring  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation from SERCA2b-dependent stores by inositol trisphosphate (IP3).

**Keywords:** SERCA, platelet secretion, calcium signalling.

La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) joue un rôle central dans la signalisation cellulaire. De fait, il existe de nombreux mécanismes de régulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui mènent à la création, dans l'espace subcellulaire et le temps, de messages précis nécessaires aux fonctionnements cellulaires. Parmi les acteurs impliqués dans l'homéostasie calcique, nous distinguons les  $\text{Ca}^{2+}$ ATPases du réticulum sarco-endoplasmique (SERCA). Ces protéines sont des pompes transmembranaires qui stockent le  $\text{Ca}^{2+}$  dans les réserves intracellulaires réduisant ainsi directement la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , et permettant le maintien d'un gradient de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le cytosol (100 nmol/L) et le réticulum endoplasmique (RE) (1 mmol/L). L'autre rôle, fondamental, est la participation à la phase ascendante du signal calcique : cette phase est la composante complexe résultant de la mobilisation instantanée de  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves et de sa recapture plus ou moins rapide par les SERCAs, selon leurs caractéristiques intrinsèques

(affinité, activité catalytique, seuil de déclenchement, qui diffèrent entre SERCA2b et SERCA3), mais aussi leur topographie qui semble différente dans l'espace subcellulaire. L'activité des SERCAs est donc au cœur du signal calcique.

Les SERCAs sont codées par 3 gènes, ATP2A1, ATP2A2 et ATP2A3, qui produisent plusieurs transcrits alternatifs et isoformes de protéines : SERCA1a/b, SERCA2a-c et SERCA3a-f. Ces protéines sont retrouvées dans plusieurs tissus. Les plaquettes sont depuis longtemps utilisées comme un modèle non musculaire pour étudier la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces cellules anucléées expriment en particulier une quantité importante de SERCAs, y compris les isoformes SERCA2b et SERCA3 (1). De plus, la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  depuis des réserves internes des plaquettes est décrite comme un événement précoce en amont de toutes les autres voies de signalisation. Cette mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  est très importante car elle permet l'activation des plaquettes, la sécrétion des granules denses et alpha, et l'engagement de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  dans l'agrégation.

Depuis plusieurs années, nous nous intéressons au système multi-SERCA plaquettaire et nous nous interrogeons sur la possibilité de rôles distincts entre SERCA2b et SERCA3, notamment pour expliquer pourquoi coexistent 2 activités SERCAs, avec des caractéristiques différentes, et ce de façon relativement conservée dans l'évolution puisque retrouvées dans des espèces éloignées comme l'Homme et la souris.

Bien sûr des études biochimiques ont montré que si les SERCAs partagent des structures similaires, elles présentent des activités intrinsèques distinctes : l'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  est plus élevée pour SERCA2b que pour SERCA3 ( $K_D \sim 0,27 \mu\text{mol/L}$  contre  $1 \mu\text{mol/L}$ ), mais la capacité de transport du  $\text{Ca}^{2+}$  est plus faible pour SERCA2b que pour SERCA3 (respectivement  $7 \text{ nmol/min/mg}$  de protéine contre  $21 \text{ nmol/min/mg}$ ). Ces caractères semblent requis pour que les deux SERCAs maintiennent de concert le  $\text{Ca}^{2+}$  à de faibles niveaux dans les cellules au repos (2, 3). Mais ces données ne permettaient pas de répondre à toutes nos interrogations.

Dans les plaquettes, les études d'immuno-localisation par microscopie électronique ont suggéré des topologies distinctes pour les SERCAs : périphériques pour les SERCA3, et plus centrales pour les SERCA2b (4). Une colocalisation de SERCA3 avec STIM1 a aussi été décrite : STIM1 est une protéine sensible à la teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves intracellulaires, et, quand celle-ci diminue, STIM1 peut s'associer aux canaux SOCE (*Store Operated Calcium Entry*) de la membrane plasmique et activer leur ouverture. Ce mécanisme permettrait, en

augmentant  $[Ca^{2+}]_i$  dans l'environnement de ces réserves, de les réapprovisionner en  $Ca^{2+}$  par les pompes SERCA3 (5). Par ailleurs, une différenciation fonctionnelle entre SERCA3 et SERCA2b a été proposée à la suite d'études pharmacologiques (basée sur l'inhibition préférentielle de SERCA3 par le 2,5-di(ter-butyl)-1,4-hydroquinone (tBHQ)) suggérant une association de SERCA3 avec les réserves acides de  $Ca^{2+}$  (6).

