



**HAL**  
open science

## Rôle inflammatoire des plaquettes sanguines : application en transfusion

Thi Kim Anh Nguyen

► **To cite this version:**

Thi Kim Anh Nguyen. Rôle inflammatoire des plaquettes sanguines : application en transfusion. Hématologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013. Français. NNT : 2013STET014T . tel-01058759

**HAL Id: tel-01058759**

**<https://theses.hal.science/tel-01058759>**

Submitted on 28 Aug 2014

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

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

**THESE** de l'Université Jean Monnet de Saint-Étienne, Membre de l'Université de Lyon

Pour l'obtention du **DIPLÔME DE DOCTORAT** en Biologie, Médecine, Santé

Présentée et soutenue publiquement le 29 Octobre 2013 par

**Thi Kim Anh NGUYEN**

# **RÔLE INFLAMMATOIRE DES PLAQUETTES SANGUINES : APPLICATION EN TRANSFUSION**

## **Membres du jury :**

<b>Pr Philippe BIERLING</b>	<b>Examineur</b>	Établissement Français du Sang Ile-de-France Université Paris XII, Il de France
<b>Pr Jean-Daniel TISSOT</b>	<b>Rapporteur</b>	Service Régional Vaudois de Transfusion Sanguine & Université de Lausanne – Suisse
<b>Pr Philippe SAAS</b>	<b>Rapporteur</b>	Établissement Français du Sang Bourgogne Franche- Comté & INSERM Unité Mixte de Recherche 1098 & Université de Franche-Comté, Institut Fédératif de Recherche 133, Besançon
<b>Pr Bruno POZZETTO</b>	<b>Examineur</b>	Université de Lyon, GIMAP, EA3064, Saint-Étienne
<b>Dr Fabrice COGNASSE</b>	<b>Co-Directeur de thèse</b>	Établissement Français du Sang Auvergne-Loire & Université de Lyon, GIMAP, EA3064, Saint-Étienne
<b>Pr Olivier GARRAUD</b>	<b>Directeur de thèse</b>	Établissement Français du Sang Auvergne-Loire & Université de Lyon, GIMAP, EA3064, Saint-Étienne

# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Jean-Daniel TISSOT et le Professeur Philippe SAAS de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer cette thèse et pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail.

Je tiens à remercier également le Professeur Philippe BIERLING d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineur.

Je remercie le Professeur Bruno POZZETTO, directeur du GIMAP EA3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes) de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je tiens à remercier et à témoigner toute ma reconnaissance au Professeur Olivier GARRAUD, mon directeur de thèse, d'une part, pour la confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée dans le laboratoire, mais également pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche et à valoriser les travaux ainsi qu'à m'orienter et à m'aider dans ma future carrière.

Je remercie tout particulièrement et sincèrement le Docteur Fabrice COGNASSE pour sa présence au quotidien, son écoute, sa disponibilité et son encadrement, mais aussi pour sa bonne humeur et ses encouragements. Je le remercie également pour ses multiples conseils pertinents pour la suite de ma carrière.

Je remercie vivement le Docteur Hind HAMZEH-COGNASSE pour ses conseils, ses aides et sa présence au quotidien.

Je remercie également l'Établissement Français du Sang Auvergne-Loire pour son soutien financier ainsi que l'ensemble du personnel que j'ai pu côtoyer durant ces 3 années. Je tiens aussi à remercier les donateurs de sang qui, en plus de l'importance de leur don, m'ont permis d'effectuer la majeure partie de mes travaux.

Je tiens à remercier tous nos collaborateurs pour leurs contributions dans nos travaux scientifiques, en particulier Sabine Palle pour ses aides techniques et sa bonne humeur.

Je remercie particulièrement le « Platelet team » notamment Marie-Ange, Charles-Antoine et Pauline pour leur présence, leur partage et leurs aides dans ma thèse et aussi au quotidien avec une bonne humeur que je n'oublierai jamais.

Je tiens à remercier également l'ensemble des membres du GIMAP EA3064 dont je ne pourrais me permettre d'écrire la liste complète, mais qui se reconnaîtront. Merci pour votre bonne humeur permanente et pour l'entraide forte entre « Gimapiens » : Olivier D, Fahd, Thibaut, Nicolas, Rachel, Alex, Agathe, Fabienne, Blandine, Severine, Françoise ainsi qu'une partie du GIMAP EA3064 à Robespierre et tous les autres que j'ai certainement du oublier et pour lesquels je m'excuse d'avance. J'ai, en tout cas, passé 3 années sympathiques au sein du laboratoire que je n'oublierai pas.

Je veux remercier de tout mon cœur ma famille et ma belle-famille, mes amis les plus proches, et plus spécialement mes parents, qui ont toujours été à mes côtés et me soutiennent moralement malgré la distance, sans qui je ne serais jamais arrivée ici.

Enfin, le mot de la fin ira pour mon mari qui est présent dans tous les moments de ma vie depuis presque 4 ans et qui me soutient de tout son cœur. Je te remercie également d'avoir partagé en permanence toutes mes émotions d'expatriées et le stress que j'ai accumulé pendant la dernière période de mes études. Merci pour tout.

# Sommaire

<b>Résumé .....</b>	<b>10</b>
<b>Index des abréviations .....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures et des tableaux.....</b>	<b>16</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>18</b>
<b>Revue bibliographique du sujet .....</b>	<b>21</b>
<b>A. Les plaquettes sanguines.....</b>	<b>22</b>
<b>I) Généralités .....</b>	<b>22</b>
1.    Morphologie.....	22
2.    Structure.....	23
2.1.  La membrane plasmique des plaquettes.....	23
2.2.  Le cytosquelette des plaquettes .....	24
2.3.  Les organites des plaquettes.....	25
2.3.1  Les granules $\alpha$ .....	26
2.3.2  Les granules denses.....	29
2.3.3  Les lysosomes .....	30
2.3.4  Les autres organites : les mitochondries, les peroxysomes et les granules T.....	30
<b>II) La physiologie plaquettaire et le rôle des plaquettes dans l'hémostase.....</b>	<b>31</b>
1.    Généralité sur l'hémostase .....	31
2.    L'adhésion plaquettaire .....	32
3.    L'activation plaquettaire .....	33
3.1.  Les récepteurs d'activation, leurs agonistes solubles et les voies de signalisation intraplaquettaire impliquées dans l'activation plaquettaire .....	33
3.1.1  Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG)...	33

3.1.2	Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK).....	35
3.1.3	Les récepteurs de type intégrine.....	36
3.2.	Changement morphologique .....	38
3.3.	La sécrétion plaquettaire .....	40
4.	L'agrégation plaquettaire.....	41
<b>III)</b>	<b>Les fonctions des plaquettes dans le système immunitaire .....</b>	<b>42</b>
1.	Récepteurs immunitaires plaquettares.....	42
1.1.	Les récepteurs d'immunité innée .....	42
1.2.	Les récepteurs des cytokines et chimiokines.....	42
1.3.	Les récepteurs d'hémostase impliqués dans la fonction immunitaire ....	43
2.	Facteurs solubles plaquettares .....	44
2.1.	Les cytokines et chimiokines plaquettares .....	45
2.2.	Les facteurs immunomodulateurs .....	46
2.3.	Les autres facteurs .....	47
3.	L'interaction des plaquettes avec les cellules immunitaires .....	47
3.1.	Interactions : plaquettes – PBMC.....	47
3.2.	Interactions : plaquettes – cellules dendritiques.....	47
3.3.	Interactions : plaquettes – lymphocytes.....	48
4.	Plaquettes – EC.....	51
5.	Interaction des plaquettes avec les pathogènes infectieux .....	52
5.1.	Interaction des plaquettes avec les bactéries.....	52
5.2.	Interaction avec les virus.....	53
5.3.	Interaction avec les parasites.....	53
<b>IV)</b>	<b>Les sous-populations plaquettares .....</b>	<b>54</b>
<b>V)</b>	<b>La thrombopoïèse.....</b>	<b>55</b>
1.	La mégacaryopoïèse et la maturation des MK.....	55

2.	La formation des proplaquettes.....	56
2.1.	Le modèle statique.....	56
2.2.	Le modèle dynamique.....	59
3.	La libération des plaquettes aux extrémités des proplaquettes .....	60

## **B. Récepteurs Siglec..... 61**

### **I) Reconnaissance des signaux de danger et signalisation dans l'immunité innée 61**

1.	Généralités .....	61
2.	Les principaux PRR .....	63
2.1.	Les TLR.....	63
2.2.	Les NLR et RLR .....	64

### **II) Les récepteurs Siglec ..... 65**

1.	Historique de la découverte et leur structure .....	65
1.1.	Historique de la découverte des Siglec .....	65
1.2.	Structure.....	65
2.	Classification, expression et évolution des Siglec : .....	66
2.1.	Classification et expression .....	66
2.2.	Évolution structurale des CD33r Siglec .....	68
3.	Les ligands des Siglec.....	70
3.1.	Les Siglec reconnaissent les ligands du soi de type glycane sialylé .....	70
3.2.	Les gangliosides.....	71
4.	Les fonctions connues des Siglec .....	72
4.1.	Régulation de la réponse immunitaire innée.....	72
4.1.1	Interaction des cellules de l'immunité innée avec les pathogènes par l'engagement des Siglec .....	72
4.1.2	Fonction inhibitrice des réponses inflammatoires : Corécepteur de TLR/NLR.....	73

4.1.3	Les Siglec distinguent les DAMP et PAMP .....	75
4.1.4	Dysfonction de la régulation .....	76
4.2.	La régulation de la réponse immunitaire adaptative.....	77
4.2.1	Régulation négative de la signalisation du récepteur des cellules B (BCR) et maintenance la tolérance immunitaire .....	77
4.2.2	Les Siglec et la régulation de la signalisation des cellules T .....	78
4.3.	Prolifération, différenciation, survie et apoptose cellulaire .....	79
5.	Signalisation des récepteurs Siglec .....	80
5.1.	Les domaines ITIM/ITIM-like.....	80
5.2.	Les Siglec n'ayant pas de domaine ITIM/ITIM-like.....	81
5.3.	« Clusterisation » des Siglec.....	81
6.	Thérapeutique et Siglec .....	82
6.1.	Anticorps anti Siglec : cible thérapeutique des maladies de l'immunité cellulaire.....	82
6.2.	Les ligands glycanes sialylés : une nouvelle méthode pour cibler les Siglec.....	83
6.3.	Les autoanticorps anti-Siglec et les immunoglobulines intraveineuses (IVIg).....	83
7.	Les spécificités du Siglec-7 .....	84

**C. Le phénomène apoptotique plaquettaire ..... 86**

**I) Généralité sur la mort cellulaire ..... 86**

**II) L'apoptose plaquettaire ..... 87**

1.	Les inducteurs de l'apoptose .....	87
1.1.	Les plaquettes âgées .....	87
1.2.	Les stimuli chimiques .....	88
1.3.	Les inducteurs physiques .....	90
1.4.	Pathologie et apoptose plaquettaire .....	90



2.	Les changements morphologiques au cours d'apoptose .....	90
3.	Les différentes voies d'apoptose .....	91
3.1.	La voie intrinsèque : .....	91
3.1.1	La formation des mPTP et la dépolarisation de la membrane mitochondriale.....	92
3.1.2	La formation de l'apoptosome .....	93
3.1.3	La famille Bcl-2.....	94
3.2.	La voie extra-mitochondriale .....	96
3.2.1	L'exposition de la PS .....	96
3.2.2	L'activation de la caspase-3.....	97
3.2.3	La formation des microparticules plaquettares .....	98
3.3.	La voie extrinsèque .....	99
3.4.	L'interconnexion des différentes voies d'apoptose.....	101
4.	L'élimination des plaquettes apoptotiques et des PMP .....	102
5.	Rôle et implication en clinique de PMP .....	104
6.	La régulation de l'apoptose plaquettaire.....	106
6.1.	Les intégrines plaquettares .....	106
6.1.1	La GPIIb/IIIa .....	106
6.1.2	La GPIb $\alpha$ .....	108
6.2.	Le Calcium .....	108
6.3.	La régulation de l'apoptose par les composants du mPTP .....	110
6.3.1	Le CyP-D.....	110
6.3.2	ANT - VDAC .....	110
6.4.	La régulation de l'apoptose plaquettaire par les voies intraplaquettares.....	111
6.4.1	Les ROS .....	111
6.4.2	La protéine kinase C .....	111

6.4.3 Le P2Y12 inhibe l'apoptose plaquettaire en activant le couple PI3k/Akt.....	113
7. Conclusion et méthodologie d'étude des marqueurs d'apoptose plaquettaire	113
<b>D. Les plaquettes sanguine dans un contexte transfusionnel.....</b>	<b>115</b>
I) Les TLR plaquettares .....	115
II) Les facteurs solubles plaquettares .....	116
III) L'interaction des plaquettes et les autres cellules .....	116
IV) L'interaction des plaquettes avec les pathogènes .....	117
<b>E. Revue générale: « Les concentrés plaquettares en transfusion sanguine : préparation, normes et principes de sécurité pour une meilleure tolérance et l'éviction d'effets indésirables ».....</b>	<b>119</b>
<b>Objectif du travail .....</b>	<b>157</b>
<b>Résultats expérimentaux.....</b>	<b>160</b>
Article I: Do manual and automated processes with distinct additive solutions affect whole blood-derived platelet components differently?.....	161
Article II: A computerized prediction model of hazardous inflammatory platelet transfusion outcomes .....	164
Article III: Role of Siglec-7 in apoptosis in human platelets.....	217
<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>274</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>288</b>
I) Article en cours de préparation .....	289
II) Publications .....	293
III) Communications orales et affichées .....	293
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>295</b>

# Résumé

Les plaquettes sanguines sont des cellules qui ont un rôle majeur au cours des processus de l'hémostase primaire et jouent un rôle primordial dans l'immunité innée mais aussi adaptative. Ces cellules anucléées ont une capacité sécrétoire très importante de facteurs solubles notamment de cytokines, de chimiokines (CK/CH) et de facteurs immunomodulateurs. L'émergence du rôle inflammatoire des plaquettes sanguines dans la communauté scientifique a soulevé de nombreuses questions auxquelles nous essayons de répondre dans ce manuscrit. La majorité de ces questions repose sur la capacité de ces cellules anucléées à répondre de manière régulée à des stimuli complexes. Nos investigations pour répondre à ces questions ont été réalisées dans un contexte transfusion sanguine.

Au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence la corrélation des profils de sécrétion plaquettaire avec les récepteurs membranaires et les voies de signalisations intraplaquettaires engagées.

Les plaquettes expriment plusieurs récepteurs immunitaires sur leur surface notamment les « Pattern recognition receptors » (PRR) et des récepteurs aux CK/CH. Nous avons démontré et caractérisé la fonction d'un nouveau récepteur plaquettaire, le Siglec-7. Ce récepteur est localisé dans les granules  $\alpha$  ; son expression sur la membrane est corrélée avec l'état d'activation plaquettaire. Le Siglec-7 a une avidité élevée avec les molécules composées d' $\alpha$ 2,8-disialyl (NeuAca $\alpha$ 2,8NeuAca $\alpha$ 2,3Gal) et de  $\alpha$ 2,6-sialyl (Gal- $\beta$ 1,3[NeuAca $\alpha$ 2,6]HexNAc) (comme les gangliosides GD2, GD3 et GT1b). L'engagement de ce récepteur peut induire l'apoptose plaquettaire par la voie intrinsèque et extramitochondriale. Ce processus nécessite l'engagement du récepteur GPIIb/IIIa et P2Y1 et la signalisation de la voie de PI3k.

Nous avons également étudié et mis en évidence une composante inflammatoire multifactorielle dans les effets indésirables des receveurs (EIR) et trouvé dans les concentrés plaquettaires (CP), plusieurs facteurs solubles ayant une valeur prédictive élevée pour la survenue des EIR, notamment le sCD40L et l'IL-13. Nous avons confirmé que la concentration de ces facteurs augmente au cours de temps de stockage des CP, étant, en partie, responsable du taux élevé de l'EIR des CP âgés. Enfin, en plus de la conservation, les processus de préparation des CP peuvent aussi avoir des impacts sur les propriétés inflammatoires des plaquettes.

Ces travaux montrent que la réponse inflammatoire plaquettaire est régulée en fonction du stimulus, permettant d'argumenter sur le rôle présumé de sentinelle des plaquettes sanguines humaines. Ainsi, mes travaux s'inscrivent dans la ré-exploration de la fonction inflammatoire des plaquettes sanguines et l'étude du rôle des plaquettes comme cellules de l'immunité à composante inflammatoire.

# Index des abréviations

$\Delta\Psi_m$	Potentiel transmembranaire mitochondrial
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ANT	Adenin nucleotide translocator
Apaf	Apoptosis Protein Activating Factor
ATP	Adénosine triphosphate
CH	Chimiokines
CK	Cytokines
CD41b	GPIIb (ou intégrine $\alpha$ IIb)
CD61	GPIIIa (intégrine $\beta$ 3)
CD41a	GPIIb/IIIa (intégrine $\alpha$ IIb $\beta$ 3)
CD42b	GPIb
CD42a	GPIX
CD31	PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule)
CD36	GPIV (GPIIIb)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CP	Concentré plaquettaire
CyP-D	Cyclophiline D
DAG	1,2-diacyl glycerol
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DC	Cellules dendritiques
DcR	Decoy receptor
DISC	Death-inducing signaling complex
DMS	Membranes de démarcation
DMU	Dispositifs médicaux à usage unique
DR	Death receptor
DTS	Système tubulaire dense
EC	Cellules endothéliales
EIR	Effets indésirables des receveurs
FcR	Récepteurs pour la portion Fc

Fg	Fibrinogène
Fn	Fibronectine
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GP	Glycoprotéines
Gro- $\alpha$	Growth regulated oncogene-alpha
HMGB1	High mobility group box 1
HSP	Heat shock proteins
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
ITAM/ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based activatory/inhibitor motifs
IVIg	Immunoglobulines intraveineuses
LAT	Linker for Activation of T cells
LPS	Lipopolysaccharide
LyB, T	Lymphocytes B, T
MAPK	The mitogen-activated protein kinases
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1-alpha
MK	Mégacaryocyte
mPTP	Pores de transition de perméabilité mitochondriale
NET	Neutrophile Extracellular Traps
NK	Natural Killers
NLR	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
OCS	Système canaliculaire ouvert
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PAR	Protease-activated receptor
PCC	Coefficient de la corrélation de Pearson
PF4	Platelet factor 4
PG	Prostaglandine
PI3k	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMNC	Polymorphonuclear cells

PMP	Microparticules plaquettaires
PRP	Plasma riche en plaquettes
PRR	Pattern Recognition Receptors
PS	Phosphatidylsérine
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTI	Purpura thrombopénique idiopathique
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secrete
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RLR	RIG-like receptors
ROS	Reactive oxygen species
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
SAMP	Self – associated molecular patterns
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SH2	Src Homology 2
SHP1/2	domaine SH2 contenant la protéine tyrosine phosphatase 1 et 2
Siglec	Sialic acid binding Immunoglobulin – like Lectins
SMAC/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with Low pI
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion Attachment Protein Receptor
SOCS	Supressor of cytokines signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCR	T cells receptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
TPO	Thrombopoïétine
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand ou Apo2L
TRALI	Transfusion-related acute lung injury
TRAP	Thrombin receptor activating peptide
TREM1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TxA2	Thromboxane A2
VDAC	Voltage-dependent anion channel ou porine



# Liste des figures et des tableaux

<b>Figure 1</b> : Observation des plaquettes en microscopie électronique à balayage (A, B) et transmission (C, D).....	22
<b>Figure 2</b> : Modèle de la formation de granule $\alpha$ dans les MK.....	27
<b>Figure 3</b> : Les phases de l'hémostase .....	32
<b>Figure 4</b> : Cascade de signalisation de GPVI .....	36
<b>Figure 5</b> : Signalisation de l'intégrine GPIIb/IIIa .....	37
<b>Figure 6</b> : Signalisations engagées au cours d'activation des plaquettes .....	38
<b>Figure 7</b> : Réorganisation de l'actine dans l'adhésion et l'activation plaquettaire.....	39
<b>Figure 8</b> : Régulation du changement morphologique des plaquettes par les protéines liées à l'actine .....	40
<b>Figure 9</b> : Récepteurs plaquettaires jouant un rôle dans les processus immunitaires .....	43
<b>Figure 10</b> : Les effets des plaquettes sur les sous-populations lymphocytaires.....	50
<b>Figure 11</b> : Schéma de la migration des MK.....	56
<b>Figure 12</b> : L'élaboration des proplaquettes murines et la structure de leur microtubule	58
<b>Figure 13</b> : Structure commune des Siglec.....	66
<b>Figure 14</b> : Classification, structure et expression des Siglec.....	68
<b>Figure 15</b> : Évolution des CD33r Siglec.....	69
<b>Figure 16</b> : Interaction entre Siglec avec ses ligands.....	71
<b>Figure 17</b> : L'interaction du CD22 et TLR-9.....	75
<b>Figure 18</b> : L'interaction entre Siglec-G et le CD24 basée sur leur structure glycoprotéine permet la distinction entre les DAMP et les PAMP .....	76
<b>Figure 19</b> : Modulation de la signalisation du BCR par le CD22 .....	78
<b>Figure 20</b> : Synthèse de la signalisation et des fonctions connues des Siglec .....	82
<b>Figure 21</b> : Morphologie des plaquettes apoptotiques en microscopie électronique à balayage.....	91

<b>Figure 22</b> : Mécanisme de la formation des mPTP.....	93
<b>Figure 23</b> : Principales voies d'apoptose .....	94
<b>Figure 24</b> : Classification de la famille Bcl-2 .....	95
<b>Figure 25</b> : L'échange de phospholipides entre deux feuillets lipidiques de la membrane cellulaire .....	97
<b>Figure 26</b> : Interconnexion des différentes voies d'apoptose des cellules nucléées.....	102
<b>Figure 27</b> : Élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes .....	103
<b>Figure 28</b> : Élimination des PMP.....	104
<b>Figure 29</b> : Régulation dans les phénomènes apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2 par l'intermédiaire de la concentration du Ca <sup>2+</sup> .....	109
<b>Figure 30</b> : Mécanisme de régulation négative de l'apoptose par l'engagement du P2Y <sub>12</sub> en activant la voie de PI3k/Akt après la fixation de l'ADP .....	113
<b>Figure 31</b> : Ordre des événements de l'apoptose plaquettaire .....	114
<b>Tableau 1</b> : Facteurs contenus dans les granules $\alpha$ (liste non exhaustive).....	29
<b>Tableau 2</b> : Rôle de l'interaction des récepteurs plaquettaire avec leurs ligands solubles et les voies de signalisations dans les réponses plaquettaire .....	41
<b>Tableau 3</b> : Interaction entre les bactéries et les récepteurs de type d'hémostase plaquettaire .....	44
<b>Tableau 4</b> : Molécules plaquettaire ayant fonctions immunes.....	45
<b>Tableau 5</b> : Liste (non exhaustives) des DAMP .....	62
<b>Tableau 6</b> : L'affinité des Siglec avec leurs ligands de nature glycane.....	72
<b>Tableau 7</b> : Effet de l'interaction Siglec-TLR.....	74
<b>Tableau 8</b> : Inducteurs d'apoptose plaquettaire .....	89
<b>Tableau 9</b> : Marqueurs plaquettaire de voie d'extrinsèque d'apoptose .....	100
<b>Tableau 10</b> : Techniques d'étude des phénomènes apoptotiques plaquettaire .....	114

# Introduction générale

Les plaquettes sanguines sont de petites cellules anucléées issues de la fragmentation des mégacaryocytes (MK). Ces cellules contiennent un cytosquelette dense qui maintient leur forme discoïde à l'état normal et transforme les plaquettes en format sphérique après leur activation.

Les plaquettes jouent un rôle primordial à la réparation vasculaire et au maintien de l'hémostase notamment dans l'hémostase primaire. Les intégrines membranaires plaquettaires peuvent interagir avec les éléments de l'endothélium lésé, induisant leur adhésion suivie par l'activation et enfin l'agrégation, aboutissant à la formation d'un thrombus constitué par un agrégat des plaquettes reliées entre elles par le fibrinogène (Fg) pour fermer la brèche vasculaire.

Ces cellules jouent également un rôle important dans l'immunité innée et adaptative en interagissant directement ou indirectement avec les autres cellules immunitaires pour déclencher ou entretenir la réponse inflammatoire. Plusieurs acteurs plaquettaires participent au processus inflammatoire, notamment par l'expression membranaire de nombreux récepteurs immunitaires comme les récepteurs aux cytokines (CK), les chimiokines (CH) et un grand nombre des facteurs solubles contenus dans leurs granules (notamment les granules  $\alpha$  comme les CK/CH, les facteurs immunomodulateurs et les facteurs de croissance etc). Parmi ces facteurs, le sCD40L, dont les plaquettes sont des pourvoyeurs majeurs, est une molécule clé, caractérisée de chef d'orchestre, du système immunitaire. La capacité sécrétoire plaquettaire est très importante et nous supposons que leur profil de sécrétion est dépendant du récepteur plaquettaire mis en jeu et qu'il est strictement régulé par les voies de signalisation intraplaquettaire, en fonction des stimuli.

Les plaquettes sont des cellules sentinelles qui possèdent aussi les récepteurs « Pattern recognition receptors » (PRR) pour détecter les signaux de dangers exogènes (Pathogen-associated molecular patterns, PAMP) et endogènes (Damaged-associated molecular patterns, DAMP).

Sur les cellules du système immunitaire, il a été démontré que la famille de récepteurs transmembranaires Siglec (Sialic acid-binding immunoglobulin-like type lectins) est capable de reconnaître et de distinguer ces deux types de signaux de danger. La liaison de ces récepteurs avec leurs ligands sialylés, (exprimés par des cellules

immunitaires ou des pathogènes) inhibe la réponse inflammatoire et maintient la tolérance d'immunité grâce à la phosphorylation du résidu tyrosine du motif ITIM/ITIM-like dans leur région intracellulaire. Les Siglec sont aussi capables de réguler la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la survie cellulaire. À ce jour, chez l'homme, 4 récepteurs Siglec apparentés au CD22, et 10 au CD33, ont été identifiés. Cependant l'expression et la fonction de ces récepteurs n'ont jamais été mises en évidence pour ce qui concerne la plaquette. Aussi, une large partie de nos travaux concerne l'expression et le rôle fonctionnel des Siglec plaquettaires.

L'apoptose plaquettaire est le principal processus, strictement contrôlé, par lequel les plaquettes sont physiologiquement éliminées ; ce mécanisme qui évite l'activation immunitaire, est assez bien documenté au niveau de la plaquette. Nous avons cherché à comprendre si ce processus est associé avec l'engagement des Siglec plaquettaires dans la régulation négative de la réponse inflammatoire.

Au cours de la transfusion plaquettaire, il a été démontré que certains facteurs solubles plaquettaires comme les CK/CH sont responsables, en partie, d'effets indésirables des receveurs (EIR). La concentration de ces facteurs dans les concentrés plaquettaires (CP) est influencée par les processus de préparation et de stockage ainsi que par l'âge des plaquettes. De plus, les stress oxydatifs peuvent conduire à la libération des DAMP, ce qui induit l'engagement de leurs récepteurs plaquettaires correspondant, notamment les PRR, qui entretiennent les réactions inflammatoires plaquettaires et favorisent les EIR. Nos travaux nous ont conduits à étudier cette composante inflammatoire plaquettaire et établir un modèle mathématique prédictif pour la survenue de ces réactions.

Ainsi de nombreuses questions auxquelles nous essayons de répondre dans ce manuscrit concernent le rôle inflammatoire des plaquettes sanguines dans un contexte transfusionnel.

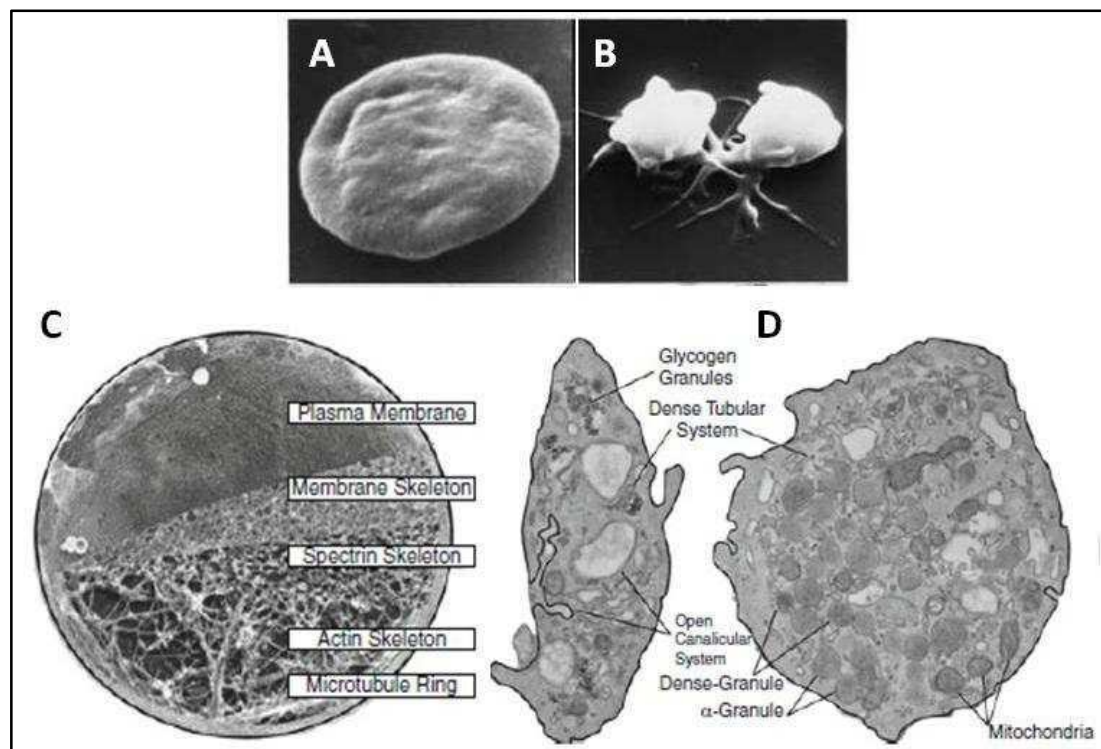
## **Revue bibliographique du sujet**

## A. Les plaquettes sanguines

### I) Généralités

#### 1. Morphologie

Les plaquettes sont des éléments circulants du sang. Elles se présentent au repos sous une forme discoïde avec un diamètre de 2 à 4  $\mu\text{m}$  et un volume de 6 à 8  $\mu\text{m}^3$  (Figure 1A). Lors de l'activation, ces cellules anucléées évoluent en sphère compacte avec de longs prolongements dendritiques facilitant leur adhérence (Figure 1B). L'observation en microscopie électronique à transmission permet de distinguer 3 parties : la membrane plasmique, le cytosquelette et les différents organites intracellulaires (Figure 1C et D) [1]–[3].



**Figure 1 : Observation des plaquettes en microscopie électronique à balayage (A, B) et transmission (C, D)**

D'après [3], [4]

*Morphologie des plaquettes au repos (A) et après activation (B). (C). La membrane plasmique et le cytosquelette. (D). Les différents organites*

## **2. Structure**

### **2.1. La membrane plasmique des plaquettes**

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche lipidique caractérisée par des phospholipides riches en cholestérol libre et en lipides neutres, qui permet d'assurer une certaine stabilité et rigidité des membranes. Sont également insérés dans cette bicouche lipidique différents récepteurs dont les glycoprotéines (GP) (60% des protéines totales) comprenant notamment la GPIIb/IIIa et la GPIb-IX-V impliquées dans la fonction plaquettaire : les interactions cellules-cellules, la détection de molécules extracytoplasmiques et la transduction des signaux [3] (Tableau 2).

Parmi les composants des phospholipides membranaires, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont majoritairement situées sur le feuillet externe, tandis que la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol sont majoritaires sur le feuillet interne. Il existe une asymétrie de distribution des lipides membranaires, les charges négatives étant confinées essentiellement dans le feuillet interne. Au cours de l'activation des plaquettes, les charges négatives migrent vers le feuillet externe sous l'action des floppases et scramblases, phénomène dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP), soutenant la coagulation (voir paragraphe C.II.3.2.1) [3]. Effectivement, l'exposition des aminophospholipides facilite la formation et l'activation du complexe de la tenase qui convertit le facteur de zymogène X en facteur Xa, cette protéase s'associe immédiatement dans le complexe de prothrombinase qui convertit rapidement la prothrombinase en prothrombine [5].

Au niveau de la membrane plasmique, on observe des radeaux lipidiques et des protéines de signalisation importantes, notamment les protéines G, les molécules de la famille Src kinase et la protéine adaptatrice LAT (Linker for Activation of T cells) dont les fonctions seront détaillées dans le paragraphe A.II.3.1. Le regroupement des glycoprotéines au niveau de ces radeaux lipidiques permet une centralisation de ces molécules membranaires ou transmembranaires et une meilleure transduction de la signalisation. Les plaquettes expriment des quantités élevées de radeaux lipidiques par rapport aux cellules eucaryotes, caractérisant ainsi l'importance des interactions des plaquettes avec le milieu extracellulaire [6].



Le feuillet externe de la membrane plasmique présente de nombreuses invaginations ouvertes sur l'extérieur formant ainsi le système canaliculaire ouvert (OCS) (Figure 1D). Ce système permet l'entrée des éléments externes dans les plaquettes et la libération du contenu des granules lors de leur activation. Par ailleurs, l'OCS constitue une importante extension du réservoir mobilisable de la membrane interne facilitant la formation des filopodes, l'étendue des plaquettes et la fusion des membranes lors de la sécrétion. Ce système fonctionne enfin comme un site de stockage des GP membranaires. De la même manière, au niveau du cytoplasme plaquettaire, se trouve le système tubulaire dense (DTS) non connecté à la surface, correspondant au réticulum endoplasmique qui séquestre le calcium ( $Ca^{2+}$ ) et les enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines. Il apparaît que les deux systèmes membranaires OCS et DTS sont étroitement liés pour favoriser la libération du contenu des granules de sécrétions [3], [7].

La membrane plasmique plaquettaire avec son nombre très important de récepteurs spécifiques, régule finement le signal intraplaquettaire dépendant de l'activation plaquettaire et module la libération des granules afin d'assurer les fonctions plaquettaires notamment l'inflammation. Sa plasticité est essentielle pour les mécanismes de transduction du signal, mais aussi lors des différentes réponses physiologiques plaquettaires telles que le changement de conformation, la sécrétion, l'agrégation et la formation du clou plaquettaire.

## **2.2. Le cytosquelette des plaquettes**

La membrane plasmique est supportée par un cytosquelette très développé, constitué par différents systèmes fibrillaires : les microtubules et les micro-filaments d'actine [3]. Ce cytosquelette joue un rôle important dans le maintien et le changement de forme des plaquettes observées au cours de l'activation et de l'agrégation (voir paragraphe A.II.3.2).

Située en dessous de la membrane plasmique, la bande marginale circonférentielle composée de multiples microtubules (7-12 anneaux filamenteux) est responsable de la forme d'ellipse discoïde des plaquettes au repos [8]. Les microtubules sont constitués de sous-unités de dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ 1 qui s'organisent en proto-filaments puis en

filaments associés avec les protéines notamment la dynéine et la kinésine [9]. La bande marginale est caractéristique des plaquettes sanguines [8].

L'actine, composant essentiel du cytosquelette plaquettaire, résulte de la polymérisation d'actine monomérique (actine G) en proto-filaments qui vont s'associer deux à deux pour former le filament d'actine ou actine F. Environ 60% de l'actine existe sous forme d'actine G dans les plaquettes au repos. Alors que le réseau de microtubules dans les plaquettes est principalement sous-membranaire, le réseau d'actine s'organise différemment : on distingue i) un réseau intracellulaire et ii) un réseau adjacent aux microtubules c'est-à-dire sous-membranaire (Figure 7. Plaquettes discoïde). Le réseau intracellulaire d'actine traverse la totalité du cytoplasme des plaquettes. Différentes protéines sont associées aux filaments d'actines : on trouve l' $\alpha$ -actinine et la tropomyosine pour le réseau d'actine intracellulaire. La spectrine et la filamine sont essentiellement associées à l'actine sous-membranaire. Une partie de ces protéines permet la liaison du réseau d'actine avec des protéines membranaires comme les GPIIb/IIIa (l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) et GPIb [9], [10]. Le cytosquelette d'actine est responsable du maintien de l'intégrité plaquettaire et semble plus impliqué dans la sécrétion des granules [3], [11].

Le changement morphologique des plaquettes lors de leur activation est le résultat du désassemblage et d'assemblage des microtubules et d'actine du cytosquelette (voir le paragraphe A.II.3.2)

### **2.3. Les organites des plaquettes**

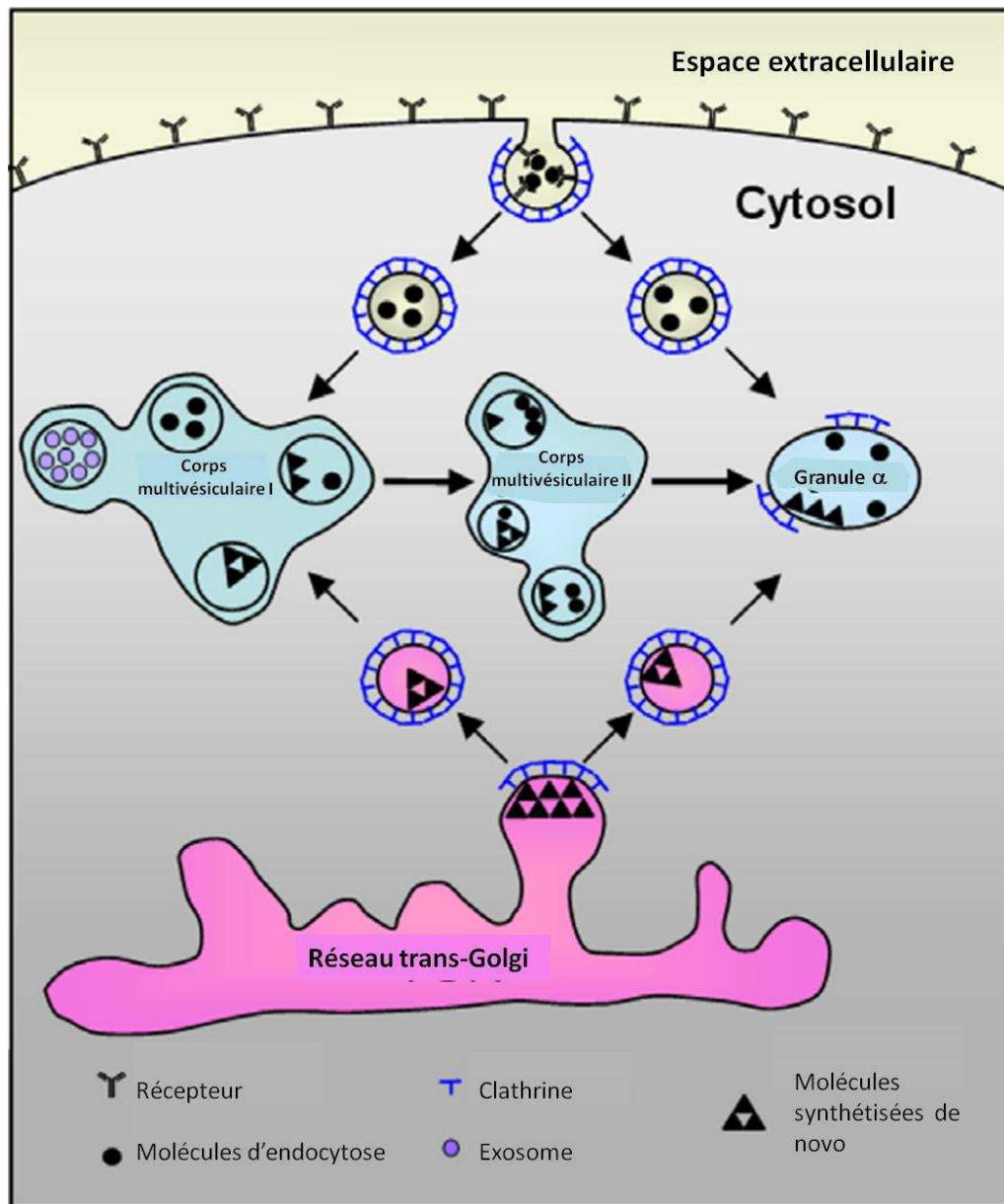
Le cytoplasme des plaquettes contient un grand nombre d'organites comme des mitochondries, des grains de glycogènes et de différents types de granules dont certains sont spécifiques aux plaquettes. Les granules  $\alpha$ , les granules denses et les lysosomes sont des organelles sécrétoires, dans lesquels les deux types de granules sont les principaux réservoirs plaquettaires d'un grand nombre des facteurs solubles [3]. Ces deux types de granules se distinguent par la composition moléculaire, la morphologie ultra-structurale, la cinétique de l'exocytose et la réponse aux différents stimuli ainsi que les anomalies génétiques pouvant être spécifiques de tel ou tel types de granules [12]. Ces granules

sont positionnées à proximité des OCS ; ainsi, lors de l'activation des plaquettes, elles fusionnent et sécrètent la plupart de leur contenu dans l'OCS [11].

### **2.3.1 Les granules $\alpha$**

Les granules  $\alpha$  sont des organites plaquettaires, de 200 à 500 nm de longueur. Ces sont les plus abondants et leur contenu est hétérogène. Au nombre d'environ 80 par cellule, les granules  $\alpha$  occupent 10% de volume plaquettaire [4].

Le développement des granules  $\alpha$  est initié au niveau du MK mais il continue dans les plaquettes circulantes à partir des corps multivésiculaires qui sont composés par les petites vésicules fragmentées du réseau trans-Golgi (concernant les molécules synthétisées par les MK/plaquettes) ou de la membrane plasmatique (concernant les molécules d'endocytose) [4] (Figure 2).



**Figure 2 : Modèle de la formation de granule  $\alpha$  dans les MK**

D'après [4]

*Les facteurs sont de l'origine de la fragmentation du TG et de l'endocytose de membrane plasmique. Les deux processus sont régulés par les molécules de type clathrine. Les vésicules sont tapissées de corps multivésiculaires et transformées en granule  $\alpha$*

Ces granules contiennent des facteurs de croissance, des protéines de coagulation, des molécules d'adhérence, des CK/CH. La plupart des molécules de la membrane plasmique plaquettaire sont présentes sur la membrane des granules  $\alpha$ , par exemple le

récepteur CD62P, les intégrines et les GP [13], [14] (Tableau 1). Parmi ces molécules, certaines sont spécifiques aux plaquettes (synthétisées seulement par les MK ou les plaquettes, comme le PF4 (Platelet factor 4) ou la  $\beta$ -TG ( $\beta$ -thromboglobuline), alors que d'autres sont dites plaquettes-sélectives (synthétisées majoritairement par les MK, mais aussi par d'autres cellules, comme la thrombospondine qui est synthétisée par les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuse et les MK [12]. Enfin, d'autres ne sont pas synthétisées par les MK [12]. Cette dernière catégorie de molécules peut être présente au niveau des granules plaquettaires suivant deux procédés, soit par l'endocytose passive (pinocytose) à partir du plasma circulant (albumine ou immunoglobuline G - IgG), soit par l'intégration dépendante de récepteurs (principalement la GPIIb/IIIa) comme pour le Fg [12]. Ces deux procédés évoluent au cours de la durée de vie des plaquettes circulantes. En effet, la quantité des protéines d'endocytose augmente dans les granules  $\alpha$  des plaquettes âgées [4].

En microscopie électronique, les granules  $\alpha$  présentent 4 zones morphologiques distinctes [12]. De l'extérieur vers l'intérieur des granules, on trouve la membrane périphérique externe, la structure vésiculaire et tubulaire, une zone transparente et une zone foncée. Chacune de ces zones contient des molécules différentes [12]. En microscopie confocale, en utilisant des anticorps spécifiques, il a été démontré que ces molécules sont stockées dans les différents compartiments [15], les molécules d'endocytose se situent souvent à la périphérie alors que les molécules synthétisées sont localisées au centre. La membrane contient des molécules d'adhérence telles que le CD62P et la GPIIb/IIIa tandis que la structure tubulaire contient des formes multimériques du facteur von Willebrand (vWF). Les granules  $\alpha$  présentent de nombreuses molécules dans différentes zones : la zone claire contenant du Fg et de la thrombospondine, la zone foncée contenant du PF4, des protéoglycanes et de la  $\beta$ -TG. Certains granules  $\alpha$  matures contiennent encore des exosomes de taille de 40 à 100 nm, qui sont libérées après activation par la thrombine. Les exosomes sont distincts des microvésicules plaquettaires (encore appelés microparticules plaquettaires - PMP) dont la taille est comprise entre 100 nm et 1  $\mu$ m qui contiennent des protéines membranaires plaquettaires (CD62P et GPIIb/IIIa) et semblent provenir d'une vésiculation de la membrane plasmique après activation plaquettaire [12].

La sécrétion des granules  $\alpha$  survient lorsque leur membrane fusionne avec la membrane plasmique ou avec l'OCS [4]. Cette fusion nécessite des interactions de même origine entre les domaines cytoplasmiques des protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion Attachment Protein Receptor). Ces protéines associées à la membrane sont orientées vers le cytosol. L'association des vSNARE (SNARE associés aux granules ou SNARE vésiculaires) avec les tSNARE (SNARE associés avec l'OCS ou la membrane plasmique) génère l'énergie nécessaire pour la fusion membranaire [11].

Cytokines	Protéines	Facteurs de croissant	Molécules	Récepteurs	Peptides	Autres
Chimiokines	de coagulation	Angiogenèse	d'adhésion		antibactériens	
sCD62P, sCD40L (CD154)	Fibrinogène	ADAM10	vWF	GP1ba-IX-V	Thrombocidin 1-2	c3/c4 précurseur
TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$ 1	Facteur V-VIII-XI-XIII	ADAMST13	vWF antigen II	GP1IbIIa	Thymosin- $\beta$ 4	C1-inhibiteur
IL-1/IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$	$\alpha$ 2-antiplasmin	Angiopoietin-1	Vitronectin	GPVI		PF-H
IL-7, IL-8 (CXCL8)	$\alpha$ 2-antitrypsin	Angiopoietin-r growth factor	Fibronectin			Albumine
Gas-6	PAI-1	bFGF	Ostéonectine			IgG, IgA, IgM
BMP2-6	Anti-thrombin	CD15s				$\alpha$ 2-macroglobulin
CCL2, CCL3 (MIP1 $\alpha$ )	TFPI	CTGF				
CCL4, CCL5 (RANTES)	Plasminogène	EGF				
CCL7 (MCP-3), CCL17	Protéine S	PDGF				
CXCL1 (Gro $\alpha$ )	Protéase nexin-2	VEGF				
CXCL4 (PF4)		VEGF-121-165-189-C				
CXCL5 (ENA-78)		MMP-1-2-9				
CXCL7 (NAP-2/ $\beta$ -TG)		Thrombospondin				
CXCL12 (SDF-1)		TIMPs-1-4				

**Tableau 1 : Facteurs contenus dans les granules  $\alpha$  (liste non exhaustive)**

D'après [3], [4], [13], [14]

*TGF : Transforming growth factor, BMP : Bone morphogenetic proteins, PAI-1: Plasminogen activator inhibitor 1, TFPI : Tissue factor pathway inhibitor, ADAM10 : A disintegrin and metalloproteases 10, ADAMST13 : A disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13, FGF : Fibroblast growth factor, CTGF : Connective tissue growth factor, EGF : Epidermal growth factor, PDGF : Platelet- derived growth factor, VEGF : Vascular endothelial growth factor, MMP : Matrix metalloproteinase, TIMPs : Tissue inhibitor of metalloproteinases*

### 2.3.2 Les granules denses

Les granules denses sont identifiés en microscopie électronique à transmission grâce à leur centre opaque aux électrons. Ces granules de l'ordre de 100 à 200 nm sont plus petites que les granules  $\alpha$  et moins présentes dans les plaquettes avec 3 à 9 granules denses par cellules [3]. Comme pour les granules  $\alpha$ , la formation et le développement des corps multivésiculaires dans les MK sont également une étape intermédiaire dans la

maturation des granules denses (Figure 2). L'adénosine di-phosphate (ADP), l'ATP et le  $\text{Ca}^{2+}$  sont stockés dans les granules denses en grande quantité [16]. L'exocytose de ces granules est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et observée lors de l'activation plaquettaire en particulier après la stimulation par le collagène ou l'ADP. La sécrétion du contenu des granules denses semble être le résultat de la fusion entre leur membrane et la membrane plasmique, induite par les activités des protéines SNARE, mais ce mécanisme n'est pas totalement élucidé [16].

Actuellement, le nombre de molécules libérées par les granules denses semble moins important numériquement que celui des granules  $\alpha$ , mais les granules denses jouent un rôle très important qualitativement dans l'activation et le recrutement plaquettaire aux sites des lésions vasculaires ; l'ADP, un agoniste faible des plaquettes, est capable d'induire le changement morphologique, la sécrétion des granules dense et  $\alpha$  et l'agrégation. Par ailleurs, ce facteur peut aussi maintenir l'état activé des plaquettes adjacentes [3], [16].

### **2.3.3 Les lysosomes**

Les plaquettes possèdent des lysosomes primaires et secondaires qui sont des lysosomes actifs, se formant après intégration de l'élément à dégrader [17]. Ce sont des petits organites qui contiennent une grande variété d'enzymes de dégradation, comprenant notamment la cathepsine, la  $\beta$ -galactosidase, l'arylsulfatase, la  $\beta$ -glucuronidase, et les acides phosphatases participant à la dégradation de l'élément ingéré par phagocytose ou pinocytose des cellules eucaryotes [3]. Comme il n'y a pas d'évidence de ces processus dans les plaquettes, la présence et le rôle de leurs lysosomes secondaires sont principalement impliqués dans les phénomènes d'autophagie [17].

### **2.3.4 Les autres organites : les mitochondries, les peroxysomes et les granules T**

Les plaquettes possèdent d'autres organelles, parmi lesquels les mitochondries fournissant l'énergie nécessaire aux différentes activités plaquettaires et contenant un réservoir d'ADN plaquettaire (ADN mitochondriaux).

On note également la présence des peroxysomes contenant notamment l'enzyme catalase qui décompose l'excès du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et oxygène [3].

Récemment, un nouveau type granulaire (granule T) contenant le Toll-like receptor 9 (TLR-9) fonctionnel a été identifié [18], [19] confirmant le rôle complexe des plaquettes, entre l'hémostase et l'immunité.

Les plaquettes contiennent également dans leur cytoplasme des ARN pré-messagers issus des MK qui sont polyadénylés [20] et capables d'être traduits en protéines par le spliceosome constitutivement ou de façon dépendante des activateurs [20]–[22].

## **II) La physiologie plaquettaire et le rôle des plaquettes dans l'hémostase**

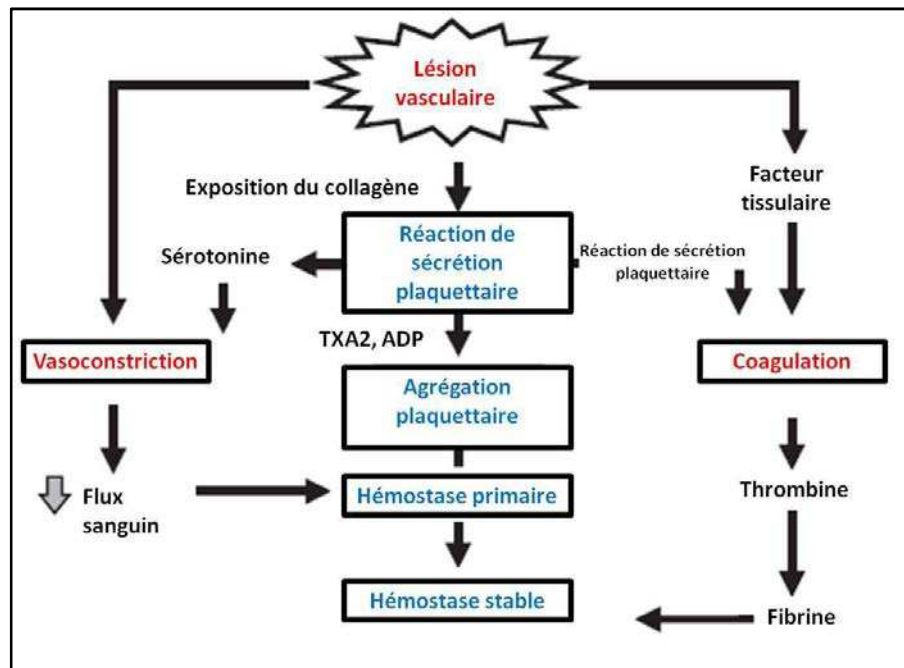
### **1. Généralité sur l'hémostase**

Cet aspect sera volontairement peu abordé dans le cadre de cette thèse qui s'intéresse majoritairement aux aspects inflammatoires des plaquettes.

L'hémostase concerne l'ensemble des mécanismes qui contribuent à arrêter les hémorragies et à empêcher les phénomènes de thrombose. On distingue classiquement trois phases qui sont initiées simultanément (Figure 3) : i) l'hémostase primaire qui conduit à la formation d'un thrombus constitué par un agrégat des plaquettes reliées entre elles par le Fg pour fermer la brèche vasculaire ; ii) la coagulation qui consolide ce premier thrombus en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges puis iii) la fibrinolyse qui permet la destruction des caillots, ou la limitation de leur extension [5].

L'hémostase primaire se décompose en fonction des étapes de la physiologie plaquettaire : i) l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium exposé ; ii) l'activation plaquettaire et le recrutement des autres plaquettes circulantes ; iii) l'agrégation des plaquettes. Ces événements impliquent un grand nombre de récepteurs plaquettaires [5].





**Figure 3 : Les phases de l'hémostase**

D'après [5]

## 2. L'adhésion plaquettaire

En cas de lésion vasculaire, les constituants du sous-endothélium comme le vWF, le collagène et le Fg sont exposés et ils entrent en contact direct avec leur récepteur spécifique exprimé à la surface des plaquettes circulantes (GPIb-IX-V, GPVI et GPIIb/IIIa respectivement), favorisant l'adhésion plaquettaire sur l'endothélium lésé.

Plusieurs récepteurs plaquettaire sont impliqués dans cette étape (Tableau 2). En présence de forces de cisaillement faibles, l'adhésion plaquettaire est principalement régulée par l'interaction entre le Fg et son récepteur – l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  (la GPIIb/IIIa). Mais lors que ces forces sont élevées, cette adhésion devient indépendante du récepteur GPIIb/IIIa et se fait par le complexe des glycoprotéines GPIb-IX-V qui se lie au vWF, lui-même lié au collagène du sous-endothélium [23].

Cette première interaction permet le ralentissement des plaquettes au niveau du flux sanguin et favorise les interactions d'autres types de récepteurs plaquettaire pour renforcer leur adhésion. Ainsi, l'interaction de la GPVI-FcR $\gamma$  avec le collagène va

déclencher un certain nombre de signaux intraplaquettaires permettant d'augmenter l'affinité des récepteurs pour leur ligand. En présence de forces de cisaillement faibles, le rôle de GPVI est primordial, mais cette interaction est soutenue par les intégrines de type  $\alpha 2\beta 1$  [24].

### **3. L'activation plaquettaire**

Le processus d'activation plaquettaire est enclenché après une adhésion stabilisée au niveau de la lésion vasculaire. Cette activation est caractérisée par 4 événements : le changement morphologique, biochimique, l'activation du récepteur GPIIb/IIIa et la libération du contenu des granules plaquettaires.

#### **3.1. Les récepteurs d'activation, leurs agonistes solubles et les voies de signalisation intraplaquettaire impliquées dans l'activation plaquettaire**

##### **3.1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG)**

Les protéines G sont constituées de trois sous unités  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . Les différentes sous unités  $G\alpha$  exprimées par les plaquettes sont  $G\alpha_s$ ,  $q$ ,  $12/13$ ,  $z$  et  $i2/3$ . Les récepteurs plaquettaires de la thrombine, de l'ADP/ATP, du thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) et des certaines CH (par exemple CXCR4) sont RCPG [25].

##### **Les récepteurs à la thrombine**

La thrombine générée à partir de l'activation du facteur tissulaire plasmatique sur la surface des plaquettes est capable de catalyser le Fg en fibrine, protéine indispensable pour stabiliser l'agrégat plaquettaire. La thrombine est un des activateurs puissants des plaquettes et le principal effecteur de protéase du système de la coagulation. Quand la thrombine engage ces récepteurs, une protéase hydrolyse l'extrémité N-terminale de ces récepteurs entraînant un changement de conformation et faisant apparaître une nouvelle extrémité responsable de l'activation plaquettaire. Les récepteurs de la thrombine sont donc appelés PAR « protease-activated receptor » [26]. Les plaquettes humaines

expriment les récepteurs PAR1 et PAR4. Ces PAR sont couplés aux protéines G $\alpha$  q, 12/13 et i, [26], [27] mais leur signalisation, après l'engagement, est différente. Ces deux récepteurs sont essentiels dans la physiologie plaquettaire et sont activés de façon indépendante. Le peptide spécifique de la thrombine, le SFLRN (ou TRAP - Thrombin receptor activating peptide) - est capable d'activer le PAR1 alors que le peptide GYPGKF active le PAR4 [27]. Il a été démontré aussi que le PAR1 est sensible à de faibles concentrations de thrombine alors que PAR4 nécessite de fortes doses de ligand [26].

### **Les récepteurs à l'ADP et au TxA2**

L'ADP et le TxA2 dont l'action est autocrine et paracrine fonctionnent comme des médiateurs de « feedback positif » au cours de l'activation plaquettaire afin de maintenir cette activation. L'ADP est stocké en grande quantité dans les granules denses et libéré après activation plaquettaire. Les récepteurs de l'ADP : le P2Y1 et le P2Y12, dont la présence est requise pour une activation plaquettaire complète par l'ADP, sont couplés respectivement aux protéines G $\alpha$  q et G $\alpha$  i2 [28]. Le récepteur P2Y12 est responsable de la plupart des effets potentialisateurs de l'ADP [29] et le P2Y1 a un rôle particulier dans le réarrangement du cytosquelette et le changement de forme des plaquettes [30]. Le TxA2 est un dérivé de l'acide arachidonique. Les RCPG, les récepteurs du TxA2 (TP)  $\alpha$  et  $\beta$  (couplés aux G q et G12/G13) sont activés par les prostaglandines (PG) : PGG2 et PGH2. Cette activation est restreinte au niveau local en raison de sa courte demi-vie [25].

Les plaquettes possèdent plusieurs autres RCPG pour les CH qui sont des activateurs plaquettaires faibles comme les CCR1, CCR2, CX3CR1 récepteurs respectivement du RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) et fractalkine [25].

### **La signalisation induite par les RCPG**

Après la liaison des agonistes sur leur RCPG, les sous unités des protéines G correspondantes seront activées, induisant des signalisations intraplaquettaires différentes. La sous unité G $\alpha$  q active les iso-formes  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 de la phospholipase C (PLC)

intraplaquettaires. L'activation de la PLC  $\beta$  conduit à la formation d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et de 1,2-diacylglycérol (DAG) qui seront responsables respectivement de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et de l'activation de la protéine kinase C (PKC) [31], [32]. Le  $\text{Ca}^{2+}$  et la PKC activent la protéine CalDAG-GEFI, qui stimule la GTPase Rap1B impliquée dans l'activation de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  [33].

La sous-unité G13 activée sous-groupe de Rho GEF (Rho specific guanine nucleotide exchange factors) inhibe l'activité de la phosphatase des chaînes légères de la myosine ce qui provoque une accumulation de chaînes légères de myosine phosphorylées induisant le changement de forme des plaquettes après activation [34].

La signalisation induite par les RPCG au niveau de la sous-unité Gi, et notamment les sous-unités respectivement appelées  $\beta$ ,  $\gamma$  est capable de réguler négativement l'activité de l'adénylate cyclase et d'activer la PI3k (Phosphoinositide 3-kinase) qui produit le  $\text{PIP}_3$  (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate), lui-même activateur des effecteurs Akt, PKB et de Rap1 [35]. Il a été démontré que la PI3k régule également l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  plaquettaire [36]. Deux voies de signalisation seraient donc impliquées dans l'activation de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (signalisation inside-out) : i) la sous-unité  $\text{G}\alpha_q$ , mobilisant la PLC  $\beta$ , DAG et  $\text{Ca}^{2+}$ , et ii) la sous-unité  $\text{G}\alpha_i$  mobilisant la PI3k. Ces deux voies de signalisation convergent vers l'activation de la protéine Rap1 et le changement morphologique tout comme la dégranulation plaquettaire.

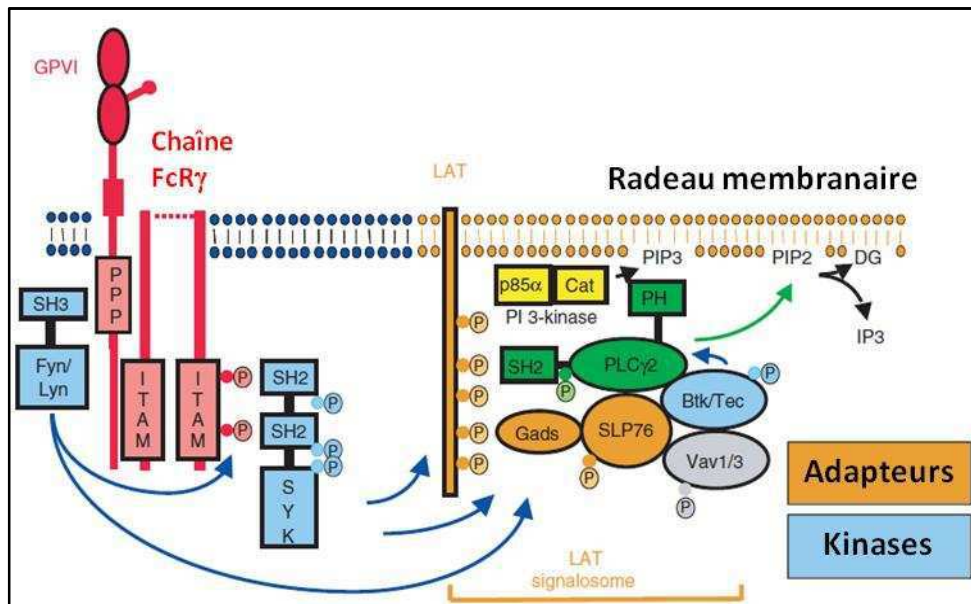
### **3.1.2 Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK)**

Les RTK possèdent des résidus tyrosines dans leur domaine ITAM/ITIM (immunoreceptor tyrosine-based activatory/inhibitor motifs) qui sont phosphorylés une fois que les récepteurs sont activés, induisant les activités activatrices (ITAM) ou inhibitrices (ITIM). Le GPVI-FcR $\gamma$  et le complexe GPIb-IX-V sont des récepteurs RTK également [37].

Le récepteur plaquettaire majeur du collagène est la GPVI, qui s'associe avec le récepteur FcR $\gamma$  contenant deux sites ITAM (Figure 4) dont la phosphorylation par le Src, Lyn et Fyn conduit à la cascade de recrutement et de phosphorylation du SYK, puis des protéines adaptatrices de type LAT et de la PLC $\gamma$ 2. LAT est associée directement à la PI3k.

Ce complexe permet le recrutement de la PIP<sub>3</sub> qui se lie au domaine PH de la PLC $\gamma$ 2 phosphorylée favorisant son association avec la membrane [37]. Cette cascade de signalisation permet la libération des molécules de message secondaire tel que le DAG et l'IP<sub>3</sub> dans les plaquettes, initialisant l'activation plaquettaire. L'IP<sub>3</sub> favorise la sécrétion du Ca<sup>2+</sup> à partir du système tubulaire et le DAG active la PKC puis le Rap1b conduisant à l'activation de la GPIIb/IIIa (signalisation inside-out) [38] (Figure 6).

Les domaines ITAM peuvent être régulés par les signalisations inhibitrices des protéines contenant les domaines ITIM comme le PECAM-1. La phosphorylation de la tyrosine des motifs ITAM conduit au recrutement des SHP1 et SHP2 induisant la déphosphorylation des principales protéines ITAM.



**Figure 4 : Cascade de signalisation de GPVI**

D'après [38]

### 3.1.3 Les récepteurs de type intégrine

Les intégrines appartiennent à une famille de récepteurs hétérodimériques transmembranaires dont l'expression est ubiquitaire. Les intégrines plaquettares sont constituées de la sous unité  $\beta$ 1 ou  $\beta$ 3 avec une sous unité  $\alpha$ . On peut identifier l' $\alpha$ 2 $\beta$ 1

(récepteur du collagène), l' $\alpha 5\beta 1$  (récepteur du fibronectine (Fn)), l' $\alpha 6\beta 1$  (récepteur de la laminine), l' $\alpha IIb\beta 3$  (récepteur de la Fg, vWF...) et l' $\alpha v\beta 3$  (récepteur de la vitronectine) [39]. En quantité abondante au niveau de la membrane plaquettaire, l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$ , une fois activée, joue un rôle indispensable à l'homéostasie et lors de l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire.

Après activation plaquettaire des récepteurs (RTK ou RCPG) par leurs ligands solubles respectifs, on observe un ensemble de signalisations intracellulaires (voir la signalisation induite par les RCPG présentée ci-dessus) (Figure 6) conduisant à l'activation – dans un second temps - des intégrines, et notamment l' $\alpha IIb\beta 3$  caractérisant la voie « inside-out » (Figure 5A) [33], [36]. Cette activation entraîne un changement de conformation des récepteurs membranaires qui favorise leur affinité avec les ligands (le Fg et le vWF) et déclenche une signalisation « outside-in » (Figure 5B), responsable de la deuxième vague d'activation plaquettaire de manière irréversible [40] et notamment la libération du contenu des granules dont la plupart réagissent comme des médiateurs de « feedback positive » pour amplifier les réponses plaquettaires.

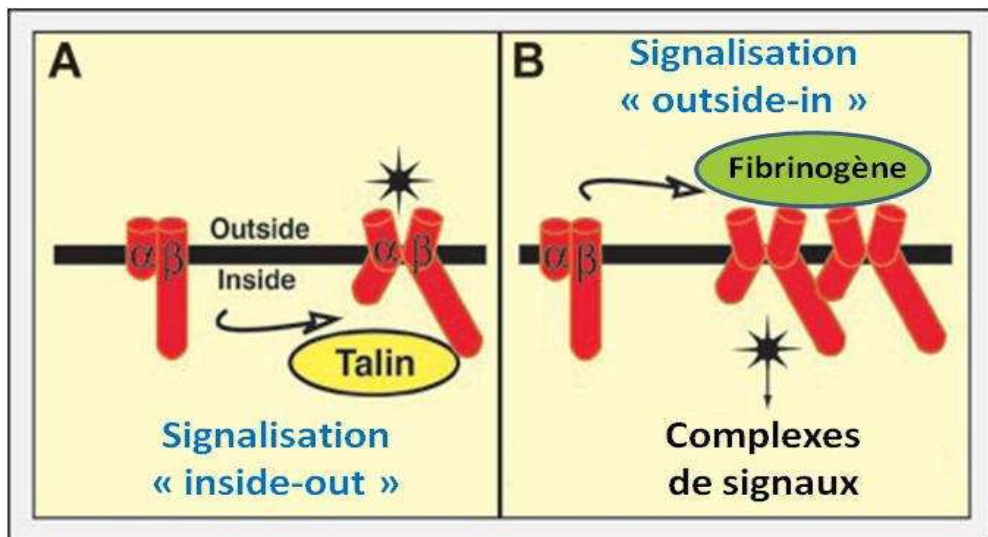


Figure 5 : Signalisation de l'intégrine GPIIb/IIIa

D'après [40]

L'activation plaquettaire fait intervenir plusieurs récepteurs et voies de signalisations entraînant des modifications biochimiques comme l'augmentation du taux  $Ca^{2+}$  intracellulaire, la diminution du taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la libération de l'acide arachidonique, des changements morphologiques ainsi que la sécrétion du contenu des granules denses et  $\alpha$  et la formation des agrégats plaquettaires (synthétisée dans le Figure 6 et le Tableau 2).

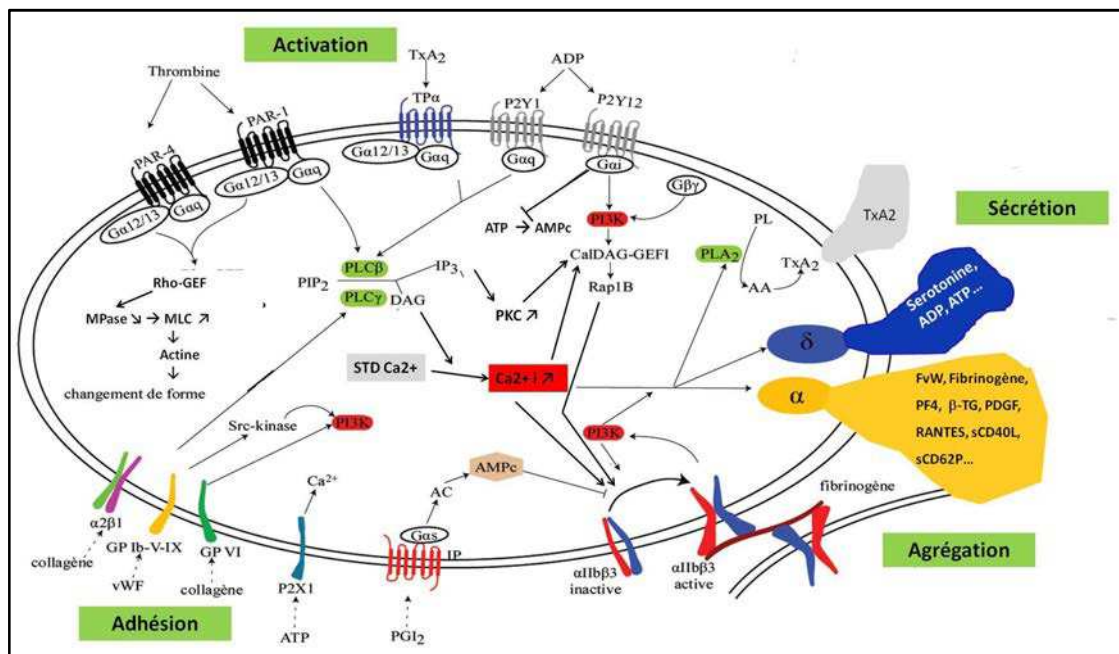


Figure 6 : Signalisations engagées au cours d'activation des plaquettes

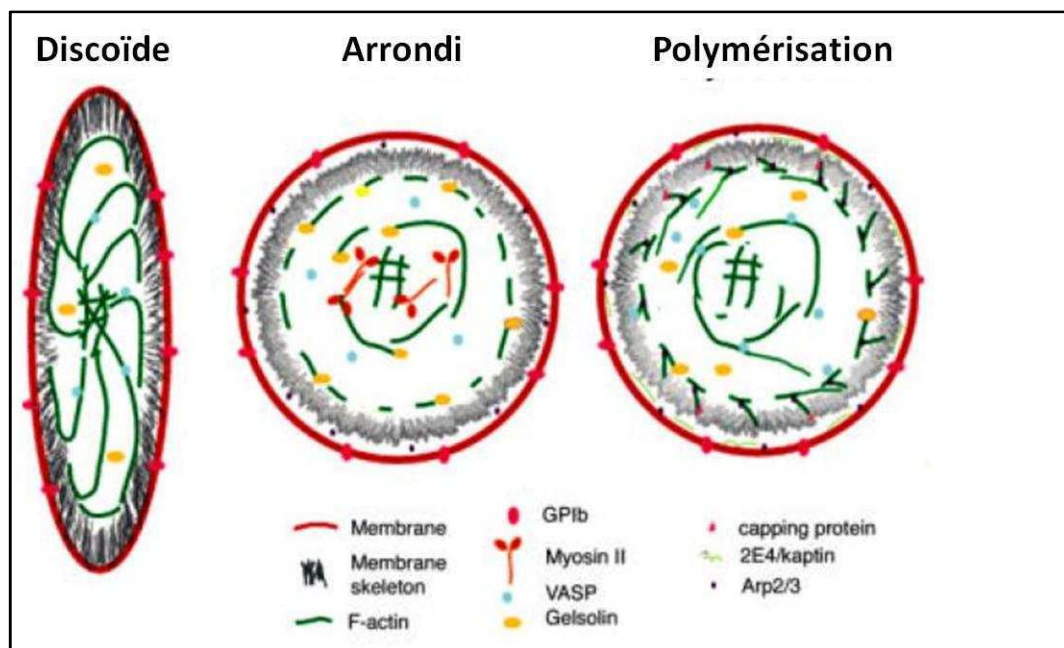
D'après [25], [41]

STD : système tubulaire dense

### 3.2. Changement morphologique

Lors de l'activation, les plaquettes discoïdes au repos sont capables de se transformer rapidement en prenant une forme sphérique (arrondie) avec émission des filopodes ou des lamellipodes, avant la phase d'étalement et finalement la contraction [2] (Figure 7). Ces changements morphologiques sont associés avec une fusion de la membrane des granules avec la membrane plasmique ou avec l'OCS conduisant à la sécrétion plaquettaire.

Ces modifications sont dues aux réarrangements du cytosquelette qui dépendent de la réorganisation des filaments d'actine qui se fait en 2 étapes [42]. Lors de la première étape (désassemblage et contraction), le réseau d'actine préexistant sous la membrane plasmique se rompt, la connexion entre ce réseau et la membrane squelettique est dissociée entraînant des altérations chimiques des protéines liées aux filaments d'actine comme des phénomènes i) de phosphorylation (par exemple de VSAP - vasoactive – stimulated phosphoprotein), ii) de déphosphorylation (par exemple de la cofidine/ADF - actin depolymerizing factor) et iii) de protéolyse (par exemple de spectrine). De plus, dans ces conditions on observe, une forte mobilisation des molécules,  $Ca^{2+}$  et  $PIP_2$  (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). La deuxième étape correspond au réassemblage de filaments d'actine pour la formation des filopodes et des lamellipodes, ainsi que les fibres de stress et les anneaux contractiles (Figure 7).



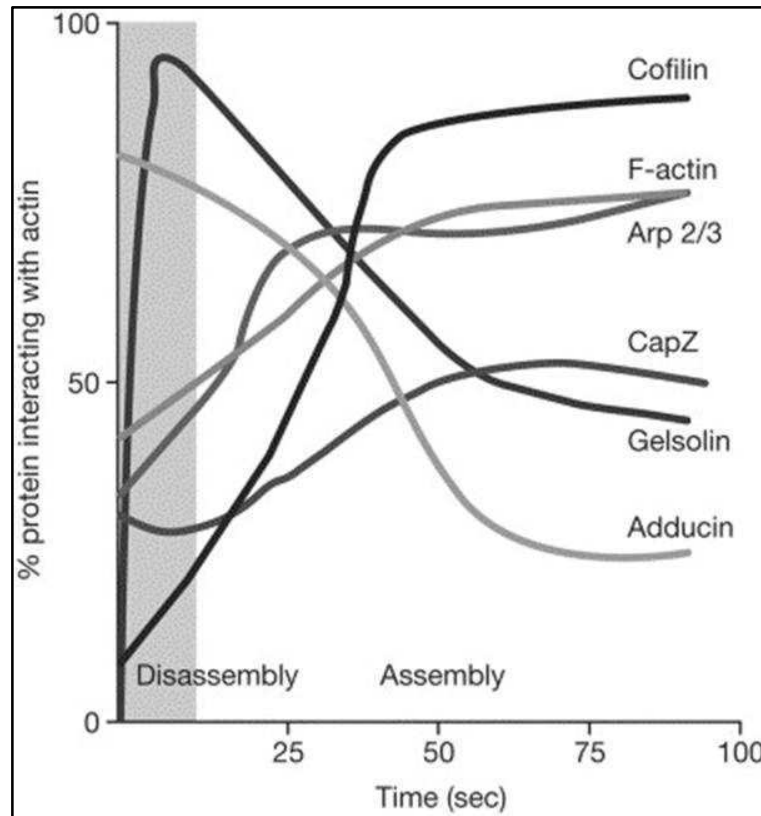
**Figure 7 : Réorganisation de l'actine dans l'adhésion et l'activation plaquettaire**

D'après [42]

La dynamique de la formation/déformation du réseau d'actine lors du changement morphologique des plaquettes est régulée par un grand nombre des protéines liées à



l'actine notamment le gelsoline et l'Arp 2/3 (Actin related protein 2/3) (Figure 8) et cette dynamique joue un rôle important dans la signalisation des intégrines et l'adhésion des plaquettes [42].



**Figure 8 : Régulation du changement morphologique des plaquettes par les protéines liées à l'actine**

D'après [2]

### 3.3. La sécrétion plaquettaire

Les plaquettes libèrent leurs facteurs solubles contenus dans toutes les organelles de façon chronologique. Sont libérées, tout d'abord les molécules contenues dans les granules  $\alpha$ , puis celles des granules denses et enfin celles des lysosomes dont le mécanisme est décrit précédemment (voir le paragraphe A.I.2.3.1). Le rôle des facteurs solubles plaquettaire, notamment lors de l'inflammation, est détaillé dans le paragraphe A.III.2.

#### 4. L'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est le processus au cours duquel, les plaquettes adhèrent les unes sur les autres aux sites de lésion vasculaire formant le clou plaquettaire. Ce processus est déclenché transitoirement pendant la première activation plaquettaire ensuite amplifiée par la fixation du Fg sur son récepteur  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  activé [41]. La signalisation « inside-out » conduit au changement conformationnel des intégrines augmentant sa concentration au niveau membranaire et son affinité avec les ligands solubles particulièrement le Fg. Ce ligand devient donc un substrat adhésif pour engager les autres plaquettes adjacentes aux agrégats. Par ailleurs, l'interaction de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  – Fg stabilise l'agrégation grâce à la signalisation « outside-in » et la formation de la fibrine ancre les agrégats plaquettaires à la paroi du vaisseau. Lors de contraintes de cisaillement élevé, l'agrégation est plus dépendante de l'interaction du vWF/ Fn qu'avec les intégrines  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  [23].

Phase de réponse	Ligands	Récepteurs	Voie de signalisation
Adhésion	vWf	GP Ib-IX-V	PI3K
	Collagène	Intégrine $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ , GP VIFcRy	PI3K, PLC $\gamma$
	Fg, fibrine (Fn)	Intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	
	Fibronectine (fn)	Intégrine $\alpha\text{5}\beta\text{1}$	
	Laminine	Intégrine $\alpha\text{6}\beta\text{1}$	
	Thrombospondine	CD36	
Activation	Thrombine	PAR1, PAR4	Gq, G12/13, PLC $\beta$
	ADP	P2Y1, P2Y12	Gq, Gi, Rho, PLC $\beta$
	TxA2	TP $\alpha$ , TP $\beta$	Gq, G12/13, PLC $\beta$
	Adrénaline	$\alpha\text{2A}$	Gz
	Sérotonine	5-HT2A	Gq
Agrégation	Fg, fn, vWf	Intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activée	PI3K, PLC $\gamma$
	vWf	GP Ib-IX-V	PI3K
Stabilisation/Rétraction	P-sélectine	GP Ib-IX-V	
	CD40L	Intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	
	Fn	Intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	

**Tableau 2 : Rôle de l'interaction des récepteurs plaquettaires avec leurs ligands solubles et les voies de signalisations dans les réponses plaquettaires**

D'après [41]

### III) Les fonctions des plaquettes dans le système immunitaire

En plus de leurs fonctions cruciales en hémostase, les plaquettes sont considérées comme des cellules immunes. En effet, ces cellules expriment des récepteurs étant capables de détecter des pathogènes et de sécréter plusieurs molécules inflammatoires et/ou immunomodulatrices qui peuvent interagir avec les autres cellules immunes (ou non immunes comme les cellules endothéliales – EC) de l'environnement et moduler les réponses cellulaires de l'immunité innée ainsi qu'adaptative [43].

#### 1. Récepteurs immunitaires plaquettaires

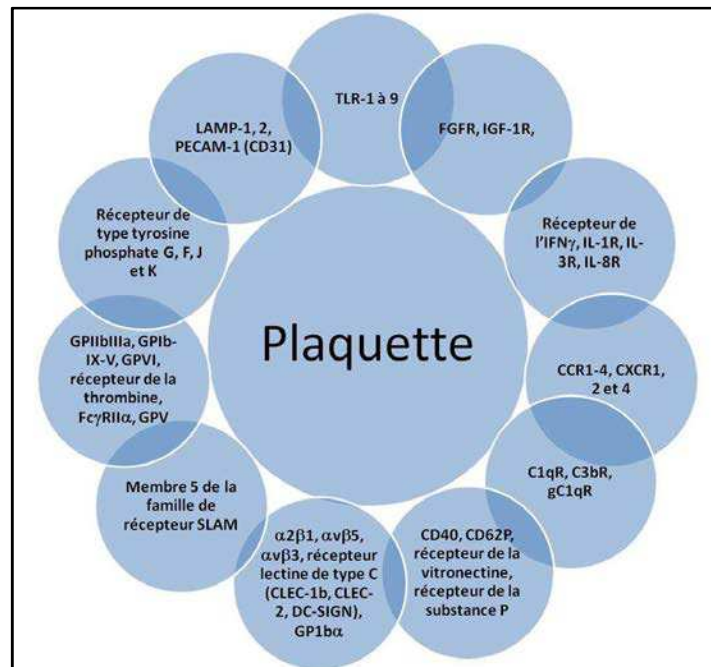
##### 1.1. Les récepteurs d'immunité innée

Parmi ces récepteurs, on note les PRR décrits dans le paragraphe B.1.2. En ce sens, les plaquettes expriment les TLR (TLR-1 à 9) (Figure 9) qui sont fonctionnels [43], [44]. Ces récepteurs ont la capacité de distinguer des PAMP et d'induire une réponse plaquettaire différentielle au terme de libération de facteurs solubles après phosphorylation des molécules associées au NF- $\kappa$ B (voir le paragraphe B.1.2.1). Par ailleurs, les plaquettes expriment aussi les récepteurs aux molécules du complément (comme le gC1q-R) et les récepteurs pour les Ig (FcR - récepteurs pour la portion Fc dont la plus étudiée au niveau plaquettaire est le Fc $\gamma$ R1a) ; ces récepteurs jouent un rôle important dans l'agrégation plaquettaire induite notamment par les bactéries comme *S. sanguinis*, *S. gordonii*, and *S. pneumoniae* [45]. Enfin, récemment, Haselmayer *et al* [46] ont montré que les plaquettes expriment le TREM1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1) dont l'interaction avec son ligand exprimé sur les neutrophiles augmente l'activation de ces cellules et module la réponse inflammatoire (en augmentant la sécrétion de l'IL-8 et la production de ROS – reactive oxygen species).

##### 1.2. Les récepteurs des cytokines et chimiokines

Les plaquettes expriment un grand nombre des récepteurs pour les CK/CH (Figure 9) [13]. L'engagement de ces récepteurs par leur ligand respectif induit les signalisations de l'activation et l'agrégation des plaquettes [47]. *In vivo*, on observe une augmentation

significative de l'expression plaquettaire de récepteurs de certaines CK/CH pro-inflammatoires comme l'IL-1R et l'IL-8R dans les maladies inflammatoires intestinales suggérant un rôle inflammatoire des plaquettes sanguines [48]. De plus, les plaquettes expriment les récepteurs de plusieurs CK/CH et elles libèrent également les ligands de ces récepteurs après leur activation. C'est le cas notamment des récepteurs de type CCR1 et CCR3 capable de se lier avec le RANTES, un facteur soluble sécrété par les plaquettes [47]. Cette interaction CH-récepteur auto-entretient le rôle inflammatoire des plaquettes ainsi que les plaquettes adjacentes montrent leur capacité potentielle d'établir des boucles autocrines et paracrines bidirectionnelles.



**Figure 9 : Récepteurs plaquettaires jouant un rôle dans les processus immunitaires (liste non exhaustive)**

D'après [13], [14], [43], [49], [50]

### **1.3. Les récepteurs d'hémostase impliqués dans la fonction immunitaire**

Les bactéries expriment plusieurs protéines capables d'interagir avec les récepteurs de surface membranaire des plaquettes notamment via les glycoprotéines : GPIIb/IIIa,

GPIb et FcγIIa, ce qui conduit à l'adhésion et/ou l'activation plaquettaire. Cette interaction est classée en deux types : i) la liaison directe entre les protéines des pathogènes et les plaquettes et ii) la liaison indirecte effectuée par une molécule intermédiaire dans le plasma comme des ligands tels que le Fg ou la Fn pour le GPIIb/IIIa ou le vWF pour le GPIb [45]. Les récepteurs plaquettaire, les protéines bactériennes et les molécules plasmatiques participant à cette interaction sont présentés dans le Tableau 3.

Récepteur plaquettaire	Bactérie	Protéine bactérienne	Protéine de pontage
GPIIbIIIa	<i>S. epidermidis</i>	SdrG	Fg
	<i>S. aureus</i>	FnbpA/B	Fg
	<i>S. aureus</i>	FnbpA/B	Fg
	<i>S. aureus</i>	ClfA	Fg
	<i>S. aureus</i>	ClfA	Fg
	<i>S. aureus</i>	IsdB	Direct
	<i>S. pyogenes</i>	M1	Fg
	<i>S. gordonii</i>	PadA	Direct
	<i>S. lugdunensis</i>	Fbl	Fg
GPIba	<i>S. sanguis</i>	SrpA	Direct
	<i>S. gordonii</i>	GspB/Hsa	Direct
	<i>S. aureus</i>	Protéine A	vWF
	<i>Helicobacter pylori</i>	?	vWF
FcγRIIa	<i>S. aureus</i>	FnbpA/B	IgG
	<i>S. aureus</i>	ClfA	IgG
TLR-2	<i>S. pneumoniae</i>	?	Direct
	?	Lipoprotéine	Direct
TLR-4	<i>Escherichia coli</i>	LPS	Direct
gC1q-R	<i>S. sanguinis</i>	?	C1

**Tableau 3 : Interaction entre les bactéries et les récepteurs de type d'hémostase plaquettaire**

D'après [45]

## 2. Facteurs solubles plaquettaires

Les plaquettes sanguines sont des réservoirs importants des médiateurs solubles (les CK/CH, les facteurs immunomodulateurs et hémostatiques) qui sont présents dans les granules sécrétoires, en particulier les granules α, les granules denses et les lysosomes, qui sont libérés lors de leur activation [3], [13], [43].

## 2.1. Les cytokines et chimiokines plaquettaires

Les plaquettes contiennent une grande variété de CK/CH qui sont synthétisés principalement dans les MK et stockée dans les granules  $\alpha$  dans la plupart des cas (Tableau 4).

Molécule	Location sur les plaquettes Mécanisme de sécrétion	Etat d'activation	Fonction	Cibles
Histamine	Synthèse et location inconnues Sécrétion lors de l'activation	Préformé	↑ l'allergie type hypersensibilités	EC, Mo, PMNC, NK LyB, LyT, Eo
Sérotinine	Granule dense Sécrétion lors de l'activation	Préformé	Sur SNC: ↑coagulation et activation des cellules T	Mo, Mac, Plt
TXA2	Membrane plasmique	Synthétisé	↑ inflammation et coagulation	Plt, Mac, LyT
PAF	Membrane plasmique	Synthétisé	↑ inflammation	Plt, PMNC, Mo, Mac
PDGF	Granule $\alpha$ Sécrétion lors de l'activation	Préformé	↑ cicatrisation des plaies	Mo, Mac, LyT
TGF- $\beta$	Granule $\alpha$ Sécrétion lors de l'activation	Préformé	Inhibition de croissance Immunosuppression	Mo, Mac, LyB, LyT cDC, pDC, NK
CXCL7 (NAP-2)	Inconnu	Clivage du produit de précurseur préformé	Chemokine	PMNC
CXCL4 (PF4)	Granule $\alpha$ Sécrétion lors de l'activation	Préformé	Chemokine	PMNC, Plt
CXCL1 (Gro- $\alpha$ )	Granule $\alpha$ Sécrétion lors de l'activation	Préformé	Chemokine	PMNC
CXCL5 (ENA-78)	Granule $\alpha$ Sécrétion lors de l'activation	Préformé	Chemokine	PMNC
CCL5 (RANTES)	Granule $\alpha$ Sécrétion lors de l'activation	Préformé	Chemokine	Mo, Eo, Ba, LyT NK, DC, Plt
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	Granule $\alpha$ Sécrétion lors de l'activation	Préformé	Chemokine	Mo, Eo, Ba NK, DC
CCL7 (MCP-3)	Inconnu	Préformé	Chemokine	Mo, Ba, NK, DC
IL-1 $\beta$	Inconnu	Synthétisé	Activation des cellules T Multiple effects	Mo, Mac DC, LyT
HMGB1	Inconnu	Préformé	Regulation de la gène inflammatoire	Mac, PMNC EC
Thrombocidine 1 et 2	Granule $\alpha$ Sécrétion lors de l'activation	Préformé	Peptides antibactériales	Bactéries
CD40	Membrane plasmique	Préformé	Multiples effects	LyT
CD154	Granule $\alpha$ et membrane plasmique relarguage et clivage	Préformé	Co stimulation Interaction avec l'endothélium	LyB, DC, Mac Mo, EC
TLR-1, 2, 3, 5, 6 et 7	Membrane plasmique	Préformé	Détection des pathogènes	PMNC, DC, Mac, Mo, Plt
TLR-4	Membrane plasmique	Préformé	Détection des pathogènes	PMNC, DC, Mac, Mo
TLR-9	Site intérieure inconnu augmenter sur membrane plasmique lors de l'activation	Préformé	Détection des pathogènes	PMNC, DC, Mac, Mo
TREM1 ligand	Membrane plasmique Expression augmentée lors de l'activation	Préformé	Détection des pathogènes	PMNC, DC, Mac, Mo

**Tableau 4 : Molécules plaquettaires ayant fonctions immunes**

D'après [43], [51], [52]

*PMNC : Cellules polymorphonucléaires, Eo : Eosinophiles, Ba : Basophiles, Mo : Monocytes, Mac : Macrophages, Plt : Plaquettes, DC : Cellules dendritiques (cDC, pDC : DC conventionnelles, plasmacytoïdes respectivement), NK : Cellules naturel killer, EC : Cellules endothéliales*

Ces CK/CH peuvent interagir directement avec les cellules du système d'immunité innée et adaptative (Tableau 4) ou indirectement par des cellules relais immunes ou non, comme les cellules endothéliales. Les CK/CH plaquettaires contribuent à réguler les cellules environnantes et notamment leur prolifération, différenciation et activation [43]. De manière intéressante, les plaquettes expriment aussi les récepteurs de plusieurs CK/CH qu'elles sécrètent (voir le paragraphe A.III.1.2), montrant leur capacité potentielle d'établir des boucles autocrines et paracrines bidirectionnelles.

## 2.2. Les facteurs immunomodulateurs

Parmi les facteurs d'immunomodulateurs plaquettaires, on trouve des facteurs de croissance, des CK/CH, mais encore des molécules partageant les principales caractéristiques des CK et des CH comme le sCD40L/CD154, la P-sélectine/CD62P soluble, le PDGF-AB, le TGF- $\beta$ , l'IL-1 $\beta$ , le RANTES et le PF4.

Parmi ces facteurs, le sCD40L joue un rôle central dans les réponses immunitaires [55]. Les plaquettes sécrètent 95% du sCD40L circulant dont le clivage membranaire se fait en 2 phases (voir revue dans la partie D) [53]. L'interaction du sCD40L et son récepteur de type CD40 exprimé sur les cellules immunitaires ou non, comme les cellules endothéliales, peut moduler leurs réponses cellulaires [54]. Effectivement, le sCD40L plaquettaire en interagissant avec le CD40 des cellules endothéliales induit des réponses inflammatoires caractérisées par l'expression des récepteurs d'adhérence : E-sélectine, P-sélectine, ICAM-1, VCAM-1 ; la libération des CK/CH pro-inflammatoires (CCL2, IL6, IL8) et le recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires [53]. L'engagement, *in vitro*, du CD40 des neutrophiles par le sCD40L induit la génération des ROS et la destruction des cellules endothéliales pulmonaires suggérant un rôle de ce facteur dans les TRALI (Transfusion-related acute lung injury) [55]. Par ailleurs, le sCD40L plaquettaire crée un lien entre l'immunité innée et adaptative en favorisant la maturation [56], l'activation [57], la sécrétion [58] et la présentation des antigènes des DC –cellule capable d'activer les cellules T naïves pour induire une réponse immunitaire adaptative effective [54]. Elzey *et al* ont démontré que le sCD40L des plaquettes est capable, *in vitro* et *in vivo*, d'amplifier les activités des LyT CD8<sup>+</sup> spécifiques au pathogène, se traduisant par la production de IFN- $\gamma$  (Interféron gamma) et la fonction lytique [59]. Physiologiquement,

Iannacone *et al* montrent que le nombre de LyT cytotoxiques au cours de l'infection au virus *choriomeningitis* lymphocytaires (VCML) est réduit critiqueusement à cause d'une thrombopénie sévère (plus de 98% des plaquettes sont déplétées à cause de l'infection à ce virus) [60].

Le couple CD40/CD40L, joue un rôle majeur dans l'interaction des LyT CD4<sup>+</sup> et les LyB, participant à la prolifération, la différenciation et la production d'Ig par les plasmocytes. Le sCD40L, dont les plaquettes sont des pourvoyeurs majeurs, est donc une molécule clé, ayant un rôle de chef d'orchestre du système immunitaire.

### **2.3. Les autres facteurs**

Les plaquettes libèrent également i) des facteurs de croissance favorisant l'angiogenèse, qui sont également nécessaires dans la réparation des lésions aux sites inflammatoires, ii) des facteurs coagulants – requis pour les fonctions hémostatiques plaquettaires, iii) des peptides antibactériens, iv) des facteurs d'adhérence (Tableau 1), v) des médiateurs inflammatoires comme la sérotonine et l'histamine.

## **3. L'interaction des plaquettes avec les cellules immunitaires**

Les plaquettes sont capables d'interagir plusieurs types de cellules immunitaires de façon directe (contact membrane/membrane) ou par l'intermédiaire de facteurs solubles. Nous détaillerons 3 interactions majeures : plaquettes – lymphocytes, plaquettes – DC et plaquettes – PMNC (notamment les neutrophiles).

### **3.1. Interactions : plaquettes – PMNC**

Les PMNC notamment les neutrophiles jouent un rôle important dans l'immunité innée [61]. L'interaction des plaquettes et des neutrophiles implique 3 mécanismes i) l'interaction des facteurs solubles et des molécules membranaires plaquettaires avec leurs récepteurs exprimés par les neutrophiles ; ii) l'interaction des CK/CH sécrétés par des neutrophiles activés et les récepteurs plaquettaires correspondants et iii) le rôle des plaquettes activées dans la formation des NET (Neutrophil Extracellular Traps) [61], [62].



Ainsi, les plaquettes sécrètent des CH comme des CXC (i.e. le CXCL1 (Gro- $\alpha$ )/CXCL5 (ENA-78)) qui sont capables d'interagir avec leurs récepteurs (CXCR) exprimés sur les neutrophiles (i.e. CXCR2), caractérisant les effets chimio-attractants des neutrophiles aux sites inflammatoires [49]. L'interaction des plaquettes et des neutrophiles notamment lors du phénomène de « rolling » met en jeu le couple P-sélectine plaquettaire et son ligand, PSGL-1 exprimé sur les neutrophiles [61]. De plus, après leur adhésion sur les plaquettes, les neutrophiles sont activés par les CH CXC plaquettaires comme le CXCL4 (PF4) et CXCL7 (NAP-2) [63]. Ces CH CXC sont également capables de moduler la phagocytose des neutrophiles [63]. Les plaquettes sécrètent aussi les autres facteurs immunomodulateurs comme le sCD40L (voir le paragraphe A.III.2.2) et le ligand pour le récepteur TREM1 des neutrophiles [46] qui sont capables de moduler les réponses inflammatoires des neutrophiles et promouvoir l'immunité innée.

Réciproquement, les neutrophiles activés, sécrètent des CH/CK comme l'IL-8 ou le MIP-1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein 1 alpha) qui interagissent avec les récepteurs plaquettaires CCR1 et CCR5/1 amplifiant les réponses plaquettaires : activation, agrégation et sécrétion de leurs granules (effet bidirectionnel) [61].

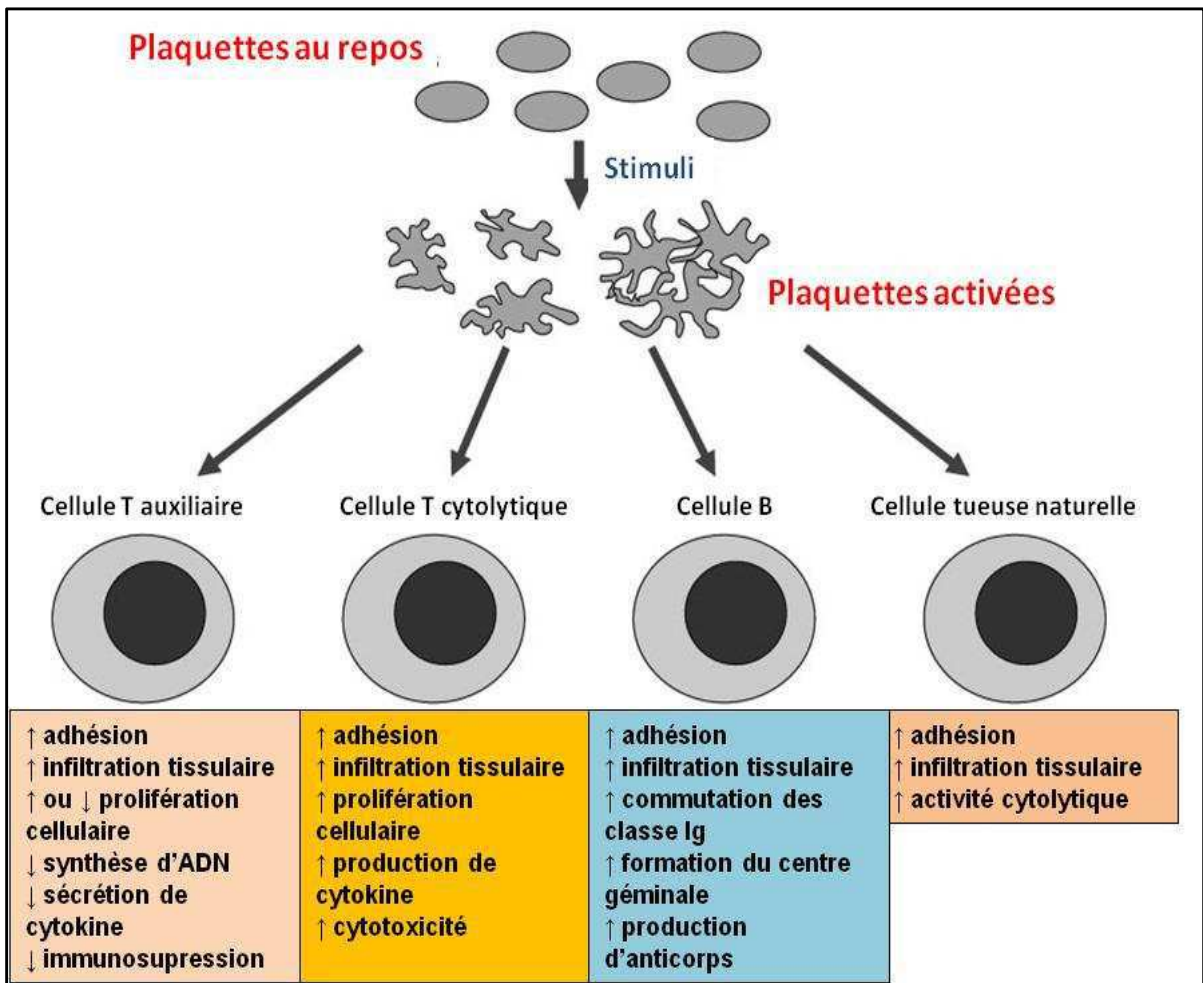
Au cours du sepsis, les plaquettes activées par les pathogènes infectieux semblent notamment responsables de la production de NET, réseau d'ADN et d'histones que les neutrophiles libèrent afin de capturer les bactéries [64].