C'est l'utilisation du modèle murin *knock-out* pour SERCA3 (*Serca3<sup>-/-</sup>*) qui a permis la mise en évidence de rôles distincts pour les deux types de pompes SERCA2b et SERCA3, dévoilant une signalisation plaquettaire plus complexe qu'initialement décrite. Les souris *Serca3<sup>-/-</sup>* existent depuis 1997 (7), et aucune altération phénotypique majeure n'avait été décrite, à l'exception d'une réponse altérée du nerf gustatif. *In vitro*, une relaxation altérée des anneaux de l'aorte associée à une relaxation défectueuse des cellules musculaires lisses vasculaires a été objectivée, avec une signalisation  $Ca^{2+}$  altérée, et une faible production de NO (7) (8). En comparant les plaquettes issues d'animaux sauvages et *Serca3<sup>-/-</sup>*, nos travaux ont récemment montré que les pompes SERCA3 et SERCA2b contrôlaient des réserves de calcium distinctes, avec une mobilisation de celles-ci impliquant des voies de signalisation différentes en réponse en particulier à la thrombine que nous avons privilégiée dans nos études.

## **SERCA3 ET SERCA2b CONTRÔLENT DES RÉSERVES DE $Ca^{2+}$ PHYSIOLOGIQUEMENT DISTINCTES**

En utilisant deux sondes fluorescentes dédiées à la mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$  (le fura2 et le fura2-NM), nous avons pu confirmer que les activités des deux pompes concernent des réserves ayant des localisations subcellulaires distinctes. Alors que le fura2 évalue la  $[Ca^{2+}]_i$  globale, le fura2-NM, qui reste accroché au feuillet interne de la membrane, mesure uniquement la concentration de calcium dans l'environnement sous membranaire. La comparaison des données obtenues avec ces deux sondes a montré que le fura2-NM ne détecte que le  $Ca^{2+}$  libéré des réserves contrôlées par SERCA3 (réserves SERCA3), confirmant une localisation sous membranaire de ces réserves et une mobilisation calcique se produisant de préférence près de la membrane plasmique. La possibilité de visualiser la mobilisation de réserves SERCA3 a permis de montrer qu'elles sont spécifiquement mobilisées par le NAADP (*Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*). Ceci a pu être démontré par des expériences analysant le signal calcique et la sécrétion en réponse à la thrombine en présence d'un

antagoniste spécifique du NAADP (Ned-19), ou inversement par des expériences analysant les réponses plaquettaires induites par le NAADP exogène (NAADP-AM). De plus, nous avons montré que la mobilisation des réserves SERCA3 était insensible à l'inhibition de la phospholipase C (principale productrice d'inositol 1,4,5 trisphosphate (IP3)) (9). En revanche, les réserves contrôlées par SERCA2b (réserves SERCA2b) sont mobilisées par l'IP3, et cette mobilisation semble être potentialisée par la voie NAADP/SERCA3. Nos systèmes d'enregistrement ne pouvant pas faire la distinction entre les cinétiques de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes des voies SERCA3/NAADP et SERCA2b/IP3, il est possible que toutes les deux sont initiées dans le même laps de temps. Par contre, nos résultats montrent que la voie PLC/IP3 est amplifiée par la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves SERCA3, et que cette amplification est liée à la sécrétion précoce de l'ADP. En effet, la seule mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des réserves SERCA3, directement induite par le NAADP-AM ou par la thrombine en présence d'apyrase, ne déclenche ou n'amplifie pas une mobilisation secondaire du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci indique que dans les plaquettes nous n'observons pas un mécanisme du type CICR (*Calcium Induced Calcium Release*) où l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  favoriserait d'elle-même l'ouverture des récepteurs de l'IP3.