### **3.2. Interactions : plaquettes – DC**

Les DC sont des cellules sentinelles du système immunitaire, qui permettent notamment de faire le lien entre l'immunité innée et adaptative et présentatrice d'antigènes. Les plaquettes sont capables d'interagir avec les DC par l'intermédiaire du couple CD62P plaquettaire et CD162 des DC [56], mais également en mobilisant les molécules du couple CD40/CD40L (voir le paragraphe A.III.2.2). Aussi, la maturation, l'activation et la sécrétion de CK/CH par les DC ne sont pas observées après un contact direct avec les plaquettes [56] ; cependant, un contact indirect des plaquettes et des DC favorise cette activation, qui est en partie due à la libération de facteur soluble plaquettaire de nature nucléotidique.

### 3.3. Interactions : plaquettes – lymphocytes

L'interaction multiple et réciproque entre les plaquettes et les lymphocytes est un élément central qui place les plaquettes comme des éléments majeurs dans la régulation du système immunitaire (Figure 10) [65]. L'interaction des plaquettes et les lymphocytes participent aux phénomènes d'adhésion, de migration, de « homing » et régulent la réponse de toutes les sous-populations lymphocytaire (phénomènes synthétisés dans la Figure 10) [65]. Réciproquement, les LyT CD3<sup>+</sup> sont capables d'activer les plaquettes par interaction mettant en jeu le couple CD40L-CD40, conduisant à la sécrétion des CK/CH plaquettaire qui, à son tour, recrute les LyT (*i.e* RANTES) et régule les fonctions lymphocytaires (*i.e* PF4) [66]. Le PF4 semble intéressant, car son action est différentielle en fonction de la population de LyT ciblés. Le PF4 inhibe la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (LyT, non-T reg), cependant il augmente la prolifération des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (LyT reg), mais en faisant perdre la capacité d'inhibition de la prolifération lymphocytaire des LyT reg [67].



**Figure 10 : Les effets des plaquettes sur les sous-populations lymphocytaires**

D'après [65]

L'activation et la réponse des LyT (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) ainsi que l'activation et la différenciation des LyB, la commutation des classes des Ig et la production des anticorps des plasmocytes sont modulées la mise en jeu du couple CD40/CD40L et notamment le sCD40L plaquettaire [54] (partie A.III.2.2).

Les plaquettes sont considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes du fait qu'elles expriment le CMH classe I (Complexe majeure d'histocompatibilité), le TAP1 et l'ERp57, molécules essentielles pour la présentation de l'antigène aux T CD8<sup>+</sup> ainsi que les molécules CD86 (dont l'expression augmente après la stimulation des plaquettes par TRAP) et CD40 (dont l'expression n'est pas modifiée après activation plaquettaire)

capables d'engager les récepteurs de costimulation des cellules T respectivement le CD28 et CD40L [68]. Ces travaux suggèrent que les plaquettes sont capables non seulement de promouvoir la réponse immunitaire adaptative, mais aussi de l'initier directement. La capacité des plaquettes à présenter efficacement l'antigène est néanmoins controversée.

Par ailleurs, les plaquettes exposent de nombreux récepteurs FcR, capables de fixer les fragments Fc des Ig, notamment des IgE, IgA et IgG. Lorsque les plaquettes sont recouvertes d'IgE, après engagement des FCεR, elles peuvent fixer des allergènes ce qui entraîne une sécrétion forte de sérotonine par les plaquettes, elles peuvent ainsi participer aux réactions immunitaires dépendant des cellules T [69].

Une autre population des lymphocytes, les cellules NK qui sont spécialisés dans l'immunité anti-tumorale, interagit avec les plaquettes sanguines [65]. Les plaquettes et leur Fg participent à l'augmentation de la survie et au potentiel métastatique de cellules tumorales emboliques en empêchant la « clairance » tumorale par les cellules NK. L'inhibition de l'activation plaquettaire réduit significativement les phénomènes de métastases spontanées et expérimentales [70].

#### **4. Plaquettes – cellules endothéliales**

À l'homéostasie, les EC sécrètent des facteurs antiagrégants, comme le NO ou le PGI<sub>2</sub>, qui préviennent l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Quand la paroi endothéliale vasculaire est lésée, les plaquettes adhèrent sur le site de lésion par l'interaction des protéines sous-endothéliales et les intégrines plaquettaires (voir le paragraphe A.II.2). Cependant, même si l'endothélium vasculaire est intact, les plaquettes activées sont aussi capables d'interagir avec les EC mettant en jeu le couple PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1)/P-sélectine [71]. Ensuite, les CK/CH pro-inflammatoires ou les facteurs immunomodulateurs comme le sCD40L, sécrétés par les plaquettes, en interagissant avec le CD40 exprimé sur les EC, induisent un phénotype inflammatoire au niveau des EC, caractérisé par l'expression des récepteurs d'adhérence : E-sélectine, P-sélectine, ICAM-1, VCAM-1 et la libération des CK/CH pro-inflammatoires comme les CCL2, IL6, IL8 ainsi que le recrutement et de l'extravasation des leucocytes aux sites d'inflammation [53], [72].

## **5. Interaction des plaquettes avec les pathogènes infectieux**

Les plaquettes sont décrites comme des cellules sentinelles qui sont souvent au premier contact des pathogènes lors d'une infection par voie sanguine. De par l'expression d'une grande variété de récepteurs de type PRR et par les récepteurs hémostatiques, les plaquettes sont capables de capter des fragments de pathogènes (voir les paragraphes A.III.1.1 et A.III.1.3), que ce soit des bactéries, des virus, des parasites ou des champignons [73]. Cette interaction implique des récepteurs et signalisations intraplaquettaire différents et menant à des réponses distinctes en fonction de l'agent pathogène.

### **5.1. Interaction des plaquettes avec les bactéries**

L'action des bactéries sur les plaquettes peut impliquer 3 mécanismes : i) une sécrétion accrue du taux de CK/CH inflammatoires (comme le RANTES et le MCP-1 [44]), induites par la réponse immune vis-à-vis des infections, et qui pourrait conduire à l'activation plaquettaire ; ii) les produits sécrétés des bactéries (et notamment les toxines) activent également les plaquettes et iii) les bactéries peuvent se lier sur les plaquettes de façon directe ou indirecte (voir partie A.III.1.3) [45]. Si cette liaison est forte, les plaquettes peuvent être stimulées. Dès lors sont observés, classiquement, des phénomènes d'activation, de sécrétion et ensuite d'agrégation plaquettaire.

Les plaquettes activées par des bactéries (comme *S. pneumoniae*) ou des composants bactériens (par exemple le LPS) peuvent sécréter dans la circulation sanguine ou aux sites d'inflammation et/ou d'infection des peptides antibactériens et des CK/CH inflammatoires (voir partie A.I.2.3, Tableau 3) qui sont, à leur tour, attractants et/ou activateurs des PMNC [73]. L'activation de ces PMNC induit la libération d'une quantité importante des CK/CH comme l'IL-8 ou le MIP-1 $\alpha$  qui interagissent avec les récepteurs plaquettaires CCR1 et CCR5/1 [61] conduisant à une activation réciproque. Par ailleurs, les plaquettes sont aussi capables « d'ingérer » directement certaines bactéries comme *S. aureus* ou *P. gingivalis* et de favoriser la phagocytose des pathogènes par les neutrophiles [45].

La réponse plaquettaire aux pathogènes est différente avec les agonistes classiques, par exemple les analogues de la thrombine. Premièrement, la réponse plaquettaire semble non-immédiate avec un temps qui varie entre 90 secondes et 20 minutes alors que la stimulation par les agonistes agit en moyenne en 10 secondes [45]. Ceci peut en partie s'expliquer d'une part par le temps nécessaire pour la reconnaissance et la mise en place d'une liaison effective (avec une signalisation intra plaquettaire) entre les fragments et/ou pathogènes entiers et les plaquettes. Deuxièmement, cette réponse est dépendante de la nature et la concentration des fragments et/ou bactérie entière. Ainsi, la réponse plaquettaire semble dépendante d'une concentration seuil [45].

Les plaquettes peuvent répondre non seulement aux bactéries entières, mais aussi aux toxines bactériennes. Plusieurs travaux, dont ceux du GIMAP-EA 3064 ont montré que les plaquettes sont capables de distinguer différents types de danger du « non soi » par les PRR et notamment les TLR (i.e. LPS/TLR-4). Les plaquettes semblent ajuster leur réponse en fonction de chaque pathogène et signal de danger, notamment en terme de relargage des facteurs solubles [74], [75].

## **5.2. Interaction avec les virus**

Les plaquettes expriment un grand nombre des récepteurs pour les virus, [50] dont les récepteurs pour le VIH et notamment le CXCR4 [47]. Ces récepteurs permettent aux plaquettes de capturer différents types de virus. Par exemple le GPIIb/IIIa reconnaît la séquence RGD des *Adénovirus* et des *Hantavirus* et l' $\alpha 2\beta 1$  reconnaît la protéine VP4 des *Rotavirus* [50]. L'internalisation des virus (et notamment le VIH) par les plaquettes a été démontrée [76] cependant la finalité de cette internalisation tant pour le virus que pour les plaquettes n'est pas clairement définie. Par ailleurs, les plaquettes activées par le VIH sécrètent des CH ayant un rôle antiviral et/ou chimio-attractant comme le RANTES [50].

## **5.3. Interaction avec les parasites**

Une des pathologies majeures parasitaires est le paludisme dont la cause – pour ce qui concerne les formes les plus graves – est le *P. falciparum*. Cox *et al* ont défini dans le cadre d'un modèle d'étude du paludisme cérébral une contribution de l'activation

plaquettaire dans cette pathologie : i) cette activation conduit à l'agrégation des plaquettes et une agglutination des globules rouges occluant les vaisseaux cérébraux ; ii) la liaison des plaquettes avec les EC activées induisant la perte de la perméabilité de la barrière endothéliale avec des signes cliniques qui s'accompagnent souvent de thrombopénie [77]. Dans une autre étude *in vitro*, il a été montré que les plaquettes purifiées sont capables, en co-culture, de détruire le *P. falciparum* intra-érythrocytaire [78] sans pour autant que ce phénomène a été caractérisé.

#### IV) Les sous-populations plaquettaires

L'existence de deux sous-populations plaquettaires a été décrite la première fois au cours de l'observation du changement morphologique induit par un stress osmotique [79]. Certaines différences biochimiques ont été également reportées comme la présence, au niveau d'une sous-population, d'une phosphatase qui phosphoryle la tyrosine sur quelques protéines ; cette phosphorylation est impliquée dans l'activation plaquettaire, conduisant donc à une plus forte réactivité qu'une autre sous-population après la stimulation par le collagène [80]. Plusieurs études ont montré qu'à l'état de repos, les plaquettes sont identiques. La distinction des sous-populations ne survient qu'après une double stimulation par la thrombine et la convulxine, le collagène ou l'A23187 lors que sont investigués i) d'expression de la PS et la libération des PMP qui sont associées avec la déphosphorylation étendue de la tyrosine [81] ; ii) l'expression et la fonction du facteur V (caractérisées comme facteur V plaquettaire induit par la thrombine et la convulxine, COAT-FV) [82] ainsi qu'une surexpression des protéines contenues dans les granules  $\alpha$  plaquettaires comme le Fg, le vWF, la thrombospondine, l' $\alpha_2$  antiplasmine et la Fn qui sont tous des substrats de la transglutaminase [83]. Dans ce dernier travail, une sous-population des plaquettes a été décrite comme des plaquettes « coated », qui sont plus adhérente et ayant une capacité plus importante par rapport aux autres plaquettes, de fixer des protéines pro-coagulantes plasmatiques ainsi que des protéines sécrétées par les granules  $\alpha$ .

A ce jour, le mécanisme et le rôle physiologique *in vivo* des plaquettes « coated » ne sont pas vraiment élucidés. Il semble que ce phénomène concerne les plaquettes « jeunes

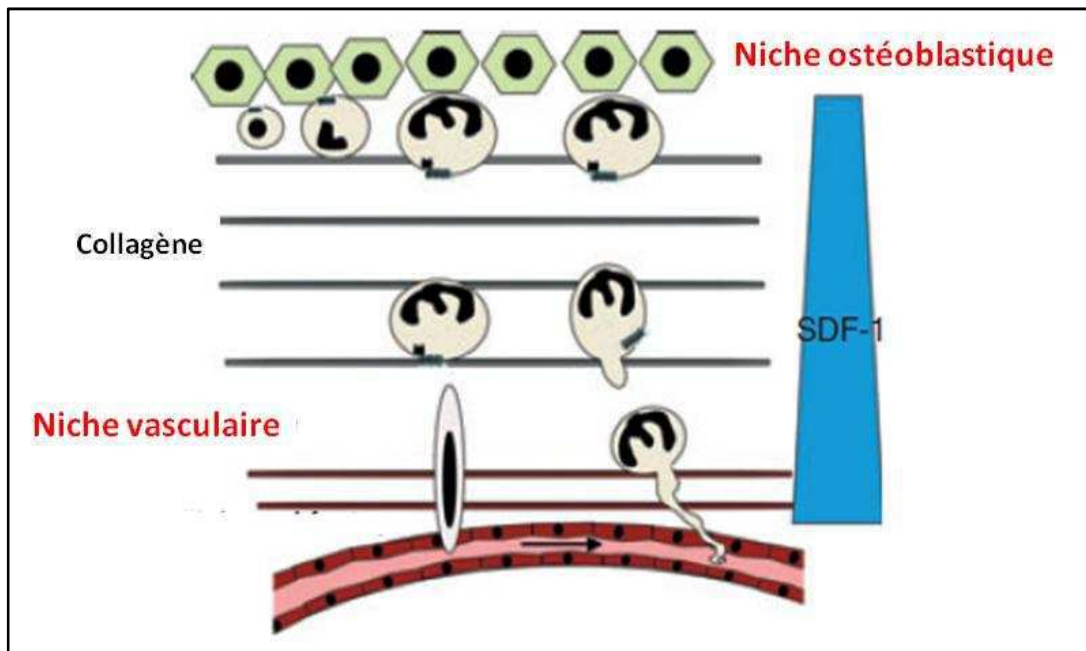
» [82] avec une baisse de la phosphotyrosine [81] ; ces hypothèses ne sont pas suffisantes [83]. Cependant, il semble admis que les plaquettes « coated » peuvent favoriser une deuxième vague d'activation plaquettaire et jouer un rôle important au cours de l'hémostase. Par ailleurs, il sera intéressant d'étudier les impacts de ces sous-populations plaquettaires dans l'immunité et l'inflammation.

## V) La thrombopoïèse

### 1. La mégacaryopoïèse et la maturation des MK

Les MK proviennent des cellules souches hématopoïétiques. La mégacaryopoïèse est régulée par différents facteurs de croissance, dont un des plus importants est la thrombopoïétine (TPO). La liaison entre la TPO et son récepteur mégacaryocytaire, le c-Mpl induit la phosphorylation de la tyrosine kinase cytoplasmique Jak2 qui à son tour active différentes voies de signalisation comme les voies STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), MAPK (The mitogen-activated protein kinases) ou PI3k conduisant à la prolifération progressive des MK et à l'initiation de la synthèse des protéines comme la GPIIb/IIIa et la GPIb [84]. Après la période de prolifération, les MK deviennent polyploïdes par une succession d'endomitoses qui sont plus ou moins concomitantes avec leur maturation. Cette polypléidie est accompagnée par une modification de l'expression des protéines plaquettaires et une augmentation du volume cytoplasmique du MK qui est proportionnelle à l'efficacité et au rendement de production des plaquettes [85]. Au cours de la maturation, les MK synthétisent de nombreux granules sécrétoires, en particulier de type  $\alpha$ , indispensables aux futures plaquettes et forment un réseau membranaire, appelé membranes de démarcation (DMS) qui est en continuité avec la membrane plasmique et sert de réservoir membranaire dans la formation des proplaquettes et des plaquettes [86]. Grâce au gradient des cytokines notamment du SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1), les MK « plaquetto-gènes » migrent depuis la niche ostéoblastique vers l'espace vasculaire, le réseau sinusoïde, où ils étendent leurs prolongements (Figure 11) [85].





**Figure 11 : Schéma de la migration des MK**

D'après [85]

## **2. La formation des proplaquettes**

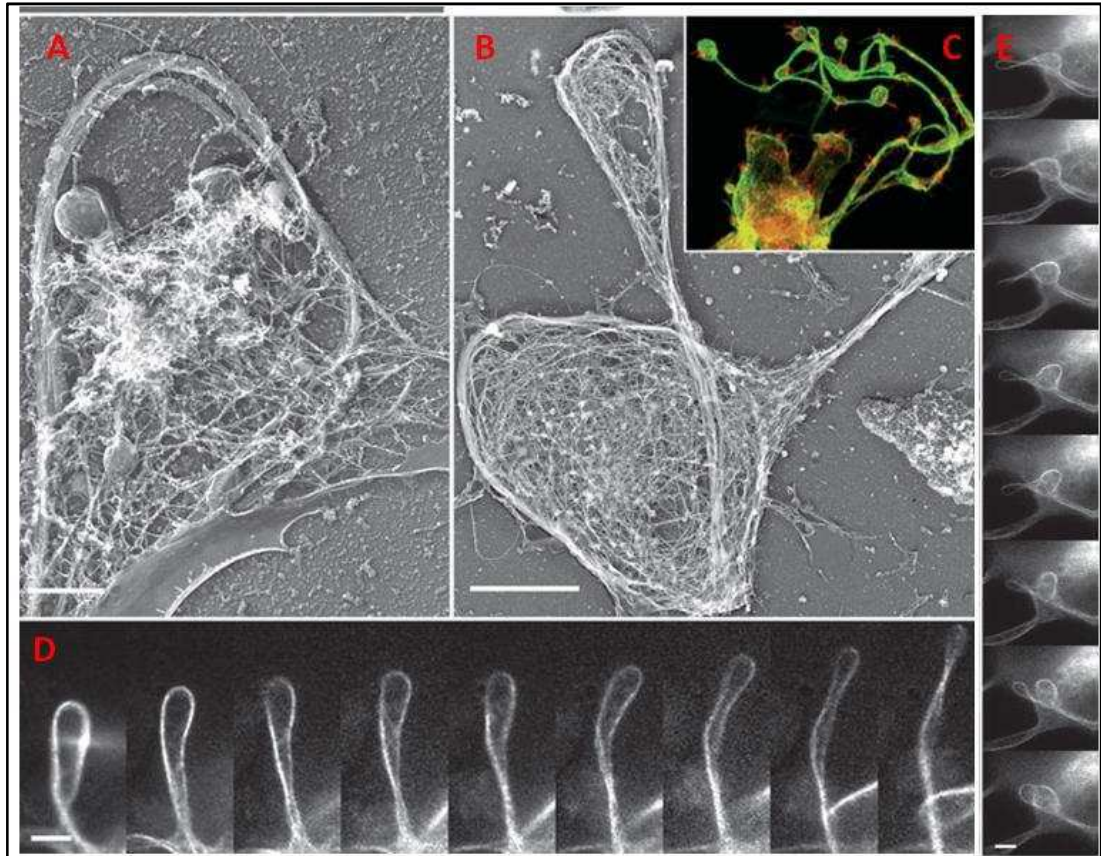
### **2.1. Le modèle statique**

La production des proplaquettes est une étape intermédiaire obligatoire pour la libération des plaquettes et correspond à la phase finale du développement du MK. Ce processus dynamique implique notamment les éléments du cytosquelette (le réseau d'actine et la tubuline) et nécessite une grande organisation pour transformer le cytoplasme des MK, cellules de grande taille donc d'un volume important, en prolongements cytoplasmiques de 100 à 500  $\mu\text{m}$  de long et de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre. Italiano *et al* [87] ont montré dans un modèle murin que ce changement morphologique est conduit par le réseau dynamique de microtubules (Figure 12A et B) : la polymérisation de la tubuline s'associe à la dépolymérisation du réseau d'actine (Figure 12C), conduisant à une réorganisation complète du cytosquelette de la cellule [87]. Effectivement, ce réseau de microtubules avec les filaments d'actine et le DMS sont de principaux éléments de l'élaboration des proplaquettes et la libération des plaquettes [85].

Italiano *et al* [87] ont montré que les microtubules localisés sous la membrane plasmique des MK conduisent au déploiement des DMS pour former des pseudopodes (les proplaquettes) qui sont des extensions membranaires composées de zones extrêmement fines et de zones de condensation à l'extrémité où les microtubules (dimère de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ 1) s'organisent en anneau (Figure 12D). Cette formation des proplaquettes se poursuit jusqu'à l'utilisation complète du cytoplasme et du DMS. L'accroissement du réseau de microtubules grâce à la polymérisation continue le long de ces pseudopodes abouti à leur élongation et à leur ramification, ce qui permet de multiplier considérablement les extrémités qui seraient le lieu de libération des plaquettes. Cette organisation conduit à une production plaquettaire importante [88].

À l'extrémité de chaque proplaquette, le réseau de tubuline forme une boucle (Figure 12E) vers laquelle sont acheminées les granules et les organelles nécessaires à l'élaboration d'une plaquette. Ces organites sont pris en charge par des transporteurs, les dynéines et les kinésines, qui glissent le long des microtubules par un processus bidirectionnel [89]. L'intégralité du cytoplasme du MK semble ainsi pouvoir être convertie en proplaquettes qui seront ensuite libérées. La fragmentation cytoplasmique de l'extrémité distale de ces proplaquettes est présumée être à l'origine de la formation des plaquettes [87].

Le microenvironnement de la moelle osseuse favorise cette migration des MK et contribue au développement des proplaquettes ; les protéines de la matrice extracellulaire comme la vitronectine, la Fn ou le vWF favorisent également cette élaboration [85]. Toutes les étapes de ce processus sont présentées dans la Figure 11.



**Figure 12 : L'élaboration des proplaquettes murines et la structure de leur microtubule**

D'après [88]

*Structure du cytosquelette des MK avant (A) et pendant (B) la formation des proplaquettes en microscopie électronique. C. Marquage d'immunofluorescence de tubuline (vert) et d'actine (rouge) du MK et ses proplaquettes associées. D et E. Séquence d'images en vidéo-microscopie de l'extrémité de proplaquette (la barre d'échelle dans l'image C est de 0,2  $\mu\text{m}$  et dans D est de 1  $\mu\text{m}$ ). D. Séquence d'images de gauche à droite montrant comment les faisceaux de microtubules d'une proplaquette du MK exprimant eGFP -  $\beta$ -tubuline s'allongent et mincissent lorsque la proplaquette se développe dans la longueur. La barre d'échelle est de 5  $\mu\text{m}$ . Le temps total dans cette séquence est de 10 min. E. Séquence d'images de haut en bas montrant comment les faisceaux de microtubules d'une proplaquette du MK exprimant eGFP -  $\beta$ -tubuline se tordent et se bouclent lorsque que les extrémités de proplaquettes sont amplifiées. La barre d'échelle est de 5  $\mu\text{m}$ . Le temps total de cette séquence est de 10  $\mu\text{m}$ .*

## 2.2. Le modèle dynamique

La formation des proplaquettes semblait bien connue chez l'homme [85], [87] ; cependant, le processus de libération de plaquettes individualisées n'avait pas été observé qu'en conditions statiques. Dans un modèle de souris exprimant une GPIIb/IIIa endogène fluorescente, Junt *et al* [90] ont montré pour la première fois la migration des MK de la moelle osseuse vers le flux sanguin à travers les sinusoides médullaires ainsi que leurs protrusions qui pénètrent dans le compartiment vasculaire pour libérer les fragments cytoplasmiques (les proplaquettes). Les proplaquettes sont retrouvées dans le sang circulant et sont soumises à des forces de cisaillement qui sont inversement proportionnelles au diamètre du vaisseau [90].

Ce modèle a été ensuite modélisé *in vitro* avec les MK humains par Dunois-Lardé *et al* [91]. Pour cela, des MK ont été introduits dans une chambre de perfusion dont la surface était recouverte par le vWF, reproduisant les conditions hémodynamiques des artérioles et de la microcirculation. Lors de force de cisaillement élevée, l'interaction spécifique entre GPIb et le vWF conduit aux modifications cytoplasmiques des MK et la fragmentation en proplaquettes et en plaquettes. Par ailleurs, le Fg s'est également avéré indispensable pour la formation des proplaquettes en activant le récepteur GPIIb/IIIa [92].

Récemment, l'équipe de Schwertz [93] a démontré une nouvelle forme intermédiaire qui peut correspondre à des plaquettes immatures en cours de division dans lesquelles la polymérisation de la tubuline est bidirectionnelle avec à chaque extrémité des anneaux de tubuline de la taille d'une plaquette qui régule le volume des plaquettes. Les auteurs suggèrent que les plaquettes isolées du sang périphérique peuvent former des plaquettes « progénies » dont la forme, la structure et la fonction sont similaires avec les autres plaquettes. Chassac Poirault *et al* [94] ont également observé cette formation en condition *in vitro* où les plaquettes humaines et murines sont soumises à des forces de cisaillement élevées sur la surface du vWF.

### 3. La libération des plaquettes aux extrémités des proplaquettes

Les forces de cisaillement élevées intra-vasculaires, en particulier dans la microcirculation pulmonaire, pourraient conduire à libération des plaquettes à partir de l'extrémité des proplaquettes [95].

Des phénomènes apoptotiques semblent également impliqués dans la formation des plaquettes. Lors de la libération des plaquettes, les MK présentent des marqueurs d'apoptose, notamment l'exposition de la PS, la fragmentation de l'ADN, l'expulsion de leur noyau [96] et l'activation diffusée des caspases [97]. De ce fait, les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle indispensable dans la formation des proplaquettes ; la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 sur les MK CD41<sup>+</sup> inhibe totalement cette formation [97].

Physiologiquement, chez l'homme, après 7 jours environ de différenciation, le MK devient « plaquetto-gène » et produit en moyenne 10<sup>4</sup> plaquettes par cellule et donc un nombre total de 10<sup>11</sup> plaquettes par jour. Cette production peut être multipliée par 10 en cas de stress, suggérant ainsi une homéostasie réactive (24-48 heures après une thrombocytopenie induite) [98]. Chez l'homme, la numération plaquettaire varie entre 150 à 400 000 cellules/ $\mu$ l, dont un tiers est séquestré dans la rate. La durée de vie et la clairance des plaquettes apoptotiques sont présentées dans le paragraphe C.II.4.

La production plaquettaire est donc un processus finement régulé de façon continue depuis la moelle osseuse jusqu'à la circulation sanguine périphérique. Les plaquettes formées *in vitro* sont fonctionnelles en réponse à une stimulation *in vitro* [91] cependant aucune étude concernant leur rôle inflammatoire n'a été réalisée à ce jour.

## B. Récepteurs Siglec

### I) Reconnaissance des signaux de danger et signalisation dans l'immunité innée

#### 1. Généralités

L'immunité innée, décrite dès le XIXe siècle par Elie Metchnikoff, constitue la première ligne de défense de l'organisme [99]. L'immunité innée repose sur une distinction globale des signaux de danger et ceux de tolérance, proposée la première fois en 1994 et complétée en 2001 par Matzinger [100], [101]. Les signaux de dangers peuvent être des pathogènes, ou des fragments de pathogènes du « non-soi » (PAMP) au cours de l'infection, ainsi que les différents signaux de dangers « du soi » qui sont notamment libérés à partir des cellules et des tissus endommagés ou nécrotiques (DAMP). Cette distinction passe par le fait que les cellules de l'immunité innée expriment un ensemble de récepteurs PRR capables de reconnaître directement ou indirectement ces signaux et déclenchent la réponse immunitaire innée [101], [102].

Les DAMP appelés également "alarmines" sont des molécules endogènes comme l'ATP, l'IL1 $\alpha$ , l'acide urique, les protéines cytoplasmiques telles que les HSP, les protéines nucléaires (par exemple le HMGB1 - High mobility group box 1) qui participent aux processus physiologiques cellulaires [103] (Tableau 5). La libération de ces molécules est souvent rapide lors d'une nécrose cellulaire et contribue à l'inflammation stérile [103]. En dehors des processus nécrotiques, les cellules immunitaires ainsi que d'autres cellules comme les entérocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules neuronales peuvent libérer ces molécules en utilisant la voie de sécrétion de lysosome ou le réticulum endoplasmique (mettant en jeu l'appareil de Golgi) [104]. Les DAMP ont des activités immunostimulantes avec notamment i) le recrutement et l'activation des cellules du système d'immunité innée qui expriment leur récepteur respectif – détaillés dans la partie B.I.2 ; ii) l'activation des cellules présentatrices d'antigène principalement les DC qui se traduit par l'augmentation de la maturation, l'activation et la sécrétion des facteurs chimiotactiques afin de promouvoir directement ou indirectement les réponses immunitaires adaptatives [103]. Ces molécules peuvent aussi restaurer l'homéostasie en favorisant la reconstruction des tissus endommagés [102], [104].

Molécule	Sécrétion		Rôle	
	Passive	Active	Immunité/Inflammation	Régénération du tissu
HMGB1	x	x	x	x
S100s		x	x	x
HDGF	x	x		x
HSPs		x	x	
IL-1 $\alpha$		x	x	
Cathelicidines		x	x	x
Défensines		x	x	
ADN		x	x	
Galectines		x	x	x
Nucléoline		x	x	
Annexine		x	x	

**Tableau 5 : Liste (non exhaustives) des DAMP**

D'après Varki [104]

*HDGF: Hepatoma-derived growth factor.*

*A contrario*, les PAMP sont des molécules exogènes représentant des fragments des pathogènes et qui sont essentielles pour leur survie, telles que les acides nucléiques, les composants de la membrane cellulaire, notamment. La plupart des PAMP sont les glycoconjugués (par exemple les lipo-oligosaccharides bactériennes) ou les polymères à base glycane (comme le peptidoglycane bactérien) ainsi que l'ADN bactérien, l'ARN viral, les glucane –  $\beta$  fongiques [102].

Enfin les SAMP (self – associated molecular patterns) concernent un groupe de molécules endogènes qui sont reconnues par les récepteurs de type inhibiteur pour réguler la réponse du système d'immunité afin de maintenir un état de base (non-activé) maîtrisé [104]. Parmi les SAMP on note les dérivés d'acide sialique qui sont présents sur la membrane plasmique des cellules et les glycosaminoglycanes. Les pathogènes sont capables d'imiter la structure des SAMP des cellules hôtes pour échapper au système de l'immunité innée [104].

Les PMNC, les phagocytes mononucléés (les monocytes et les macrophages, les DC, les cellules NK, les LyT et B non conventionnels, et les plaquettes, sont les principales cellules de l'immunité innée. Tous, reconnaissent les signaux de dangers au travers les « germ-line encoded receptors » membranaire ou intracellulaires appelé PRR. Parmi les

PRR on trouve : les TLR, les NLR (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors), les RLR (RIG-like receptors), les FcR, les GPCR [102] et la famille des récepteurs Siglec identifiée récemment [105], [106]. Ces récepteurs sont exprimés constitutivement sur les cellules de l'hôte et détectent les PAMP/DAMP/SAMP [102] de façon indépendante de la mémoire immunitaire. Au contraire du nombre quasiment illimité des récepteurs de l'immunité adaptative ( $>10^{16}$ ), le nombre de récepteurs PRR est limité [102].

L'interaction entre les différents PRR et leurs PAMP/DAMP/SAMP correspondant peut activer les voies de signalisation spécifiques et déclenche les différentes réponses immunitaires contre les pathogènes [102].

## **2. Les principaux PRR**

### **2.1. Les TLR**

Avec 11 membres chez l'homme (TLR-1-11) et 12 membres chez les souris (TLR-1 à 9 et TLR-11 à 13), la famille des TLR est la principale parmi les PRR [107]. Ces récepteurs sont des glycoprotéines de type I transmembranaire contenant 3 domaines : domaine extracellulaire riche en leucine pour la reconnaissance des PAMP, domaine transmembranaire et domaine intracellulaire TIR (Toll – IL1 receptor) requise pour la transduction du signal [107]. Les TLR sont exprimés sur les différentes cellules immunitaires : macrophages, DC, LyB, T, plaquettes et cellules non immunes (fibroblastes, cellules épithéliales). Cette expression est modulée rapidement en réponse aux pathogènes, aux CK/CH et aux autres signaux de stress. Ces récepteurs sont capables de reconnaître les PAMP dans l'environnement extracellulaire (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 et TLR-11) ou dans les endo-lysosomes (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9 et TLR-10) [107]. Après engagement, les TLR se dimérisent et subissent un changement de conformation qui leur permet de recruter les molécules adaptatrices. Au niveau des cellules eucaryotes, la signalisation des TLR est réalisée par des protéines adaptatrices, notamment le MyD88 et le TRIF (Toll-receptor associated activator of interferon). À l'exception du TLR-3, les TLR connus sont capables d'engager directement le MyD88 combiné avec l'adaptateur TIRAP/MAL ; le TLR-3 et le TLR-4 peuvent engager également le TRIF [107]. Ces deux voies



conduisent à l'activation des cascades de signalisation intracellulaires en activant la transcription du facteur nucléaire-kappaB (NF- $\kappa$ B) [102]. Une fois son inhibiteur I $\kappa$ B libéré, le NF- $\kappa$ B induit la transcription des gènes, traduction et sécrétion de nombreux produits, y compris les médiateurs inflammatoires [107]. L'engagement de ces voies de signalisation dépend de la nature du pathogène en cause qui interagit, via les PAMP, avec les TLR [75]. Par exemple le S-LPS active seulement la voie dépendante du MyD88, mais la haute affinité R-LPS peut déclencher les deux voies dépendantes du MyD88 et du TRIF, conduisant à la production d'IFN de type I dans les cellules de mammifères [75].

Par exemple, l'engagement du TLR-4 plaquettaire par le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* (LPS) module la libération des cytokines des plaquettes de façon différentielle : la libération du sCD62P, de l'IL-8, de l'EGF et du TGF- $\beta$  est dépendante de l'activation plaquettaire après l'engagement du TLR-4 ; la concentration du RANTES, de l'Angiogenine et du PDGF-AB est plus faible alors que la concentration du sCD40L et du PF4 est plus élevée dans les surnageant plaquettes après l'engagement du TLR-4 [75]. Ces résultats suggèrent le TLR-4 joue un rôle important dans la réponse inflammatoire plaquettaire induite par le LPS. Cependant, récemment Kayagaki *et al* ont montré que le lipide d'hexa-acyl A, une composante du LPS bactérien est capable d'accéder dans le cytoplasme des macrophages murins et initier les réponses immunitaires (l'activation de l'inflammasome noncanonique) en activant le caspase-11, indépendamment du TLR-4 [108].

Après l'activation des TLR, on note diverses réponses cellulaires pouvant conduire à un recrutement des leucocytes, l'adhésion et la survie cellulaire, le remodelage de la matrice extracellulaire, la réponse antivirale, les signalisations intracellulaires négatives et positives [107].

## **2.2. Les NLR et RLR**

Les pathogènes peuvent être détectés par les PRR cytoplasmiques comme les NLR et les protéines CARD (caspase activation and recrutement domains)-hélicase (RLR) qui sont impliqués dans la reconnaissance des bactéries et des virus intracellulaires préférentiels [102]. Exprimés au niveau des macrophages, des DC, des neutrophiles et des cellules

épithéliales [102], [109], ces récepteurs sont capables d'activer la signalisation des facteurs intracellulaire de type NF- $\kappa$ B et MAPK, puis d'induire la sécrétion des CK/CH pro-inflammatoires et de stimuler l'autophagie [102].

## II) Les récepteurs Siglec

### 1. Historique de la découverte et leur structure

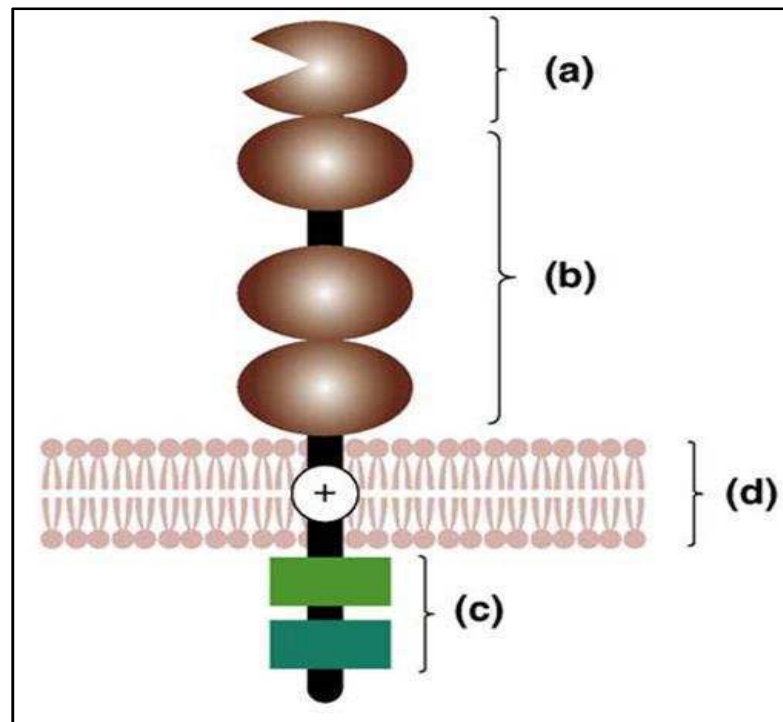
#### 1.1. Historique de la découverte des Siglec

Williams A.F. et Barclay A.N, dans les années 1980, avaient montré le rôle des molécules de la superfamille d'Ig en tant que molécules de reconnaissance du système immun grâce à une affinité élevée de leur domaine Ig, avec un nombre illimité de structures moléculaires, notamment les antigènes, les molécules de la présentation d'antigène (CMH classe I et II), les cytokines, les facteurs de croissance...etc [110]. Un sous-groupe de cette superfamille, capable de lier les structures variables des glycanes sont des lectines de type d'Ig [105], parmi lesquels, les récepteurs Siglec sont les mieux caractérisés et décrits dans la littérature [105].

#### 1.2. Structure

Les Siglec sont des protéines transmembranaires de type I composées de trois régions [105], [106], [111] (Figure 13). i) La région extracellulaire possède un domaine d'Ig N-terminale « V-set » contenant le résidu d'arginine formant un pont salin avec le groupe carboxylate de l'acide sialique, permettant la liaison spécifique avec cette molécule et un nombre qui varie de 1 à 16 de domaine d'Ig « C2-set » [105]. ii) La région transmembranaire permet de transmettre le signal vers la queue cytoplasmique de la région intracellulaire du récepteur. Cette queue contient deux types de molécules : un ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) qui se situe à proximité de la membrane et un ITIM-like qui se situe à distance de la membrane. Ces molécules possèdent des tyrosines et ITIM (motif de type inhibiteur et suppresseur des signaux d'activation) [106]. Certains Siglec n'ont pas de région intracellulaire comme la

sialoadhesine [112], le Siglec-H [113], le Siglec-14 [114], le Siglec-15 [115] et le Siglec-16 [116].



**Figure 13 : Structure commune des Siglec**

D'après [117]

*(a) Domaine d'Ig N-terminale « V set » contient un résidu arginine conservée qui est capable de se lier avec l'acide sialique. Ce domaine est suivi par un nombre variable (1-16) de domaines d'Ig « C2-set » (b). Dans le domaine cytosolique, la plupart des Siglec contiennent une combinaison de motif tyrosine y compris ITIM, ITIM-like, et les sites d'adhésion Grb2 et kinase Fyn (c). Sialoadhesine, Siglec-14, Siglec-15 et Siglec-16 n'ont pas de queue cytoplasmique, mais contiennent un résidu chargé positivement dans la région transmembranaire (d) qui permet la liaison avec la protéine adaptatrice DAP-12 (Figure 14).*

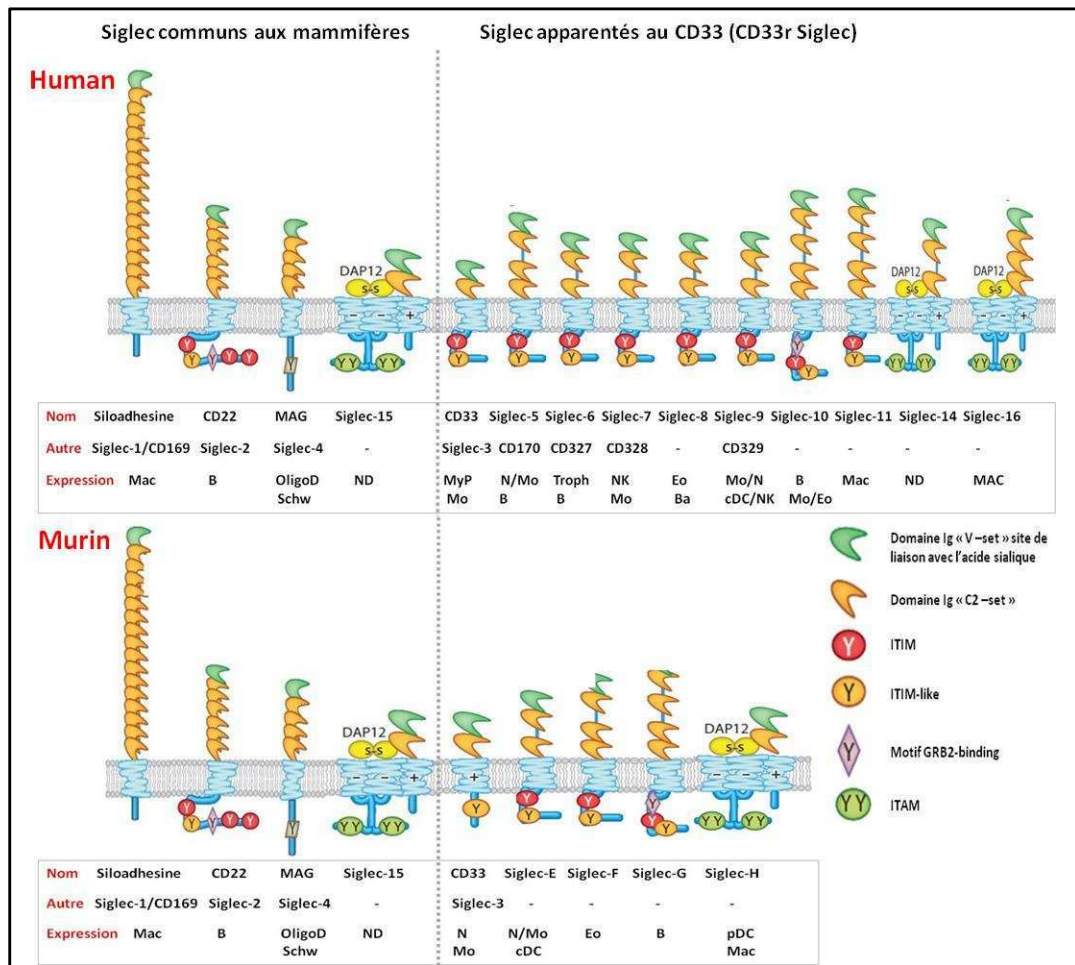
## 2. Classification, expression et évolution des Siglec :

### 2.1. Classification et expression

Les Siglec, présentent une structure similaire et conservée au cours de l'évolution, et sont divisés en deux groupes (dont l'expression et la structure sont synthétisées dans la Figure 14) [105], [118]. i) Le premier groupe commun pour tous les mammifères contient 4 Siglec : le Siglec-1/Sialoadhesin/CD169, le Siglec-2/CD22, le Siglec-4/MAG - Myelin-

associated glycoprotein [112] et le Siglec-15 [115] dont la structure de la queue cytoplasmique et le nombre de domaines « C2-set » sont très différents. ii) Dans le deuxième groupe – le nombre de Siglec apparentés au CD33 (CD33r Siglec) identifié dans la littérature est plus important et concerne à ce jour 10 Siglec chez l'humain : le Siglec-3/CD33 [119], le Siglec-5/CD170 [120], le Siglec-6/CD327 [121], le Siglec-7/CD328 [122], le Siglec-8 [123], le Siglec-9/CD329 [124], le Siglec-10 [125], le Siglec-11 [126], le Siglec-14 [114], le Siglec-16 [116] et 5 Siglec chez les souris : le Siglec-3/CD33 [127], le Siglec-E [128], le Siglec-F [129], le Siglec-G [130], le Siglec-H [113]. Dans une même espèce, les CD33r Siglec ont une structure très similaire, par exemple, la seule différence entre ces Siglec humains est le nombre des domaines C2 [111]. Mais entre deux espèces, la structure est différente ; par exemple, contrairement au CD33 humain [119], le CD33 murin ne possède pas de motif ITIM dans sa région cytoplasmique et cette molécule ne semble pas capable de se coupler avec DAP-12 [127]. Cela peut expliquer pourquoi les souris KO en CD33 n'ont aucune modification importante de leur réponse immunitaire [127]. Par ailleurs, ce Siglec murin est exprimé surtout sur les neutrophiles alors que l'expression du CD33 humain est trouvée sur les monocytes [119], [127]. Aussi, il est difficile de comparer des résultats des études *in vitro* des modèles humains et murins.

Dans la plupart des cas, ces récepteurs sont exprimés différemment sur les cellules hématopoïétiques et les cellules du système d'immunité innée comme les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles, les monocytes, les macrophages, les DC et les cellules NK [108] à l'exception du Siglec-6 et MAG qui sont exprimés sur les cellules cyto/syncytiotrophoblastiques, les oligodendrocytes et les cellules Schwann [112], [121] (Figure 14). Les cellules T non activées (chez l'humain et chez la souris) n'expriment pas les Siglec [131]. Cependant, certains auteurs ont montré que les cellules TCD3<sup>+</sup> expriment le Siglec-7 et 9 faiblement [132]. À l'état activé, ces cellules expriment le Siglec-8 (chez l'humain) et le Siglec-F (chez la souris) [106]. Le CD33 est un marqueur des cellules progénitrices myéloïdes [119].



**Figure 14 : Classification, structure et expression des Siglec**

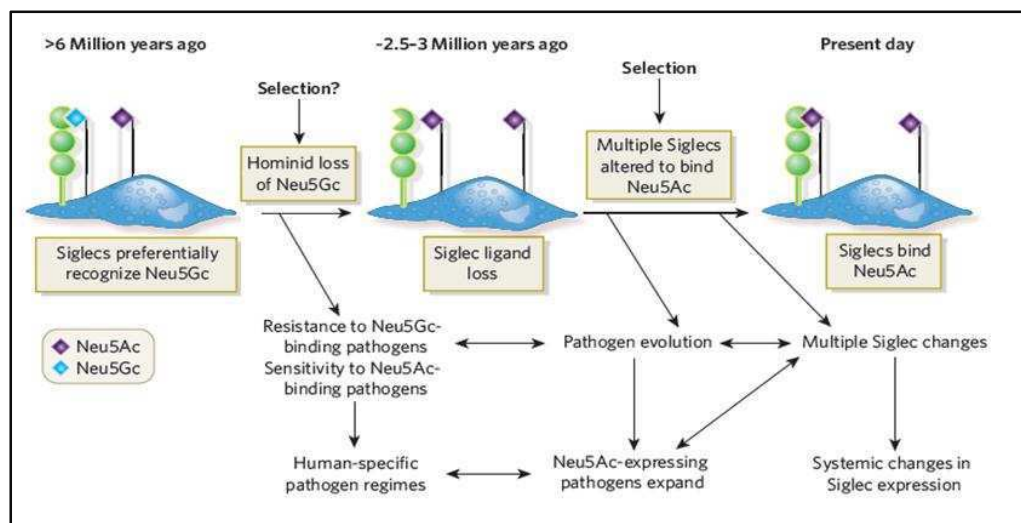
D'après [106], [118]

*Mac* : macrophages, *B* : cellules B, *OligoD* : Oligo dendrocytes, *ND* : Non déterminé, *N* : Neutrophiles, *Mo* : Monocyte, *cDC* : Cellules dendritiques conventionnelles, *pDC* : plasmacytoïdes dendritiques, *Eo* : Eosinophiles, *Ba* : Basophiles, *Schw* : cellules schwann, *NK* : Nature killer cells, *troph* : trophoblasts, *MyP* : myéloïdes progénitrices.

## 2.2. Évolution structurale des CD33r Siglec

La fonction initiale et principale du Siglec CD33r est de reconnaître les molécules du « soi » afin de réguler la réponse immunitaire de l'hôte via l'interaction avec les ligands et l'engagement des molécules intra-cytoplasmiques inhibitrices de type ITIM. Cette fonction est exploitée par les pathogènes pour échapper aux réponses immunitaires de l'hôte en synthétisant ou capturant des glycanes sialylés qui sont reconnues par les Siglec [133]. Ce phénomène conduit premièrement au changement du sialome de l'hôte et

ensuite à l'évolution très rapide des CD33r Siglec pour adapter à ces nouveaux ligands « du soi » ; ces nouveaux Siglec ne connaissent plus les anciennes glycanes sialylés exploitées par les pathogènes permettant donc la résistance à ces pathogènes [134]. Effectivement, initialement, les Siglec reconnaissent l'acide N-Glycolylneuraminique (Neu5Gc) exprimé sur la même cellule (interaction cis) [134]. La perte de Neu5Gc chez l'homme au cours de l'évolution conduit d'une part : i) à la perte brutale de site de liaison pour la Neu5Gc de plusieurs CD33r Siglec qui induirait probablement une activation anormale du système immunitaire, ii) d'autre part favorise la reconnaissance préférentielle du Neu5Gc du pathogène permettant la résistance des pathogènes exprimant la Neu5Gc et la N-acetylneuraminique (Neu5Ac) [134]. Afin de réguler le système immunitaire, plusieurs Siglec changent leur structure pour pouvoir lier le ligand Neu5Ac. Ce phénomène est observé systématiquement pour tous les Siglec au cours de l'évolution. Comme une sélection naturelle, les pathogènes évoluent aussi pour s'adapter au changement de l'hôte en développant les espèces contenant Neu5Ac (Figure 15) [134]. Par conséquent, les pathogènes contribuent à l'évolution de ces récepteurs de façon indirecte. Cette évolution des CD33r Siglec suit la modification du génome (délétion, duplication inversée, conversion) et le changement spécifique d'acide aminée surtout dans l'extrémité N-terminale du domaine « V-set » qui reconnaît l'acide sialique [105].



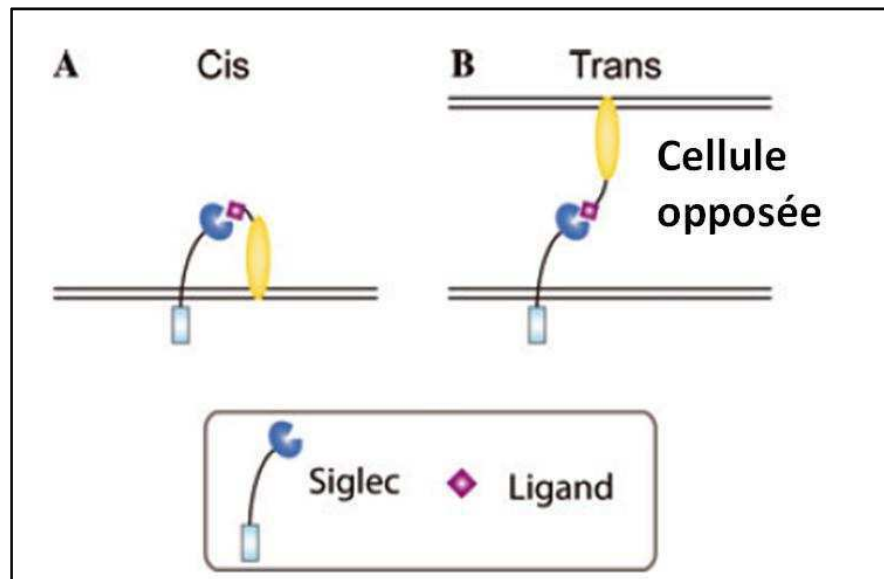
**Figure 15 : Évolution des CD33r Siglec**

D'après [134]

### 3. Les ligands des Siglec

#### 3.1. Les Siglec reconnaissent les ligands du soi de type glycane sialylé

Les Siglec possèdent un résidu d'arginine qui est capable de former un pont salin avec le groupe carboxylate de l'acide sialique permettant leur liaison spécifique [105]. L'acide sialique appartient à une famille de sucres dont la plupart des membres sont dérivés de l'acide Neu5Ac. Cette acide est souvent localisée dans la partie terminale de la chaîne des oligosaccharides (encore appelé glycane sialylé ou sialoside) à la surface cellulaire [106]. À l'état de base, les Siglec sont liés avec ces ligands donc qui sont exprimés sur la même cellule (interaction *cis*) ; leurs sites de liaison sont généralement masqués (Figure 16A) [106], [131]. L'affinité des Siglec avec les ligands de type glycane sialylé exprimés sur les autres cellules (interaction *trans* – Figure 16B) est beaucoup plus faible. L'interaction *cis* est donc prédominante [131]. Cependant, l'interaction *trans* pourrait être en compétition avec l'interaction *cis* quand les ligands glycanes sialylés (*trans*) sont attachés aux glycoprotéines et glycolipides qui leur permettent d'avoir une affinité plus élevée (par exemple les structures des PAMP (LPS ou peptidoglycanes bactériales) ou les gangliosides) [118]. Par ailleurs, les sites d'interaction *cis* peuvent être clivés par la sialidase (composant de certaines pathogènes comme *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringen* et *Arthobacter ureafacien* [118], [135] ou démasqués suite de l'activation cellulaire qui permet aux Siglec d'avoir des interactions en *trans* [136].



**Figure 16 : Interaction entre Siglec avec ses ligands**

D'après [131]

*A : interaction cis (ligands exprimés sur la même cellule). B : interaction trans (ligands exprimés sur les cellules opposées).*

### 3.2. Les gangliosides

Les gangliosides sont composés de céramides et d'oligosaccharides contenant trois ou plusieurs résidus osidiques dont au moins un est estérifié par l'acide sialique [137]. Ce sont des composants du feuillet externe de la membrane plasmique exprimés abondamment sur les cellules du système nerveux et les cellules tumorales sous forme des micro domaines qui sont impliqués dans les processus d'adhérence et de transduction du signal [118], [137]. Les gangliosides formés de glycosphingolipides sont des ligands des Siglec avec une affinité très élevée [137]. L'affinité des CD33r Siglec est différente pour chaque ganglioside en fonction de leur structure (Tableau 6) : Le Siglec-7 et Siglec-9 sont sélectifs pour les gangliosides de série B contenant le résidu 2,8-disialyl (GalNAc ou GlcNAc) comme GQ1b, GT1b, GD2, GD3, alors que le Siglec-8 semble avoir une faible avidité avec ces gangliosides (Tableau 6) [137]–[140].



Siglec <sup>1</sup>	Glycan Preference <sup>3</sup>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sn	●	○	*	●	●	●	*	*	*	*	*
hCD22	●	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-
mCD22	○	●	○	-	-	-	-	-	-	-	-
hSig-10	○	●	*	●	●	*	*	*	*	*	*
mSig-G	-	●	*	-	●	*	*	*	*	*	*
hSig-8	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-	-
mSig-F	○	-	-	○	-	○	●	●	○	○	-
Sig-5	●	●	*	●	●	●	*	*	*	*	*
Sig-7	○	○	-	○	○	●	*	●	*	●	●
hSig-9	○	○	*	○	○	○	*	-	*	●	-
mSig-E	○	-	●	●	-	●	*	●	*	●	●

Tableau 6 : L'affinité des Siglec avec leurs ligands de nature glycane

D'après [131]

#### 4. Les fonctions connues des Siglec

La fonction principale des Siglec est de réguler la réponse immunitaire de l'hôte

##### 4.1. Régulation de la réponse immunitaire innée

##### 4.1.1 Interaction des cellules de l'immunité innée avec les pathogènes par l'engagement des Siglec

Certains pathogènes comme *Campylobacter jejuni* [141] et *Streptococcus* de groupe B [133] sont capables de synthétiser ou de capturer l'acide sialique de leur hôte puis de l'incorporer dans leur structure pour engager des Siglec induisant la signalisation inhibitrice des motifs ITIM. Cette signalisation va diminuer la réponse immunitaire de l'hôte et maintenir la survie des pathogènes et faciliter leurs activités et proliférations [142].

Cependant l'interaction *trans* avec les cellules immunitaires innées par l'engagement des récepteurs Siglec peut aussi faciliter l'élimination des pathogènes par la

phagocytose ou l'endocytose [118]. Par exemple, le sialoadhésine des macrophages peut reconnaître l'acide sialique de *Neisseria meningitidis* et conduire à la phagocytose de cette bactérie [143].

#### **4.1.2 Fonction inhibitrice des réponses inflammatoires : Corécepteur de TLR/NLR**

Les molécules de type Siglec participent à la régulation négative des voies intracellulaires mises en jeu après engagement des TLR/NLR. Ce phénomène permet de prévenir la réponse immunitaire excessive après activation de ces récepteurs [118]. Effectivement, la phosphorylation des motifs ITIM et ITIM-like des Siglec permet le recrutement des SHP-1 et 2 qui inhibent les signaux d'activation des récepteurs ITAM et bloquent l'activation du NF- $\kappa$ B [144]. Quatre Siglec n'ont pas de queue cytoplasmique contenant des tyrosines : le Siglec-H [113], le Siglec-14 [114], le Siglec-15 [115] et le Siglec-16 [116]. Ces Siglec sont capables d'assurer cette régularisation en s'associant directement ou indirectement (par la « clusterisation » avec un autre Siglec – voir partie B.II.5.3) avec une protéine adaptatrice contenant des ITAM, le DAP12. Par ailleurs, les Siglec sont capables de se lier avec les protéines SOCS (Supressor of cytokines signaling) connues pour la régularisation négative de la signalisation des TLR [145], [146]. Kawasaki *et al* montrent que l'induction des protéines SOCS est diminuée chez la souris knock-out en CD22 provoquant une hyper activation des cellules B [147].

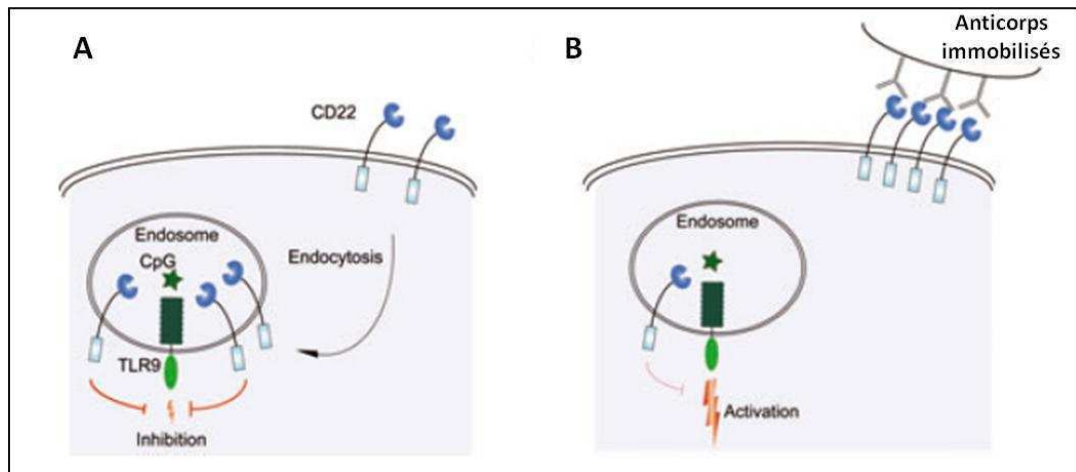
La régulation de l'activation des cellules après engagement des TLR est différente pour chaque type cellulaire (Tableau 7) [131]. Cette fonction inhibitrice des Siglec est exploitée par les pathogènes qui imitent la structure de leurs ligands afin d'établir une réponse immunitaire avantageuse pour leur survie dans l'hôte.

Molécule	TLR	Phénotype observée
<b>CD22</b>	TLR3, 4, 7 et 9	↑ prolifération des cellules B KO en CD22
<b>Siglec-G</b>	TLR3, 4, 7 et 9	↑ prolifération des cellules B KO en Siglec-G
		↑ production du TNF $\alpha$ des DCs KO en Siglec-G
<b>Siglec-E</b>	TLR4	↓ Production de l'IL-12 par réticulation avec l'Ac
<b>Siglec-H</b>	TLR9	↓ Production du TNF $\alpha$ par réticulation avec l'Ac
<b>Siglec-5</b>	TLR2, 3, 4 et 9	↓ production du TNF $\alpha$ et ↑ IL-10 par la surexpression
<b>Siglec-9</b>	TLR2, 3, 4 et 9	↓ production du TNF $\alpha$ et ↑ IL-10 par la surexpression
<b>Siglec-11</b>	TLR4	↓ transcription de l'IL-1 $\beta$ par la réticulation avec l'Ac
<b>Siglec-14</b>	TLR4	↑ production du TNF $\alpha$ par la surexpression

**Tableau 7 : Effet de l'interaction Siglec-TLR**

D'après [131]

Les travaux récents montrent que le blocage des Siglec par des anticorps bloquants modifie de façon très importante la signalisation des TLR, ce qui suggère que la densité de l'expression des Siglec à proximité des TLR peut influencer les fonctions de ces récepteurs [131]. Le CD22 a la capacité d'endocytose ; il est localisé au niveau de la membrane et de l'endosome des cellules B où est exprimé le TLR-9 (Figure 17A) ; il inhibe l'activation de ce récepteur induite par les CpG [147]. La neutralisation du CD22 par des anticorps bloquants permet de restreindre son expression endosomale et de favoriser donc la signalisation du TLR endosomal (Figure 17B) [147]. Les travaux sur les autres Siglec endocytiques : Siglec-H (modèle souris) [113] et Siglec-11 [148] montrent aussi des résultats similaires (Tableau 7). Le lieu (membranaire ou endosomal) d'expression des Siglec peut aussi moduler la réponse immunitaire innée de l'hôte après engagement des TLR.



**Figure 17 : L'interaction du CD22 et TLR-9**

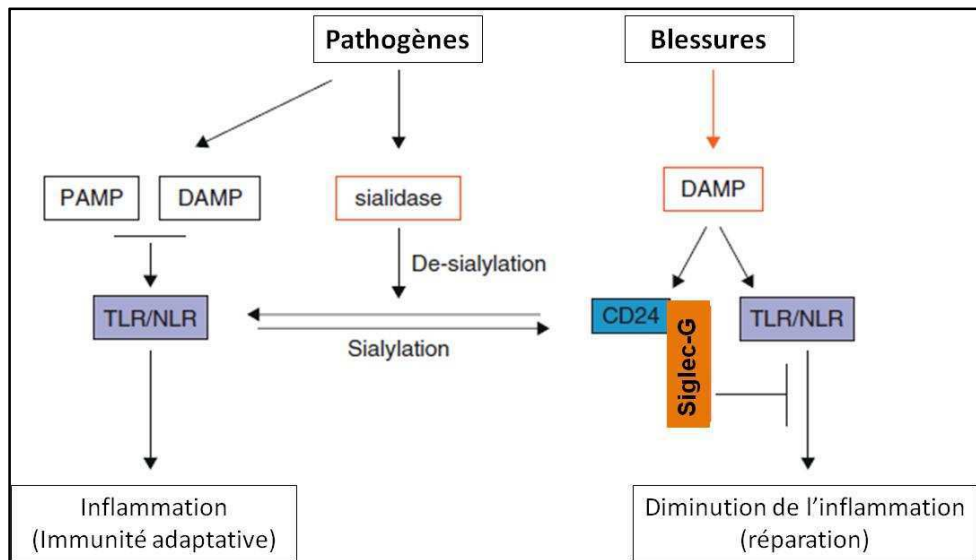
D'après [131]

*A. L'endocytose sur l'endosome du CD22 inhibe l'activation du TLR-9. B. L'anticorps immobilisé réduit la concentration endosomale du CD22 favorisant l'activation du TLR-9.*

#### 4.1.3 Les Siglec distinguent les DAMP et PAMP

Les Siglec sont exprimés généralement sur les cellules immunitaires ayant un rôle dans la régulation du système immunitaire inné [118]. Les récepteurs PRR sont capables de reconnaître les signaux de dangers du « soi » (DAMP) et du « non-soi » (PAMP) pour déclencher des réactions inflammatoires. L'engagement de ces récepteurs après engagement par les DAMP peut aussi réduire l'inflammation et favoriser la réparation et la cicatrisation des plaies [136]. Chen *et al* [149] ont mis en évidence pour la première fois, le mécanisme par lequel le Siglec-10/Siglec-G permet aux cellules de l'immunité innée de distinguer les DAMP et les PAMP afin d'établir une réponse inflammatoire capable d'assurer la défense contre les pathogènes, mais tout en maintenant l'intégrité des tissus à la fin du processus de défense après l'infection. Ils ont montré que l'interaction entre le CD24 et le Siglec-10 humain (Siglec-G murin) peut réduire la réponse inflammatoire induite par les DAMP de type HMGB1 et HSP70, 90, mais pas en présence de certains PAMP (LPS et le PolyI:C qui activent les TLR-4 et TLR-3 respectivement). Effectivement, la glycoprotéine CD24 est capable de former un complexe Siglec-10/Siglec-G et DAMP qui inhibe l'activation des TLR/NLR par l'inhibition des motifs ITIM (Figure 18). Cependant, certains pathogènes infectieux comme *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*

et *Arthobacter ureafacien* [118], [136] qui possèdent une sialidase, peuvent cliver la liaison entre les Siglec et le CD24 ; en ce cas la distinction entre des signaux DAMP et PAMP ne sera donc pas effective.



**Figure 18 : L'interaction entre Siglec-G et le CD24 basée sur leur structure glycoprotéine permet la distinction entre les DAMP et les PAMP**

D'après [136]

*En présence de la sialidase cette discrimination est annulée.*

#### 4.1.4 Dysfonction de la régulation

La régulation de la réponse immunitaire après engagement des Siglec est dépendante des sialidases. D'une part, les pathogènes exprimant cette enzyme peuvent réduire la réponse immunitaire de l'hôte après engagement des Siglec en démasquant l'interaction *cis* entre les Siglec et les sialoglycanes du soi et favorisant l'interaction *trans* entre les Siglec et les sialoglycanes des pathogènes [118], [133]. Ce phénomène permet de faciliter l'infection de l'hôte et de maintenir la survie des pathogènes. D'autre part, la sialidase joue un rôle dans la suppression de la liaison entre le CD24 et le Siglec-10 (Siglec-G) qui supprime la reconnaissance et la régulation négative des DAMP par les Siglec [136]. La survie prolongée des pathogènes et la suppression de la régulation

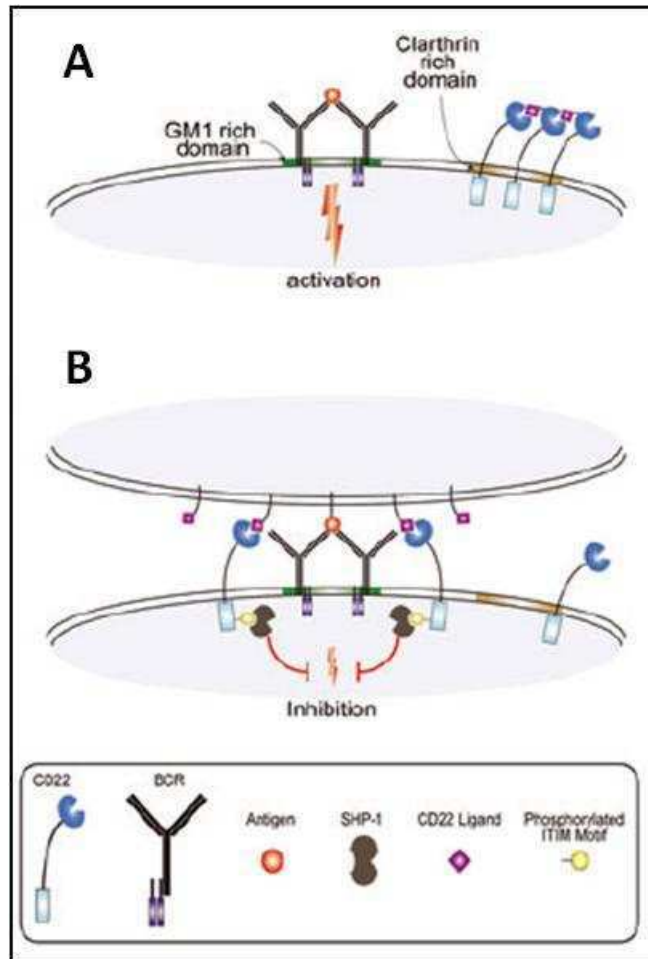
négative de la réponse inflammatoire sont probablement à l'origine d'une réponse inflammatoire massive induite par ces pathogènes.

## **4.2. La régulation de la réponse immunitaire adaptative**

### **4.2.1 Régulation négative de la signalisation du récepteur des cellules B (BCR) et maintenance la tolérance immunitaire**

Les cellules B expriment deux types de Siglec : le CD22 et le Siglec-10 (Siglec-G chez souris) qui sont susceptibles de réguler négativement la signalisation du BCR quand ces récepteurs sont à proximité [131]. En effet, à l'état de base, les CD22 et les BCR se situent dans deux compartiments différents à la surface membranaire des cellules B grâce à l'interaction *cis* entre le CD22 et ses ligands sialoglycanes de la même cellule. Ainsi, le CD22 n'inhibe pas l'activation des cellules B (Figure 19A). Dans le cas où les antigènes sont de nature glycanes dont l'affinité avec les Siglec est plus élevée (par exemple le nitrophénol - polyacrylamide sialylé ; NP-PA-bNeuGc), le CD22 peut s'engager dans l'interaction en *trans* et ce Siglec devient juxtaposé au BCR (Figure 19B). Cette position permet le recrutement notamment des SHP-1 après la phosphorylation de leur domaine ITIM, favorisant la déphosphorylation des sous unités intracellulaire du BCR [150]. Ce phénomène participe à l'inhibition de la signalisation du  $Ca^{2+}$  induit par l'engagement du BCR et empêche l'hyper activation des cellules B contre le « soi », permettant, notamment, la prévention des phénomènes d'autoimmunité [118], [147].

Dans les modèles de souris knock-out (KO) en CD22 et Siglec-G, il a été observé une hyper activation des cellules B en partie due à la diminution de l'induction des protéines SOCS [147], ce phénomène pourrait participer au développement de maladies autoimmunes systémiques [151]. Cette dernière observation conforte le rôle des récepteurs Siglec après engagement par leurs ligands sialoglycanes dans la régulation des réactions inflammatoires excessive et le maintien de la tolérance par les cellules immunitaires. Ainsi, les domaines ITIM (ou DAP12 pour les Siglec n'ayant pas de domaine ITIM) sont essentiels aux Siglec pour la régulation de la réponse immunitaire. En effet, des mutations des domaines ITIM peuvent inhiber cette fonction [152].



**Figure 19 : Modulation de la signalisationsignalisation du BCR par le CD22**

D'après [131]

A. CD22 et BCR sont localisés dans deux compartiments sur la surface des cellules B. B. le CD22 est juxtaposé du BCR.

#### 4.2.2 Les Siglec et la régulation de la signalisation des cellules T

Dans un modèle *in vitro* de culture des cellules Jurkat transfectées par le Siglec-7 ou le Siglec-9, Ikehara *et al* ont montré que ces Siglec sont partiellement colocalisés avec le complexe TCR-CD3 (T cell receptor). L'engagement du TCR conduit au recrutement de SHP-1 des Siglec (voir partie B.II.5.1), réduisant la phosphorylation de Tyr-319 sur le ZAP-70 et diminuant les activités NFAT (nuclear factor of activated T cells), suggérant une régulation négative de la signalisation du TCR [132].

Un argument qui contribue également à montrer le rôle du Siglec-7 et 9 dans la régulation négative du TCR est que la mutation de leur résidu d'arginine, qui est indispensable pour la reconnaissance de l'acide sialique, pourrait réduire cette régulation négative en augmentant la phosphorylation du ZAP-70 et la production de l'IL12 [153].

Cependant, ces modèles de cellules transfectées sont critiquables, car physiologiquement et à l'état de base, l'expression des Siglec sur les cellules T est encore controversée. La sous population T CD3<sup>+</sup> (notamment les cellules T  $\alpha\beta$ ) exprime le Siglec-7 et 9 avec un taux faible et de façon donneur dépendante [132].

Le sialoadhésine (Siglec-1) peut aussi réguler négativement la différenciation des cellules T naïves en T CD8<sup>+</sup> [118] parce que ce Siglec est capable de se lier aux structures glycoconjuguées sur la surface des T CD8<sup>+</sup>, mais il ne se lie pas à celles de T CD4<sup>+</sup>. Effectivement, les souris KO pour la sialoadhésine présentent une augmentation de cellules T CD8<sup>+</sup> dans la rate et les ganglions lymphatiques [118].

Cependant, le rôle des autres Siglec dans la différenciation, la polarisation et l'activation des cellules T est encore mal exploré.

#### **4.3. Prolifération, différenciation, survie et apoptose cellulaire**

Le CD22 est bien décrit pour maintenir l'homéostasie et la survie des cellules B [147]. Les récepteurs CD33r Siglec jouent également un rôle important dans l'inhibition de la prolifération, différenciation des cellules de la lignée myélomonocytaire et des cellules CD34<sup>+</sup> (du sang cordon) ainsi que les cellules dans la leucémie myéloïde aiguë [154]. Dans un modèle murin *in vivo*, il a été montré pour la première fois que le Siglec-F est capable de contrôler l'expansion des leucocytes dans la réponse inflammatoire [129]. De plus l'engagement des molécules Siglec-8 et 9 a provoqué des phénomènes de mort cellulaire (apoptotique ou non) des cellules éosinophiles et neutrophiles [155], [156]. Cette mort cellulaire est aggravée en présence des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  ainsi que le GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) qui normalement favorisent la survie cellulaire, suggérant l'interaction complexe entre ces facteurs et les Siglec [156].



Le mécanisme de ces fonctions concerne le recrutement de tyrosines phosphatases de domaine ITIM/ITIM-like et le recrutement des SHP1, SHP2 et/ou SOCS3, bien que la réponse, synthétisée dans la Figure 20 soit différente pour chaque récepteur [106].

## **5. Signalisation des récepteurs Siglec**

### **5.1. Les domaines ITIM/ITIM-like**

Comme présentées précédemment, la majorité des fonctions des Siglec sont induites par la phosphorylation de la tyrosine des domaines cytoplasmiques (motifs ITIM et ITIM-like). Le motif ITIM des Siglec est défini comme une séquence d'acides aminés caractéristiques, qui après la phosphorylation, va créer des sites de liaison avec les protéines de type Src Homology 2 (SH2) particulièrement les SHP1 et SHP2 (domaine SH2 contenant la protéine tyrosine phosphatase 1 et 2) ou les protéines SOCS. Le niveau de phosphorylation des séquences d'acides aminés caractéristiques des ITIM, est un facteur crucial déterminant la fonction des Siglec [144]. Le motif ITIM est prépondérant sur celui de l'ITIM-like dans ce recrutement et dans la fonction inhibitrice des Siglec [128], [144]. Par ailleurs, les ITIM sont aussi importants pour d'autres fonctions cellulaires après engagement des Siglec, notamment la suppression de l'adhésion des ligands syalylés [144], [152] et l'endocytose [157]. En ce qui concerne l'ITIM-like, ce motif est impliqué dans le recrutement optimal de SHP1, mais pas dans le SHP2 ; qui est probablement un mécanisme important pour une régulation sélective de la réponse immunitaire après engagement des Siglec, au même titre que d'autres récepteurs de l'immunité innée, les TLR-4 et l'engagement des molécules adaptatrice de type TRIF et MyD88 [107].

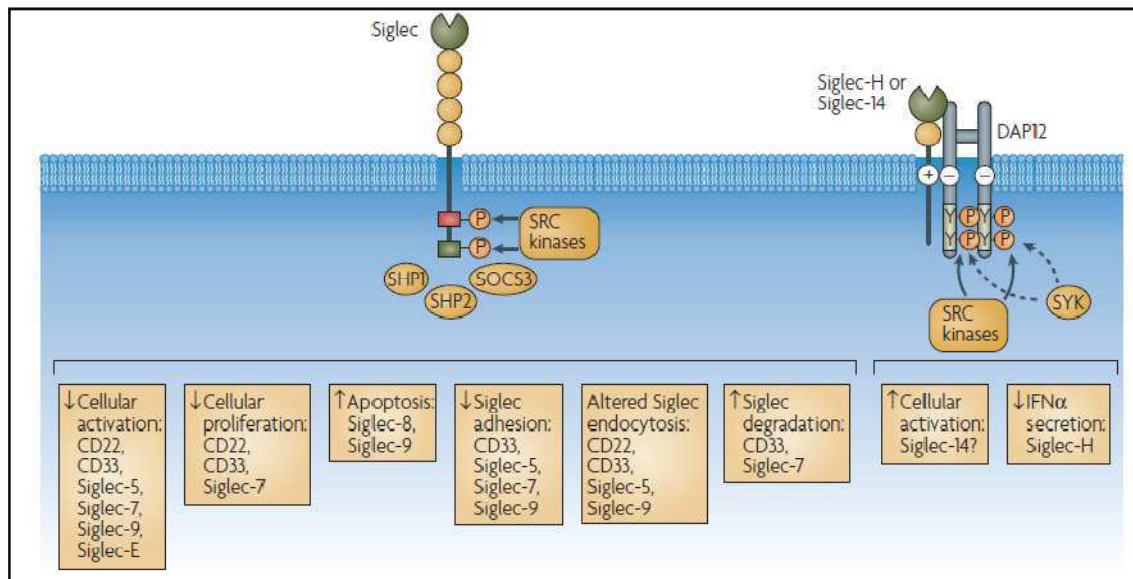
Pour le Siglec-7 [145] et le CD33 [146], les protéines SOCS peuvent adhérer sur leur ITIM en compétition avec le SHP1 et le SHP2. Ces protéines sont capables de réguler négativement la signalisation des TLR par exemple le TLR-2, 4, 7 et 9 de façon dépendante de MyD88 [118] et la signalisation des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 [158] des cellules myéloïdes, aussi le recrutement de ces molécules est un élément important pour la fonction régulatrice de ces récepteurs.

## **5.2. Les Siglec n'ayant pas de domaine ITIM/ITIM-like**

L'engagement des Siglec comme le Siglec-H [113] et le Siglec-15 [115] est capable de mobiliser une autre molécule avec une longue chaîne intracellulaire, en l'absence de motifs ITIM/ITIM-like, le DAP12. DAP12 est une protéine adaptatrice présentant un « immunorécepteur tyrosine-based activation motif » (ITAM) [117] dont la phosphorylation peut déclencher à la fois des signaux d'activation et d'inhibition par le recrutement et l'activation des molécules SYK (Spleen tyrosine kinase) [113]–[116] (Tableau 7). Le complexe DAP12 - Siglec-H réduit la sécrétion de l'IFN- $\alpha$  par les DC plasmacytoïdes en réponse à l'agoniste du TLR-9 [159].

## **5.3. « Clusterisation » des Siglec**

Certains récepteurs de type inhibiteur sont capables de se coupler avec les homologues de type activateur dont la structure du domaine extracellulaire est similaire, mais les régions transmembranaires et cytoplasmiques sont différentes [106]. Dans l'exemple du couple du Siglec-5/Siglec-14, ces protéines ont une structure très similaire, les deux molécules sont exprimées sur les cellules myéloïdes [114]. Le Siglec-5 est un récepteur ayant des fonctions inhibitrices, car il possède un motif ITIM [120] alors que le Siglec-14 est un récepteur activateur grâce à la liaison avec le DAP12 qui contient un motif activateur ITAM [114]. Ce dimère présente donc deux récepteurs ayant un résidu d'arginine différent dans le domaine Ig de reconnaissance d'acide sialique. Ceci détermine la reconnaissance différentielle des ligands syalylés et ainsi induits une signalisation activatrice ou inhibitrice [114]. Le couple Siglec-11/Siglec-16 fonctionne selon le même mécanisme [116].



**Figure 20 : Synthèse de la signalisation et des fonctions connues des Siglec**

D'après [106]

## 6. Thérapeutique et Siglec

### 6.1. Anticorps anti Siglec : cible thérapeutique des maladies de l'immunité cellulaire

L'expression caractéristique des récepteurs Siglec sur certaines cellules du système immunitaire comme l'expression du CD33 et du Siglec-7 sur les cellules myéloïdes normales comme sur les cellules malignes dans la leucémie myéloïde aiguë [154] sont utilisées comme biomarqueurs pour détecter ces cellules et les cibler spécifiquement. Le Gemtuzumab (Ozogamicin®) est un anticorps monoclonal anti-CD33 à l'usage humain, couplé avec une molécule cytotoxique, la Calicheamicine®, qui est utilisé pour le traitement de leucémie myéloïde aiguë en ciblant spécifiquement les molécules CD33, plus fortement exprimées sur les cellules tumorales que sur les cellules normales [117]. Après engagement du CD33, la Calicheamicine® est rapidement internalisée vers le lysosome et l'endosome grâce à l'activité d'endocytose du CD33. Au niveau du lysosome, la calicheamicine®, est libérée et casse les ADN des cellules leucémiques, ce qui entraîne la mort cellulaire des cellules CD33<sup>+</sup>. D'autres cibles, comme le Siglec-8 exprimés sur les éosinophiles [155], le CD22 sur les cellules B malignes [160], la sialoadhesine sur les

macrophages tissulaires [161], sont aussi utilisées dans de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## **6.2. Les ligands glycanes sialylés : une nouvelle méthode pour cibler les Siglec**

Plusieurs ligands glycanes synthétisés sont capables de se fixer sur les Siglec en compétition avec les ligands endogènes (interaction *cis*) et d'induire l'endocytose de ces récepteurs. Il a été montré que l'endotoxine de type saporin, en se liant avec le ligand synthétisé du CD22, est internalisée et provoque la mort cellulaire des lignées lymphocytaires B [117]. Ce phénomène est repris dans des approches pharmaceutiques basées sur l'utilisation des ligands des Siglec couplés à des nanoparticules ciblés vers les cellules myéloïdes et lymphoïdes [117].

## **6.3. Les autoanticorps anti-Siglec et les immunoglobulines intraveineuses (IVIg)**

Les IVIg sont utilisées pour le traitement substitutif des déficits immunitaires associés à une hypogammaglobulinémie ou agammaglobulinémie [162]. Ces IVIg sont utilisées chez les patients présentant des maladies autoimmunes ou inflammatoires systémiques [162]. Dans la composition « normale » des IVIg, il y a des autoanticorps (par exemple l'autoanticorps anti Fas et aussi des anticorps actifs anti Siglec-9) qui réagissent avec les cellules immunocompétentes, et notamment les neutrophiles, pour contrôler les auto-réactivités et la tolérance du soi [162]. Des anticorps naturels anti Siglec-8 et 9 présents dans les préparations d'IVIg ont été décrits et ces derniers sont capables d'induire une mort cellulaire des éosinophiles (phénomènes apoptotiques) et neutrophiles (phénomènes non-apoptotiques) respectivement [163], [164]. Ces effets s'aggravent en présence des CK/CH pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ), l'IFN- $\gamma$  et le GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor) [163], [164]. Ces effets pro-apoptotiques peuvent être exploités pour contrôler la prolifération cellulaire de certains désordres immunitaires. Cette approche thérapeutique peut être exceptionnellement utilisée pour limiter le nombre d'éosinophiles dans les syndromes

hyperéosinophiliques (SHE) dont les cellules sont très sensibles aux effets des autoanticorps anti Siglec-8 présent dans les IVIg [163].

## 7. Les spécificités du Siglec 7

Le Siglec-7 est un récepteur membre des CD33r Siglec, identifié en 1999 par Nicoll *et al* [122]. Le gène codant pour Siglec-7 présente une grande similarité avec ceux de Siglec-3 (CD33), Siglec-5, 6 et la protéine OBBP-like, ces gènes se trouvent sur la même région du chromosome 19a13.3 [122]. On note une forte expression de ce récepteur sur la majorité des cellules NK et une partie de cellules T-CD8<sup>+</sup>, alors que le taux d'expression est intermédiaire sur les monocytes et faible sur les granulocytes [122]. Comme les autres Siglec, le Siglec-7 présente trois régions : i) la région extracellulaire qui contient trois domaines Ig-like : un domaine « V-set » contenant l'extrémité N-terminale et deux domaines « C2-set », ii) la région transmembranaire et iii) la queue intracytoplasmique composée de deux résidus de tyrosine : ITIM et ITIM-like. Cette structure partage 80% de séquences qui sont identiques avec le Siglec-9 [165].

Le Siglec-7 est capable de se lier de façon dépendante de l'acide sialique exprimé par les érythrocytes ainsi que les ligands glycoconjugués [122]. Plusieurs travaux ont montré que les ligands présentant une forte affinité pour ce récepteur sont des molécules composées d'  $\alpha$ 2,8-disialyl (NeuAca2,8NeuAca2,3Gal) et de  $\alpha$ 2,6-sialyl (Gal- $\beta$ 1,3[NeuAca2,6]HexNAc) [122], [166]. Ces motifs sont similaires aux ligands de type glycane en forte concentration sur les érythrocytes [122]. Les gangliosides comme le GD3, GD2, GT1b contiennent également ces motifs et possèdent une forte affinité avec le Siglec-7 [138]–[140].

Initialement [122], le Siglec-7 a été classé dans le groupe des récepteurs inhibiteurs des cellules NK de par la présence des motifs ITIM au niveau de la queue cytoplasmique, sa structure étant similaire avec les autres récepteurs inhibiteurs de type Ig-like sur les cellules NK. En effet, l'engagement du Siglec-7, par un anticorps monoclonal anti Siglec-7, inhibe la fonction cytolytique des cellules NK [167]. Nicoll *et al* ont montré que, la cytotoxicité des cellules NK est diminuée vis-à-vis des cellules cibles qui possèdent les ligands d'affinité élevée avec le Siglec-7 tel que le GD3 [139]. Par ailleurs, l'expression de

ce récepteur au niveau de la membrane des cellules NK est significativement diminuée dans l'infection HIV-1 lorsque la charge virale est élevée et associée à un dysfonctionnement des cellules NK, ce qui suggère une interaction possible entre les Siglec-7 et le virus [168]. Le rôle du Siglec-7 dans l'inhibition de la réponse immunitaire est mis en évidence également dans la régulation négative de la signalisation du récepteur des cellules T [132]. De plus, le Siglec-7 est capable d'induire la réponse pro-inflammatoire des monocytes [169]. Enfin, il a été montré que la phosphorylation de motif ITIM du Siglec-7 permettant leur association avec les SHP-1 et 2 est le principal mécanisme déterminant la fonction inhibitrice de ce récepteur [152]. Son domaine C2-set (partie proximale de la membrane), mais pas l'ITIM, semble responsable de la mort cellulaire non-apoptotique des cellules de la lignée U937 [170].

Les Siglec sont des récepteurs de type inhibiteur ayant un rôle indispensable dans le contrôle des processus physiologiques cellulaires et dans la régulation négative du système immunitaire inné et adaptatif vis-à-vis des signaux de danger. Au cours de notre travail de recherche, nous avons mis en évidence une expression plaquettaire importante du Siglec-7. Nous avons montré également que l'engagement de ce récepteur plaquettaire est capable d'induire l'apoptose des plaquettes et cette fonction est strictement régulée par les voies de signalisation intra plaquettaire. Cette fonction du Siglec-7 sur les plaquettes est probablement un mécanisme de la régulation négative d'une réponse plaquettaire inflammatoire excessive (Nguyen *et al*, soumis).

## C. Le phénomène apoptotique plaquettaire

### I) Généralité sur la mort cellulaire

Malgré les progrès dans les études de la mort cellulaire depuis la description de l'apoptose en 1972 [171], la classification, la définition des modèles ainsi que les mécanismes distincts concernant ce processus sont encore discutés. En 2005, pour la première fois, un consensus de la nomenclature de la mort cellulaire, basée principalement sur les changements morphologiques a été publié [172]. Selon ce consensus, une cellule est considérée comme morte lorsqu'elle a atteint un « point de non-retour », dans lequel : i) elle perd l'intégrité de la membrane plasmique, ii) la cellule ainsi que son noyau subissent une fragmentation complète dans les corps apoptotiques et/ou iii) ces corps apoptotiques (ou les fragments) sont phagocytés par une cellule adjacente *in vivo* [172]. En 2012, la classification a été actualisée en reposant sur les changements biochimiques, permettant d'identifier treize modèles de mort cellulaire [173]. Certains de ces modèles, cependant, sont des processus cellulaires et seulement dans certaines circonstances, devenir une voie de mort cellulaire, par exemple, l'autophagie. En effet, l'autophagie empêche la sénescence cellulaire et c'est un mode de résistance au stress, permettant à la fois la survie au cours de carences nutritionnelles et la mort des cellules endommagées ou carencées en facteurs de survie [174].

La nécrose est une mort cellulaire accidentelle qui est classiquement caractérisée par une augmentation du volume cellulaire, une perte de l'intégrité membranaire et la libération du contenu intra cytoplasmique provoquant la lyse des cellules adjacentes, mais également une réponse inflammatoire [172], [174].

Lors de l'apoptose, la mort cellulaire programmée est caractérisée par la condensation nucléaire et cytoplasmique, la fragmentation de la membrane plasmique, les activités endonucléasiques et la formation des corps apoptotiques. Ce processus affecte en général des cellules isolées et les organelles restent en général intactes [175]. Le processus apoptotique joue un rôle majeur dans l'homéostasie d'un organisme dès le développement embryonnaire, notamment lors de son organisation, l'homéostasie tissulaire ou l'immunité, notamment lors de l'établissement de la tolérance du soi et l'élimination des agents étrangers ou des cellules anormales. C'est aussi le mécanisme

physiologique principal responsable de la durée de vie cellulaire en éliminant des cellules indésirables ou inutiles, permettant également d'éviter une sur-activation de système immunitaire [174]. L'apoptose physiologique est strictement régulée, mais peut devenir pathologique si cette régulation est perturbée [175].

En 1997, le concept d'apoptose plaquettaire est défini par Vanag *et al* qui ont montré pour la première fois que l'apoptose plaquettaire est induite *in vitro* par l'ionomycine [176].

## II) L'apoptose plaquettaire

### 1. Les inducteurs de l'apoptose

#### 1.1. Les plaquettes âgées

*Ex vivo*, l'apoptose plaquettaire a été mise en évidence au cours du stockage des CP [177]. Pendant ce stockage, on note l'accumulation des produits bioactifs dérivés des leucocytes résiduels ou des plaquettes elles-mêmes [178] parmi lesquels le TNF- $\alpha$  (sécrété par les leucocytes résiduels dans les CP transfusionnels), qui est capable d'activer les caspases [179], une voie majeure des processus apoptotiques.

Cet événement est probablement la conséquence séquentielle de l'activation plaquettaire au cours de temps de stockage. En effet, dans des CP leucoréduits stockés jusqu'à 16 jours, Leytin *et al* [180] ont montré que l'activation plaquettaire apparaît dès le deuxième jour (J2) de stockage alors que les marqueurs d'apoptose sont positifs très tardivement. La dépolarisation de la membrane mitochondriale et l'activation des caspases ne sont significatives qu'à partir de J13-14 ; l'expression de la phosphatidylsérine (PS) et la libération des PMP s'élèvent de façon transitoire à J2, mais l'augmentation significative de cette expression n'est observée qu'à J13.

*In vivo*, dans un modèle canin, la perte du potentiel de la membrane mitochondriale et l'augmentation de l'expression de la PS ont été observées sur la population des plaquettes âgées. Dans ces travaux, il s'agit de plaquettes circulantes 8 jours après l'injection d'estradiol avec une dose élevée ayant induit la suppression de la thrombopoïèse [181]. Les phénomènes apoptotiques plaquettaires expliquent leur



élimination de la circulation par les mécanismes de phagocytose régulés avec le processus de thrombopoïèse permettant de maintenir le nombre et les fonctions intactes des plaquettes [181].

## **1.2. Les stimuli chimiques**

Les agonistes plaquettaires comme la thrombine, la convulxine, le collagène sont capables d'induire une activation et une agrégation plaquettaire. De plus, ils peuvent éventuellement induire l'apoptose sur les plaquettes. Les effets semblables sont aussi observés avec d'autres agents (bio) chimiques (résumés dans le Tableau 8) [182].

Leytin *et al* ont montré que la stimulation par la thrombine n'induit pas l'activation et l'apoptose plaquettaire de façon corrélée. En effet, si la réponse plaquettaire est dépendante de la concentration de la thrombine, et si une concentration faible de thrombine induit l'activation plaquettaire, il faut une concentration élevée pour déclencher l'apoptose [183]. Physiologiquement, la concentration de la thrombine générée, *in vivo*, est très variable et dépend de l'intensité et de la phase de coagulation. Au cours de la phase de propagation, cette concentration peut augmenter jusqu'à 200 fois par rapport à la phase initiale de la coagulation [183]. Ces données suggèrent que les plaquettes stimulées par la thrombine à faible dose sont capables de réaliser leurs fonctions hémostatiques (activation et agrégation) et ne sont pas impliquées dans des processus apoptotiques. En revanche, aux concentrations très élevées, la thrombine – générée au cours de la phase de propagation de la coagulation et la thrombogénèse – peut efficacement déclencher l'apoptose des plaquettes. Cela signifie que l'hypercoagulation et la thrombose peuvent induire un taux d'apoptose plaquettaire important. Potentiellement, ce phénomène pourrait contribuer à la physiopathologie des thrombopénies dans les maladies associées à l'augmentation de la génération de la thrombine comme les septicémies et la coagulation intra-vasculaire disséminée [182].

Inducteur de l'apoptose	Réponses apoptotiques observées
<b>1. Antagoniste des plaquettes</b>	
Thrombine	$\Delta\Psi_m$ , Bax, Bak, Bid, Bcl-2 (-), Cyt, Cas9, Cas3, PS, PMP
SFLLNR (TRAP)	Bax, Bid, PMP
Collagène	$\Delta\Psi_m$ , Cas9, Cas3, PS (-), PMP
Collagène/Convulxine + Thrombine	$\Delta\Psi_m$ , Cas3, gelsolin, PS, PMP
Adenosine diphosphate	$\Delta\Psi_m$ (?), Bax, Bak, Bid, Cas9, Cas3, gelsolin, PS (-)
U46619	$\Delta\Psi_m$ , Cas9, Cas3, gelsolin, PS (?)
Acide arachidonique	$\Delta\Psi_m$ (-), Cas9 (-), Cas3 (-), PS (-)
Epinephrine	$\Delta\Psi_m$ , gelsolin, PS (-)
<b>2. Ionophore du calcium</b>	
A23187	$\Delta\Psi_m$ , MPTP, Bax, Bak, Bcl-2 (-), Cas9, Cas3, gelsolin, moesin, PS, rétr, PMP
Ionomycine	$\Delta\Psi_m$ , Bax, Bcl-2, Cas9, Cas3, PS, PMP
<b>3. Ionophore du potassium valinomycine</b>	$\Delta\Psi_m$
<b>4. Protonophore CCCP</b>	$\Delta\Psi_m$
<b>5. Anticorps anti-plaquettaires pro-apoptotiques</b>	
Anticorps monoclonal anti-GPIIb	$\Delta\Psi_m$ , Cas3, PS
Anticorps polyclonal anti-plaquettaire	Caspases totales, Cas3, PMP
<b>6. vWf + ristocetine</b>	$\Delta\Psi_m$ , Bax, Bak, gelsolin, PS
<b>7. BH3 mimétique</b>	
ABT-737	Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w (-), Mcl-1 (-), Cyt, Cas3, gelsolin, PS
Cosyypol	$\Delta\Psi_m$ , PS, PMP
Methoxy-antimycine	$\Delta\Psi_m$ , PS
<b>8. Rotenone - agent de dépolarisation du <math>\Delta\Psi_m</math></b>	$\Delta\Psi_m$ , Cas9, Cas3
<b>9. Peroxide d'hydrogène</b>	$\Delta\Psi_m$ , Bax, Bid, Cyt, Cas9, Cas3, PS
<b>10. Stress d'ER inducteur de TPEN</b>	Cas9, Cas8, Cas3, PS
<b>11. Anesthésie locale</b>	
Dibucaïne et tetracaïne	$\Delta\Psi_m$ , Cyt, Cas9, Cas3, PS
<b>12. Antagoniste de calmoduline</b>	
W7, tamoxifène, trifluoperazine	$\Delta\Psi_m$ , Cas3, PS
<b>13. Force de cisaillement très élevée</b>	$\Delta\Psi_m$ , Cas3, PS, Rétr, PMP

**Tableau 8 : Inducteurs d'apoptose plaquettaires**

D'après [182], [184]

*Abréviation : SFLLNR: hexapeptide Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (peptide activatrice du récepteur PAR-1; U46619: thromboxane A2 mimétique ; A23187 : ionophore du calcium ; ER : reticulum endoplasmic ; TPEN : N,N,N',N-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine ; CCCP : carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone ; W7 : N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulphonamide;  $\Delta\Psi_m$  : dépolarisation du potentiel de la membrane mitochondriale ; MPTP: formation des pores de transition de perméabilité mitochondriale ; Bax, Bak, Bid, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1: expression et/ou l'activation, et/ou la translocation vers la mitochondrie des protéines apparentées de la famille Bcl-2 indiquées ; Cyt : relargage du cytochrome c de la mitochondrie dans le cytosol ; Cas3, Cas9, Cas8 : activation des caspase-3, 9 et 8 ; gelsoline, actine, moesine : clivage des protéines du cytosquelette indiquées ; PS : exposition de la phosphatidylserine sur la membrane plaquettaire ; Rétr : rétrécissement du volume plaquettaire ; PMP : formation des microparticules plaquettaires.*

### **1.3. Les inducteurs physiques**

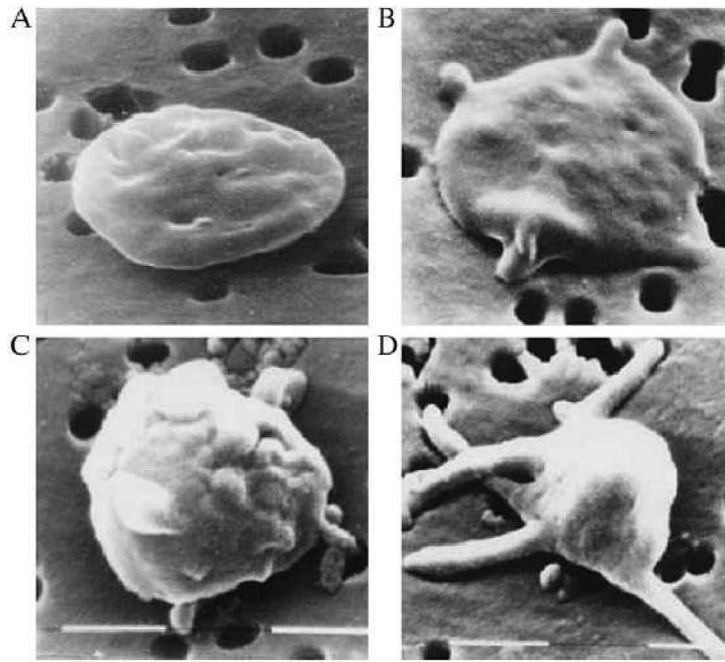
Les inducteurs physiques sont capables d'induire l'apoptose des plaquettes. Parmi eux, on trouve les contraintes des cisaillements élevées dans les vaisseaux en sténose en impliquant l'interaction entre le vWF et son récepteur plaquettaire GPIIb/IIIa, qui fonctionne probablement comme un des mécanorécepteurs permettant de transmettre les signaux d'activation et d'apoptose à l'intracellulaire [185], et la température pendant le stockage *ex vivo*. En effet, il a été montré que la conservation des CP à 37°C accélérât la viabilité des plaquettes [186] de même que la condition de stockage entre 0 et 4°C induit également l'apoptose plaquettaire par la « clusterisation » du GPIIb/IIIa qui contribue à l'activation des protéines pro-apoptotiques [187].