### **LA VOIE NAADP/SERCA3 PERMET UNE SÉCRÉTION D'ADP PRÉCOCE QUI AMPLIFIE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE**

Nous avons récemment montré que la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves SERCA3 permettait une sécrétion spécifique d'ATP et d'ADP nécessaire à l'activation complète des plaquettes en réponse à de faibles concentrations d'agonistes (10).

La mesure de la cinétique de sécrétion a, par la suite, démontré que la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves SERCA3 entraînait surtout une sécrétion en phase précoce, bien que celle-ci soit également impliquée tout au long de la sécrétion. En effet, en comparant les cinétiques de sécrétion des plaquettes sauvages et *Serca3<sup>-/-</sup>* après stimulation par la thrombine à faible concentration (0,04 mU/mL), nous avons observé que la sécrétion précoce (à 5 secondes) est abolie en l'absence de SERCA3. À partir de 10 secondes, une sécrétion secondaire est visible dans les plaquettes *Serca3<sup>-/-</sup>*, mais elle reste moins importante que dans les plaquettes sauvages, et, après 3 minutes, elle reste défectueuse. Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'inhibiteur pharmacologique de SERCA3 (tBHQ), mais pas de SERCA2b (thapsigargine).

Il semble que ce défaut de sécrétion ne soit pas dû à un défaut global de l'augmentation cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$ , car une concentration élevée de thrombine (0,1 mU/mL), rétablissant des niveaux normaux de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  (mesurée sur l'ensemble du volume plaquettaire) dans les plaquettes  $\text{Serca3}^{-/-}$ , ne permet pas de rétablir une sécrétion comparable à celle observée dans les plaquettes de souris sauvages. Ces résultats suggèrent donc un rôle de la mobilisation des réserves SERCA3 dans une sécrétion spécifique qui ne peut pas être compensée en l'absence de SERCA3 ou en présence d'un inhibiteur de cette mobilisation comme avec l'antagoniste du NAADP.

Par ailleurs, il est notable qu'en présence d'une faible concentration de thrombine, l'ajout d'ADP exogène permet de compenser en grande partie (mais pas totalement) le défaut de sécrétion observé en l'absence de SERCA3 ou en présence de Ned-19, antagoniste du NAADP. Ceci suggère fortement que la sécrétion précoce d'ADP par la voie NAADP/SERCA3 permet de potentialiser l'autre sécrétion (que nous appelons secondaire car nous la détectons après 10 secondes) en renforçant la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  de la voie SERCA2b/IP3.

Cependant, la mobilisation directe du  $\text{Ca}^{2+}$  par NAADP-AM ne permet pas, seule, d'induire de sécrétion primaire ni d'agrégation plaquettaire, ces deux phénomènes nécessitant un stimulus supplémentaire. Ce n'est que lorsque le NAADP-AM est associé au PMA ou à l'OAG-AM, tous deux activateurs de PKC, qu'une sécrétion d'ADP du même niveau que celle observée à 5 secondes de stimulation par la thrombine a été observée. Ce résultat suggère que le  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisé à partir des réserves SERCA3 et le diacyl-glycérol (DAG, provenant de la dégradation des phospholipides par les phospholipases) sont tous deux nécessaires pour induire la sécrétion primaire d'ADP (Figure 1).

## **IMPORTANCE EN PHYSIO-PATHOLOGIE HUMAINE**

Si une grande partie des travaux a été réalisée avec nos modèles murins, l'utilisation du tBHQ, pour inhiber préférentiellement SERCA3, et du Ned-19, pour inhiber le NAADP, nous a permis de confirmer l'existence d'une voie de signalisation similaire dans les plaquettes humaines, dont l'inhibition se traduit par une réduction de l'activation plaquettaire en réponse à de faibles stimulations. De plus, nous avons récemment observé, dans les plaquettes de patients souffrant d'obésité sévère, une diminution acquise de l'expression de SERCA3 associée à une diminution des capacités des plaquettes à être activées. Les plaquettes de patients ont été réanalysées après amaigrissement, un an après un *by-pass* gastrique, et la perte

de poids a été associée à une normalisation de l'activation plaquettaire et une restauration du niveau d'expression de SERCA3 plaquettaire (11). Nous avons alors proposé que l'obésité sévère est un état pathologique pro-thrombotique, et que la réduction de l'activité plaquettaire est une réponse adaptative qui permet d'atténuer le risque de thromboses. Cette observation suggère que le ciblage de la voie de signalisation NAADP/SERCA3 pourrait être un moyen de limiter l'activation plaquettaire spontanée, sans complètement inhiber l'activité plaquettaire hémostatique.