### **1.4. Pathologie et apoptose plaquettaire**

Plusieurs travaux *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'apoptose plaquettaire est associée avec plusieurs pathologies associées aux thrombopénies comme le purpura thrombopénique idiopathique (PTI), caractérisées par la présence d'autoanticorps de type anti GPIIb/IIIa, GPIIb/IIIa [188], ou lors de l'injection d'anticorps anti-plaquette dans un modèle murin *in vivo* [189]. D'autres pathologies sont liées au processus d'apoptose plaquettaire, telle que le syndrome de Bernard Soulier [190], l'urémie chronique [191], l'infection de bactérie *Helicobacter pylori* [192] ou encore le diabète [193].

## **2. Les changements morphologiques au cours d'apoptose**

Les changements morphologiques des plaquettes apoptotiques concernent la condensation cytoplasmique, la fusion des granules avec la membrane plasmique, le bourgeonnement de cette membrane, l'extension de filopodes, le rétrécissement de leur taille et la fragmentation des microparticules plaquettaires (Figure 21). Ces changements peuvent être détectés en microscopie électronique (à balayage ou à transmission) et sont similaires aux changements morphologiques des cellules nucléées [185].



**Figure 21 : Morphologie des plaquettes apoptotiques en microscopie électronique à balayage**

D'après [182]

*Plaquettes non stimulées avec la forme discoïde et la surface lisse (A) ; le bourgeonnement (B, C), l'extension des filopodes (D), le rétrécissement du volume (D) et la fragmentation en PMP (C, D).*

### **3. Les différentes voies d'apoptose**

Comme pour les cellules nucléées, il existe aussi trois voies d'apoptose plaquettaire : les voies intrinsèque, extrinsèque et extra-mitochondriale [182].

#### **3.1. La voie intrinsèque**

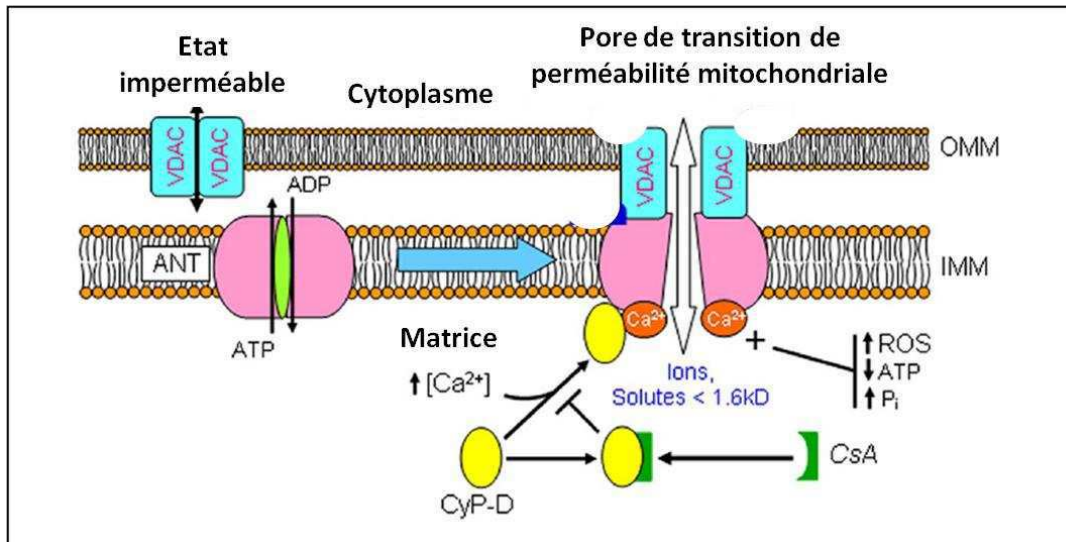
La voie intrinsèque ou encore appelée la voie mitochondriale intervient dans la majorité des cas d'apoptose plaquettaire, car c'est le lieu de convergence de multiples stimuli apoptotiques et aussi le centre de décision concernant la survie ou la mort cellulaire [194]. La perméabilité de la membrane mitochondriale régulée par les protéines de la famille Bcl-2 est un élément clé de cette voie [195]. Sous le contrôle de protéines de la famille Bcl-2, suite à la stimulation par un inducteur apoptotique, les pores de

transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) sont ouverts induisant la libération de différents facteurs apoptogéniques dans l'espace inter-membranaire mitochondriale [196].

### **3.1.1 La formation des mPTP et la dépolarisation de la membrane mitochondriale**

Les mPTP se forment entre les membranes interne et externe de la mitochondrie et sont composés des protéines VDAC (Voltage-dependent anion channel ou porine), de l'ANT (Adenin nucleotide translocator) et de la cyclophiline D (CyP-D) [196] (Figure 22). Lors de l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  mitochondriale, la régulation positive des dérivés réactifs de ROS et la disponibilité en ATP, se met en place la formation des mPTP puis la dépolarisation de la membrane mitochondriale [197].

Dans les conditions physiologiques, la membrane mitochondriale interne maintient un gradient électrochimique qui permet la synthèse d'ATP. Dès lors, les protons de la matrice sont pompés vers l'espace inter-membranaire par les complexes de phosphorylation oxydative, induisant une différence de charge appelée potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) [198]. Ce paramètre est classiquement mesuré dans le cadre de l'étude de la voie intrinsèque des phénomènes apoptotiques. L'ouverture du mPTP, d'une part induit la dépolarisation de la membrane mitochondriale interne avec la perte du potentiel transmembranaire (dépolarisation  $\Delta\Psi_m$ ). D'autre part, cela entraîne le découplage de la phosphorylation oxydative et le gonflement de la mitochondrie suite à l'entrée de l'eau dans la matrice. La membrane externe se rompt et devient perméable avec les facteurs apoptogéniques comme le cytochrome c, l'AIF (apoptosis inducing factor) et SMAC/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with Low pI). Ces facteurs sont ensuite libérés depuis l'espace inter-membranaire de la mitochondrie vers le cytosol [196].



**Figure 22 : Mécanisme de la formation des mPTP**

D'après [196]

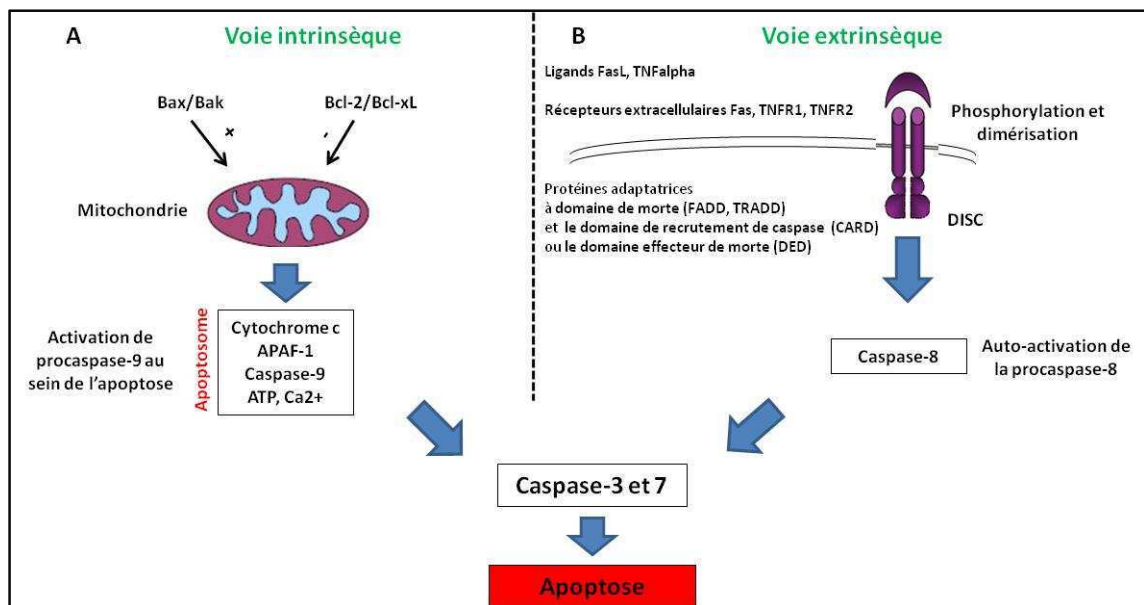
*CyP-D : Cyclophilin D ; ANT (Adenine nucleotide translocase) ; VDAC (voltage-dépendant anion channel) ; CsA (cyclosporine A) ; OMM (feuillet externe de la membrane mitochondriale) ; IMM (feuillet interne de la membrane mitochondriale) ; ROS (reactive oxygen species).*

### 3.1.2 La formation de l'apoptosome

L'apoptosome est le complexe activateur de la caspase-9 dans la voie mitochondriale. Il se compose par trois facteurs Apaf (Apoptosis Protein Activating Factor) ; le facteur cytosolique Apaf-1, le cytochrome c (Apaf-2), et la caspase-9 (Apaf-3) qui ont été caractérisés pour leur capacité à activer la procaspase-3 en présence d'ATP [196]. Les plaquettes expriment les caspase-3, 9, l'apaf-1 et le cytochrome c en quantité équivalente avec les cellules nucléées [199]. Le cytochrome c est une protéine de faible poids moléculaire de 15 kDa localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondriale ayant un rôle majeur dans la production d'ATP au sein de la chaîne respiratoire [200]. L'Apaf-1 est une protéine cytosolique contenant un domaine CARD, qui lui permet d'interagir avec la procaspase-9 et de s'oligomériser. L'Apaf-1 contient également un site de fixation d'ATP.

Le complexe de ces différents facteurs se fait selon un ordre chronologique précis. Suite à un stimulus apoptotique, le cytochrome c « se transloque » depuis l'espace inter-

membranaire mitochondriale vers le cytoplasme de la cellule, où il s'associe pour former l'apoptosome. Le cytochrome c se lie au domaine C-terminal de Apaf-1 dans une région riche en motifs répétés « WD » connus pour être impliqués dans les interactions protéines-protéines. Ceci facilite la fixation de l'ATP par l'Apaf-1 qui forme un heptamère par attachement de ses domaines N-terminaux. Enfin la procaspase-9 est recrutée suite à sa libération dans le cytosol de la mitochondrie et se lie aux domaines CARD de l'Apaf-1, ce qui provoque son activation par dimérisation. La cascade d'activation des caspases effectrices 3 et 7 est alors initiée. Elles vont être elles-mêmes recrutées au niveau du complexe et s'activer à leur tour (Figure 23A) [182], [196], [200], [201].



**Figure 23 : Principales voies d'apoptose**

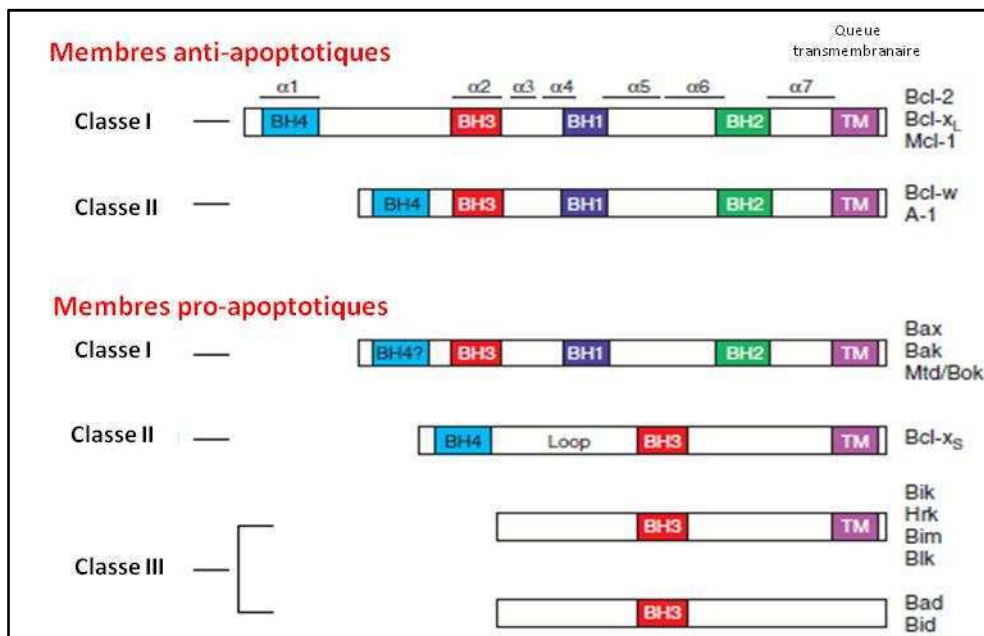
Adapté de [182], [196], [201]

A. Voie intrinsèque. B. Voie extrinsèque

### 3.1.3 La famille Bcl-2

L'ouverture des mPTP et la libération des facteurs apoptogéniques sont contrôlées par la famille Bcl-2. C'est une grande famille de régulateurs de l'apoptose qui favorisent la survie cellulaire (anti-apoptotique) ou facilitent l'apoptose (pro-apoptotique) [195]. Il a été montré que les plaquettes expriment les protéines de cette famille [198].

Les protéines apparentées à Bcl-2 sont constituées de 1 à 4 régions homologues conservées appelées BH (Bcl-2 homology domains) : BH1-BH4. Certaines protéines possèdent 4 régions comme Bcl-2 et Bcl-xl mais certaines comme Bim/Bad/Bid ne possèdent que la région BH3 qui est requise pour les activités pro-apoptotiques (Figure 24). La plupart des protéines contiennent également la séquence C-terminale du signal d'ancrage qui leur permet de cibler la membrane mitochondriale externe [195].



**Figure 24 : Classification de la famille Bcl-2**

D'après [195]

Les domaines BH entre les membres de cette famille peuvent interagir formant un réseau dynamique complexe d'homo ou d'hétérodimères en fonction de leur environnement et de leur localisation dans la cellule [195]. Les combinaisons spécifiques des domaines BH peuvent influencer sur les capacités de dimérisation de ces protéines. L'hétérodimérisation entre les protéines pro et anti-apoptotiques peut neutraliser leur activité suggérant ainsi que l'expression relative d'une protéine par rapport à l'autre influence le devenir de la cellule [195]. La classification des protéines apparentées à Bcl-2 en deux groupes comme ci-dessous est basée sur leur structure et leur fonction : les



protéines pro-apoptotiques peuvent interagir avec les protéines VDAC pour ouvrir les mPTP, rendre la membrane externe perméable, provoquer une chute du gradient des ions  $H^+$  et permettre la libération du cytochrome c. *A contrario*, les protéines anti-apoptotiques maintiennent le canal fermé et le gradient d'ions  $H^+$ , la membrane externe est très peu perméable ce qui empêche la libération du cytochrome c. En absence de signal de mort cellulaire, ces molécules sont généralement localisées dans des compartiments cellulaires différents. Les protéines anti-apoptotiques se trouvent au niveau de la membrane mitochondriale externe, du réticulum endoplasmique alors que les protéines pro-apoptotiques comme Bax/Bad/Bid sont libres dans le cytosol. Sous l'influence d'un signal de mort cellulaire, ces protéines changent leur conformation et se localisent au niveau de la membrane mitochondriale externe [195].

Un stress oxydant tel que le peroxyde d'hydrogène ou les peroxydes organiques peuvent agir directement sur les mPTP en favorisant la liaison du  $Ca^{2+}$  indispensable pour l'ouverture des pores [202]. Si ce stress est trop important, la cellule meurt majoritairement par nécrose plutôt que par apoptose [197].

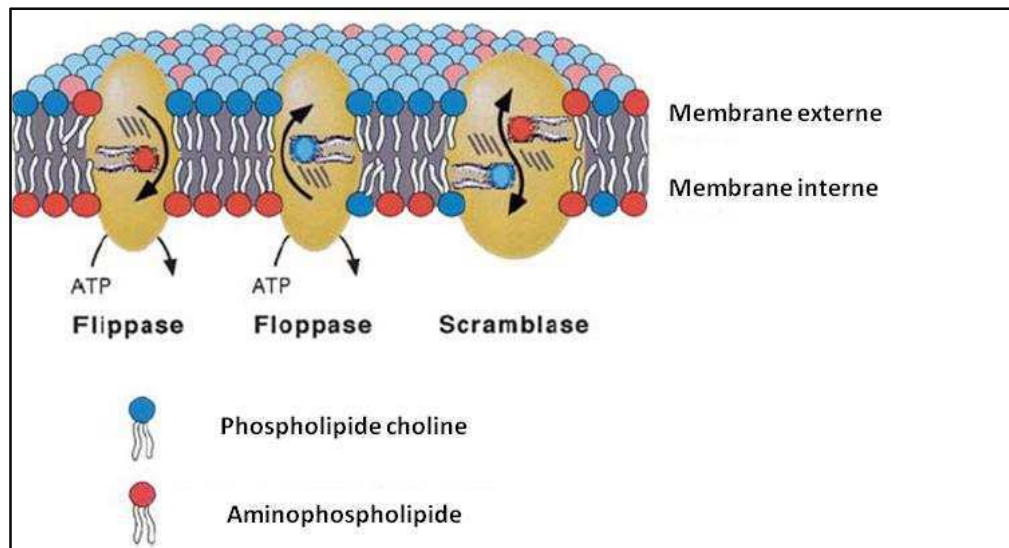
### **3.2. La voie extra-mitochondriale**

Les stimuli (bio)-chimiques et les forces de cisaillement élevées sont capables d'induire des réponses apoptotiques plaquettaires de type extra-mitochondriales matérialisées par l'activation de la caspase-3, le clivage de la gelsoline (protéine de 82kDa cytosolique, activée par la présence des ions  $Ca^{2+}$  en forte concentration) et les autres protéines du cytosquelette (comme l'actine et la myosine), le bourgeonnement de la membrane plasmique, l'exposition des phosphatidylsérines (PS) sur le feuillet externe de la membrane plasmique, l'extension des filopodes, le rétrécissement du volume cellulaire et la libération des MPs [182].

#### **3.2.1 L'exposition de la PS**

En condition physiologique, la distribution des phospholipides sur la membrane plasmique des plaquettes, tout comme sur celle des cellules eucaryotes, est asymétrique. Ce phénomène est régulé grâce aux enzymes de type translocase (flippases et floppases)

dépendants d'ATP [203]. La PS est un phospholipide anionique situé sur le feuillet interne de la membrane plasmique. En présence de signaux apoptotiques, on observe une élévation de la concentration du  $Ca^{2+}$  : la PS s'expose sur le feuillet externe de membrane plasmique par l'activation de scramblase qui i) catalyse le transport bidirectionnels des phospholipides des flippases et floppases et ii) inhibe l'action de la translocase des aminophospholipides (Figure 25) [203], [204]. La génération des ROS peut aussi initier l'exposition du PS en formant des mPTP, cette exposition apparaît rapidement après une perte du potentiel de la membrane mitochondriale [205]. Cet événement nécessite la participation des protéines Bak/Bax [205], [206]. L'exposition du PS est un indicateur important des plaquettes apoptotiques [207].



**Figure 25 : L'échange de phospholipides entre deux feuillets lipidiques de la membrane cellulaire**

D'après [204]

### 3.2.2 L'activation de la caspase-3

Les caspases (cysteinyl-aspartate-cleaving proteases) constituent un groupe d'enzymes de type protéases des cystéines qui jouent le rôle essentiel dans l'apoptose. Ce groupe contient 11 enzymes chez humain [201]. Les caspases sont localisées dans le cytoplasme sous forme inactivée en "procaspase". En réponse aux signaux apoptotiques,

les procaspases contenant un domaine adaptateur comme c'est le cas des caspases initiateuses 8, 9, et 10, sont recrutées soit i) dans un complexe membranaire appelé DISC (death-inducing signaling complex) qui caractérise la voie extrinsèque des caspases-8 et 10, soit ii) au niveau mitochondrial sous la forme d'un complexe appelé apoptosome caractérisant la voie intrinsèque de la caspase-9 .

Ces caspases initiateuses activées vont à leur tour activer les autres procaspases n'ayant pas de domaine adaptateur, comme les caspase-3 et 7 (caspases effectrices) et leurs effecteurs pour cliver les substrats apoptotiques comme le gelsoline et la fodrine [201]. L'activation dépendante de l'ATP des caspase-3, 9 et le relargage du cytochrome c sont spécifiques dans le phénomène apoptotique [198], [199].

### **3.2.3 La formation des microparticules plaquettaires**

Les PMP ou vésicules plaquettaires sont des molécules de taille inférieure à 0,5 µm portant les antigènes spécifiques des plaquettes intactes comme la GPIIb/IIIa, ou la GPIb ; elles représentent 70 à 90% des microparticules circulantes. Ces molécules sont anti-coagulantes, pro-coagulantes et pro-inflammatoires [208]. La segmentation en vésicules est un événement terminal des plaquettes apoptotiques quelle que soit l'étiologie [209]. Le détachement de la membrane plasmique de la corticale d'actine du cytosquelette ou la perte d'association entre la membrane et le cytosquelette est un élément central de ce processus. Il y a plusieurs mécanismes induisant ce détachement dont l'élévation de la concentration du  $Ca^{2+}$  est le principal [209]. Le  $Ca^{2+}$  peut interagir directement avec le phospholipide anionique ou avec les protéines impliquées dans la formation des PMP. Effectivement, l'activation de la calpaïne – une protéinase qui est capable de cliver les protéines de la membrane de squelette (membrane plasmique) comme l'actine ou la fodrine est dépendant de l'augmentation de la concentration du  $Ca^{2+}$  intraplaquettaire induite par les agonistes (comme la thrombine et le collagène) [209]. De plus, cette protéinase peut dégrader la kinase diphosphoinositide (PIP kinase) qui favorise la production du  $PIP_2$  à partir de PIP qui peut inhiber la formation des PMP [209]. Par ailleurs, les PMP peuvent aussi être générées en présence du complément C5b-9 [210] ou par l'activation des protéines kinase comme la calmoduline [211] indépendamment de la calpaïne.

### 3.3. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque ou encore appelée voie des récepteurs de mort cellulaire, est déclenchée par l'interaction entre ces récepteurs et les ligands de mort cellulaire et les protéines adaptatrices (Figure 23B) [182]. Les plaquettes expriment l'ARN messager de la plupart de ces molécules [182] (Tableau 9). Cependant, cette voie apoptotique plaquettaire est peu étudiée. À ce jour, le « Decoy récepteur 2 » (DcR2) est le seul récepteur de mort cellulaire dont l'expression sur la membrane plaquettaire a été mise en évidence [212].

Plenchette *et al* ont montré que ce récepteur est exprimé sur les plaquettes dès le J1 du stockage ; c'est un marqueur précoce des lésions plaquettaires pendant leur stockage alors que l'expression des autres récepteurs de mort cellulaire comme DcR1, DR4 (Death receptor - TRAILR1), DR5 (TRAIL2) ainsi que leur ligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand ou Apo2L) n'a pas été détecté sur les plaquettes pendant 11 jours de stockage [212] (Tableau 9).

Les DcR sont aussi des membres de la famille des TNFR qui ne contiennent pas de domaines de mort cellulaire cytoplasmique ; ils ne sont pas capables de se lier avec les protéines adaptatrices pour induire l'apoptose [182]. Au contraire, leur liaison avec les ligands de mort cellulaire (comme le TNF- $\alpha$  et FasL) réduit la liaison de ces ligands avec les autres récepteurs de mort, conduisant à la régulation négative de l'apoptose plaquettaire [182]. Au cours du temps de stockage, l'expression plaquettaire de ces récepteurs est augmentée [212] ce qui peut en partie expliquer pourquoi le phénomène d'apoptose des plaquettes dans les CP est relativement faible [180].

Marqueurs		Plaquettes fraîches		Plaquettes stockées
		Jour 0	Jour 1	Jour 4 - 11
		ARNm	Protéine	Protéine
Ligand de mort	TRAIL	(+)	(-)	(-)
	Fas	(-)		
Récepteurs de mort	TNFR1	(+)		
	DR3	(+)		
	DR4	(+)	(-)	(-)
	DR5	(+)	(-)	(-)
	Fas	(-)	(-)	(-)
Decoy récepteurs	DcR1		(-)	(-)
	DcR2		(+)	↑
Protéines adaptatrices	TRADD	(+)		
	RIP	(+)		
Activation de caspase	Caspase-8	(+)	(-)	(-)
	Caspase-10	(-)		

**Tableau 9 : Marqueurs plaquettaire de voie d'extrinsèque d'apoptose**

D'après [182]

Concernant les caspases de la voie extrinsèque, les plaquettes expriment les procaspase-8, 10 et l'ARN messager de la caspase-8. L'expression de ces molécules n'est pas modifiée au cours du stockage des plaquettes [177], [212]. Récemment, Mutlu *et al* ont montré une modulation de l'expression de la caspase-8 activée sur la membrane plaquettaire après la stimulation par l'ABT-737 (une molécule mimétique des protéines contenant seulement le domaine BH3) et de l'A23187 (un ionophore du calcium). Cette modulation semble mitochondriale et indépendante des récepteurs de mort cellulaire [213].

Dans un modèle murin, Piguet *et al* [179] ont montré que l'injection du TNF pourrait induire l'activation des caspase-1, 3, 6, 8 et 9 plaquettaires au travers du TNFR1 ; cependant l'expression plaquettaire du TNFR1 et 2 est controversée [179]. Cette voie d'apoptose plaquettaire est donc encore à explorer.

La voie extrinsèque peut être régulée par le cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein) qui inhibe le recrutement et l'activation des caspase-8 et 10 dans le complexe DISC [182].

### **3.4. L'interconnexion des différentes voies d'apoptose**

Le déclenchement de la réponse apoptotique par la voie mitochondriale suite à une stimulation des récepteurs de mort cellulaire définit deux types de cellulaires : type I et type II. Pour les cellules de type II, le clivage de Bid – une protéine de la famille Bcl-2 contenant uniquement le domaine BH3, est nécessaire pour l'apoptose induite par les ligands de mort cellulaire. Ce n'est pas le cas pour les cellules de type I, car l'activation de la voie extrinsèque est suffisante pour provoquer l'apoptose [214].

L'interconnexion des différentes voies d'apoptose est dépendante de la caspase-8 qui est activée par la voie extrinsèque, mais une fois activée, elle contribue à cliver les molécules Bid en tBid, qui après translocation sur la membrane mitochondriale, initie la voie intrinsèque, induisant l'activation de la caspase-3 et enfin l'apoptose (Figure 26) [214].

Au niveau plaquettaire, l'activation de la caspase-8 par la voie extrinsèque – phénomène clé de cette interconnexion des différentes voies d'apoptose, comme présentée ci-dessus n'est pas encore documentée.

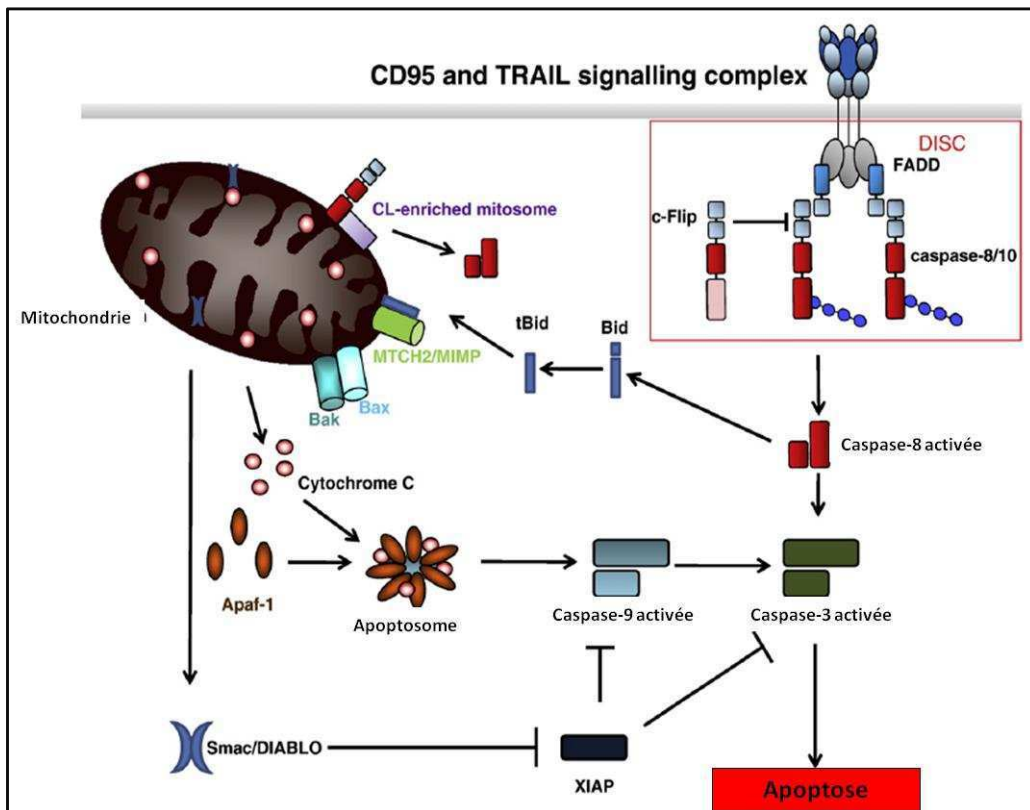


Figure 26 : Interconnexion des différentes voies d'apoptose des cellules nucléées

D'après [214]

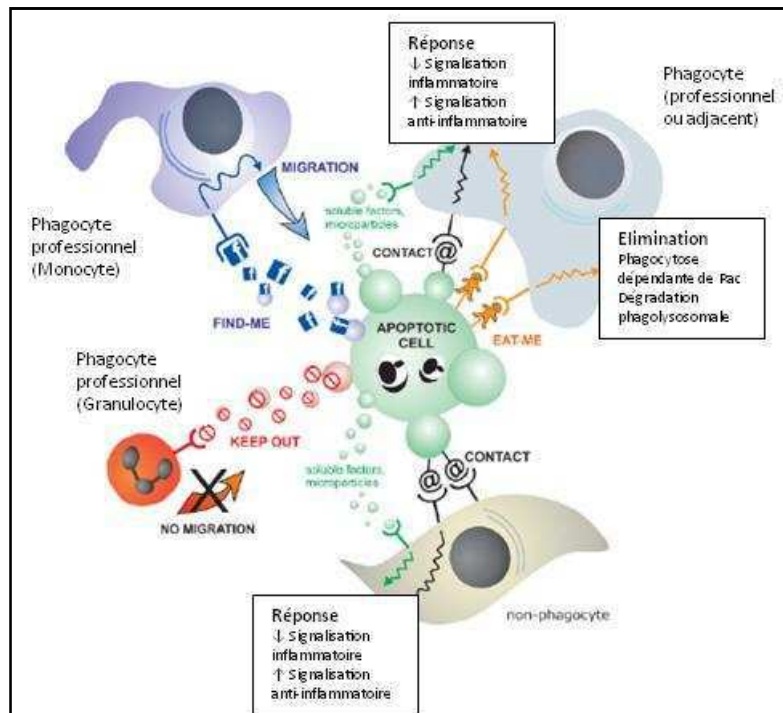
#### 4. L'élimination des plaquettes apoptotiques et des PMP

L'élimination des cellules apoptotiques en général est réalisée en trois étapes : la reconnaissance, la réponse et l'élimination (Figure 27) [215].

En effet, au cours d'apoptose, les cellules libèrent les signaux « find-me » qui sont des molécules chimio-attractants comme le fractalkine (CX3CL1) ou les nucléotides ATP et UTP, conduisant à la migration des phagocytes professionnels. La reconnaissance des cellules apoptotiques implique la perte des signaux « don't-eat-me » comme le CD31, CD47 ; ainsi que l'exposition des signaux « eat-me » sur leur surface, notamment la PS et les ACAMP (Apoptotic-cell-associated molecular patterns) [215], [216].

Les ACAMP sont similaires aux PAMP. Ces motifs sont également reconnus par les récepteurs PRR du système d'immunité innée notamment le CD14 (considérée comme la reconnaissance du « non soi ») [216].

Les phagocytes reconnaissent la PS sur les cellules apoptotiques (la reconnaissance de l'altération « du soi ») selon deux mécanismes : direct et indirect concernant les molécules de pontage solubles comme Gas6 ou MFGE8 [207]. A ce jour, de nombreux récepteurs sur les phagocytes étant capables de reconnaître la PS ont été identifiés [215]. En effet, la reconnaissance directe mobilise les récepteurs de type « scavengers » comme le CD36, le CD68 [217] ainsi que les autres récepteurs identifiés récemment comme TIM (T cell immunoglobulin and mucin), BAI1 (brain angiogenesis inhibitor 1) et la protéine membranaire Stabilin 2 contenant le motif EGF [207]. La reconnaissance indirecte concerne principalement l'intégrine  $\alpha\beta3$  (par l'intermédiaire de la molécule MFGE8) et le récepteur Mer kinase (par l'intermédiaire Gas6) [207].



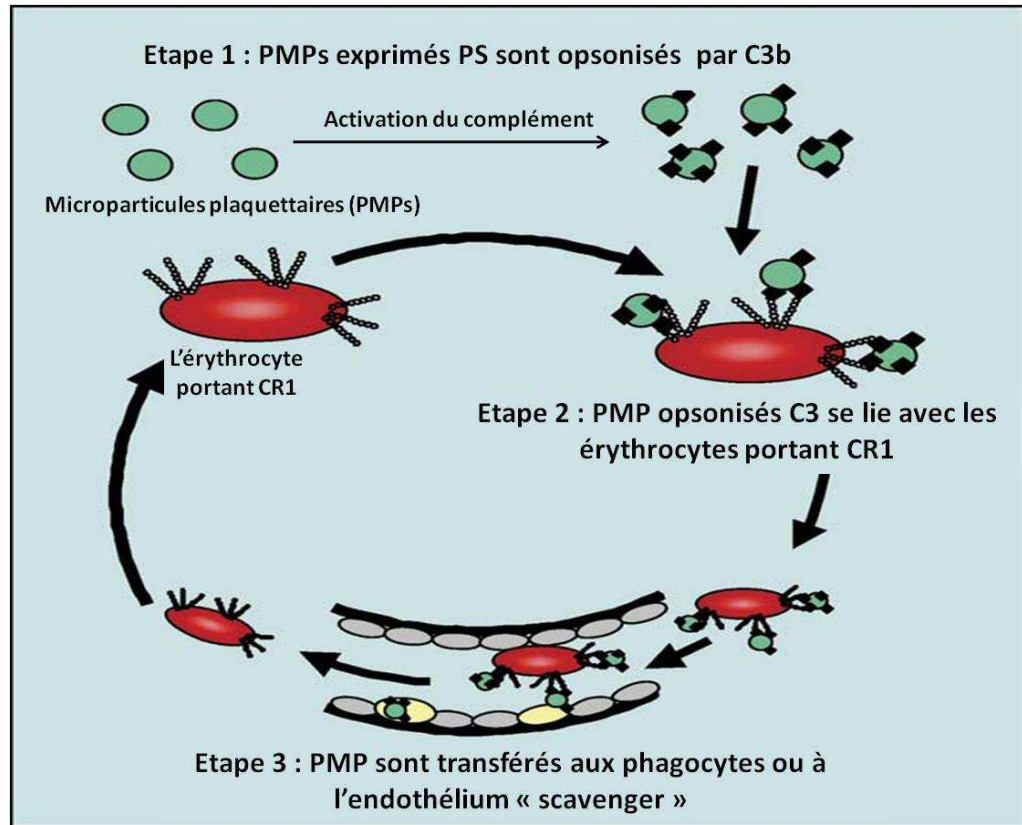
**Figure 27 : Elimination des cellules apoptotiques par les phagocytes**

D'après [215]

Les PMP sont opsonisées principalement par le C3b du complément, participant ainsi, rapidement, à l'élimination des PMP de la circulation [209]. L'exposition de la PS sur la surface des PMP peut favoriser l'opsonisation du C3 qui est clivé en C3b et l'activation



de la cascade du complément [209]. Les particules opsonisées sont liées avec le CR1 sur les érythrocytes, puis éliminées par les phagocytes au niveau de la rate (Figure 28) [209].



**Figure 28 : Élimination des PMP**

D'après [209]

## 5. Rôle et implication en clinique de PMP

Plusieurs travaux [208], [209], [218] ont démontré le rôle important de PMP dans l'hémostase, la thrombose et les processus inflammatoires. Dans le cadre de nos travaux, nous abordons principalement ses derniers aspects.

Les PMP sont riches en récepteurs membranaires (les glycoprotéines, les récepteurs CK/CH et les récepteurs d'adhérence spécifiques des plaquettes [208], le facteur de coagulation Va et possèdent des activités de prothrombinase contribuant à leurs propriétés procoagulantes [210]. Cliniquement, l'élévation du taux de PMP circulant est associée avec un risque thrombotique plus important [208]. De plus, ces molécules sont

aussi capables d'induire des effets anti-coagulants en favorisant la capacité d'inactiver le facteur Va de la protéine C activée [218] donc le déficit en PMP peut provoquer des troubles de l'hémostase [208].

Contenant les molécules solubles (comme le sCD40L, le PF4, le RANTES) et des récepteurs associés à l'inflammation (comme les récepteurs des CK/CH), les PMP peuvent être considérées comme des bio-marqueurs et des effecteurs des processus inflammatoires. Ainsi, les PMP contiennent une quantité suffisante de RANTES et ils déclenchent une réponse de la part des EC activées, favorisant le recrutement des monocytes [219]. Le rôle des PMP a été décrit dans plusieurs pathologies comme les maladies cardio-vasculaires, autoimmunes et infectieuses [208].

Par ailleurs, ces vésicules contribuent à réguler la réponse immune en délivrant les molécules immuno-modulatrices plaquettaires aux autres cellules du système immunitaire (transcellular delivery modules), ainsi la libération du CD154 (CD40L) soluble plaquettaire et l'engagement du CD40 des cellules B permet l'optimisation de la réponse immunitaire et la production d'IgG spécifique [220]. De plus, la libération plaquettaire du RANTES active l'endothélium, induisant le recrutement des monocytes participant à l'état inflammatoire notamment observé lors de l'athérosclérose [219]. Les PMP peuvent aussi transférer des récepteurs membranaires plaquettaires, tels que le CD41a (GPIIb/IIIa), CD61 (GPIIIa), CD62P, CXCR4 et le PAR-1, aux cellules progénitrices hématopoïétiques de type CD34<sup>+</sup> et augmenter leur adhérence sur l'endothélium ainsi que réduire le temps de la prise de greffe de moelle osseuse chez des souris [221].

Les PMP sont également capables de moduler les interactions entre les cellules. En effet, l'expression et la libération de l'acide d'arachidonique des PMP peuvent augmenter l'adhérence des cellules cibles inflammatoires, ce qui entraîne une régulation positive des intégrines et des molécules adhérentes favorisant l'adhésion des monocytes et des EC [222].

## 6. La régulation de l'apoptose plaquettaire

### 6.1. Les intégrines plaquettaires

#### 6.1.1 La GPIIb/IIIa

La GPIIb/IIIa (également appelé intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ) est le récepteur pour le Fg et le facteur vWF dont l'expression est abondante sur la surface membranaire des plaquettes. L'activation de ce récepteur est un élément clé dans l'hémostase et la thrombose [38]–[40]. Dans ce paragraphe, le rôle de la GPIIb/IIIa sera étudié au cours de la régulation de la réponse apoptotique plaquettaire.

#### **La régulation positive de l'apoptose plaquettaire par la GPIIb/IIIa**

En utilisant un modèle d'injection d'un anticorps de type agoniste ciblé contre la sous-unité GPIIb – le MWReg30, Leytin *et al* ont montré que cet anticorps est capable d'induire l'apoptose des plaquettes murines *in vivo* en engageant deux mécanismes intraplaquettaires : l'un mitochondrial et l'autre extra-mitochondrial ; on observe alors une thrombopénie [223]. Cependant, ces effets ne sont induits que par l'administration des anticorps monoclonaux anti-GPIIb/IIIa entiers. En effet, ce n'est pas le cas, lors de l'utilisation des fragments F(ab)<sub>2</sub>, ce qui indique que ce mécanisme est dépendant du fragment Fc [224]. Ces données suggèrent que les intégrines GPIIb/IIIa sont impliquées directement dans la signalisation pro-apoptotique des plaquettes [223].

Chez l'homme, des résultats similaires ont été aussi observés *in vivo au cours des* PTI caractérisés par la présence d'autoanticorps anti GPIIb, GPIIb $\alpha$  et par une thrombopénie corrélée avec une apoptose plaquettaire ainsi que la capacité des DC à présenter des fragments de plaquettes apoptotiques aux cellules T [188].

De plus, la stimulation des plaquettes par des agonistes tels que la thrombine, le collagène, l'ADP ou l'ionophore du calcium provoque le changement conformationnel des GPIIb/IIIa d'état non activé vers un état activé par une signalisation « inside-out » ; cela permet ainsi la liaison de ce récepteur avec les ligands de type vWF, le Fg plaquettaire et/ou plasmatique. Dès lors se met en place une signalisation pro-apoptotique de type « outside-in » qui est observé dans l'activation de la caspase-3 [225].

### **La régulation négative d'apoptose plaquettaire par les antagonistes du GPIIb/IIIa**

La liaison entre la GPIIb/IIIa avec ses ligands, notamment le Fg est dépendante de la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) exprimée constitutivement. Les antagonistes synthétiques de la GPIIb/IIIa, contenant cette séquence RGD, peuvent se lier avec ce récepteur, ils inhibent alors son changement conformationnel, transmettant la signalisation anti-apoptotique [182], [225]. Leytin *et al* ont montré que les deux antagonistes du récepteur GPIIb/IIIa, le Tirofiban<sup>®</sup> (une molécule non-peptide présentant une séquence RGD) et l'Eptifibatide<sup>®</sup> (une hepta-peptide cyclique présentant une séquence KGD - Lys-Gly-Asp) peuvent réduire l'apoptose plaquettaire en inhibant l'activation de la caspase-3 [225].

Cependant, certains antagonistes du récepteur GPIIb/IIIa contenant le peptide RGD ou une structure mimétique comme l'Orbofiban<sup>®</sup> et le Xemilofiban<sup>®</sup> peuvent, au contraire, favoriser l'apoptose par l'activation directe de la procaspase-3 [226]. Cette régulation est indépendante de l'engagement de l'intégrine car la procaspase-3 contient également un site de liaison pour le RGD [227].

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle des IVIg dans l'inhibition de l'apoptose plaquettaire observée lors du traitement des PTI et certaines maladies autoimmunes induites par les autoanticorps anti GPIIb/IIIa mais pas anti GPIIb $\alpha$  [223], [228]. Cette inhibition intervient au niveau de la voie extra-mitochondriale [223]. À ce jour, le mécanisme d'action d'IVIg dans l'apoptose n'est pas totalement identifié, mais dépendrait du type de cellule ciblé. Ainsi, contrairement à l'effet anti-apoptotique d'IVIg sur les plaquettes, les autoanticorps anti Siglec-8 contenus dans l'IVIg peuvent induire l'apoptose des éosinophiles, comme présenté précédemment [164]. Concernant les plaquettes, les IVIg réduisent significativement l'apoptose induite par des anticorps anti-GPIIb (MWRReg30) *in vitro* et *in vivo*; cependant ceux-ci ne semblent pas capables d'inhiber la liaison de ces anticorps et les plaquettes [229]. Ces données suggèrent que les IVIg régulent négativement l'apoptose par un phénomène d'inhibition compétitive de l'interaction des récepteurs Fc des cellules phagocytaires avec les fragments Fc sur les anticorps anti-GPIIb, plutôt que par l'inhibition de la liaison de ces anticorps sur les plaquettes.

### 6.1.2 La GPIb $\alpha$

La GPIb $\alpha$  est le récepteur du vWF et cette glycoprotéine de surface plaquettaire est capable de participer au déclenchement de l'apoptose des plaquettes. Li *et al* ont montré que l'interaction du vWF avec le récepteur GPIb $\alpha$  après stimulation par la Ristocétine, active la voie intrinsèque et extra-mitochondriale de l'apoptose plaquettaire. Ce phénomène n'est pas observé lorsque les plaquettes sont traitées avec vWF ou la Ristocétine seule, ou en présence d'anticorps anti GPIb $\alpha$  (bloquant l'interaction de ce récepteur avec vWF) [230].

Dans cette même étude, les auteurs ont indiqué que la réponse apoptotique est fortement diminuée lorsque le récepteur GPIb-IX est muté au niveau de la queue cytoplasmique, perdant ainsi, le site de liaison pour la protéine de signalisation intracellulaire 14-3-3 $\zeta$ . Ces travaux suggèrent que ce site est essentiel pour la régulation positive de l'apoptose plaquettaire induite par l'interaction de la GPIb $\alpha$  et le vWF [230]. Enfin, l'apoptose des plaquettes peut être aussi déclenchée par la « clusterisation » de la GPIb $\alpha$  induite par l'incubation de plaquettes à 0°C pendant 4 h et impliquant la signalisation de la protéine de signalisation intracellulaire 14-3-3 $\zeta$  [187].

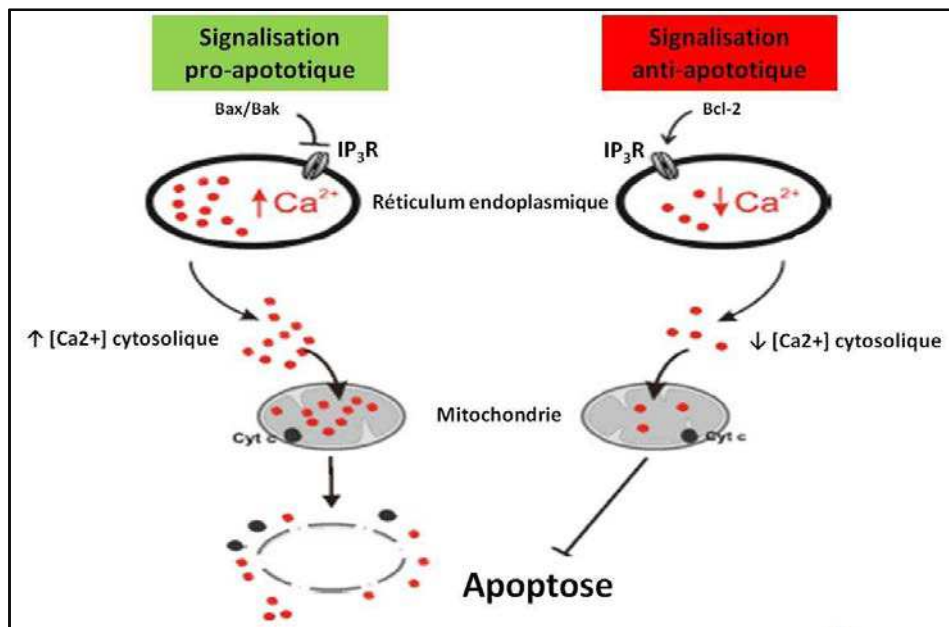
### 6.2. Le Calcium

Après la stimulation plaquettaire par les agonistes comme la thrombine, la concentration du Ca<sup>2+</sup> cytosolique est augmentée grâce à la libération des stocks intracellulaires dans le réticulum endoplasmique [231]. Cette libération est déclenchée par la mobilisation des Inositol triphosphates (IP3) après activation de la phospholipase C (PLC) permettant l'entrée du flux du Ca<sup>2+</sup> depuis le milieu extracellulaire (encore appelé SOCE - Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry) [231]. Il existe aussi un autre mécanisme indépendant du stock de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, induit par le diacylglycérol (produit de l'activation du PLC) (encore appelé NCCE - non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry) [231]. Ces deux mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'exposition de la PS induite par les antagonistes comme la thrombine et la convulxine [205], [231].

L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique induit l'élévation du Ca<sup>2+</sup> mitochondrial qui, à son tour, déclenche l'ouverture de la mPTP, la libération de cytochrome c ainsi que

d'autres facteurs pro-apoptotiques comme les procaspases, l'AIF, les protéines pro-apoptotiques apparentées à la famille Bcl-2 et l'activation irréversible des caspases effectrices [197] ; en parallèle, l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial contribue à l'activation de la calpaïne, une protéinase capable de cliver les protéines squelettiques de membrane pour la formation des PMP [209].

Pinton *et al* ont montré que les protéines anti-apoptotiques comme le Bcl-2 régulent négativement l'apoptose plaquettaire induite par la céramide en diminuant la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum endoplasmique (Figure 29) [232]. *A contrario*, les protéines pro-apoptotiques comme Bax/bak, en augmentant la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  depuis les stocks intracellulaires peuvent favoriser l'apoptose [233] (Figure 29).



**Figure 29 : Régulation dans les phénomènes apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2 par l'intermédiaire de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$**

D'après [234]

*IP<sub>3</sub>R* : récepteur d'*IP<sub>3</sub>*

Cependant, dans certaines conditions telles que la stimulation des plaquettes par la thrombine, les événements apoptotiques (comme l'activation et la translocation des

caspase-3, 9) sont induits indépendamment avec la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique [235], cela est assigné à la génération des ROS [236] (voir paragraphe C.6.4.1).

### **6.3. La régulation de l'apoptose par les composants du mPTP**

#### **6.3.1 Le CyP-D**

Le CyP-D est synthétisé dans le cytosol et pénètre dans la mitochondrie en utilisant une séquence de ciblage mitochondrial possédant une extrémité N-terminale qui serait ensuite clivée [197]. La régulation positive du CyP-D dans l'ouverture des mPTP est corrélée à la fonction de la cyclosporine A (CsA) [197]. Il a été montré que la CsA et ses analogues par exemple le 6-méthyl-ala-CsA, 4-méthyl-val-CsA (NIM-811) sont capables de bloquer l'ouverture des mPTP, en inhibant les activités du CyP-D par la formation d'un complexe avec la cyclophiline A, qui inhibe la calcineurine - une protéine phosphatase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  [197], [198]. *In vivo* l'ouverture des mPTP des souris knock-out en CyP-D n'est plus sensible à la CsA, suggérant l'importance de cette molécule dans la formation des mPTP [237].