Il est donc important de connaître l'ensemble des protéines impliquées dans cette voie pour déterminer quelle pourrait être la meilleure cible thérapeutique.

### **LA VOIE NAADP/SERCA3**

La voie de signalisation impliquant la mobilisation de réserves SERCA3 par le NAADP reste entièrement à découvrir. Plusieurs pistes sont actuellement explorées.

#### **La source du NAADP**

La rapide mobilisation des réserves SERCA3 suggère une génération rapide de NAADP ou l'existence de réserves de NAADP. Le rôle de CD38, une enzyme membranaire qui catalyse l'échange du groupe nicotinamide du NADP<sup>+</sup> avec l'acide nicotinique pour synthétiser le NAADP, a été proposé dans les fonctions plaquettaires, mais l'implication de cette enzyme devra être confirmée car elle est plutôt décrite comme impliquée dans des processus plus longs de l'ordre de 30 secondes (12, 13).

#### **La cible du NAADP**

La cible du NAADP a fait l'objet de nombreuses publications, et aujourd'hui il semble qu'un consensus se fasse autour de l'hypothèse selon laquelle les canaux TPC (*Two Pore Channel*) sont ouverts par le NAADP, même si aucune interaction directe entre ces deux molécules n'a pu être démontrée et que l'action d'une protéine intermédiaire est possible (14). La présence et l'implication des TPC devront être étudiées dans les plaquettes.

#### **La cible de l'ADP de la sécrétion primaire**

L'ADP, agissant de façon autocrine, est une cible clé, et il existe déjà des inhibiteurs contre ses récepteurs spécifiques, à savoir P2Y1 et P2Y12. Dans le cas de P2Y12, son inhibition est déjà au cœur de traitements antithrombotiques, et l'inhibition de ce récepteur se traduit par

une forte inhibition de l'agrégation plaquettaire soutient que son implication dans l'activation des plaquettes va bien au-delà d'un effet sur la voie NAADP/SERCA3.

## CONCLUSION

L'une de nos conclusions les plus importantes est que la sécrétion précoce d'ADP, détectable dans les secondes suivant la stimulation par un agoniste des plaquettes, est totalement dépendante de la voie SERCA3-NAADP, tandis qu'une voie de sécrétion secondaire d'ADP, dépendante de SERCA2b et IP3, apparaît entre 5 et 10 secondes. Le décalage entre ces deux sécrétions peut être dû à la localisation de deux voies de signalisation et/ou à la machinerie sécrétoire : par exemple, les réserves SERCA3 qui sont périphériques permettent la sécrétion de granules périphériques nécessitant une très faible réorganisation du cytosquelette et des membranes, tandis que les réserves SERCA2b, plus centrales, mobilisent des granules plus éloignés de la membrane dont l'exocytose prend plus de temps. La conséquence majeure est que les deux voies initient la sécrétion de manière séquentielle. Cette organisation temporelle, avec une mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du NAADP avant les autres voies de mobilisation, a déjà été observée dans un certain nombre d'autres types de cellules, mais ces études n'ont pas cherché à corréliser cette signalisation calcique avec des mécanismes de sécrétion. Il est possible qu'une voie de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  NAADP-SERCA3 régulant une sécrétion précoce soit un mécanisme plus général retrouvé dans d'autres systèmes cellulaires.

Une des questions concerne la sécrétion initiale d'ADP (et d'ATP) ; Dépend-elle de 2 populations distinctes de granules denses, chacune étant associée à un type de voie de signalisation des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  du SERCA : dans ce cas, un sous-type de granules denses serait physiquement et/ou fonctionnellement associé aux réserves SERCA3, et serait le seul capable de libérer son contenu lors de la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves SERCA3. Les granules restants libèreraient ensuite leur contenu lors de la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des réserves SERCA2b. Alternativement, la population de granules denses serait homogène, mais les granules proches des réserves de SERCA3 (et près de la membrane plasmique) sécrèteraient leur contenu lors de la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir de ces réserves. Il est aussi possible que SERCA3 soit directement insérée dans la membrane d'un granule qui serait sécrété suite à la mobilisation de son propre  $\text{Ca}^{2+}$ . L'identification de ces différents mécanismes nécessitera des études plus approfondies.