#### **6.3.2 ANT - VDAC**

La régulation de l'apoptose plaquettaire par les molécules ANT (Adenine Nucléotide Translocator) dépend de ses ligands [197]. Parmi un grand nombre de nucléotides, seuls les substrats de type ADP, dADP et ATP peuvent interagir avec le mPTP, dont l'effet est dépendant du changement de la conformation des ANT [197]. En présence des substrats transportables (ADP, dADP ou ATP), l'ANT bascule entre deux conformations : i) soit le site de liaison avec ADP/ATP est sur le côté matrix de la membrane mitochondriale interne (m-state) inhibant l'ouverture des mPTP ; ii) soit ce site se trouve sur le côté cytoplasmique (c-state) activant l'ouverture des mPTP [197].

Le VDAC (Voltage-Dependent Anion-selective Channel), encore appelé porine, est aussi un composant des mPTP, formant un complexe avec l'ANT et le CyP-D. Cependant, l'ouverture des mPTP ne semble pas strictement dépendant des molécules VDAC [197].

## **6.4. La régulation de l'apoptose plaquettaire par les voies intraplaquettaires**

### **6.4.1 Les ROS**

Les ROS plaquettaire dont le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) endogène généré en stimulation physiologique par la thrombine ou la convulxine ou dans certaines conditions pathologiques telles que le diabète ou l'ischémie/la reperfusion [238]. Cette génération de ROS stimule la protéine pp60<sup>src</sup> de façon indépendante avec la concentration en Ca<sup>2+</sup>, activant l'entrée du flux du Ca<sup>2+</sup> depuis le milieu extracellulaire (SOCE) qui est impliquée dans l'apoptose plaquettaire [239]. Par ailleurs, ROS régule positivement l'apoptose en formant des mPTP induisant la libération du cytochrome c, l'exposition de la PS, l'activation des caspase-3, 9 et la translocation des protéines pro-apoptotiques Bax/bak vers la mitochondrie indépendamment de la concentration du Ca<sup>2+</sup> cytosolique [205], [235], [236]. Des résultats similaires ont été observés après stimulation des plaquettes par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène dans des modèles *in vitro*, et *in vivo* dans des modèles murins où la co-stimulation des plaquettes murines par la thrombine et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit une apoptose importante [236].

*A contrario*, les effets pro-apoptotiques de la thrombine sont diminués significativement en présence des inhibiteurs de ROS ou des catalases [205], [236]. Ces résultats suggèrent que le peroxyde d'hydrogène généré dans les plaquettes lors de la stimulation par un antagoniste (tel que la thrombine) est indispensable pour la régulation positive de l'apoptose induite par ces facteurs.

### **6.4.2 La protéine kinase C**

La protéine kinase C (PKC) en particulier l'iso-forme PKC delta est connue comme un facteur pro-apoptotique pour plusieurs types de cellules nucléées (par exemple les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses ou la lignée des cellules parotide C5) [240]. Au niveau plaquettaire, il a été confirmé que l'activation et la translocation des caspase-3 et 9 nécessitent l'activation de la PKC et la polymérisation de l'actine [235].

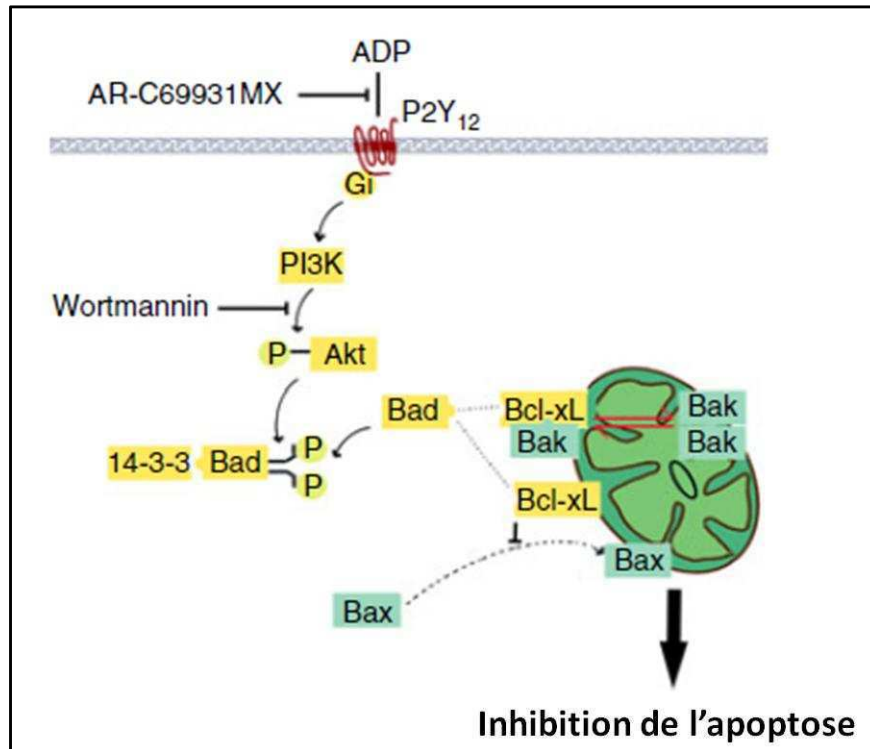
Cependant, Harper *et al* ont montré que lorsque les récepteurs PAR1 sont engagés, la PKC régule négativement la libération du Ca<sup>2+</sup> à partir de ses stocks intracellulaires et



l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, ce qui entraîne une réduction de l'exposition des PS des plaquettes ; ces effets ne sont pas observés dans le cas d'une activation du récepteur PAR4 [241].

#### **6.4.3 Le P2Y12 inhibe l'apoptose plaquettaire en activant le couple PI3k/Akt**

Après stimulation des plaquettes par l'ABT-263<sup>®</sup> (dérivé oral d'ABT-737, un agent pro-apoptotique parfois utilisé dans le traitement des leucémies [242], l'engagement du P2Y12 par l'ADP active la voie des PI3k en phosphorylant les molécules Akt et Bad en lien avec des protéines chaperonnes de signalisation comme la protéine 14-3-3 [242]. Ces molécules sont capables de réduire l'association entre Bad et Bcl-xL, dès lors, la protéine Bcl-xL libre peut d'une part former un hétérodimère avec la protéine Bak et empêcher sa dimérisation au niveau mitochondrial. D'autre part, de façon indirecte, Bcl-xL inactive Bax en inhibant sa translocation dans les mitochondries [242]. L'ensemble de ces phénomènes permet d'inhiber la réponse apoptotique induite par l'ABT-263<sup>®</sup> (Figure 30). Dans un modèle murin déficitaire en P2Y12 ou en présence de son antagoniste, l'activation des molécules Bak/Bax restaure l'apoptose plaquettaire ce qui suggère que le récepteur P2Y12 régule négativement l'apoptose plaquettaire de façon dépendante de la voie PI3k [242].



**Figure 30 : Mécanisme de régulation négative de l'apoptose par l'engagement du P2Y<sub>12</sub> en activant la voie de PI3K/Akt après la fixation de l'ADP**

D'après [242]

## 7. Conclusion et méthodologie d'étude des marqueurs d'apoptose plaquettaire

L'apoptose plaquettaire est un phénomène cellulaire contrôlé qui comprend plusieurs événements coordonnés mis en place séquentiellement (Figure 31). Il existe plusieurs techniques d'étude, pour les cellules nucléées et plaquettares, pour chaque étape des processus apoptotiques (Tableau 10). Ces techniques permettent de détecter l'apoptose plaquettaire et étudier les 3 voies d'apoptose mise en jeu.

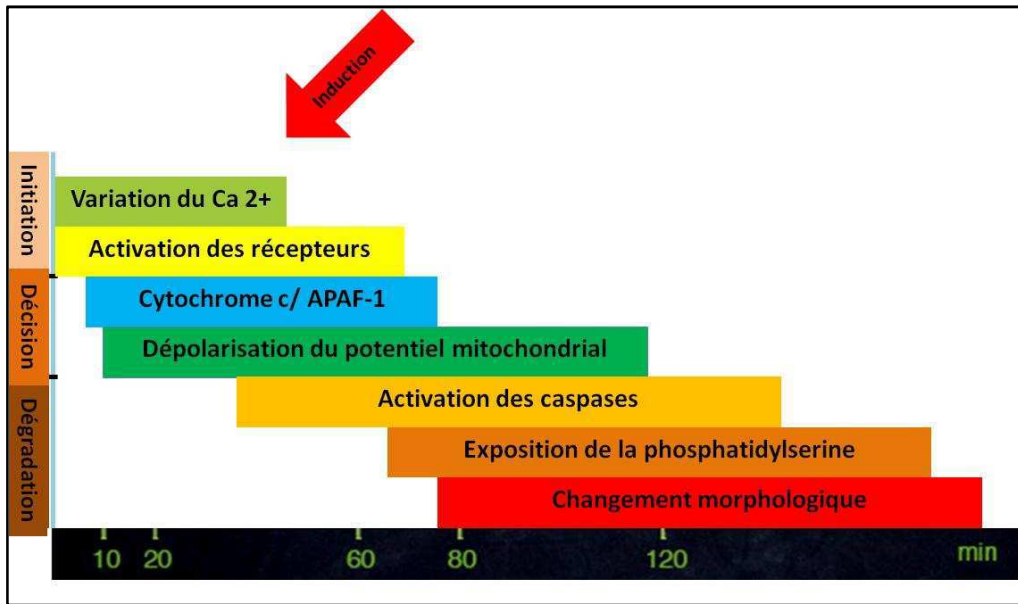


Figure 31 : Ordre des événements de l'apoptose plaquettaire

D'après [175], [182], [243]

Marqueurs	Compartiments cellulaires	Méthodes	Sonde de détection
Dépolarisation $\Delta\Psi_m$	Mitochondrie	Cytométrie en flux	DiOC6(3), JC-1
Expression, translocation vers mitochondrie des protéines Bax/Bak/Bcl-2	Cytosol Feuillet externe de la membrane	Cytométrie en flux Western blot	Anticorps anti-Bax/Bak/Bcl-2 conjugués FITC/PE/APC ou anticorps 1 <sup>er</sup> + anticorps 2 <sup>e</sup> conjugués à HRP
Relarguage de cytochrome c	Espace intermembranaire mitochondrial Cytosol	Western blot	Anticorps anti-cytochrome c
Caspase-3 activée	Cytosol	Cytométrie en flux	FAM-DEVD-FMK
Exposition de la PS	Membrane plasmatique	Cytométrie en flux	Annexin couplé à FITC/PE/APC
Libération des PMPs	Cellule entière	Cytométrie en flux Microscopie électronique à balayage	Anticorps anti-CD41a couplé à FITC/PE/APC analyse FSC dot plot
Rétrécissement du volume	Cellule entière	Cytométrie en flux	Analyse d'histogramme FSC
		Microscopie électronique à balayage	
Changements morphologiques	Membrane plasmatique	Microscopie électronique à balayage	

Tableau 10 : Techniques d'étude des phénomènes apoptotiques plaquettaire

D'après [243]

## D. Les plaquettes sanguine dans un contexte transfusionnel

### I) Les TLR plaquettaires

Nous savons maintenant que l'interaction des TLR avec leurs ligands infectieux (PAMP) conduit à l'activation de la réponse immunitaire innée. L'interaction la plus étudiée est celle du lipopolysaccharide bactérien (LPS) avec TLR-4. Les conditions stériles du prélèvement et du stockage des CP empêchent la présence de bactérie revivifiable. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la présence de débris bactériens ou les agents infectieux émergents dans certains CP [244]. Par ailleurs, les plaquettes expriment les TLR et notamment le TLR-4 [45], ces récepteurs peuvent être engagés lors du contact avec leurs ligands PAMP respectifs conduisant aux réponses inflammatoires plaquettaires.

Toutefois, le modèle de « non-soi » pour la reconnaissance immunitaire ne pourrait pas expliquer l'activation des réponses immunitaires innées dans le cadre de signaux de danger stériles tels que ceux résultant des stress oxydatifs dans les poches des CP au cours du temps de stockage ainsi que l'ensemble des lésions de stockage. Le concept des molécules exogènes (PAMP) et endogènes (DAMP), permet d'expliquer des phénomènes d'activation du système immunitaire par l'infection ainsi que des dommages tissulaires/cellulaires stérile [245].

Effectivement, les TLR sont engagés également par des ligands endogènes (DAMP) comme les HSP (Heat shock proteins) 60, 70, 90, HMGB1 induisant des signalisations intraplaquettaires similaires aux signaux de dangers de type PAMP, qui conduisent à la réponse inflammatoire tel que la libération des CK pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et IL-12 et les CH de type CXC des monocytes, macrophages [19], [245].

Pendant leur stockage, en réponse aux stress, les plaquettes peuvent sécréter les ligands endogènes pour les TLR comme les HSP90 [246]. Par conséquent, l'activation des TLR, par les molécules endogènes de type HMGB1 (hypothèse en cours d'investigation par notre groupe), peut représenter un lien entre le stress oxydatif et l'inflammation plaquettaire.

## II) Les facteurs solubles plaquettaires

La liste des facteurs solubles présentés ci-dessus n'est pas exhaustive au regard du nombre de facteurs contenus dans les plaquettes [14], mais ils reflètent les fonctions complexes de ces cellules dans l'hémostase et l'immunité. Au cours d'une transfusion plaquettaire, le taux élevé des CK/CH et des facteurs immunomodulateurs, en particulier le sCD40L, [247] dans les poches de CP semblent participer aux différents EIR aigus tel que : l'allergie, les réactions fébriles non hémolytiques ou le TRALI qui engage le pronostic vital [55], [248]–[250]. La concentration de certains de ces facteurs solubles plaquettaires comme le sCD40L et le RANTES augmente significativement généralement à partir de 3<sup>e</sup> jour de stockage des CP [247]. Par ailleurs la libération de ces facteurs est très liée à l'état d'activation plaquettaire et leur métabolisme. Aussi, cet état d'activation plaquettaire est déterminé, en partie, en fonction des processus de préparation, des dispositifs médicaux à usage unique (DMU) utilisés en transfusion sanguine et notamment les poches, le tampon de solubilisation des PSL, la durée de stockage (voir la revue et l'article II). Donc, en parallèle avec la mise en évidence du rôle inflammatoire des facteurs solubles plaquettaires ainsi que leur valeur de prédictive pour la survenue des EIR, la recherche de l'optimisation des processus de préparation, pour limiter la sécrétion plaquettaire dans les CP délivrés est aussi très importante afin de réduire l'incidence d'EIR.

## III) L'interaction des plaquettes et les autres cellules

L'interaction entre les plaquettes, les cellules immunitaires et les EC jouent un rôle majeur dans l'induction des EIR notamment le TRALI qui est la première cause de la mortalité reliée à la transfusion. Certaines études montrent que 0,08% des patients transfusés peuvent développer un TRALI [251]–[254].

Au cours de ces interactions multiples, le sCD40L qui s'accumule dans les CP de façon importante au cours du stockage est un élément clé qui implique les plaquettes (source de 95% sCD40L dans la circulation sanguine [53] et les cellules exprimant son récepteur, le CD40, et notamment les neutrophiles, les CE, les LyB. Après engagement du couple CD40L-CD40, une réponse inflammatoire est induite. Cette dernière favorise

l'activation, la sécrétion et la destruction des EC et des jonctions serrées de la paroi de l'endothélium vasculaire [255] facilitant l'extravasation et l'activation des neutrophiles étant un phénomène clé de l'induction du TRALI. Par ailleurs, l'interaction plaquettaire avec les neutrophiles dans le contexte NET est un deuxième mécanisme de cette pathologie [62]. Ainsi l'interaction plaquette – neutrophile dans le cadre du couple donneur/receveur est une cible importante pour la prévention du TRALI [256].

#### **IV) L'interaction des plaquettes avec les pathogènes**

Il existe donc une grande diversité des agents pathogènes qui peut menacer la sécurité transfusionnelle par la transmission des agents infectieux notamment des agents émergents (ou inconnus) qui ne sont pas détectables par les tests conventionnels de purification biologique des dons [244]. Les technologies de réduction/inactivation des pathogènes sont des solutions pour réduire le taux d'incidence des EIR de type infectieux.

Les techniques d'inactivation ou de réduction des pathogènes (PI/PR) actuellement inactivent, de façon variable selon la technique, un grand nombre d'agents microbiens : bactéries, virus, parasites. Mais toutes ces techniques n'inactivent pas tous les agents pathogènes microbiens et ni avec la même efficacité de réduction du pouvoir infectieux [257]. D'une manière générale, ces techniques ne sont pas ou sont peu efficaces sur les spores bactériens, les virus non enveloppés et les prions pathologiques.

Plusieurs études cliniques ont montré que les plaquettes inactivées/réduites en pathogènes sont compatibles avec leur usage thérapeutique ; cependant, en terme de la qualité des plaquettes, ces produits semblent présenter des impacts négatifs sur les fonctions plaquettaires in vitro et les lésions de stockage [258]. Effectivement, certaines études ont montré que les procédés de PI/PR ont tendance à accélérer les lésions du stockage des plaquettes [258] et favoriser les signalisations pro-apoptotiques mais très différemment selon les énergies des illuminations utilisées [259]. Cependant, Cognasse *et al* ont montré, in vitro, qu'il y a pas de différence significative concernant le relargage de certaines CK/CH, dont le sCD40L, entre les CP PI par la photochimie et les CP contrôles [260]. Aussi l'impact des PI sur les concentrés plaquettaires est donc encore à discuter. Ainsi, l'application de ces techniques doit être limitée en parallèle avec le développement

de nouveaux outils de haute sensibilité pour la détection de la contamination dans des poches CP.

## **E. Revue générale : « Les concentrés plaquettaires en transfusion sanguine : préparation, normes et principes de sécurité pour une meilleure tolérance et l'éviction d'effets indésirables »**

En transfusion, les CP – comme les autres Produits Sanguins Labiles doivent respecter des critères stricts pour le don, la préparation des produits individuels ou de mélanges, la qualification, la conservation, mais aussi pour les spécifications qui définissent le produit, en particulier pour ce qui concerne son contenu en principe actif thérapeutique. Cependant les CP peuvent être responsables pour certaines EIR et représentent une troisième composante de la variabilité de la triade transfusionnelle : donneur/don – produit – patient.

Cette revue a pour principaux objectifs de présenter les différents modes de préparation des CP et de souligner les étapes qui peuvent donner lieu à des altérations des cellules (plaquettes) et des dérivés biologiquement actifs ainsi que les pistes d'amélioration qui peuvent être retenues. Un focus particulier sera fait sur les EIR revêtant des aspects inflammatoires, qui pour une large part déroulent de la physiologie des plaquettes elles-mêmes.

Cette revue a été soumise dans le journal d'Hématologie.



## Les concentrés plaquettaires en transfusion sanguine : préparation, normes et principes de sécurité pour une meilleure tolérance et l'éviction d'effets indésirables

Kim Anh NGUYEN<sup>1,2</sup>, Fabrice COGNASSE<sup>1,2</sup>, Françoise BOUSSOULADE<sup>2</sup>, Patrick FABRIGLI<sup>2</sup>, Hélène ODEnt-MALAURE<sup>2</sup>, Léna ABSI<sup>2</sup>, Patricia CHAVARIN<sup>2</sup>, Olivier GARRAUD<sup>1,2,\*</sup>

1. EA3064/GIMAP, Université de Lyon/Saint-Étienne, Saint-Étienne, France
2. Établissement français du Sang Auvergne-Loire, Saint-Étienne, France

\* **Auteur correspondant** : Pr. O. Garraud. Établissement français du Sang Auvergne-Loire, 25, boulevard Pasteur, 42023 Saint-Étienne cedex 02, France. Email : [olivier.garraud@efs.sante.fr](mailto:olivier.garraud@efs.sante.fr), Tel : 04.77.81.42.42

**Déclaration d'intérêts** : Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

## **Les concentrés plaquettaires en transfusion sanguine : préparation, normes et principes de sécurité pour une meilleure tolérance et l'éviction d'effets indésirables**

### **Résumé :**

Les concentrés plaquettaires (CP) – comme les autres Produits Sanguins Labiles (PSL) – sont issus de dons de sang ou de ses composants. La réglementation impose des critères stricts pour le don, la préparation des produits individuels ou de mélanges, la qualification, la conservation, mais aussi pour les spécifications qui définissent le produit, en particulier pour ce qui concerne son contenu en principe actif thérapeutique, ainsi – le cas échéant – que les étapes et produits intermédiaires, qui – tous – doivent figurer sur l'étiquette du PSL. Malgré des efforts considérables d'homogénéisation qui ont été entrepris, il demeure des facteurs de variabilité dans les produits, dont tous ceux qui sont liés aux propres caractéristiques génétiques et le cas échéant métaboliques des donneurs. A cela s'ajoute des facteurs de variabilité dans les processus de préparation, qui utilisent des dispositifs différents, et aussi de variabilité dans l'âge du PSL à délivrance, puisqu'il s'agit d'un produit vivant, ce qui est particulièrement sensible avec les produits cellulaires comme les CP. Enfin, les receveurs (patients transfusés), très divers selon leurs caractéristiques génétiques d'une part, pathologiques (cause de la transfusion) d'autre part, sont une troisième composante de la variabilité de la triade transfusionnelle : donneur/don – produit – patient. Un certain nombre d'effets indésirables des receveurs (EIR) peuvent ainsi apparaître au décours des épisodes transfusionnels, et particulièrement après les transfusions de CP. Cette revue a pour principaux objectifs de

présenter les différents modes de préparation des CP et de souligner les étapes qui peuvent donner lieu à des altérations des cellules (plaquettes) ainsi que les pistes d'amélioration qui peuvent être retenues. Les modes de préparation et de conservation des CP s'avèrent en effet être des facteurs très sensibles rendant compte de la survenue possible d'EIR en ce sens qu'en sus du produit actif, il existe des dérivés biologiquement actifs soit déclenchés par le processus, soit amplifiés pendant la conservation des produits. Un focus particulier sera fait sur les EIR revêtant des aspects inflammatoires, qui pour une large part déroulent de la physiologie des plaquettes elles-mêmes ; cette revue permettra de rappeler les mécanismes d'activation des plaquettes, dont certains – stériles – sont ou peuvent être mis en jeu pendant la préparation et la conservation des produits.

**Mots clés :** Transfusion ; concentrés plaquettaires ; inflammation ; hémovigilance ; cytokines/chimiokines ; incidents transfusionnels.

## **Platelet concentrates for transfusion: Preparation, principle and safety criteria for optimal tolerance and reduction of hazards**

### **Abstract**

Platelet Components (PCs)—like other Labile Blood Components (LBCs)—originate from donations by healthy, generous volunteers. The regulation in force impose strict criteria for donation acceptance, preparation of whole blood derived buffy-coat PCs or single donor apheresis platelets, qualification and quality control, the storage, and also technical specifications that define the characteristics of the product for therapeutic use. Thus, case, indications relative to all preparation steps and use of intermediate products must read in clear on the LBC label. Despite considerable efforts for homogenization, there are still many variability factors in the products, which relate to specificities within the genetics and metabolic status of the donors. Moreover, there are different processes of preparation with different devices, as well as variability within the age of the LBCs; the latter issue is particularly sensitive with cellular products such as PCs comprise of living cells and this may influence the final quality of the PC. Finally, recipients (the transfused patients) present with their causal pathology but also display a wide range of genetic characteristics as well. There is thus a transfusion triad for variables in transfusion, perhaps exacerbated regarding PC transfusion: from the donor, the product, and the recipient. Some adverse events (AEs) can occur after PC transfusions. This review aims at presenting the different methods of PC preparation and to highlight the steps leading to cell (platelet) alterations as well key issues. The methods of preparation and storage of PC

are very sensitive factors for the occurrence of AE because, in addition to the active substances, there are many active biologic derivatives triggered by the processes or amplified during the storage. A particular focus on inflammatory aspects of AEs, which mostly related to the physiology of platelets themselves will overviewed. We will also introduce the issue that platelets are prone to activation signals—some being sterile and some being driven by pathogen moieties—leading to the release to secreted products, of which a large array of pro-inflammatory factors.

**Key words:** Transfusion; Platelet Concentrate; inflammation; haemovigilance ; cytokines/chemokines; transfusion related adverse events/hazards.

## Introduction

Il y a trois grands types de produits sanguins labiles (PSL), prescrits pour la transfusion : les concentrés de globules rouges (CGR), les unités de plasma thérapeutiques (uniquement sous la forme de plasma frais congelé [PFC] en France), et les concentrés de plaquettes (CP). Tous – qu'ils soient obtenus à partir du sang total « matière première » (ce n'est pas encore le cas pour le plasma thérapeutique bien que cela l'ait été dans le passé et que cela puisse l'être à nouveau dans un proche avenir), ou qu'ils soient prélevés par aphérèse sous la forme d'un composant « fini » – sont dits « déleucocytés » (en fait, leuco-réduits à  $< 10^6$  leucocytes résiduels par produit, et en moyenne aux alentours de  $2 \text{ à } 3 \times 10^5$ ). Tous également sont issus de dons bénévoles, anonymes et non rémunérés, plaçant la générosité des donneurs au cœur du système transfusionnel ; c'est sur ce principe fondamental qu'est bâti le système national, qui fait en sorte que la première des sécurités pour le patient soit celle d'un approvisionnement constant et sans à-coups, mais qui, pour être respectueux de l'éthique du don, tend à s'autolimiter afin de garantir la non péremption (de fait  $< 1\%$  et plus proche de  $0,5\%$ ). Les autres paramètres de la sécurité pour les receveurs que sont la prévention des infections transmissibles (par la sélection médicale des donneurs et la qualification biologique des dons (infectieuse, immuno-hématologique, et hématologique) sont bien sûr assurés. Ainsi, les infections virales transmissibles résiduelles sont estimées à  $0,3 \text{ à } 0,4$  pour  $10^6$  produits délivrés, ce qui est extrêmement peu et ce qui correspond aux délais incompressibles d'apparition des marqueurs biologiques après la contamination (asymptomatique) du donneur (la « fenêtre sérologique » ou plus précisément « biologique »).

Tous les PSL obéissent à des règles de prescription strictes, ajustées sur les besoins cliniques : la transfusion dite de confort n'est plus de mise actuellement, ce qui n'exclue néanmoins pas la transfusion dite prophylactique, pour les CP en particulier, afin d'éviter l'apparition d'une hémorragie. Les PSL sont indiscutablement salvateurs ; on ne dispose pas à ce jour d'alternative satisfaisante, tout au mieux quelques moyens palliatifs comme l'érythropoïétine et le fer pour certains cas d'anémie, mais presque rien pour les thrombopénies dans la mesure où tous les substituts de facteurs de croissance plaquettaires se sont avérés décevants voire toxiques.

Les globules rouges et les plaquettes sont des produits cellulaires vivants, dont la durée de vie peut être calculée, et qui se dégradent selon des mécanismes physiologiques qui peuvent être accélérés ou aggravés par les conditions mécaniques de leur production sous la forme de PSL <sup>1</sup>. Il est important de préciser que les plaquettes en particulier sont bien des cellules, car cette donnée est moins universelle qu'il n'y paraît, dans la mesure où ces petits éléments – anucléés – ont longtemps été et sont encore parfois considérés comme non pas des cellules mais comme des fragments de cytoplasme (des mégacaryocytes) et comme des débris voire des polluants (en histologie et cytologie en particulier). Les plaquettes sont bien de fait des cellules : elles sont capables de sécrétion <sup>2</sup> et qui plus est, de sécrétion différenciée (selon la forme de programmes) ajustée à la nature des stimuli qu'elles rencontrent <sup>3</sup> et elles ont un signalosome qu'elles peuvent activer, jusqu'à la phosphorylation des molécules associées au NFκB <sup>4</sup>. Elles peuvent de ce fait être détruites par des mécanismes de l'apoptose <sup>5</sup>.

Si, grâce à ces propriétés, en lien avec le fait que les plaquettes expriment jusqu'à plus de 1000 molécules différentes dont une centaine sont exprimées à leur surface

membranaire et/ou peuvent être sécrétées <sup>6</sup>, les plaquettes peuvent lier des ligands externes (de nature infectieuse ou d'autres natures de danger) <sup>7</sup>, la première mission des plaquettes – pour laquelle est prescrite la transfusion de concentrés plaquettaires – est bien d'assurer l'hémostase primaire et d'initier le processus de la coagulation, *in vivo*.

### ***Les concentrés de plaquettes : état des lieux et actualités***

La délivrance de CP concerne environ 9,36% de l'ensemble des PSL délivrés en France (en 2011, ce sont 3.100.539 PSL qui ont été délivrés au bénéfice de 568.513 malades (receveurs), parmi lesquels dont 290.177 CP) [14]. Les CP sont de deux natures, distinctes quant à leur mode de préparation : -a) les concentrés de plaquettes d'aphérèse (CPA), qui sont obtenus directement par prélèvement de donneurs à l'aide d'automates de séparation ; cela représente environ 50% des CP délivrés en France actuellement <sup>8</sup>. En France toujours, trois types d'automates d'aphérèse plaquettaire sont principalement utilisés (Trima Accel® [Terumo-BCT], Amicus® [Baxter] et MCS+3P® [Haemonetics]) pour lesquels les processus de prélèvement, d'injection d'anticoagulant et de séparation sont différents, ce qui peut avoir un impact sur la qualité et le rendement plaquettaire. -b) Les mélanges de CP standards (MCPS), qui représentent l'autre moitié des CP ; ils sont préparés après mélange de plusieurs (4 à 6 en moyenne) concentrés de plaquettes standards (CPS) (couches leuco-plaquettaires encore appelées *buffy-coats*, récupérées après centrifugation des unités de sang total en solution de conservation). Pour chacun de ces deux types, les CP sont conservés pour un tiers de plasma et deux tiers de solution additive (*Platelet Additive Solution* ou PAS). En France actuellement, la production de MCPS est entièrement automatisée grâce à une plateforme (en l'occurrence Tacsi-II®



[Terumo-BCT]), et toute la production de CP (CPA comme MCPS) est effectuée en PAS, sauf exception. Les CPA et MCPS sont préalablement leuco-réduits soit pendant le processus par l'automate d'aphérèse soit par une filtration secondaire en préparation.

Dans tous les cas de figure, un CP est issu d'un don, que celui-là soit spécifiquement ciblé sur un don de plaquettes (CPA) ou qu'il soit un don de sang total (ce type de don permet de préparer un concentré de GR (CGR), une dose unitaire de plaquettes, et un certain volume de plasma qui sera fractionné pour en faire des médicaments dérivés du sang comme de l'albumine ou des immunoglobulines). Cette notion de don doit être parfaitement comprise par les équipes soignantes car le CP comme tous les autres PSL reste un produit précieux, parfois rare et surtout unique par rapport à ses caractéristiques, en particulier immunologiques, compliquant ainsi la prise en charge du patient qui présente une autre unicité que celle du ou des donneurs. Ces situations peuvent obliger à lancer des invitations en urgence vers certains donneurs pour un don adapté : l'exemple type est l'existence chez un donneur de caractéristiques phénotypiques rares comme par exemple HPA1a<sup>-</sup>/1b<sup>+</sup>, pouvant permettre une transfusion compatible chez un receveur ayant les mêmes caractéristiques mais, qui, immunisé, ne peut pas recevoir de CP standard, présentant pour >99% d'entre eux l'antigène plaquettaire HPA1a (il s'agit bien entendu d'un exemple).

***Les concentrés de plaquettes en tant que produits sanguins labiles « étiquetés conformes »***

Les plaquettes sont dénombrées dans les CP, et cette notion figurera sur l'étiquette, ce qui permettra au clinicien de suivre le rendement plaquettaire post-transfusionnel de façon plus fine que l'appréciation qu'il devait faire il y a quelques années sur la base d'une quantité estimée de façon statistique. Les CP subissent également un contrôle de qualité validant la leuco-réduction et le nombre d'érythrocytes résiduels. Ce contrôle est dit « statistique », réalisé selon un plan d'échantillonnage ; en cas de dérive observée de l'automate ou de la technique, un contrôle dit « hors statistique », hors plan d'échantillonnage, est réalisé sur chaque PSL pour s'assurer de la conformité du produit.

L'étiquetage des PSL est un élément important de la production. Il comporte des indications réglementaires nécessaires à l'amélioration de la sécurité transfusionnelle. Ainsi pour les CP doivent apparaître (entre autres) : la dénomination du produit qui précise les éventuelles techniques complémentaires. Parmi ces techniques complémentaires, on peut citer la réduction de pathogène si elle a été utilisée, comme c'est le cas en Alsace et dans les DOM à ce jour en routine, hors essais cliniques, par le procédé Intercept® [Cerus], à savoir l'addition d'un psoralène de synthèse – l'Amotosalen – en milieu HCl, suivie d'une exposition courte aux UVA (basse énergie), pour rendre l'intercalation du produit avec les bases des ADN/ARN des agents infectieux, irréversibles). L'étiquette fait encore apparaître le code du produit, le numéro du don à l'origine du produit (CPA) ou d'un numéro permettant de retrouver les dons à l'origine du produit (MCPS) et le nombre de plaquettes (exprimé en  $10^{11}$ ). Cette numération est effectuée depuis plusieurs années dans chaque CP, permettant d'adapter un mieux la posologie et d'établir le rendement transfusionnel plaquettaire après la transfusion. Cette méthode permet ainsi d'affiner et d'adapter l'acte transfusionnel. Par

ailleurs le prix de cession du produit est basé sur la quantité de produit actif (QPA). Les notions autres que le volume et la numération qui figurent encore sur l'étiquette sont d'une part relatives aux caractéristiques du donneur : le groupe ABO et le groupe RH1 (D). Dans le plasma résiduel, il existe des anticorps dits naturels anti-A et/ou anti-B et les plaquettes expriment quelques copies de sucres A et/ou B à leur surface<sup>9</sup>, même si cette expression est minime voire négligeable. Ce conflit potentiel n'a que peu d'incidence dans la majorité des cas, même si quelques études rapportent une moindre efficacité en cas d'incompatibilité cellulaire et le cas échéant aussi plasmatique. La notion de la présence d'hémolysine(s) (anticorps anti-A et/ou anti-B de nature immune) est aussi figurée sur l'étiquette ; si des anticorps iso-groupes « immuns » sont détectés à un taux élevé, la mention « réserver à une transfusion iso-groupe » est indiquée en clair sur l'étiquette. Le groupe RH1 (D) doit également apparaître sur l'étiquette du fait de la présence d'hématies résiduelles, dont le nombre – même faible – peut être suffisant pour générer une allo-immunisation anti-RH1 ou D ; figurent aussi, si elles sont disponibles (car recherchées exprès), les éventuelles qualifications phénotypiques (HLA de classe I ou HPA) et séronégativité du donneur pour le CMV, au jour du prélèvement). Les autres notions figurant sur l'étiquette sont d'autre part relatives à la validité dans le temps du CP : date et heure de péremption, sachant que le produit doit être transfusé au plus tôt et réglementairement dans les 6h maximum après sa réception dans le service de soins. Enfin, si le CP a fait l'objet d'une préparation secondaire, comme une irradiation (plus exceptionnellement une réduction de volume ou de plasma, voire une déplasmatisation/lavage), cela est bien sûr indiqué en clair également.

Les plaquettes se conservent à  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (stricts), sous agitation douce et constante. Le délai d'utilisation de ces produits est de 5 jours en France, rendant la gestion (distribution) des CP extrêmement sensible pour éviter les péremptions inutiles tout en maintenant leur mise à disposition permanente pour les prescripteurs. Lors de la délivrance, un test simple est réalisé : le *swirling* qui consiste à pincer la poche pour observer le tournoiement des plaquettes permet de « bloquer » un produit pour lequel cet indice de tournoiement n'est pas satisfaisant. Différentes études ont en effet montré un parallélisme entre l'indice de tournoiement, le pH et la possible contamination bactérienne<sup>10</sup>. Ce test est donc *a priori* grossier mais relativement efficace. Cela étant, un test de contamination bactérienne va probablement être mis en place de façon systématique (contrairement à la majorité de ses voisins, la France n'avait pas mis de test de dépistage bactérien en routine car aucun test de première génération ne semblait satisfaisant, alors que les nouveaux tests de seconde et troisième génération, qui sont actuellement en cours d'évaluation, prétendent à des niveaux très supérieurs de sensibilité et de spécificité).

Les CP sont délivrés comme les autres PSL sur un document de groupage sanguin validé et une ordonnance sécurisée, qui précise – le cas échéant – la préférence du clinicien en termes de CP (CPA/MCPS) et les spécifications/préparations secondaires. En ce cas, il est important d'anticiper la « commande » et d'avoir pris un contact préalable avec le site de délivrance. La délivrance fait l'objet d'une fiche de délivrance et d'une fiche de traçabilité qui devra être retournée au site de délivrance, complétée avec les dates et heures de transfusion, les commentaires (effet indésirable receveur ou incident), l'identité du patient receveur effectif de la transfusion, les noms et qualités de la

personne ayant réalisé l'acte transfusionnel, la mention de la bonne vérification de concordance des documents (et de la réalisation du contrôle ultime au lit compatible pour les CGR). L'informatisation des documents de groupage, de délivrance et de traçabilité est la meilleure garantie à ce jour de la sécurité pour le patient. Il est par ailleurs rappelé que l'Etablissement Français du Sang (EFS) assure réglementairement un conseil transfusionnel permanent, auquel il est parfois judicieux pour les prescripteurs de se référer en cas de difficulté ou de prise en charge complexe, et plus encore bien entendu si le rendement transfusionnel est inférieur à l'attente. De plus, toute survenue d'un incident – qu'il soit sans conséquence pour le receveur, comme par exemple une erreur dans le circuit et le blocage de la transfusion, ou qu'il ait une conséquence possible ou avérée chez le receveur, doit faire l'objet dans les meilleurs délais – et en aucun cas après 48 h – d'une déclaration au médecin en charge de l'hémovigilance dans l'établissement de soin, avec avertissement concomitant à l'EFS et au coordinateur régional d'hémovigilance (CRH) de l'ARS. Une déclaration électronique à l'ANSM sera ainsi établie.

### ***Les quelques débats persistants sur les concentrés de plaquettes***

Le propos de cette revue n'est pas de traiter des indications des transfusions de CP : ce sujet fait néanmoins débat actuellement, et il a fait l'objet de plusieurs revues récentes, relatives aux indications thérapeutiques et aux doses, mais plus encore aux indications prophylactiques <sup>11</sup>. L'ANSM devrait prochainement actualiser la recommandation émise par l'Afssaps en juin 2003, comme elle l'a fait pour le plasma thérapeutique en 2012 vis-à-vis des recommandations précédentes d'août 2002.

En 2013, il n'est plus tellement fait débat autour d'un sujet qui a mis des années avant de devenir relativement consensuel, en l'occurrence la préférence des CPA vs MCPS. Il est bien admis à présent que les deux types de CP sont équivalents sur le plan thérapeutique et prophylactique, chacun présentant ses avantages et ses inconvénients <sup>12</sup>. Les autres débats en cours – outre la nécessité de la détection bactérienne déjà abordée – sont encore vifs, d'une part sur l'intérêt de proposer des procédés d'inactivation ou de réduction de pathogènes (PI/PR), bien que plusieurs réunions de consensus aient indiqué leur préférence en faveur de l'application de tels procédés, et d'autre part – en lien d'ailleurs avec la cause des procédés de PI/PR – les indicateurs d'efficacité d'une transfusion de plaquettes. Le premier sujet (PI/PR) a fait l'objet de plusieurs essais cliniques <sup>13</sup> mais aussi de positions contrastées (un essai clinique français indépendant doit débuter en 2013, dont on espère qu'il pourra clarifier le débat) ; le second sujet (marqueurs d'efficacité) a fait l'objet de plusieurs propositions mais aucune n'est réellement satisfaisante à ce jour et plusieurs groupes de travail sont installés pour tenter de proposer une position de consensus. Le dernier débat sur les CP est moins prégnant que réurgent : c'est celui d'affirmer que les PAS sont aussi bénéfiques aux plaquettes conservées en vue d'être délivrées aux patients, que le plasma autologue. Il est probable que non, en termes de préservation de toutes les fonctions plaquettaires, mais la substitution de deux-tiers de plasma par du PAS a permis de réduire significativement les « Effets Indésirables chez les Receveurs » ou EIR <sup>14</sup>, tant en réduisant les réactions inflammatoires que les effets liés aux anticorps dont les anticorps anti-HLA, réduisant de ce fait significativement les occurrences de TRALI (*Transfusion Related Acute Lung Injury*) <sup>15</sup>. En ligne avec ce dernier point, il a été décidé en France en 2011, comme cela l'avait

déjà été dans d'autres pays précédemment, de ne plus accepter au don de plasma d'aphérèse et de CPA les femmes ayant eu des grossesses (*a priori* immunisantes : près d'un tiers des femmes ayant eu trois grossesses présentent des anticorps anti-HLA détectables par une technique sensible en Luminex®) <sup>16</sup>, sauf à s'assurer de l'absence de tels anticorps par sérologie.

### ***Les Effets Indésirables chez les Receveurs liés aux transfusions de concentrés de plaquettes***

Bien que ne représentant, en France, que 10% des PSL transfusés, les CP induisent près de 40% à eux seuls des EIR d'imputabilité avérée ( $\geq 2$ ), selon le classement de l'ISBT. Le tableau 1 rapporte les catégories diagnostiques de ces EIR en fonction également de leur gravité (toujours selon la classification de l'ISBT). Une très grande attention est portée aux accidents pour lesquels un lien est fermement établi avec les CP et pour lesquels également une politique de prévention a soit été établie, soit pourrait l'être selon l'évolution des indicateurs ou les exigences réglementaires. Il s'agit en particulier des « Infections Bactériennes Transmises par Transfusion » ou IBTT (la température moyenne de 22°C de conservation des CP est en effet favorable à la croissance de la plupart des colonies bactériennes, qu'elles soient liées à une bactériémie asymptomatique chez le donneur, ou à une contamination en général lors du prélèvement). Davantage de cas de TRALI a été également rapporté avec les CP <sup>8</sup> qu'avec les autres PSL mais cela n'est pas exclusif ; il en est de même pour les cas d'allergies (avérées ou attribuées par défaut à cette entité nosologique) ; on est aussi très attentif aux « Réactions Fébriles non Hémolytiques » ou RFNH, le plus souvent à type de

manifestation inflammatoire, particulièrement communes avec les CP, certaines pouvant être graves<sup>17</sup>. On s'attache à les dissocier des inefficacités transfusionnelles, du purpura post-transfusionnel, ou des conflits pouvant faire intervenir une liaison inappropriée de nature Ag/Ac (HLA/HPA en premier lieu, le cas échéant, ABO. Les séroconversions virales ne sont pas différentes avec les CP qu'avec avec les autres PSL ; il en est de même pour les accidents volumiques (surcharge etc...). L'incidence des IBTT a été très significativement réduite ces dernières années dans les pays développés comme en France (environ un cas mortel annuel en France). On peut cependant noter que des résidus bactériens peuvent jouer un rôle dans les pathogénèses des TRALI<sup>18</sup>. On maintient actuellement une vigilance sur le risque potentiel d'infections émergentes<sup>18</sup>.

#### ***Les « Réactions Fébriles Non Hémolytiques »***

Il est particulièrement remarquable que les transfusions de CP sont fréquemment associées à des RFNH (*NHFTR* en anglais)<sup>17</sup>, c'est à dire excluant *a priori* la notion directe de conflit Ag/Ac et favorisant l'étiologie inflammatoire. Pendant des décades, les transfusions de CP – très riches en leucocytes résiduels – ont été à l'origine de RFNH, considérées comme quasi-inévitables et si possible prévenues par des prémédications, en particulier une corticothérapie. Néanmoins, la leuco-réduction systématique des PSL n'a pas aboli les RFNH dans les mêmes proportions pour les CP que pour les autres PSL<sup>19</sup>. Cela suggérerait la présence d'autres facteurs, sans dédouaner cependant le rôle des leucocytes résiduels qui peuvent être inactivés par des procédés de PI/PR avec – a-t-il été rapporté – un effet bénéfique pour les patients. Parmi les « autres » facteurs (en lien fort avec les plaquettes), on trouve le CD40-ligand soluble (sCD40L), décrit dès le début des



années 2000 comme en grande partie responsable de ces RFNH post-transfusions plaquettaires ; 95% de ce facteur dont le comportement biologique l'apparente à une cytokine, lorsqu'il est mesuré dans le plasma, est d'origine plaquettaire<sup>20</sup>. Le sCD40L a depuis lors été largement confirmé dans sa responsabilité dans les RFNH consécutives aux transfusions de CP, et aussi dans la première « frappe » étiologique de la physiopathologie du TRALI<sup>21</sup> (la seconde frappe étant un anticorps anti-HLA voire HNA, le plus souvent), bien qu'une étude récente infirme cette causalité<sup>22</sup>. Des études cliniques et expérimentales ont bien montré néanmoins que le sCD40L n'était pas le seul agent modificateur du comportement biologique (*Biological Response Modifier* ou BRM) responsable des RFNH au décours des transfusions de CP : d'autres facteurs avec un lien très fort sur le plan statistique, comme l'IL-27 et l'Ox40L solubles (Hamzeh-Cognasse *et al*, soumis), ainsi que d'autres facteurs sécrétés (mais avec un lien statistique moins fort), partagent cette responsabilité<sup>23</sup>. Le sCD40L est cependant considéré comme le chef de file inflammatoire de la plaquette. Un argument indirect en faveur du rôle des BRM dans les RFNH est que l'utilisation systématique des PAS dans les CP n'a pas permis une réduction aussi drastique qu'on aurait pu l'espérer de ce type d'EIR<sup>24</sup>. Cela indique que les facteurs incriminés ne seraient pas de nature plasmatique mais plutôt cellulaire. *Contrairement*, des essais cliniques anglo-saxons récents, qui ont réduit à moins de 20 ml le plasma résiduel (plaquettes lavées), ont montré une réduction significative des EIR (allergies et RFNH)<sup>25</sup> ; il est néanmoins possible que les PAS – en particulier ceux qui sont enrichis en Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> – puissent réduire l'activation et l'apoptose des plaquettes et empêcher indirectement la libération de leurs facteurs immunomodulateurs dont les BRM<sup>26</sup>. Par ailleurs, l'application de procédés de PI/PR favoriserait pour certains

évaluateurs l'accumulation des BRM dans le CP et l'accélérait les lésions des CP pendant le stockage<sup>13</sup>. Pourtant, nous n'avons pas retrouvé, pour notre part, de différence statistique dans le contenu en cytokines sécrétées avant et après l'application du procédé Intercept®<sup>27</sup>, mais ce point peut être encore débattu. Les procédés de PI/PR en revanche, inactivent les leucocytes (nucléés) et la synthèse de cytokines, réduisant les produits inflammatoires liés aux leucocytes résiduels<sup>28</sup>.

Nos propres observations indiquent que la nature des EIR (RFNH et allergies) est fréquemment à un type de manifestations cutanées, beaucoup plus fréquemment des troubles hémodynamiques. Dans tous ces cas recensés, nous avons récupéré les poches des CP ayant induit un EIR et nous avons mesuré les BRM présents dans les tubulures ; nous avons mis en évidence une augmentation significative (de 2 à 200 fois) de la concentration de certaines cytokines/chimiokines inflammatoires (sCD40L, IFN- $\gamma$ , MDC, CCL19, Gro- $\alpha$ , 6-C kine, CXCL9, sCD62P et RANTES) dans le surnageant des CP qui ont induit un EIR en clinique vs les CP contrôles. Nous avons de plus détecté dans les CP inducteurs d'EIR des BRM indétectables dans les CP contrôles : MIP-1 $\alpha$ , IL-13, IL-15 et IL-33. Le taux de la plupart de ces BRM croît au cours de temps de stockage des CP, indiquant bien que ces facteurs sont probablement bien d'origine plaquettaire (synthétisés *de novo* ou non) (Figure 1). La majorité des EIR est survenue pour ces CP délivrés à partir de 3 jours de stockage et au-delà (jusqu'à 5 jours), comme cela avait déjà été montré dans des études précédentes concernant le sCD40L et d'autres produits. Nous avons montré une corrélation linéaire entre les BRM des PC incriminés, et proposé des valeurs prédictives d'induction (possible) d'EIR (Nguyen *et al*, soumis). L'ensemble de ces travaux et d'autres de la littérature est fortement en faveur de la responsabilité des

produits de sécrétion des plaquettes au cours du temps dans les EIR : la raison de l'activation de certains CP par rapport à la production globale reste cependant une inconnue.

### ***Les concentrés de plaquettes : principe actif et produits annexes***

La prescription de CP n'a de sens que pour corriger un déficit quantitatif ou qualitatif des plaquettes circulantes chez un patient, que l'objectif soit thérapeutique en cas d'hémorragie, ou prophylactique en cas de risque de saignements, macro ou micro. C'est donc bien la plaquette elle-même, cellule de l'hémostase primaire, qui est l'élément thérapeutique, de par l'expression de glycoprotéines de membrane capables d'adhérer à un endothélium lésé, puis de permettre l'agrégation des plaquettes entre elles pour former un thrombus, et enfin, grâce aux produits sécrétés par les plaquettes et excrétés des granules denses et alpha, d'initier la cascade de la coagulation <sup>29</sup>. Il ne sera pas fait mention ici des propriétés cicatrisantes de la plaquette, utilisées sous la forme de gels, mais uniquement des CP sous la forme de PSL.

Néanmoins, les plaquettes – principes thérapeutiques directs – se présentent en suspension dans un milieu bioactif et non pas inerte, car les plaquettes ont absolument besoin d'un milieu protecteur riche en protéines puisque, anucléées, elles n'ont pas de mécanisme de protection et de réparation autonome (pour elles-mêmes), ni de réversion d'apoptose ou plutôt d'apoptose-like. Le milieu de suspension de la plaquette thérapeutique, pleinement fonctionnelle, est au minimum à ce jour composé globalement d'un tiers de plasma pour deux tiers de PAS. Les milieux de conservation des

plaquettes préparées sous forme de CP comprennent de nombreux facteurs qui ont été largement détaillés dans une revue récente d'Azuma *et al*<sup>30</sup>.