## RÉFÉRENCES

1. Bobe R, Bredoux R, Corvazier E, Lacabaratz-Porret C, Martin V, Kovacs T, *et al.* How many Ca<sup>2+</sup>ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets. *Platelets* 2005 ; 16 : 133-50.
2. Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 14483-9.
3. Poch E, Leach S, Snape S, Cacic T, MacLennan DH, Lytton J. Functional characterization of alternatively spliced human SERCA3 transcripts. *Am J Physiol* 1998 ; 275 : C1449-C58.
4. Kovacs T, Berger G, Corvazier E, Paszty K, Brown A, Bobe R, *et al.* Immunolocalization of the multi-sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase system in human platelets. *Br J Haematol* 1997 ; 97 : 192-203.
5. Lopez JJ, Jardin I, Bobe R, Pariente JA, Enouf J, Salido GM, *et al.* STIM1 regulates acidic Ca<sup>2+</sup> store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets. *Biochem Pharmacol* 2008 ; 75 : 2157-64.
6. Lopez JJ, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Two distinct Ca(2+) compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets. *Cell Signal* 2006 ; 18 : 373-81.
7. Liu LH, Paul RJ, Sutliff RL, Miller ML, Lorenz JN, Pun RY, *et al.* Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca<sup>2+</sup> signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase isoform 3. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 30538-45.
8. Kao J, Fortner CN, Liu LH, Shull GE, Paul RJ. Ablation of the SERCA3 gene alters epithelium-dependent relaxation in mouse tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 1999 ; 277 : L264-70.
9. Feng M, Elaib Z, Borgel D, Denis CV, Adam F, Bryckaert M, *et al.* NAADP/SERCA3-Dependent Ca(2+) Stores Pathway Specifically Controls Early Autocrine ADP Secretion Potentiating Platelet Activation. *Circ Res* 2020 ; 127 : e166-e83.
10. Elaib Z, Adam F, Berrou E, Bordet JC, Prevost N, Bobe R, *et al.* Full activation of mouse platelets requires an ADP secretion pathway regulated by SERCA3 ATPase-dependent calcium stores. *Blood* 2016 ; 128 : 1129-38.
11. Elaib Z, Lopez JJ, Coupaye M, Zuber K, Becker Y, Kondratieff A, *et al.* Platelet Functions are Decreased in Obesity and Restored after Weight Loss: Evidence for a Role of the SERCA3-Dependent ADP Secretion Pathway. *Thromb Haemost* 2019 ; 119 : 384-96.
12. Cosker F, Cheviron N, Yamasaki M, Menteyne A, Lund FE, Moutin MJ, *et al.* The ecto-enzyme CD38 is a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthase that couples receptor activation to Ca<sup>2+</sup> mobilization from lysosomes in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 38251-9.
13. Mushtaq M, Nam TS, Kim UH. Critical role for CD38-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in thrombin-induced procoagulant activity of mouse platelets and hemostasis. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 12952-8.
14. Capel RA, Bolton EL, Lin WK, Aston D, Wang Y, Liu W, *et al.* Two-pore Channels (TPC2s) and Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) at Lysosomal-Sarcoplasmic Reticular Junctions Contribute to Acute and Chronic beta-Adrenoceptor Signaling in the Heart. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 30087-98.

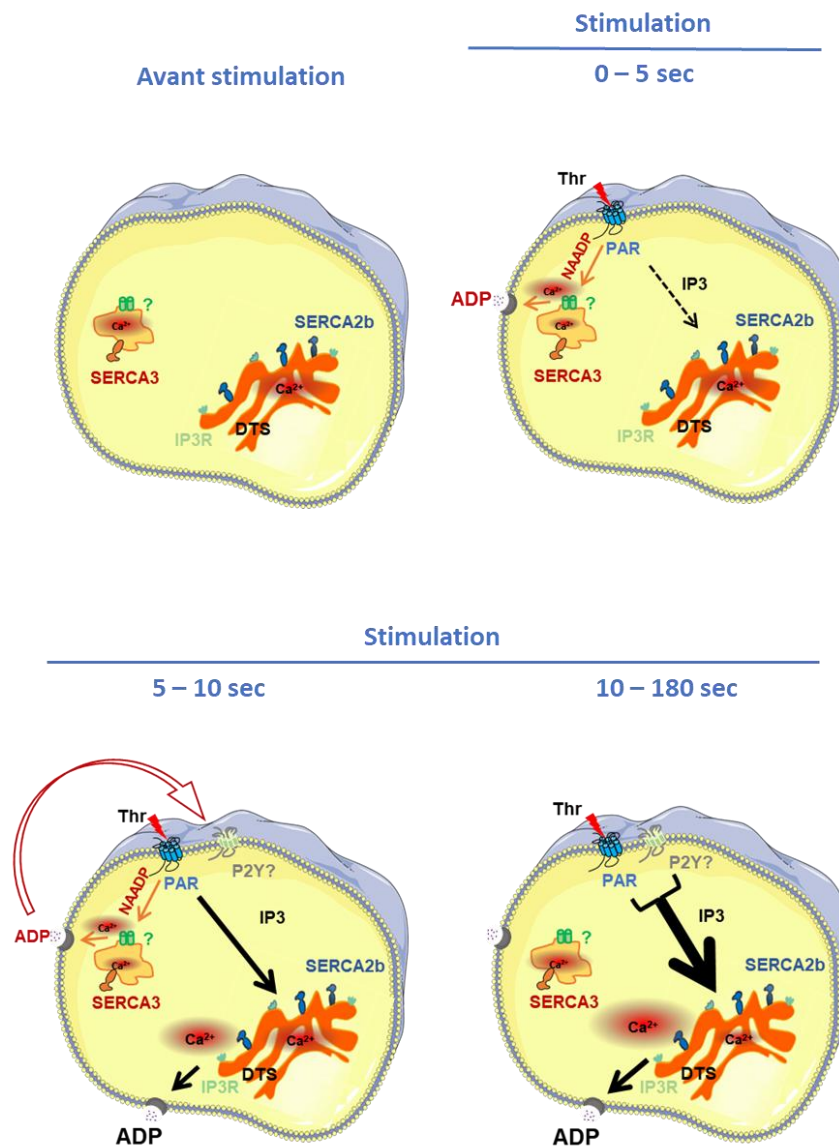


Figure 1 : Schéma de l'activation plaquettaire.

Les plaquettes au repos possèdent au moins deux réserves de  $Ca^{2+}$  distinctes contrôlées respectivement par SERCA2b et SERCA3. La stimulation à une faible concentration de thrombine conduit à une synthèse ou une libération de NAADP, qui mobilise rapidement (de 0 à 5 secondes) du  $Ca^{2+}$  à partir des réserves SERCA3, conduisant à la sécrétion primaire d'ADP. Cette sécrétion primaire d'ADP agit dans un deuxième temps (5 à 10 secondes) de façon autocrine (probablement via les récepteurs P2Y), et renforce très probablement par une synthèse accrue d'IP3 la mobilisation du  $Ca^{2+}$  à partir des réserves SERCA2b menant à la sécrétion secondaire d'ADP qui devient prédominante à partir de 10 secondes.

*Figure 1: Diagram showing platelet activation.*

*At rest, platelets display at least two different  $Ca^{2+}$  stores controlled by SERCA2b and SERCA3 respectively. Stimulation with low concentration of thrombin leads to synthesis or liberation of NAADP which rapidly mobilises (0 - 5 sec)  $Ca^{2+}$  from SERCA3 stores resulting in primary ADP secretion. This primary ADP secretion acts then (5 to 10 seconds) in an autocrine way (probably via P2Y receptors) to trigger  $Ca^{2+}$  mobilisation from SERCA2b store, most probably by an increased*

*synthesis of IP3, leading to the secondary secretion of ADP which becomes predominant after 10 seconds.*