De plus, puisqu'il va rester environ 33% de plasma (du donneur), le patient transfusé sera exposé aux immunoglobulines dites poly-réactives contenues dans ce plasma, lesquelles pourront stimuler les récepteurs Fc des propres cellules circulantes du receveur. De même, dans le plasma résiduel, on trouve :- i) des anticorps anti-HLA du donneur (en principe réduits grâce à la politique de réduction du risque TRALI adoptée récemment), -ii) des cytokines/chimiokines et -iii) des BRM principalement de nature inflammatoire (issus des plaquettes du donneur), iv) de rares produits anti-inflammatoires (comme les immunoglobulines, IL-10 et le TGF- $\beta$ ), et v) des résidus de préparation (anticoagulants etc.)<sup>31</sup>. Ces produits annexes – à la différence de ce qui serait le cas pour les CGR, qui n'apportent que 20 à 30 mL de plasma – sont abondants car le volume de plasma natif estimé peut atteindre l'équivalent d'une poche de PFC thérapeutique soit environ 200 mL si le CP est dilué par du PAS, ou deux voire trois équivalents d'unités de PFC si le CP est en 100% plasma « donneur ». La quantité de sCD40L soluble infusé, par exemple, peut être considérable, et très largement au-delà du minimum suffisant pour déclencher une action biologique sur les cellules sensibles, de l'endothélium vasculaire du receveur ou des cellules circulantes de l'immunité, comme les lymphocytes B<sup>32</sup> ; cette quantité est aussi très largement supérieure aux doses extrapolées comme capables de déclencher un TRALI dans un modèle expérimental.

La transfusion de CP a ceci de particulier par rapport aux autres PSL est qu'elle apporte un grand nombre de facteurs correctifs mais un volume tout à fait considérable

également de facteurs *a priori* non désirés, dont nombreux sont ceux qui ont des propriétés pro-inflammatoires<sup>31</sup>.

***Influence des facteurs de collection, préparation et conservation sur les paramètres inflammatoires des concentrés de plaquettes***

Sur la base que les plaquettes collectées et conservées produisent des BRM dont certains sont clairement associés à des EIR de nature RFNH (dont certains sont sévères ou graves : EIGR), un certain nombre de groupes a étudié la cinétique de la production de facteurs plaquettaires au cours du temps de leur conservation en condition de stockage en vue d'une délivrance (agitation douce et maintien à 22°C). Nous avons nous même mis en évidence dès 2006<sup>33</sup> puis confirmé régulièrement depuis que les plaquettes sont capables de libérer des BRM, mesurables de façon significativement plus élevée en particulier après trois jours de conservation par comparaison au jour de la collecte.

Non seulement ces BRM sont sécrétés mais encore sont-ils bioactifs, et capables de modifier le comportement biologique et l'activation de cellules reportrices ou de cellules de l'immunité allogéniques, du moins dans les études *in vitro* que d'autres équipes et nous-mêmes avons menées. Les plaquettes activées et/ou leurs facteurs de sécrétion activent ainsi (et parfois de façon réciproque) les lymphocytes T et B<sup>32,34</sup>, les monocytes<sup>35</sup>, les cellules dendritiques<sup>36</sup>, les PBMCs<sup>37</sup> et les polynucléaires<sup>38</sup>. Ces données ont été obtenues tant avec des plaquettes de CPA que de MCPS, voire de CPS unitaires.

Des travaux déjà anciens indiquaient que tous les séparateurs d'aphérèse pour l'obtention (collecte) de CPA n'avaient pas les mêmes performances en termes

d'activation des plaquettes, ce qui pouvait affecter leurs fonctionnalités hémostatiques<sup>39</sup>. Nous avons ainsi cherché à évaluer s'il en était de même pour les facteurs pro-inflammatoires plaquettaires et si les deux types de réponses, pro-hémostatiques et pro-inflammatoires allaient dans le même sens en cas d'activation préférentielle par tel ou tel type d'automate/séparateur. Nous avons mis en évidence que le processus d'aphérèse plaquettaire par Amicus® [Baxter] augmente significativement l'activation plaquettaire précoce comparativement au système Trima-Accel® [Terumo-BCT]. Ce phénomène est surtout observé dans la période précoce du stockage, sur l'expression membranaire du CD62P (Figure 2) et le relargage des facteurs immunomodulateurs plaquettaires comme sCD62P, sCD40L, PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1. A la fin du stockage (5 jours), cet état d'activation est toujours plus remarquable sur les plaquettes préparées par le système Amicus® vs Trima®, en termes de marqueur d'activation membranaire CD62P.

La préparation de MCPS a été longtemps manuelle ; néanmoins, plusieurs procédés d'automatisation – distincts dans leur fonctionnement (mécanique) – sont apparus sur le marché, la préparation des MCPS en France est ainsi entièrement automatisée avec un type d'automate depuis 2010 (TACSI® [Terumo-BCT]). Nous avons aussi cherché à comparer le degré d'activation que l'automation apportait – ou ôtait – aux plaquettes, par rapport aux techniques manuelles. Nous avons décrit que le niveau d'expression membranaire du CD62P (un marqueur d'activation plaquettaire) et du CD40L des CP préparés avec le système TACSI® dans le PAS-III® (Fenwal, La Châtre, France) a été réduit par rapport avec ceux qui ont été préparés par les techniques manuelles. *A contrario*, ces produits automatisés ont présenté une concentration en sCD40L significativement plus élevée. Dans le même temps expérimental, nous avons cherché à évaluer l'influence – ou

non – de l'addition de PAS dans les MCPS préparés de façon automatisée versus manuelle, pour observer qu'en général, le PAS-IIIM® (MacoPharma, Mouveaux, France) a tendance à homogénéiser la différence entre les deux méthodes de préparation. En comparaison de l'effet de deux PAS dans la technique manuelle, nous avons constaté que le PAS-III® pouvait réduire l'activation plaquettaire mais augmenter le taux du sCD40L par rapport au PAS-IIIM®. Des résultats similaires concernant le sCD40L ont été observés dans la technique automatisée. Pourtant dans cette technique, l'effet de PAS-III® sur l'inactivation plaquettaire n'était pas significatif<sup>40</sup>.

Nous concluons de ces études que les plaquettes ne sont pas inertes du point de vue biologique dans leur milieu de conservation pendant la durée précédant leur délivrance au patient. Elles sécrètent des BRM, dont certains sont libérés en un temps via l'*Open Canalicular System* (OCS), comme la plupart des facteurs solubles contenus dans les granules alpha<sup>2</sup> et d'autres en deux temps après expression à la membrane et clivage (*shedding*), comme le CD40L ou le CD62P<sup>41</sup> ; on n'exclue pas la possibilité d'une recapture par la plaquette lorsque celle-là possède le récepteur membranaire pour le ligand sécrété comme c'est le cas pour le CD40 vis-à-vis du sCD40L. Au cours de la conservation, les plaquettes enfin, semblent sécréter et/ou stocker d'autres BRM comme le RANTES (CCL5), TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF... etc., probablement dans ses granules  $\alpha$ <sup>31</sup>.

***Hypothèses sur les mécanismes d'activation plaquettaire rendant compte d'une inflammation ; pistes d'amélioration***

Sur la base de l'observation de la production de BRM par des plaquettes en circuit clos et stérile (sans pousse bactérienne en cinq jours malgré des conditions favorables

comme un milieu riche en nutriments et une température ambiante de  $> 20^{\circ}\text{C}$ ), nous nous sommes demandé si les plaquettes ainsi préparées – avec le degré d'activation que nous avons contribué à rapporter – et conservées, pouvaient réagir à des signaux de danger stériles. Nous ne pouvions pas totalement exclure cependant l'existence de signaux de danger de nature bactérienne (car même en l'absence de contamination bactérienne *stricto sensu*, des résidus bactériens issus d'une éventuelle phagocytose), et celle de dérivés solubles circulants, et de protéines de choc thermique ou HSP. En effet, les plaquettes expriment des récepteurs aux signaux de danger au sens où cela est entendu selon la théorie du non soi-infectieux défendue par Polly Matzinger à partir des années 1990<sup>42</sup>, une redécouverte, en fait, des premières théories d'Elie Metchnikoff à la fin XIX<sup>e</sup> siècle<sup>43</sup>. Outre les récepteurs classiquement reconnus pour ce qui concerne les plaquettes (récepteurs pour différentes fractions du complément, pour les chaînes lourdes  $\gamma$ ,  $\alpha$  et  $\epsilon$  des immunoglobulines [Fc $\gamma$ RIIa/CD32, Fc $\alpha$ R/CD89, Fc $\epsilon$ R/CD23]), et de ceux, moins classiques ou plus récemment identifiés, pour plusieurs types d'agents infectieux, les plaquettes expriment des *Pathogen Recognition Receptors* (PRR)<sup>7</sup>. Les plus connus et ubiquitaires d'entre eux, les *Toll-Like Receptors* ou TLR sont bien exprimés pour la plupart d'entre eux sur ou dans les plaquettes, et principalement les TLR-2, 4, et 9, mais aussi les TLR-1 et 6. Le tableau 2 montre des données reproduites à la suite de celles qui nous ont permis d'être parmi les tous premiers groupes à avoir identifié les TLR à la surface des plaquettes, et démontré leur fonctionnalité<sup>44</sup>.

Nous avons ensuite montré que ces TLR – en particulier le TLR-4 – senseur du Lipopolysaccharide (LPS) bactérien des bactéries Gram négatives – étaient fonctionnels<sup>45</sup>. Une fois engagé, le TLR-4 peut activer deux voies distinctes du signalosome de la



plaquette, soit la voie dépendante du MyD88, soit celle dépendante de TRIF, toutes deux aboutissant à la phosphorylation de NFκB, et à la production de profils distincts de cytokines et autres BRM, selon la nature biochimique du LPS exposé (et nous avons des également des données indiquant qu'il en est de même en fonction des bactéries entières)<sup>3</sup>.

Nous ne pouvons donc pas exclure que les plaquettes conservées dans ce milieu préalablement à leur délivrance pour un patient, s'activent en réponse à un stimulus (signal de danger) d'origine bactérienne (plus vraisemblablement que virale), et donc répondent *ex vivo* par la sécrétion de BRM détectables après quelques jours de stockage.

Cependant, nos travaux sur l'effet différentiel des automates d'aphérèse et des méthodes manuelles, couplés aux effets des PAS vs du plasma natif, ne permettent pas d'exclure aussi des perceptions (*sensing*) de signaux de danger non infectieux mais mécaniques et/ou chimiques, qui utiliseraient d'autres PRR que les TLR, comme par exemple des sémaphorines. Il est évident que les plaquettes sont des cellules extrêmement faciles à activer puisque c'est là leur principale propriété. De plus, elles discernent *in vivo* face à un endothélium lésé ou *in vitro* le type de réponse le plus approprié en utilisant des différents récepteurs de l'hémostase qu'elles déploient à leur surface (PAR, GPIb-IX-V, GPIIb/IIIa, P2... etc)<sup>29</sup> (Figure 3); il ne serait ainsi pas surprenant qu'elles puissent utiliser le même type de réactivité vis-à-vis de signaux (de danger) dès lors qu'elles possèdent les récepteurs *ad hoc*.

### **Conclusions**

Toute transfusion est un acte à part, car les PSL sont non seulement complexes de par leur nature (cellulaire et plasmatique) mais encore il s'agit de produits vivants, issus du corps humains, et au-delà de cela, ce sont des composés « donnés » avec toute la charge morale, intellectuelle et spirituelle qui s'y associe. Les CP sont encore plus « remarquables » car ils sont associés à une sensibilité particulière vis-à-vis de receveurs particulièrement fragiles (cf. les campagnes d'associations comme celles de Stéphanie Fugain), et ils sont inducteurs de davantage d'EIR que les autres PSL. En effet, les CP, plus que les autres produits, apportent outre l'élément thérapeutique de base, des produits dérivés, issus du métabolisme hyperactif de la plaquette, réactive à des signaux de stress infectieux (rares) mais aussi stériles (communs). L'enjeu, compte tenu de la réactivité particulière de patients fragiles à des produits pro-inflammatoires non désirés, est de maintenir la qualité thérapeutique des CP tout en réduisant significativement les composés secondaires de nature pro-inflammatoire. Ce qui peut être réalisable dès à présent, c'est l'action sur les produits eux-mêmes, c'est-à-dire sur tous les facteurs impliquant une intervention manuelle et/ou mécanique. Les facteurs qui gouvernent aussi les mécanismes de l'inflammation induite sont le terrain génétique du donneur, facteur sur lequel à ce jour il n'est pas possible d'intervenir sauf à disposer d'une typologie des donneurs, ce qui n'est pas le cas. Enfin, le terrain génétique des receveurs, facteur sur lequel on ne pourra de toutes les manières pas intervenir car le receveur est au centre du processus transfusionnel, de par le besoin qu'il a – toute co-morbidité étant possible par ailleurs – de recevoir un PSL thérapeutique et salvateur. Cela étant, les pistes pour améliorer la qualité des PSL ne sont pas toutes explorées et elles devraient

permettre de réaliser des progrès significatifs de sécurité mais aussi d'efficacité, l'inflammation induite par la transfusion pouvant être une cause de moindre efficacité.

### ***Remerciements***

Les auteurs remercient le précieux support de l'ensemble du personnel de l'Établissement français du sang (EFS) Auvergne-Loire et des donneurs de sang, ainsi que le Pr Bruno Pozzetto, Dr Hind Hamzeh-Cognasse, Mmes Sophie Acquart, Marie Ange Eyraud, Pauline Damien et Mr Charles Antoine Arthaud, pour leur contribution dans les différents travaux originaux au sein du laboratoire GIMAP–EA3064. Les auteurs remercient également le Professeur Jean-Jacques Lefrère (Université Paris 5 et INTS) et le Dr Georges Andreu (INTS), pour leur lecture critique du manuscrit. Les différentes études présentées dans cette revue ont été soutenues par l'EFS, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), « l'Association Recherche Transfusion (ART) » et « l'Association des Amis de Rémi ».

## Références

1. Devine, D. V. & Serrano, K. The Platelet Storage Lesion. *Clinics in Laboratory Medicine* **30**, 475–487 (2010).
2. Flaumenhaft, R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1152–1160 (2003).
3. Berthet, J. *et al.* Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin. Immunol.* **145**, 189–200 (2012).
4. Spinelli, S. L., Maggirwar, S. B., Blumberg, N. & Phipps, R. P. Nuclear emancipation: a platelet tour de force. *Sci Signal* **3**, pe37 (2010).
5. Leytin, V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev.* **26**, 51–63 (2012).
6. Fong, K. P. *et al.* Deciphering the human platelet sheddome. *Blood* **117**, e15–26 (2011).
7. Semple, J. W., Italiano, J. E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology* **11**, 264–274 (2011).
8. Rapport d'activité hémovigilance 2011. (2012).
9. Refaai, M. A., Phipps, R. P., Spinelli, S. L. & Blumberg, N. Platelet transfusions: Impact on hemostasis, thrombosis, inflammation and clinical outcomes. *Thrombosis Research* **127**, 287–291 (2011).
10. Naghadeh, H. T., Badlou, B. A., Ferizhandy, A. S., Mohammadreza, T. S. & Shahram, V. Six hours of resting platelet concentrates stored at 22-24 °C for 48 hours in permeable bags preserved pH, swirling and lactate dehydrogenase better and caused less platelet activation. *Blood Transfus* 1–6 (2012). doi:10.2450/2012.0035-12
11. Blajchman, M. A., Slichter, S. J., Heddle, N. M. & Murphy, M. F. New strategies for the optimal use of platelet transfusions. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 198–204 (2008). doi:10.1182/asheducation-2008.1.198
12. Schrezenmeier, H. & Seifried, E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sanguinis* **99**, 1–15 (2010).
13. Hervig, T., Seghatchian, J. & Apolseth, T. O. Current debate on pathogen inactivation of platelet concentrates--to use or not to use? *Transfus. Apher. Sci.* **43**, 411–414 (2010).
14. Kerkhoffs, J.-L. H. *et al.* A multicenter randomized study of the efficacy of transfusions with platelets stored in platelet additive solution II versus plasma. *Blood* **108**, 3210–3215 (2006).
15. Vlaar, A. P. J. Transfusion-related acute lung injury: Current understanding and preventive strategies. *Transfus Clin Biol* **19**, 117–124 (2012).

16. Rios, J. A. *et al.* Blood donations from previously transfused or pregnant donors: a multicenter study to determine the frequency of alloexposure. *Transfusion* **51**, 1197–1206 (2011).
17. Heddle, N. M. Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Curr. Opin. Hematol.* **6**, 420–426 (1999).
18. Dodd, R. Y. Emerging pathogens and their implications for the blood supply and transfusion transmitted infections. *Br. J. Haematol.* **159**, 135–142 (2012).
19. Klüter, H., Bubel, S., Kirchner, H. & Wilhelm, D. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion* **39**, 1179–1184 (1999).
20. Phipps, R. P., Kaufmann, J. & Blumberg, N. Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *The Lancet* **357**, 2023–2024 (2001).
21. Khan, S. Y. *et al.* Soluble CD40 Ligand Accumulates in Stored Blood Components, Primes Neutrophils Through CD40, and Is a Potential Cofactor in the Development of Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Blood* **108**, 2455–2462 (2006).
22. Caudrillier, A. *et al.* Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *Journal of Clinical Investigation* (2012). doi:10.1172/JCI61303
23. Muylle, L., Joos, M., Wouters, E., De Bock, R. & Peetermans, M. e. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion* **33**, 195–199 (1993).
24. De Wildt-Eggen, J. *et al.* Reactions and platelet increments after transfusion of platelet concentrates in plasma or an additive solution: a prospective, randomized study. *Transfusion* **40**, 398–403 (2000).
25. Azuma, H. *et al.* Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion* **49**, 214–218 (2009).
26. Cookson, P. *et al.* Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution. *Transfus Med* **20**, 392–402 (2010).
27. Cognasse, F. *et al.* Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* **48**, 809–813 (2008).
28. Cazenave, J.-P. Inactivation photochimique des pathogènes des plaquettes et du plasma : cinq ans d'utilisation clinique de routine et d'hémovigilance. Vers un changement de paradigme de la sécurité en transfusion. *Transfusion Clinique et Biologique* **18**, 53–61 (2011).
29. Wei, A. H., Schoenwaelder, S. M., Andrews, R. K. & Jackson, S. P. New insights into the haemostatic function of platelets. *British Journal of Haematology* **147**, 415–430 (2009).

30. Azuma, H., Hirayama, J., Akino, M. & Ikeda, H. Platelet additive solution – Electrolytes. *Transfusion and Apheresis Science* **44**, 277–281 (2011).
31. Garraud, O. & Cognasse, F. Immunologie plaquettaire et réponse immune. *Transfusion Clinique et Biologique* **16**, 106–117 (2009).
32. Cognasse, F. *et al.* Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Experimental Hematology* **35**, 1376–1387 (2007).
33. Cognasse, F. *et al.* Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion* **46**, 1184–1189 (2006).
34. Matsuda, H., Ushio, H., Geba, G. P. & Askenase, P. W. Human platelets can initiate T cell-dependent contact sensitivity through local serotonin release mediated by IgE antibodies. *J. Immunol.* **158**, 2891–2897 (1997).
35. Passacquale, G. *et al.* Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS ONE* **6**, e25595 (2011).
36. Hamzeh-Cognasse, H. *et al.* Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC Immunol.* **9**, 54 (2008).
37. Cognasse, F. *et al.* Donor platelets stored for at least 3 days can elicit activation marker expression by the recipient's blood mononuclear cells: an in vitro study. *Transfusion* **49**, 91–98 (2009).
38. Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R. K. & Ley, K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Reviews* **21**, 99–111 (2007).
39. Skripchenko, A. *et al.* Periods without agitation diminish platelet mitochondrial function during storage. *Transfusion* **50**, 390–399 (2010).
40. Nguyen, K. A., Chavarin, P., Arthaud, C.-A., Cognasse, F. & Garraud, O. Do manual and automated processes with distinct additive solutions affect whole blood-derived platelet components differently? *Blood Transfus* **11**, 152–153 (2013).
41. Otterdal, K., Pedersen, T. M. & Solum, N. O. Release of soluble CD40 ligand after platelet activation: studies on the solubilization phase. *Thromb. Res.* **114**, 167–177 (2004).
42. Matzinger, P. An innate sense of danger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **961**, 341–342 (2002).
43. Gordon, S. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *European Journal of Immunology* **38**, 3257–3264 (2008).
44. Cognasse, F. *et al.* Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 196–198 (2005).
45. Cognasse, F. *et al.* Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br. J. Haematol.* **141**, 84–91 (2008).

## Légende

### Tableau 1 : Nature des effets indésirables des receveurs

Imputabilité des effets indésirables graves donneurs (EIGD) et d'EIR : 1 : possible - 2 : probable - 3 : certaine - NE : non évaluable. Gravité d'EIR : grade 2 : sévère – grade 3 : menace vitale immédiate – grade 4 : décès. Source : Pôle vigilance EFS Auvergne-Loire.

**Tableau 2 : Expression plaquettaire des TLR (MCP - J5 – « gating » sur la population CD41<sup>+</sup>).** Les datas sont présentés en moyenne ± écart type standard (\* : Différence significative (test student  $p < 0,05$ ) entre l'expression intracellulaire vs l'expression membranaire)(Adapté de <sup>44</sup>).

**Figure 1 : Relargage des facteurs immunomodulateurs pendant le stockage des plaquettes.** Les datas du J1-J3 et J5 sont présentés en pourcentage vs J0 (100%). (\* : test student  $p < 0,05$  vs J0) (Adapté de <sup>27</sup>).

**Figure 2 : Marqueur d'activation et facteurs immuno-modulateurs plaquettaires de deux types de séparateur cellulaire Trima/Amicus durant le stockage.** Les datas du J1 et J5 de stockage sont présentés en moyenne)

**Figure 3 : Représentation des récepteurs membranaires des plaquettes (liste non exhaustive).**



Tableau 1

EIR imputabilité élevée 2, 3 pour 100000 PSL cédés		Indicateurs 2009	Indicateurs 2010	Indicateurs 2011	Indicateurs 2012
Séroconversions receveurs (VIH, VHC, VHB)		0	0	0	0
Accidents ABO impliquant l'EFS		0	0	0	0
Total EIR	Grade 3, 4	6,89	3,64	2,39	4,36
IBTT tous PSL	Grade 3, 5	0,2	0,03	0,13	0,87
TRALI tous PSL	Grade 3, 6	0,78	0,46	0,39	0
Allergie plaquettes	Grade 3, 7	13,39	3,63	3,1	0,87
Allergie plasma	Grade 3, 8	3,51	5,25	3,7	0

Tableau 2

Expression (Moyenne $\pm$ std)	TLR 1	TLR 2	TLR 4	TLR 6	TLR 8	TLR 9
Membranaire	1,8 $\pm$ 0,1	<b>18 <math>\pm</math> 3</b>	<b>58 <math>\pm</math> 2,5</b>	1,5 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,1	<b>10 <math>\pm</math> 3</b>
Intracellulaire	0,89 $\pm$ 0,4	<b>47 <math>\pm</math> 5 *</b>	<b>78 <math>\pm</math> 1,5 *</b>	2 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,3	<b>34 <math>\pm</math> 6,5 *</b>

Figure 1

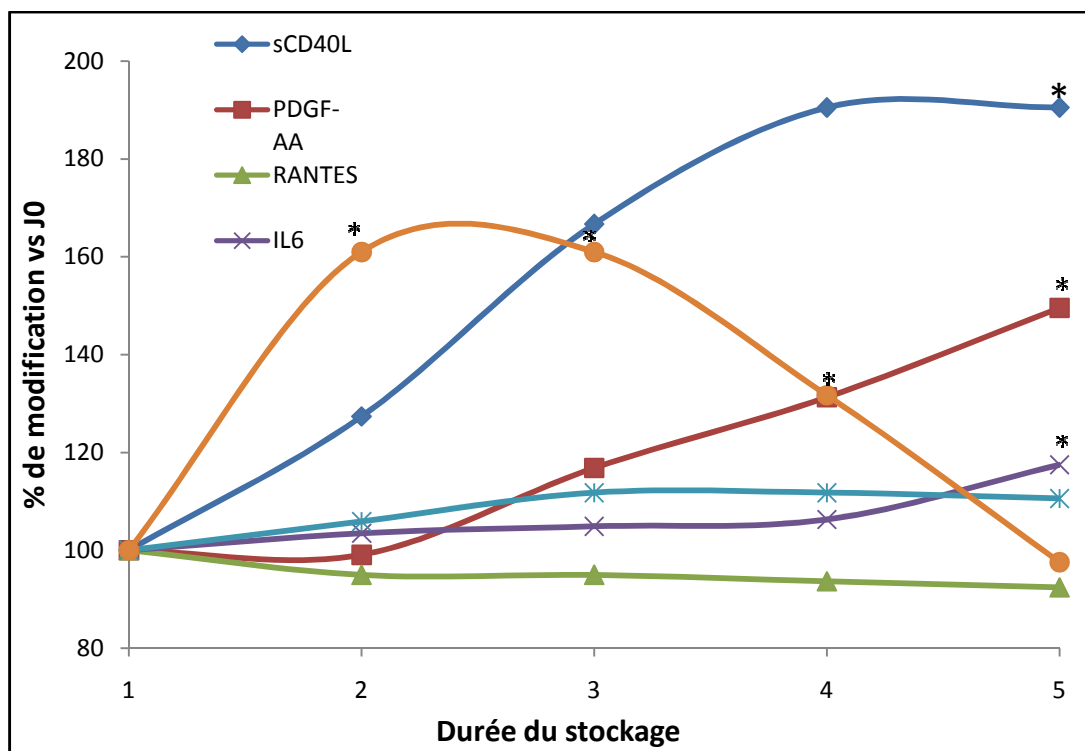


Figure 2

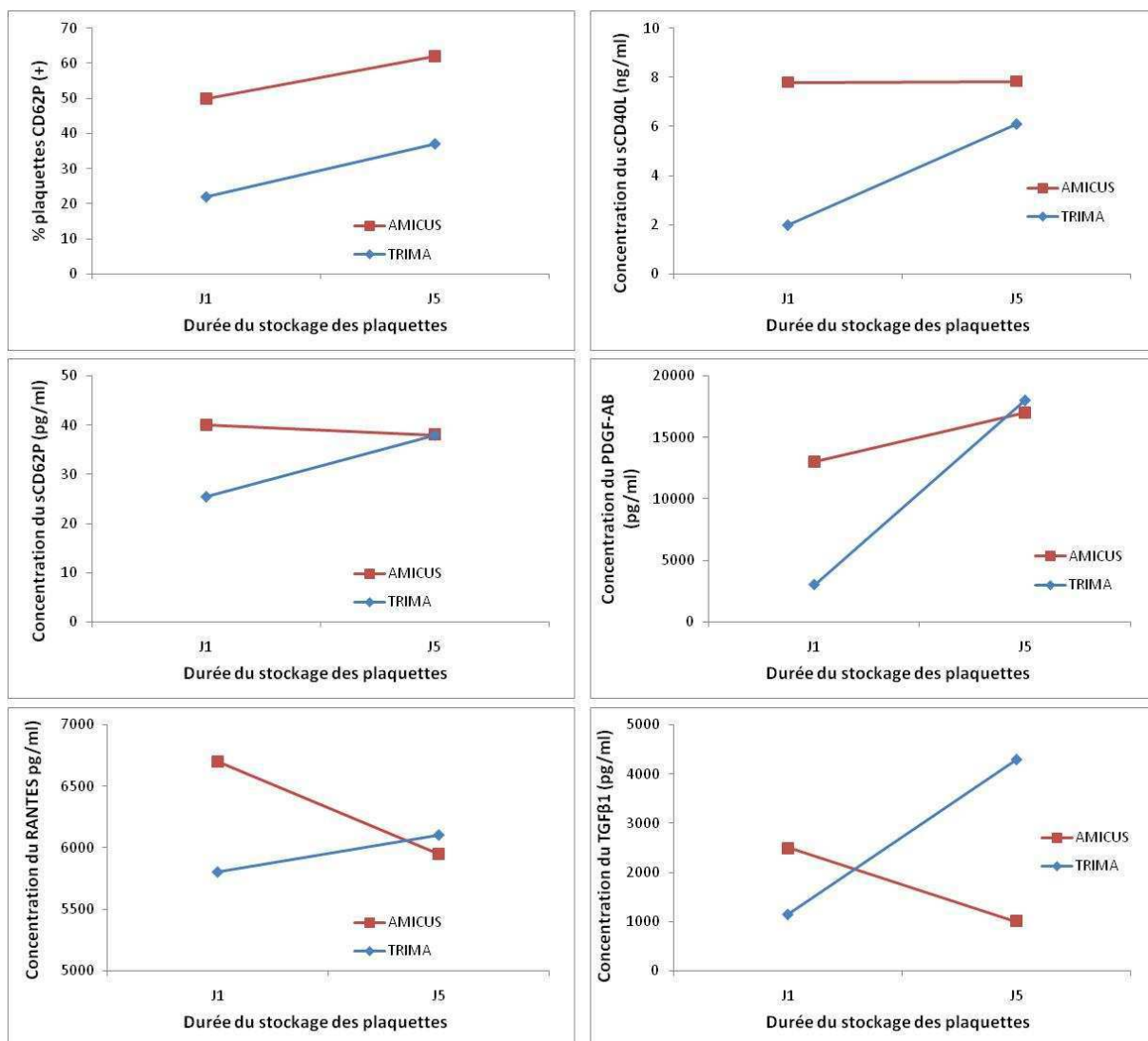
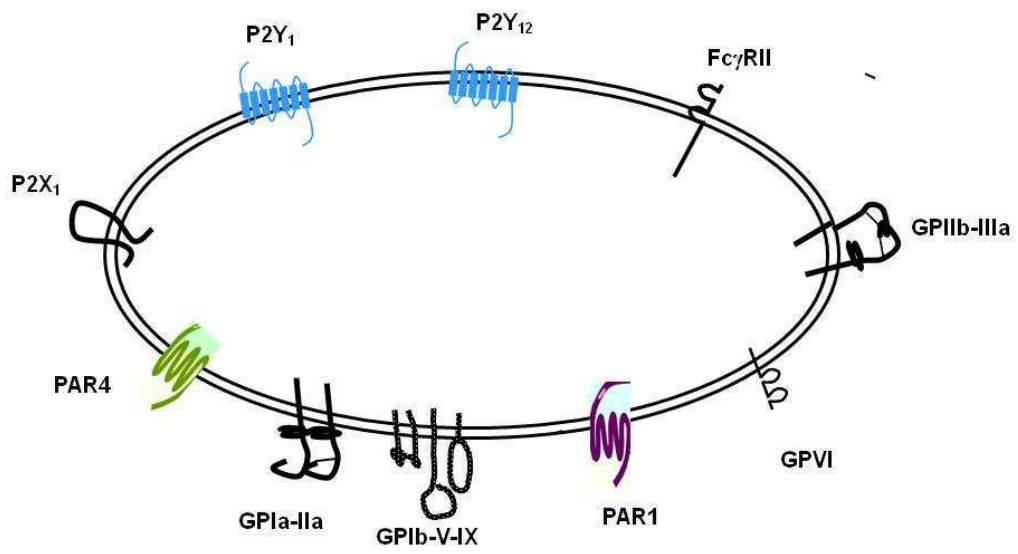


Figure 3



## **Objectif du travail**

Les plaquettes sanguines jouent un rôle important dans l'immunité innée ainsi qu'adaptative. Elles semblent être capables de reconnaître et de distinguer les signaux de dangers endogènes et exogènes pour déclencher et réguler la réponse inflammatoire. Dans la cadre de cette thèse de sciences, nous avons investigué le rôle inflammatoire des plaquettes sanguines i) dans un contexte fondamental, puis ii) lors d'application bioclinique dans un contexte transfusionnel.

Dans la première partie du travail, nous nous sommes intéressés, avec une approche fondamentale, à identifier et à caractériser, *in vitro*, la fonction des récepteurs des signaux de danger de type Siglec, au niveau des surfaces plaquettaires, après engagement par leurs ligands de type sialoglycane. Nous avons focalisé nos études sur l'apoptose plaquettaire, principal processus par lequel les cellules sont physiologiquement éliminées dans les organismes pluricellulaires et localisées dans des corps apoptotiques.

Par ailleurs, les plaquettes sont des cellules sécrétoires très importantes. Il a été démontré que la sécrétion des facteurs solubles plaquettaire est strictement régulée et programmée ; nous avons donc exploré les profils de cette sécrétion plaquettaire et leurs mécanismes moléculaires dans différentes conditions de stimulation *in vitro*.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons étudié la composante inflammatoire des plaquettes dans le contexte transfusionnel. Nous savons que les poches de CP, bien que ce soient des produits thérapeutiques sécurisés et strictement réglementés, peuvent contenir des facteurs pro-inflammatoires qui sont responsables, en partie, d'EIR. Pour cela, nous avons cherché les impacts des processus de préparation et de stockage sur les propriétés pro-inflammatoires des plaquettes afin d'optimiser la qualité des CP pour la transfusion.

Nous avons étudié également cette composante inflammatoire dans certains cas d'EIR graves afin d'identifier les facteurs solubles plaquettaires ayant une valeur prédictive pour la survenue de ces effets. Notre approche biologique de cette hypothèse de travail a été explorée avec des modèles mathématiques de prédiction et d'application sous forme d'arbre décisionnel.

Ces travaux montrent que la réponse inflammatoire plaquettaire dans un contexte transfusionnel est à considérer et que cette composante argumente sur le rôle présumé de sentinelle des plaquettes sanguines humaines aux signaux de danger, comme peuvent l'être les lésions de stockage. Ainsi, nos travaux s'inscrivent dans la ré-exploration de la fonction inflammatoire des plaquettes sanguines et l'étude du rôle des plaquettes comme cellules de l'immunité innée à composante inflammatoire.



## Résultats expérimentaux

**Article I: Do manual and automated processes with distinct additive solutions affect whole blood-derived platelet components differently?**

## Do manual and automated processes with distinct additive solutions affect whole blood-derived platelet components differently?

Kim Anh Nguyen<sup>1,2</sup>, Patricia Chavarin<sup>1</sup>, Charles-Antoine Arthaud<sup>1</sup>, Fabrice Cognasse<sup>1,2</sup>, Olivier Garraud<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>French Blood Establishment, Auvergne-Loire, Saint-Etienne; <sup>2</sup>GIMAP EA3064, University of Saint-Etienne/Lyon, Saint-Etienne, France

Dear Sir,

Platelet component transfusions are still major contributors to adverse events, and avoiding storage lesions and the production of inflammatory products is of major importance during the production of these components. *Ex vivo* activation of platelets may lead to excess production of inflammatory factors that can cause acute transfusion reactions<sup>1</sup>. We compared the induction of inflammatory platelet storage lesion in platelet components produced by manual (*m*) and automated (*a*) procedures using the TACSI platform (Terumo France S.A., Guyancourt, France). Furthermore, for each procedure we compared platelet additive solutions (*i.e.*, PASIII [Fenwal, La Châtre, France] versus PASIIIM [MacoPharma, Mouveaux, France]) with a mean range of 35% residual plasma. Differences in the composition of these platelet additive solutions have been described previously<sup>2</sup>. The comparison study involved five pooled whole blood buffy-coat-derived platelet components.

The TACSI platform has proven suitable for clinical grade platelet component production with regards to primary haemostasis<sup>3</sup> and platelet additive solutions have been developed to minimise the occurrence of transfusion-related acute lung injury (TRALI) and enable pathogen inactivation. However, little attention, if any, has been given to the impact of procedural changes on the pro-inflammatory lesions potentially inflicted by stored platelets.

The results of the quality control for each product (*m*PC/PASIII, *a*PC/PASIII, *m*PC/PASIIIM, and *a*PC/PASIIIM) are shown in Table I. All products fell within the range acceptable for use. Some significant individual differences were found, but they were corrected by reporting the quantity of product per issued platelet component. According to past experience, we focused on two markers, the activation platelet surface markers CD62p and CD40L, along with their soluble counterparts, which were measured under each condition. For reference values we used thrombin-receptor activating peptide (TRAP), an analogue of thrombin (50 µg/mL; Saint Quentin-Fallavier, France). Measurements were made on the contents of the quality control sampling bag 24 h after whole blood collection; the products in this study were not destroyed, but issued to patients as authorised, because all four types of platelet component are licensed by the notifying and regulatory body (Affsaps). Platelet membrane activation was tested by flow cytometry using fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD41 monoclonal antibody (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) for gating the whole platelet population and allophycocyanin-conjugated anti-CD62p and phycoerythrin-conjugated CD40L monoclonal antibodies (BD Biosciences) (FACSVantage SE flow-cytometer and CellQuestS-Pro software, BD Biosciences). Soluble proteins were measured in supernatant fractions using specific enzyme-linked

**Table I** - Comparison of platelets obtained from different processing systems on day 1. Results are expressed as mean±SD (n=10 in each arm).

Processing systems	Volume (mL)	Platelets (10 <sup>9</sup> /L)	Platelets (10 <sup>11</sup> /unit)	WBCs (x10 <sup>6</sup> /units)
PAS-III-m	348.8±3.23	1298.1±80.96	4.525±0.27	<0.3
PAS-IIIM-m	398.9±4.18 *	1195±61.67	4.771±0.26	<0.3
PAS-III-a	329.8±7.59 ‡	1463.5±87.33 ‡	4.822±0.3	<0.3
PAS-IIIM-a	362.3±7.07 * ‡	1288.9±50.2 *	4.664±0.15	<0.3

**Legend**

\*p <0.05 PASIII vs PASIIIM, ‡ p <0.05 m (manual) vs a (automated -TACSI) using the Mann-Whitney test.

**Table II** - Mean fluorescence intensity (MFI) of CD40L/CD62p and sCD40L/sCD62p released from platelets with or without TRAP stimulation.

PC	PAS-III				PAS-IIIIM			
	MFI		Concentration (pg/10 <sup>9</sup> Plt)		MFI		Concentration (pg/10 <sup>9</sup> Plt)	
<i>Without TRAP</i>								
	CD40L	CD62p	sCD40L	sCD62p	CD40L	CD62p	sCD40L	sCD62p
Manual	10.67±0.139	31.05±4.5	349.3±97.5	3516.7±294	9.27±0.1 *	16.6±0.8 *	1339±227 *	2517±293 *
Automated	10.4±0.11 ‡	19.9±2.05 ‡	935.89±227.2 ‡	1927.4±218.2 ‡	11.7±0.94 ‡ *	19.5±5.7	1603±604 *	2107±237
<i>With TRAP</i>								
	CD40L	CD62p	sCD40L	sCD62p	CD40L	CD62p	sCD40L	sCD62p
Manual	11.3±0.41	117.8±18.24 #	1747±248 #	6819±842 #	9±0.56	40.8±8.7 #	1732±149 #	3501±160 #
Automated	17.8±4.3 #	263.9±95.05 #	1999±302 #	2917±128 #	9.9±0.5	100.5±46.7 #	2664±484 #	3363±202 #

**Legend** Results are expressed as mean±SD, n=10 experiments; \*p <0.05 PASIII vs PASIIIIM, ‡ p <0.05 m (manual) vs a (automated TACSI platform), # p <0.05 without TRAP vs with TRAP stimulation using the Mann-Whitney test.

immunosorbent assays. The monoclonal antibodies to CD62p and sCD40L were purchased from R&D Systems Europe Ltd, Lille, France and Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria, respectively. The reader was a Multiskan EX (Labsystem, Helsinki, Finland). Inter-experimental comparisons of data (10 platelet components in each arm) were performed using the Mann-Whitney U test. P-values <0.05 were considered statistically significant.

Next, we addressed the issue of whether all four types of platelet product were equivalent with regard to their propensity to be activated and secrete detectable inflammatory cytokines *ex vivo*. Slight differences in total CD40L and CD62p platelet surface expression were found between the products processed automatically or manually, irrespectively of the platelet additive solution (Table II). Secreted products were also significantly different between manually and automatically processed preparations. Platelets from all four types of preparations maintained the ability to express and secrete CD62p and CD40L following TRAP stimulation, demonstrating their viability and the absence of detrimental storage lesions (Table II). Significant differences were found but none was consistent with preferential conditions.

None of the 40 platelet components considered led to any reported adverse transfusion reaction, and the individual levels of secreted sCD40L, a molecule that we found correlates with adverse transfusion reactions (R=0.986) (Nguyen *et al.*, submitted), were far below the level necessary to mediate a bioactive effect on encountered cells<sup>4</sup> or that has been associated with TRALI<sup>5</sup>. These findings validate the use of automated platelet component processing with commercially available platelet additive solutions, an

advantage for homogenising the production of platelet components and increasing the production of pooled buffy coat-derived platelets compared to single donor aphaeresis platelet collection, which is currently considered advantageous for the donor and recipient.

## Grant

Financial support was received through grants from the "Amis de Rémi" Association and EFS Auvergne-Loire, France.

*The Authors declare no conflicts of interest.*

## References

- 1) Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, et al. Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion* 2006; **46**: 1184-9.
- 2) Diedrich B, Sandgren P, Jansson B, et al. In vitro and in vivo effects of potassium and magnesium on storage up to 7 days of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution. *Vox Sang* 2008; **94**: 96-102.
- 3) Sandgren P, Saeed K. Storage of buffy-coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects on platelets prepared by the novel TACSI system and stored in plastic containers with different gas permeability. *Vox Sang* 2010; **99**: 341-7.
- 4) Cognasse F, Payrat JM, Corash L, et al. Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand. *Blood* 2008; **112**: 4779-80.
- 5) Refaai MA, Phipps RP, Spinelli SL, Blumberg N. Platelet transfusions: impact on hemostasis, thrombosis, inflammation and clinical outcomes. *Thromb Res* 2011; **127**: 287-91.

Arrived: 23 January 2012 - Revision accepted: 5 April 2012

**Correspondence:** Olivier Garraud  
EFS Auvergne-Loire and GIMAP-EA 3064  
Université de Saint-Etienne, Faculté de Médecine  
15 rue Ambroise Paré  
42023 Saint-Etienne cedex 2, France  
e-mail: Olivier.garraud@efs.sante.fr

**Article II: A computerized prediction model of hazardous inflammatory platelet transfusion outcomes**

## **A computerized prediction model of hazardous inflammatory platelet transfusion outcomes**

Kim Anh Nguyen<sup>1</sup>, Hind Hamzeh-Cognasse<sup>1</sup>, Marc Sebban<sup>2</sup>, Elisa Fromont<sup>2</sup>, Léna Absi<sup>3</sup>,  
Bruno Pozzetto<sup>1</sup>, Fabrice Cognasse<sup>1,3</sup>, Olivier Garraud<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> GIMAP-EA3064, Université de Lyon, 42023 Saint-Étienne, France

<sup>2</sup> Laboratoire Hubert Curien - UMR CNRS 5516

<sup>3</sup> EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France

Address for correspondence and reprint requests: Pr O. Garraud (MD, PhD), EFS Auvergne-Loire and GIMAP-EA 3064, Université de Saint-Etienne, Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France. Tel.: +33 4 77 42 14 67; Fax: +33 4 77 42 14 86; E-mail address: Olivier.garraud@efs.sante.fr

**Key Words:** Platelet, Inflammation, Acute Transfusion Reactions, Machine Learning, Decision Tree, Cytokines/Chemokines.

**Running title:** Immunomodulatory Mediators in Platelet Transfusion Reactions

**Word count:** 6243, **Abstract:** 340 words, **References:** 43, **Figures:** 6, **Tables:** 3,

**Supplemental Figures:** 2, **Supplemental Table:** 0

**Abstract**

Platelet component transfusion leads occasionally, although rarely, to inflammatory hazards. A number of biological response modifiers that are either secreted or can be secreted by the platelets themselves during storage may have some responsibility for such hazards. First, we identified non-stochastic arrangements of platelet-secreted cytokines/chemokines in platelet components that led to acute transfusion reactions. These data provide formal clinical evidence that platelets generate secretion profiles under both sterile activation and pathological conditions. We next aimed to predict the risk of hazardous outcomes by establishing statistical models based on the associations of cytokines and chemokines within the incriminated platelet components and using decision trees. We investigated a large (n=65) series of acute transfusion reactions after platelet component transfusions reported through a very homogenous system at one university hospital. Herein, we used a combination of clinical observations, ex vivo and in vitro investigations, and mathematical modeling systems. We calculated the statistical association of a large variety (n=17) of cytokines, chemokines, and physiologically likely factors with acute inflammatory reactions in patients presenting with severe hazards. We then generated an accident prediction model that proved to be dependent on the level (amount) of a given cytokine-like platelet product within the indicated component, e.g., soluble CD40-ligand ( $>289.5 \text{ pg}/10^9$  platelets), or the presence of another secreted factor (IL-13,  $>0$ ). We further modeled the risk of the patient presenting either a febrile non-hemolytic transfusion reaction or an atypical allergic transfusion reaction, depending on the amount of the chemokine MIP-1 $\alpha$  ( $<20.4$  or  $>20.4 \text{ pg}/10^9$  platelets, respectively). This original approach allows, for the first time, the modeling of a policy of risk prevention

for severe inflammatory outcomes in platelet transfusion therapy. Although most likely non-practical for large-scale use and although the most relevant markers are probably not used, this model offers a unique opportunity for best-fit transfusion in the most fragile patients to avoid placing them at risk of suffering a potentially lethal inflammatory distress syndrome in addition to their causal severe condition. Second, this unique approach may be extrapolated to better handle certain at-risk patients in general.



## Introduction

Transfusion is a safe process and leads to few adverse events (AEs), especially because systematic leukoreduction was implemented for all labile blood components (LBCs). In addition, platelet component (PC) transfusions induce, in general, three times more AEs than red blood cell component (RBCC) transfusions. Platelet-associated AEs occur in 1 out of every 1030 PC transfusions (1). Despite residual leukocyte links, AEs cannot be completely eliminated (2). There are evidence-based observations that the factors associated with stored platelets themselves play a significant role in those AEs, especially in the most severe ones, termed acute transfusion reactions (ATRs) (3-5). These factors include a large number of microparticles; oxygenated moieties of membrane lipids; inflammatory mediators such as histamine, serotonin, and ADP/ATP; and biological response modifiers (BRMs) that themselves comprise cytokines, chemokines, growth factors, inhibitory factors, and related molecules (6-9). There is further evidence that all pro-inflammatory factors increase over time (at  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , in general up to 5 days and occasionally up to 7 days) in stored PCs, which constitute the transfusion inventory issued to patients in need (10, 11). BRMs in particular are either shed from the platelet membranes or secreted from docks or eventually secreted de novo via a particular mechanism as those cells are non-nucleated (12, 13). Soluble CD40-Ligand (sCD40L), also known as sCD154, is considered to be the master pro-inflammatory mediator secreted by platelets in general and by stored PCs in particular (14, 15). On certain occasions, such as those associated with transfusion pathology in recipients, donor platelet  $\alpha$  granules are emptied of sCD40L, and almost all secreted factors (in concentrations suitable for

immune regulation) are freed in the PC supernatant (16, 17). BRMs other than sCD40L have been identified in cases associated with ATRs. Some BRMs are known to be associated with platelets, which may secrete approximately 300 products (16), whereas others were initially not linked with platelet physiology but later acknowledged as normal platelet factors (18, 19). Despite these findings, relating the presence or the increased level of a given BRM within the issued PC and an ATR outcome in the recipient is difficult because all cases address reported hazards and do not overview the non-hazardous events. Additionally, the BRM levels are measured in pathological cases despite elevated concentrations of putatively noxious factors that may also be found in PCs considered safe. Finally, most relationships established thus far between potentially harmful BRMs (from the donor's blood) and recipients presenting with ATRs have been determined by means of *ex vivo* assays, with neither direct proof of significance nor clinical relevance in the donors or patients. To overrule this caveat, we sought to collect clinical information regarding PC-linked ATRs and the residual PCs administered to these patients, which were shipped to our laboratory, and to measure a large variety of BRMs, which were then compared with asymptomatic pairs of recipients and PCs that were matched for a number of parameters. This strategy allowed the identification of 14 relevant BRMs, with some being expected (such as sCD40L) and others not previously associated with platelets. These findings further allowed the creation of profiles of BRMs linked with clinical presentations. The data also permitted the establishment of predictive models of hazard outcome based on the presence and/or the levels of three BRMs: sCD40L, IL-13, and MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein). This approach, combining clinical reports, biological data, and mathematical/statistical models, is original and may help

develop predictive tests to prevent the transfusion of possibly harmful PCs, especially in fragile patients unable to cope with inflammatory conditions.

## **Results**

### **The study population**

The study population consisted of patients who received single donor apheresis (SDA)-PC transfusions in the previous 3 years in a very homogeneous case observational study: one single blood establishment (BE) collected, processed, prepared, controlled, and transfused the PCs and contributed to the follow-up (surveillance) of the cases. The surveillance, however, of the transfused patients was conducted by one dedicated team of physicians in a single university hospital, who agreed to discuss the cases with the BE to harmonize the declaration of an AE in accordance with the national regulation in force. Over the investigation period, 65 inflammatory-type ATRs were reported, which excluded obvious or later acknowledged cases of transfusion transmitted bacterial infections (TTBI), transfusion-related acute lung injury (TRALI), severe and documented allergy cases, and cases obviously linked to an Ag/Ab conflict. The parameters linked to the PCs (65 “pathogenic” and 59 “non-noxious”) are presented in Table 1. There were no significant differences in the patient-dependent parameters. Furthermore, after dividing the ATR and control populations by donor age into five arbitrary categories (<30, 31-40, 41-50, 51-60, and >60 years of age), we identified no significant

association between donor age and ATR occurrence in the recipients ( $\chi^2$  test  $>0.05$ ). The sex ratios in the control- and ATR-associated donors were similar (1.56 and 1.5, respectively; z test  $>0.05$ ). Thus, there was no association between the gender of the donors and ATR occurrence in the recipients (OR=0.96,  $\chi^2$  test  $>0.05$ ).

We next attempted to examine whether there was a relationship between the mean age of the platelets at delivery and the broad clinical presentation. We considered three main categories of clinical presentations; however, these categories do not obey a strict consensual (international) classification as we considered them broadly “inflammatory type.”

ATRs (n=65) were divided as follows: febrile non-hemolytic transfusion reactions (FNHTRs), 48%; atypical allergic transfusion reactions (AATRs), 40%; and hemodynamic trouble (HT) (excluding ALI [and TRALI], transfusion-associated circulatory overload [TACO], myocardial Infarction, and pulmonary embolism), 4% (**Fig. 1A**). This classification system is in line with what is usually used in hemovigilance reporting systems (1). The ATR distribution was different when PCs were delivered before (20%) (**Fig. 1B**) or after 3 days (80%) (**Fig. 1C**) of age (shelf-life). Then, we investigated each population before or after the 3-day PC storage period. We observed that in the  $\leq 3$ -day storage group, the majority of reported ATRs were AATRs (55%), followed by FNHTRs (27%) and HT (18%). In the  $>3$ -day group, we observed that the majority of reported ATRs were FNHTRs (54%), followed by AATRs (36%) and HT (10%). FNHTRs were significantly less frequent (27% vs. 54%; z test,  $p=0.017$ ), whereas AATRs were more frequent (55% vs. 36%; z test,  $p=0.269$ ) when the PCs were “fresher”.

The 3-day threshold was considered based on our findings regarding PC storage time and the secretion of significant amounts of pro-inflammatory cytokines, particularly those that lead to ATRs (20% vs. 80% in the <3-day vs. 3–5-day storage periods, respectively,  $p < 0.05$ ) (**Table 1**).

As PCs were obtained with two distinct types of processes, we sought to examine the possibility that one process activates platelets more than the other with respect to the secretion of soluble, inflammatory-type factors. No consistent difference between the Amicus™ and Trima™ processes was observed, with the exception of a higher Gro- $\alpha$  concentration on days 3 and 4 in PCs prepared with the Amicus™ system and higher CCL19 concentration in PCs prepared with the Trima™ system; however, these variations were homogenized by day 5 (**Fig. S2, Supplemental figures**). The data were also similar regarding the platelet additive solutions (PAS) used (data not shown). In aggregate, we found no differences in the soluble factors in the PCs that produced ATRs between the two processes.

### **Cytokines and related secreted factors found in left-over PCs that produced ATRs**

The supernatants of SDA-PCs that resulted (65) or not (59 matched controls) in inflammatory-type ATRs were tested for 17 cytokines, chemokines, and BRMs, which were available for analysis using the Luminex® platform. sCD40L was tested as a reference marker because of its consistent association with ATRs in both our experience and the experiences of several other groups (7, 13, 15, 20-22).

Using this particular set of BRMs, we initially observed three types of responses.

1) Three factors among the seventeen were not relevant in this series, either because

they were equally present in PCs that produced ATRs and in controls (with high consistency, e.g., BCA-1 (B-cell attracting chemokine 1), or with high variability precluding homogeneity and significance, e.g., CCL20) or because they were absent in both types of SDA-PCs (e.g., TSLP) (**Fig. 2A**). 2) Ten of these factors were significantly ( $p < 0.05$ ) more elevated in SDA-PCs that produced ATRs in the recipients than in the matched control PCs. In order from maximum to minimum elevated amounts, these factors were RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted), sCD62P, sCD40L, Gro-1a, CXCL19, C-CKine, MDC, IFN- $\gamma$ , and CCL19 (**Fig. 2B**). 3) Four factors were classified within the “pathogenic-type” PCs and were not detectable in the controls, even though the amounts in the ATR-inducing PCs were higher than trace amounts, i.e., there were order-of-magnitude differences: IL-23, IL-33, IL-13, and IL-15 (**Fig. 2C**). Importantly, to the best of our knowledge, none of these BRMs have been previously included within the commonly acknowledged platelet-associated molecules (23).

### **Relevance of platelet-associated immunomodulatory factors in the stored platelet components (transfusion inventory)**

Several years ago, we and others produced evidence that platelets stored from day 1 (after collection and processing, standing for incoming in distributable products, i.e., the inventory) until days 5 to 7 were capable of secreting copious amounts of BRMs, independent of any deliberate addition of activation factor(s). The secretion profile of many of these BRMs appears to depend solely on the shelf-life of the platelets, (2, 13, 18, 24, 25), but it may be modified by the initial (whole blood buffy-

coat pools vs. SDA-PCs) or additional processes (PAS vs. 100% autologous plasma) (26). The profile also depends on the type of cell separator when considering SDA-PCs (26). Herein, because we identified a number of BRMs that have not previously had their secretion kinetics in shelf-life storage evaluated, we sought to evaluate their profiles between days 0 and 5 after collection to determine any possible relevance with the present case study. We considered the amount of each cytokine in the remaining PC returned to our BE facility and compared the BRMs in the “pathogenic” and non-pathogenic (control) PC bags.

In addition, we identified four main profile types. 1) Five BRMs (RANTES, sCD62P, BCA-1, IFN- $\gamma$ , and CCL19) were consistently secreted by both “pathogenic” and control PCs, with no significant change over time from days 1 to 5. However, although there appeared to be no variation at all between either situation regarding BCA-1, the amounts of sCD62P, sCD40L, BCA-1, and IFN- $\gamma$  were slightly (the former three) or significantly (the latter;  $p < 0.05$ ) more elevated (**Fig. 3A**). 2) Another four BRMs (IL-23, IL-33, IL-15, and IL-13) were constantly secreted in almost equivalent amounts from days 1 to 5 in the supernatants from “pathogenic” PCs, whereas they were not detectable at any time from days 1 to 5 in the control samples (**Fig. 3B**). 3) Similar to the previous situation, CCL20 and CXCL9 were found at trace, although quite invariable, amounts between days 1 and 5 in the control PC supernatants and at elevated concentrations in the “pathogenic” PC supernatants on days 4 and 5 ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 3C**). The decrease in CCL20 on day 5 may be attributable to whole protein degradation, which prevented optimal access to the detecting Ab, as has been observed in previous studies (2, 6). The last four BRMs (Gro- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , and C-6kine) (**Fig. 3D**) were elevated in both the control and “pathogenic” supernatants,

although with significant variations between the controls and ATR cases (a finding that was not unexpected for sCD40L as it confirms our and others' findings) (7, 12, 14, 18).

The control PCs were prepared just as they would be for transfusion purposes, with the exception that small volumes were sampled at the time of delivery for this study. We observed no significant modulation of the CCL22 (MDC) and CCL19 concentrations in the platelet supernatant during storage (**Fig. 4**). The levels of sCD40L and sCD62P increased notably by day 3 (on average by 160% and 77%, respectively), and the levels of 6-Ckine, RANTES, and Gro- $\alpha$  increased by day 5 (on average by 385%, 138%, and 238%, respectively). In contrast to the "pathogenic" PC supernatants, we observed no modulation of platelet immunomodulatory factor concentration during storage, most likely because of an initially high concentration of this molecule. This finding most likely suggests that a hyperresponsive platelet status characterizes the PCs involved in ATRs (**Fig. 2C and Fig. 3B**).

**Platelet components associated with acute transfusion reactions display characteristic profiles of secreted platelet factors.**

The present study revealed that among the various BRMs tested—even though the series was not comprehensive—there were preferential associations of secreted products (**Table 2**). For example, sCD40L was significantly associated with ( $p < 0.05$  with  $\alpha = 0.05$ ) MIP-1 $\alpha$  (Pearson's correlation coefficient PCC=0.56), IL-13 (PCC=0.472), IFN- $\gamma$  (PCC=0.461), IL-15 (PCC=0.545), MDC (PCC=0.336), and sCD62P (PCC=0.549) but not with 6-Ckine, CXCL9, IL-23, IL-33, CCL19, RANTES, CCL20, and BCA (NS). In contrast, IL-33, an alarmin-like cytokine that usually characterizes endothelial and



epithelial cells (27), has not been previously reported in association with platelets. IL-33 was found in the present study to be significantly correlated with 6-Ckine (PCC=0.649), IL-23 (PCC=0.707), MDC (PCC=0.277), and CCL19 (PCC=0.365).

**The selective content in secreted factors present in platelet components may be predictive of the risk of an acute transfusion reaction.**

We next aimed to determine whether given profiles of BRMs, which would have significant associations in certain PCs producing ATRs, were random. Thus, we evaluated the frequency of each product in the each of the 65 cases and its association with the other 64 cases using the ROC method, which allows the estimation of the chances that a given product is present stochastically and not specifically.

A ROC curve of each soluble factor was generated and displayed the relationship between the fraction of true positives (i.e., a specific increase in the considered soluble factor concentration in “pathogenic” PC supernatants) and the fraction of false positives (i.e., an increase in the considered soluble factor concentration in supernatants that were not reported to be associated with an AE) at various threshold settings. The area under the curve (AUC) of a factor was then used to illustrate its performance to classify the PCs into two categories (control or ATR-associated) and to select the best cut-off values for the cytokines/BRMs in the PC supernatants associated with ATRs. The greater the importance of the discriminatory ability, the more the ROC curve deviates from the random classifier line and becomes closer to the ideal classifier line. For example, sCD40L (**Fig. 5A**), MIP-1 $\alpha$  (**Fig. 5B**), and IL-13 (**Fig.**

**5C)** were better predictive markers for the possibility of the occurrence of an ATR in PC supernatants consisting of these molecules than the other BRMs, even if the latter were associated with ATR cases (e.g., BCA-1) (**Fig. 5D**).

We next calculated the AUC, which represents the level of prediction of a given factor regarding the possible occurrence of an ATR. The discriminatory ability of each factor was compared with 0.5 (random classifier), with a p-value <0.0001 (z-test). When the AUC was different from 0.5, the ATR occurrence was likely not random. Platelet supernatant levels with significant levels of sCD40L, IL-13, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, Gro- $\alpha$ , MDC, IL-15, CCL20, IFN- $\gamma$ , 6-Ckine, CCL19, sCD62p, and CXCL19 displayed significant association with the occurrence of an ATR compared with the control group. In contrast, the levels of cytokines and BRMs such IL-33 and IL-23 proved less sensitive, and BCA-1 was not informative at all, being similar to the controls (**Table 3**). The cut-off value of each soluble factor test with the optimal sensibility and specificity is presented in **Table 3**.

In aggregate, when the data for individual cases are cross-sectioned for prediction based on ATR cases with the random data possibly found in the control cases, few platelet-associated soluble factors (parameters) are reliably predictive of an ATR outcome if considered in isolation.

### **Results from “learned decision trees”**

To obtain a descriptive, interpretive model of the functional relationship between a given set of cytokines selected by a cross-validated committee method, we applied a decision tree with the Weka platform. A decision tree describes several

paths leading to leaves that assign a class to a new case, such as that depicted in **Fig. 6**. Given an individual donor PC's BRM profile, a two-branch decision may be designed downward to one of the two terminal nodes (ATR and control boxes). We can thus predict that an ATR is excluded when  $sCD40L \leq 289.5$  pg/ml/ $10^9$  platelets. In contrast, if the PC  $sCD40L$  level is  $>289.5$  pg/ml/ $10^9$  platelets, there is a significant risk of an ATR. Interestingly, the model further predicts that when  $sCD40L$  is  $>289.5$  pg/ml/ $10^9$  platelets and the MIP-1 $\alpha$  level is  $>20.4$  pg/ml/ $10^9$  platelets, there is a significant risk of an FNHTR-presenting ATR. In the presence of a similar amount of  $sCD40L$  ( $>289.5$  pg/ml/ $10^9$  platelets) and when MIP-1 $\alpha$  is  $\leq 20.4$  pg/ml/ $10^9$  platelets, there is a significant risk of an AATR-presenting ATR (**Fig. 6A**). Surprisingly, given that the involvement of  $sCD40L$  in a transfusion-like pathology was not a surprise to us, another BRM, unexpected in this role at that time, proved highly informative. On the decision tree model based on IL-13 values, this secreted product was demonstrated to be equivalent to  $sCD40L$  in predicting an ATR occurrence. When IL-13 is  $\leq 0$  pg/ml/ $10^9$  platelets, the risk of ATR was very unlikely, but when IL-13 is  $>0$  pg/ml/ $10^9$  platelets (i.e., in the presence of even minute amounts of this interleukin) and MIP-1 $\alpha$  is  $>20.4$  pg/ml/ $10^9$  platelets, then there is a significant risk of an FNHTR-presenting ATR. Conversely, when IL-13 is  $>0$  pg/ml/ $10^9$  platelets and MIP-1 $\alpha$  is  $\leq 20.4$  pg/ml/ $10^9$  platelets, then there is a significant risk of an AATR-presenting ATR (**Fig. 6B**). These data are valuable because one can theoretically deduce the possibility of a risk attributable to a given PC at both the time of its administration and the clinical presentation. However, the application of these findings is not currently practical for daily clinical practice. Even if these findings are meaningless in practical clinical medicine, they reinforce the idea that platelets have cytokine/BRM secretion

programs that are not merely stochastic but also instrumental in altering the recipient's physiology and eventually facilitating pathology.

## Discussion

Transfusion has become extremely safe. Several safety measures have been implemented over time to achieve this noticeable progress. The remaining risks fall chiefly into three main categories: overload and metabolic accidents (and—at large—the technique of transfusion), human errors (comprising chain errors, such as the wrong product to the wrong patient), and an emerging hazard characterized by deleterious inflammation in the patient (recipient). Among the transfused LBCs, PCs lead to nearly half of the reported AEs, whereas they account for only 10% of the blood components (BCs). PCs are also the BC that leads to the majority of inflammation-associated AEs and ATRs in aggregate. One likely explanation is that platelets continuously secrete a myriad of factors (several hundreds), including several dozen cytokines, chemokines and other similar molecules, collectively termed BRMs. Based on their *ex vivo* observations, several groups, including ours, harbored the suspicion that such pro-inflammatory factors are related to the reported inflammatory symptoms in ATRs, although directly relating the clinical and laboratory findings was not possible. This report is most likely the first to offer direct evidence that some PCs contain platelets having differential secretion capacity without pre-identified activation signal(s) and without any intentional activation factor being added exogenously in the context of transfusion. Some sets of BRMs may favor a pathogenic situation in certain types of recipients. This work also demonstrates that BRMs, as secreted products, are not stochastic but rather display significant associations. Furthermore, it demonstrates that some of the BRMs and, more importantly, the associations of certain BRMs are not only instrumental for triggering

an inflammatory response in the recipient when their gross amounts exceed a threshold but also critical in the clinical manifestation of the ATR symptoms. Finally, because we aimed to decipher the conditions that render a PC potentially able to produce an ATR, we developed a statistical model that predicts the safety or pathogenicity of a given PC. This application is a first in transfusion medicine, a discipline that makes every effort to dampen the unavoidable mismatched characteristics of blood donors and recipients and their consequences; however, these efforts are based only on adapted immune parameters (blood group and human leukocyte antigen/human platelet antigen [HLA/HPA] antigens) that can be grossly tested or cross-matched by serology. We have now extended the safety outcomes of BC compatibility to innate immunity while keeping in mind that inflammation can be extremely serious and life threatening.

In more detail, the present work is novel in at least three ways. First, it describes six novel cytokines that were not known to have a “normal” association with platelets, even though more than 1,000 proteins have been previously associated with platelet functions and physiology, including 626 that can be secreted (28). These six cytokines should be added to another two that our group recently identified (IL-27 and Ox40L) that are also associated with transfusion pathology in a pathogenic triad (95%) with sCD40L (29). These findings indicate that the platelet world is far from being completely understood. The reason why some platelet (glyco)-proteins are misrecognized is most likely—as has been acknowledged in this report—because they are only essentially revealed in pathological conditions. IL-13, for example, appears pathogenic when it is highly secreted. This cytokine is not borrowed from the donor’s plasma (as the detection level in normal plasma is under the minimum level of

detection of IL-13 with our method [0 pg/ml]), and as shown here, IL-13 can be elicited upon appropriate in vitro stimulation (as described in an allergic asthma context) (30). Whether IL-13 (and other pathogenic-type cytokines) is secreted by platelets in certain PCs without an apparent stimulus, while those PCs are maintained under generally suitable sterile conditions that are used worldwide, remains to be discovered. Although, at this time, it is highly speculative, we favor the donor genetics hypothesis (certain donors may present with characteristics that render them prone to stimulate certain BRMs upon lower stimulus thresholds than the general donor population). This characteristic remains at a physiological level until those platelets are infused to an unrelated individual (a patient/recipient) because they constitute a PC for transfusion purposes.

The second level of novelty in this work is that it offers insights into platelet-linked pathologies. Previous reports have revealed that platelet-secreted products become associated when they are stimulated. We recently extended data that were initially generated using in vitro models to clinical situations involving transfusion. Nearly all ATR cases tested (29/30), for example, relate to PCs with elevated levels of sCD40, IL-27, and Ox40L together. A general difficulty in transfusion hazards is relating ex vivo observations to clinical issues. The present report, with a “yes or no” situation for IL-13, provides such direct evidence. Furthermore, the MIP-1 $\alpha$  data demonstrate a clear relationship with the symptoms, which was not expected. MIP-1 $\alpha$  is produced by T and B cells, Langerhans cells, neutrophils, and macrophages and is also produced by platelets ( $\alpha$  granules) (23). MIP-1 $\alpha$  has proinflammatory activities involving the attraction and activation of monocytes, dendritic cells, and NK cells, and it is also chemotactic for basophils and eosinophils. In addition, the chemokine is a potent

activator of basophils (MIP-1 $\alpha$  acts as a direct agonist of these cells for releasing the inflammatory mediators) (31). Several reports indicate an intimate relationship between leukocyte-endothelial cells, adhesion molecules, and the expression of the monocyte-derived chemokine MIP-1 $\alpha$  during cellular adhesion. This mechanism may serve an important role in cell activation and the recruitment of leukocytes during the initiation of an inflammatory response (32-34). Platelet-originating factors (BRMs) are known to be involved in transfusion pathology. sCD40L, a cytokine-like product that originates essentially from platelets (almost 95% (35)), has been associated with pathology in ex vivo models. Furthermore, Silliman *et al* calculated that sCD40L at 10 ng/mL was able to trigger TRALI experimentally. Nevertheless, more recent data from Toy *et al* dispute the causative role of sCD40L in the physiopathology of TRALI. Our present data do not address the TRALI issue but do confirm the pathogenic role of sCD40L in transfusion above a certain level (exceeding 289.5 pg/10<sup>9</sup> platelets herein). In addition, platelet-issued products such as MPs have been demonstrated to alter tissues, such as joints (36). In aggregate, these data suggest balanced roles of platelet products, being physiologic or pathologic depending on the stimulation mode, the amount secreted, and the site of secretion. Our data contribute to this knowledge base with an ATR prediction model. This model relates directly to transfusion safety. Overall, much progress has been achieved in transfusion safety. Transfusion transmitted-infectious risks have been minimized by improving the medical selection of donor candidates and biological testing of donated blood. Many BEs also perform bacterial testing with PC delivery. Immunological risks have been reduced by baseline or extended immuno-hematological testing to prevent Ag/Ab conflicts. Inflammation is addressed in transfusion safety essentially by measures to avoid three types of



hazards also linked with an Ag/Ab conflict: ABO mismatches (which creates a potentially lethal cytokine storm), TRALI, and severe allergic reactions. However, the potential hazard of individual BCs is not currently addressed, except for bacterial detection, but the current techniques have many limitations. The avoidance of anti-HLA Abs in BCs is generic and not adjusted to specific patient situations. Our approach proposes a new paradigm in transfusion medicine. It postulates that PCs can create risk independent of the immunization process. Those risks are unpredictable by current means. Because transfusion, particularly PC transfusion, is intended to treat fragile patients, avoiding any additional risk for those patients and making an effort to ensure the safest BC are legitimate.

Third, this work provides new insight in translational medicine. It proposes the use of statistical tests to assist decision-making to avoid hazards. In contrast to other disciplines in which a 'yes or no' decision has to be made to avoid the secondary effects of a given drug, in this case, the math offers the possibility to select the best-fitted treatment for a given patient and to discard BCs that may be at risk. Although the risk is not certain, based on the principle of precaution and until novel decision trees are created to decipher who is an at-risk patient, the decision of not considering these BCs for use in patients, especially in the most fragile patients who have a minimal ability to cope with acute inflammatory syndrome, may be made.

In aggregate, the present model does not as yet assist delivery for all patients awaiting PC transfusion. Doing so would threaten the PC inventory and considerably delay administration, a situation not compatible with current emergency needs. Furthermore, the model is perhaps not optimal because it cannot be excluded that other BRMs, which were not tested here, are not more relevant than those that were

tested, and therefore selected, here. Finally, the model would be completed by a test that also predicts who may be a patient at risk of presenting post-transfusion acute inflammation. As it stands, the model facilitates moving toward the design of better-fitted assistance to patients, which can use prediction tests provided by professional statistical models.

Machine learning approaches have wide applications in bioinformatics, and decision trees are one of the most popular and successful approaches applied in this field (37). Based on a large number of assays (17 in this study) with limited sample sizes ( $n=124$ ), this method allows the generation of a simple, interpretable, and reliable model such as a model using IL-13 or sCD40L. Either model can distinguish pathological PCs from the control PCs with a high success rate. In medical or biomedical research, this approach is used more often for disease prediction and screening. One of the major challenges for proteomic studies is the comprehension of mining biologically useful information from the *in vitro*, *ex vivo*, or *in vivo* data. In addition, non-classical statistical methods for data analysis need to be performed. To obtain a comprehensible picture of biological phenomena at the molecular, cellular, and organismal levels, researchers must evaluate both all of these attributes and the relationships among them. Therefore, various machine learning classification algorithms have been developed for biological data analysis, including decision trees (38, 39). The decision tree algorithm appears to poorly be used in the transfusion context as blood involves a large amount of biological data involving intricate parameters from i) the donor, ii) the labile blood components and processing attributes, and iii) the recipient (40).

## Acknowledgements

We thank Drs. Catherine Argaud, Patricia Chavarin, Sophie Acquart, Françoise Boussoulade, Ms. Pauline Damien, Marie-Ange Eyraud, and Mr. Charles-Antoine Arthaud (EFS Auvergne-Loire, France) for help in obtaining and preparing the human blood cells. We also thank Drs. Halim Benamara, Patrick Fabrigli, Hélène Odent-Malaure, Pascale Oriol, Christiane Mounier, Denis Guyotat, and Delphine Gorodetzki for sharing clinical data. The authors gratefully acknowledge the invaluable help of Ms. Sophie Ramas, Mr. Pierre Marcoux, and Mr. Emeric Pagès with the experimental procedures. Financial support was received through grants from the National and Regional Blood Bank, EFS Auvergne-Loire, France, the Association “Les Amis de Rémi,” Savigneux, France, and the French National Agency for Drug Safety and Health Products (ANSM).

## Materials and Methods

### Cases and controls

We reported previously the methods for collecting SDA-PCs at our BE (See Supplemental Materials and Methods). We identified 65 PCs that were associated with ATRs during the years 2008 to 2011 over more than approximately 23,250 SDA-PCs produced and delivered during this period. Surveillance and hemovigilance reports were performed in accordance with the national and regional procedures of this BE. In those cases, the remainders of the PC bags were shipped back to the BE facility, along with patient serum samples, for further investigation by split sampling: one sample was used to investigate the possibility of TTBI, another one to examine the parameters of blood compatibility (immune hematology), and a third one to test the inflammatory markers (this study). The PCs were transferred in a polypropylene tube and centrifuged at 500 g for 5 minutes. The supernatants were stored at -80°C for the soluble factor assays. The 65 PCs that were associated with ATRs were compared with 59 control PCs that were not associated with an ATR. The two sets of PCs were matched in terms of storage duration.

All considered cases were scored as 3 (severe) according to the ISBT scaling system (41), i.e., necessitating medical assistance, with no grade 4 (i.e., lethal) cases observed in this survey. The cases with accountability grades of 3 (“probable”) and 4 (“certain”)—in terms of accountability according to this international scale—were retained for the survey, and the “unlikely” and “possible” cases were discarded.

After having excluded hazards obviously linked to the causal pathology in the transfused patients, the diagnosis of inflammatory-type ATR was made on the immediate observation/report of 1) FNHTR, generally associated with fever, rigors, and/or chills; 2) AATR, which commonly involves erythematous rash, urticaria, and/or pruritus or more severe reactions with angioedema, which are combined with the further discharge of typical allergic biology, such as elevated serum tryptase, histamine, or IgE; and 3) in rare occasions, HT with tachy-/bradycardia and/or hyper-/hypotension resembling non-septic shock. Those pathologies are, in general, associated with the inflammatory cases (42). We excluded infectious shock, overload, and objective cardiopulmonary lesions. We also excluded all cases of ATR with a known Ag/Ab conflict such as allo-immunization (against the donor's HLA and/or HPA), post-transfusion purpura, or refractoriness (and bleeding). As already stated, all TTBI (bacterial and other cases) were also discharged from the present survey (with secondary confirmation/identification because all those cases are—by law—investigated at least for bacterial contamination).

For the present study, we selected 59 “control” APCs that were matched with each ATR sample for the same storage time, preparation processor, and PAS and did not induce any ATR. These controls were randomly included in the storage group. The control SDA-PCs were also matched for the gender and age of the donors (**Table 1**).

**Cytokine, chemokine, and biological response modifier measurement in platelet component supernatants**

PCs that resulted in ATR were shipped almost immediately after observation of the ATR to our BE according to the procedure in place at this BE. The supernatants were discarded within hours and frozen until assay, with a maximum of 12 h of elapsed time in the case of night AE (**Fig. S1 – Supplemental figures**).

With the exception of certain BRMs for which the Luminex™ format is either not available or not convenient, we mainly focused on factors that could be tested by highly reproducible technology. We thus tested Gro- $\alpha$ , sCD40L, 6-Ckine (CCL21), CXCL9, IL-13, IL-15, IL-23, IL-33, MIP-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MDC, CCL19, CCL20, BCA-1, and TSLP in the PC supernatants using Luminex™ technology (using panels I, II, and III: HCYTOMAG-60K-08, HCYP2MAG-62K-05, and HCYP3MAG-63K-03; Millipore, Molsheim, France), according to the manufacturer's instructions. The results were determined using a Bioplex 200 system (BioplexManager™ software; Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and adjusted to  $10^9$  platelets.

Alternatively, a few BRMs of interest were tested via ELISA using a commercial kit (R&D Systems Europe Ltd, Lille, France) according to the manufacturer's instructions and as described previously. Those tested in such a manner included RANTES and sCD62P (2). Duplicate ELISA data for each sample were fitted separately and then averaged to provide the final result and standard deviations. Absorbance at 450 nm was determined with an ELISA reader (Magellan software Sunrise™; Tecan group Ltd., Lyon, France). Data (expressed in pg/ml) were adjusted to  $10^9$  platelets.

## **Statistics**

The concentrations of soluble factors between the two groups were compared using a two-tailed Student's t test, and ANOVA tests were performed to compare these concentrations per storage day. For each factor, the difference was considered significant if the p-value was  $<0.05$ . Correlations between the variables were assessed using Pearson coefficients. One given correlation was considered significantly different from zero when the p-value was  $<0.05$ .

Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to determine the cutoff values of soluble factor assays, and the AUCs were used to calculate the discriminatory ability of every candidate factor and classify them as potential sources of ATR. For each factor, a two-sample z-test was performed to test the null hypothesis. If the calculated p-value was below the significance level ( $\alpha=0.05$ ), then the AUC was considered significantly different from 0.5 (null hypothesis, meaning no discriminating power). All statistics were calculated using computer software XLSTAT™ (Addinsoft, Paris, France).

### **Decision-tree learning**

Decision-tree learning, used in statistics, data mining and machine learning, uses a decision tree as a predictive model that maps observations about an item to conclusions about the item's target value. Decision-tree learning aims to predict the value (called the class) of a particular target attribute for unseen data (called the test set), according to the values of other attributes for known examples (called the training set). The internal nodes of the tree represent tests on a given attribute, each branch represents the outcomes of this test, and each leaf node represents the class

label (the decision taken). A path from the root node to a leaf can be viewed as a classification rule. The general “Top Down Induction of Decision Tree” (TDIDT) algorithm is given as follows:

```

function TDIDT(E: set of examples) returns tree;
  T' := grow_tree(E);
  T := prune(T');
  return T;
function grow_tree(E: set of examples) returns
tree;
  T := generate_tests(E);
  t := best_test(T, E);
  P := partition induced on E by t;
  if stop_criterion(E, P)
  then return leaf(info(E))
  else
    for all Ej in P: tj :=
grow_tree(Ej);
    return node(t, {(j, tj)});

```

The algorithm first “grows” a tree and then possibly “prunes” it to address potential over-fitting phenomena using the training set (using error rates or statistical error pruning based on a minimum description length principle). The main “Grow\_tree” function has some general characteristics that vary according to the particular chosen algorithm. We chose the most well-known decision tree learning algorithm, known as C4.5, and implemented it in the Weka platform (Weka™, University of Waikato, New Zealand) (43). For continuous attributes, C4.5 generates as many tests as possible to separate between two consecutive values of this attribute in the training set. For discrete attributes, all the possible tests are generated. To select the best test, C4.5 makes a decision based on maximizing the gain brought by each test to the global entropy computation based on the set of examples involved in this test. The stopping criterion is a statistical test based on a minimum description length principle (herein, we used the default value provided by Weka, which was 0.25). The class label in each leaf is the majority class of all training examples for which all tests from the root to this leaf are true.



Decision-tree learning algorithms are popular algorithms in machine learning because they produce sound (it generalizes standard statistics), simple, and interpretable prediction models. Their simplicity is because a very small subset of all possible tests are actually used in the model because the algorithm implicitly performs a feature selection process (when choosing the best tests) that allows the capture of more relevant variables.

In our particular case, from a set of 101 training samples with 17 attributes (age of the blood sample, age of the donor, platelet count, and levels of Gro- $\alpha$ , sCD40L, 6-Ckine, CXCL9, IL-23, MIP-1 $\alpha$ , IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-15, MDC, IL-33, CCL19, CD62P, and RANTES), we could predict the risk associated with a given cytokine if present, absent, or present in excess (3 classes: AATRs, FNHTRs, and Control), which allows the forecasting of unfavorable outcomes in patients.

### **Authorship Contributions and Disclosure of Conflicts of Interest**

#### **Contribution:**

- K.A.N. designed and performed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript.
- H.H.C. performed the study and analyzed the data.
- M. S. analyzed the data.
- E. F. analyzed the data.
- P.C. analyzed the data.
- L.A. analyzed the data.
- B.P. analyzed the data.

- F.C. designed the study, analyzed the data, wrote the manuscript, and co-supervised the entire project.
- O.G. designed the study, analyzed the data, wrote the manuscript, and supervised the entire project.

The authors declare no competing financial interests

**References:**

1. Rapport d'activité hémovigilance France 2011. (ANSM, 2012).
2. F. Cognasse, F. Boussoulade, P. Chavarin, S. Acquart, P. Fabrigli, B. Lamy, O. Garraud, Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion* **46**, 1184-1189 (2006).
3. J.-P. Tung, J. F. Fraser, M. Nataatmadja, K. I. Colebourne, A. G. Barnett, K. M. Glenister, A. Y. Zhou, P. Wood, C. C. Silliman, Y. L. Fung, Age of blood and recipient factors determine the severity of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Crit Care* **16**, (2012).
4. N. M. Heddle, Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Current opinion in hematology* **6**, 420-426 (1999).
5. D. M. Sayah, M. R. Looney, P. Toy, Transfusion reactions: newer concepts on the pathophysiology, incidence, treatment, and prevention of transfusion-related acute lung injury. *Critical care clinics* **28**, 363-372, v (2012).
6. F. Cognasse, J.-C. Osselaer, J. M. Payrat, P. Chavarin, L. Corash, O. Garraud, Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* **48**, 809-813 (2008).
7. F. Cognasse, J. M. Payrat, L. Corash, J. C. Osselaer, O. Garraud, Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand. *Blood* **112**, 4779-4780 (2008).
8. J. W. Park, B. Piknova, J. Kurtz, S. Seetharaman, S. J. Wagner, A. N. Schechter, Effect of storage on levels of nitric oxide metabolites in platelet preparations. *Transfusion* **53**, 637-644 (2013).
9. P. Sandgren, S. Meinke, E. Eckert, I. Douagi, A. Wikman, P. Høglund, Random aggregates in newly produced platelet units are associated with platelet activation and release of the immunomodulatory factors sCD40L and RANTES. *Transfusion*, (2013).
10. F. Cognasse, H. Hamzeh-Cognasse, S. Lafarge, S. Acquart, P. Chavarin, R. Courbil, P. Fabrigli, O. Garraud, Donor platelets stored for at least 3 days can elicit activation marker expression by the recipient's blood mononuclear cells: an in vitro study. *Transfusion* **49**, 91-98 (2009).
11. P. Chavarin, F. Cognasse, C. Argaud, M. Vidal, C. De Putter, F. Boussoulade, C. Ripaud, S. Acquart, L. Lin, O. Garraud, In vitro assessment of apheresis and pooled buffy coat platelet components suspended in plasma and SSP+ photochemically treated with amotosalen and UVA for pathogen inactivation (INTERCEPT Blood System). *Vox Sang* **100**, 247-249 (2011).
12. N. Blumberg, K. F. Gettings, C. Turner, J. M. Heal, R. P. Phipps, An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions. *Transfusion* **46**, 1813-1821 (2006).

13. N. Blumberg, S. L. Spinelli, C. W. Francis, M. B. Taubman, R. P. Phipps, The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunol Res*, (2009).
14. J. Kaufman, S. L. Spinelli, E. Schultz, N. Blumberg, R. P. Phipps, Release of biologically active CD154 during collection and storage of platelet concentrates prepared for transfusion. *J Thromb Haemost* **5**, 788-796 (2007).
15. S. Y. Khan, M. R. Kelher, J. M. Heal, N. Blumberg, L. K. Boshkov, R. Phipps, K. F. Gettings, N. J. McLaughlin, C. C. Silliman, Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* **108**, 2455-2462 (2006).
16. P. Toy, O. Gajic, P. Bacchetti, M. R. Looney, M. A. Gropper, R. Hubmayr, C. A. Lowell, P. J. Norris, E. L. Murphy, R. B. Weiskopf, G. Wilson, M. Koenigsberg, D. Lee, R. Schuller, P. Wu, B. Grimes, M. J. Gandhi, J. L. Winters, D. Mair, N. Hirschler, R. Sanchez Rosen, M. A. Matthay, T. S. Group, Transfusion-related acute lung injury: incidence and risk factors. *Blood* **119**, 1757-1767 (2012).
17. C. C. Silliman, N. J. McLaughlin, Transfusion-related acute lung injury. *Blood Rev* **20**, 139-159 (2006).
18. J. Sahler, S. Spinelli, R. Phipps, N. Blumberg, CD40 ligand (CD154) involvement in platelet transfusion reactions. *Transfus Clin Biol* **19**, 98-103 (2012).
19. N. Blumberg, J. M. Heal, G. L. Phillips, R. P. Phipps, Platelets--to transfuse or not to transfuse. *Lancet* **380**, 1287-1289 (2012).
20. M. A. Refaai, R. P. Phipps, S. L. Spinelli, N. Blumberg, Platelet transfusions: impact on hemostasis, thrombosis, inflammation and clinical outcomes. *Thromb Res* **127**, 287-291 (2011).
21. R. P. Phipps, J. Kaufman, N. Blumberg, Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet* **357**, 2023-2024 (2001).
22. N. Blumberg, R. P. Phipps, J. Kaufman, J. M. Heal, The causes and treatment of reactions to platelet transfusions. *Transfusion* **43**, 291-292; author reply 292 (2003).
23. J. W. Semple, J. E. Italiano, Jr., J. Freedman, Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* **11**, 264-274 (2011).
24. T. O. Apolseth, T. A. Hervig, T. Wentzel-Larsen, O. Bruserud, Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage. *Transfusion* **46**, 800-810 (2006).
25. O. Garraud, H. Hamzeh-Cognasse, F. Cognasse, Platelets and cytokines: How and why? *Transfus Clin Biol* **19**, 104-108 (2012).
26. K. A. Nguyen, P. Chavarin, C. A. Arthaud, F. Cognasse, O. Garraud, Do manual and automated processes with distinct additive solutions affect whole blood-derived platelet components differently? *Blood Transfus*, 1-2 (2012).

27. C. Moussion, N. Ortega, J. P. Girard, The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* **3**, e3331 (2008).
28. K. P. Fong, C. Barry, A. N. Tran, E. A. Traxler, K. M. Wannemacher, H. Y. Tang, K. D. Speicher, I. A. Blair, D. W. Speicher, T. Grosser, L. F. Brass, Deciphering the human platelet sheddome. *Blood* **117**, e15-26 (2011).
29. H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, K. A. Nguyen, C. A. Arthaud, M. A. Eyraud, P. Chavarin, L. Absi, J. C. Osselaer, B. Pozzetto, F. Cognasse, O. Garraud, Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously oversecreted in platelet components associated with acute transfusion reactions. *Transfusion*, (2013).
30. C. K. Wong, C. Y. Ho, F. W. Ko, C. H. Chan, A. S. Ho, D. S. Hui, C. W. Lam, Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* **125**, 177-183 (2001).
31. F. Boehlen, K. J. Clemetson, Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfus Med* **11**, 403-417 (2001).
32. R. Forster, A. C. Davalos-Miszlitz, A. Rot, CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* **8**, 362-371 (2008).
33. D. N. Cook, The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* **59**, 61-66 (1996).
34. M. Nishimura, Y. Kuboi, K. Muramoto, T. Kawano, T. Imai, Chemokines as novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* **1173**, 350-356 (2009).
35. P. André, L. Nannizzi-Alaimo, S. K. Prasad, D. R. Phillips, Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* **106**, 896-899 (2002).
36. E. Boilard, P. A. Nigrovic, K. Larabee, G. F. M. Watts, J. S. Coblyn, M. E. Weinblatt, E. M. Massarotti, E. Remold-O'Donnell, R. W. Farndale, J. Ware, D. M. Lee, Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583 (2010).
37. P. Geurts, A. Irrthum, L. Wehenkel, Supervised learning with decision tree-based methods in computational and systems biology. *Mol Biosyst* **5**, 1593-1605 (2009).
38. B. L. Adam, Y. Qu, J. W. Davis, M. D. Ward, M. A. Clements, L. H. Cazares, O. J. Semmes, P. F. Schellhammer, Y. Yasui, Z. Feng, G. L. Wright, Jr., Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* **62**, 3609-3614 (2002).
39. A. Vlahou, J. O. Schorge, B. W. Gregory, R. L. Coleman, Diagnosis of Ovarian Cancer Using Decision Tree Classification of Mass Spectral Data. *J Biomed Biotechnol* **2003**, 308-314 (2003).

40. O. Garraud, F. Cognasse, H. Hamzeh-Cognasse, S. Laradi, B. Pozzetto, J. Y. Muller, [Blood transfusion and inflammation]. *Transfus Clin Biol* **20**, 231-238 (2013).
41. INTERNATIONAL HAEMOVIGILANCE NETWORK: PROPOSED STANDARD DEFINITIONS FOR SURVEILLANCE OF NON INFECTIOUS ADVERSE TRANSFUSION REACTIONS. *ISBT*, (2011).
42. H. Tinigate, J. Birchall, A. Gray, R. Haggas, E. Massey, D. Norfolk, D. Pinchon, C. Sewell, A. Wells, S. Allard, B. B. T. T. Force, Guideline on the investigation and management of acute transfusion reactions. Prepared by the BCSH Blood Transfusion Task Force. *Br J Haematol* **159**, 143-153 (2012).
43. <http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/> (in Weka C4.5 is called J48).

### **Figure legends**

**Figure 1.** Distribution of AE clinical observations resulting from a platelet transfusion. **A.** All PCs. **B.** PCs delivered before 3 days. **C.** PCs delivered from 3 to 5 days. The data are shown as percentages. FNHTR, febrile non-hemolytic transfusion reaction (fever or chill); AATRs, atypical allergic transfusion reactions (erythematous rash, urticaria, and/or pruritus or more severe reactions with angioedema); hemodynamic trouble (HT), excluding ALI (and TRALI), TACO, myocardial infarctions, and pulmonary embolism; combined ATRs, ATRs with two or more associated manifestations. We did not analyze any case with bronchospasm or anaphylaxis.

**Figure 2.** Concentrations of 17 soluble factors in the supernatants from 65 ATRs PCs and 59 control PCs. The data are adjusted to  $\text{pg}/10^9$  platelets and expressed as the mean  $\pm$  SEM. **A.** Factors that did not display any difference between the control and AE samples. **B.** Factors that had a concentration in the AE samples that was significantly higher than in the control samples or that were detected only in the ATR samples. **C.** Factors that were not detected in the controls, regardless of the amounts in the ATR samples (concentrations in the control and ATR samples were compared using two-tailed Student's t test,  $*p < 0.05$ ).

**Figure 3. Release of soluble factors during platelet storage for 5 days.** The data are adjusted to  $\text{pg}/10^9$  platelets and expressed as the mean  $\pm$  SEM. **A.** Factors that increased over 5 days of storage in only the control samples. **B.** Factors that were constantly

secreted with almost equivalent amounts between days 1 and 5 in the supernatants from “pathogenic” PCs but that were not detectable at any time between days 1 and 5 in the control samples. **C.** Factors with invariable trace amounts—between days 1 and 5 in the control PC supernatants and with elevated concentrations, but only on days 4 and 5, in the “pathogenic” PC supernatants. **D.** Factors that were elevated in both the control and pathogenic supernatants, although with significant variations between the control and ATR samples (concentrations of the soluble factors on days 2-5 vs. day 1 in the same group were compared using ANOVA, \* $p < 0.05$ ).

**Figure 4.** Factors that displayed no significant modulation in both the control and ATR samples during storage.

**Figure 5. Examples of areas under the ROC curves. A.** sCD40L; **B.** MIP-1 $\alpha$ ; **C.** IL13; **D.** BCA-1.

**Figure 6. Decision tree. A.** Assays without IL13 (among 16 assays, the success rate of the sCD40L model was the highest, 78%); **B.** Assays with IL13 (among 17 assays, the success rate of the IL13 model was the highest, 82%).

**Table 1. Parameters of platelet donors and storage time of the platelet concentrates.**

<sup>a</sup>The data are shown as percentages.



**Table 2. Pearson correlation matrix of 16 soluble factors in 65 ATRs supernatants.** The bold values were different from 0 at a significance level of  $\alpha=0.05$ .

**Table 3. Discriminatory ability of soluble factors to classify PCs as belonging to either the adverse effect or control group.** All AUCs with a p-value of  $<0.0001$  (z-test) were considered different from 0.5.

## ***Supplemental Materials and Methods***

### ***Single donor platelet component preparation, delivery and surveillance***

We reported previously on the methods for collecting single donor apheresis (SDA)-PCs at our blood establishment (BE). Briefly, apheresis platelets were collected from regular blood donors who also volunteered to provide blood for research purposes and signed a form indicating that they do not preclude the use of their sample for medical research (this procedure is in accordance with the regulation in force in France (“Arrêté du 6 novembre 2006”; L. 1223-3 article of the Public Health Code). Blood was collected on acid citrate dextrose-A with Amicus (Software Version 2.5, Fenwal, Inc., Lake Zurich, IL, USA) or Trima (Gambro BCT, Lakewood, CO) cell separators. The blood anticoagulant ratio was 10:1. The mean target level of the platelets was  $5.26 \pm 0.6 \times 10^{11}$  to prepare two identical components in PL2410 containers (Fenwal-Europe, La Châtre, France). All collection procedures were performed in one of the two regional authorized settings. The samples were immediately shipped to the unique processing platform of this BE and distributed after qualification, which was generally between days 3 and 5 after collection (>75% by days 4 and 5). The preparation procedure and the incident/accident declaration strictly conformed to the national protocols, as has been the previously reported procedure (11). In the occurrence of an AE, immediately after declaration, the incriminated PC bags were shipped back the BE facility for immediate processing. If it was an overnight AE, the processing time never exceeded 12 h.

Platelets were sampled at delivery time for the control PCs or at the time of incident declaration for the AE PCs for the evaluation of an array of in vitro properties subsequent to thrombin receptor activator peptide (TRAP; peptide SFLLRN) stimulation, which we used as a positive control (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France; 50 µg/ml).

The quality control parameters were as follows: mean volume of PC bags ( $372 \pm 36$  ml); counting the platelets using an automated blood cell counter (ABX-ARGOS, Abx Diagnostics, Montpellier, France) (mean platelet count of  $5.31 \pm 0.65 \times 10^{11}$  platelets/PC); applying the leukoreduction process to all PC bags to maintain a residual white blood cell (WBC) count of less than  $10^6$  per unit (the number of residual WBCs was counted by flow cytometry using a WBC counting kit: LeucoCOUNT, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) (mean residual leukocyte count of  $0.095 \pm 0.087 \times 10^6$  leukocytes/PC); and a mean pH that remains constant until the time of delivery to the patient ( $7.3 \pm 0.1$ ). All PCs were automatically re-suspended in 35% autologous donor plasma and 65% platelet additive solution (PAS: InterSol<sup>TM</sup>, Fenwal, la Châtre, France or SSP<sup>+</sup><sup>TM</sup>; MacoPharma, Mouveaux, France) and stored at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  with gentle rotation/shaking (60 rpm) for a maximum of 5 days before being issued for transfusion.

Figure 1.

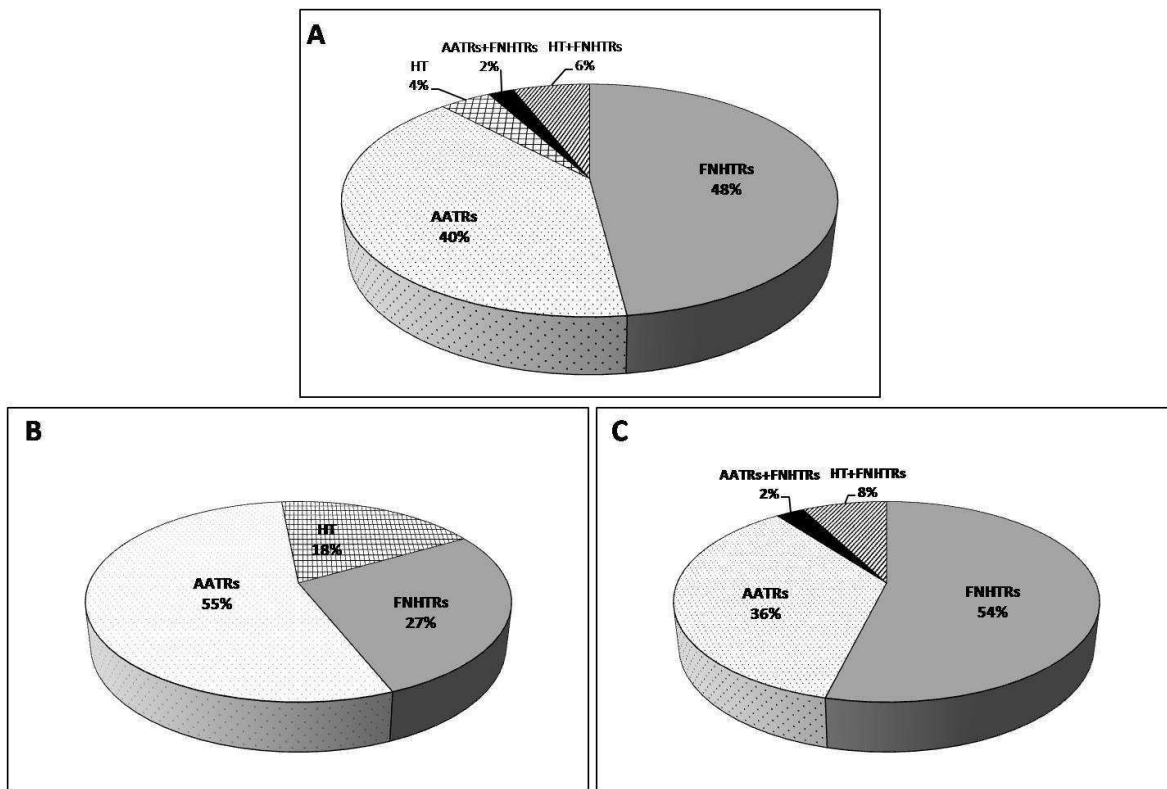


Figure 2.

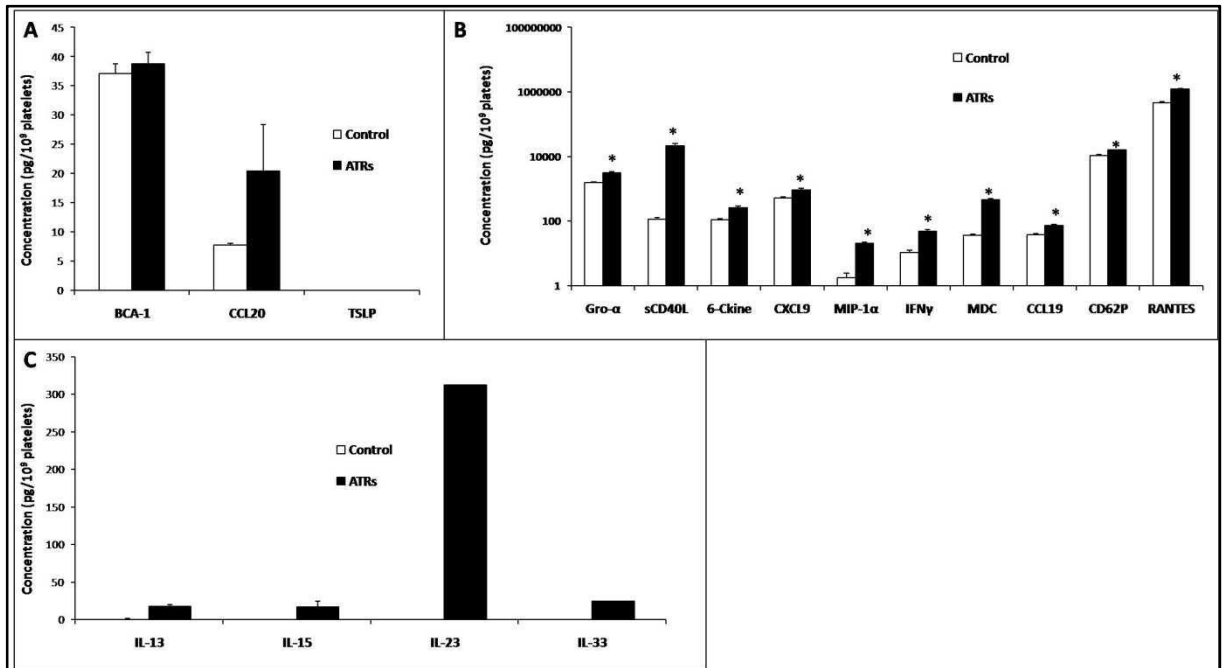


Figure 3A

A

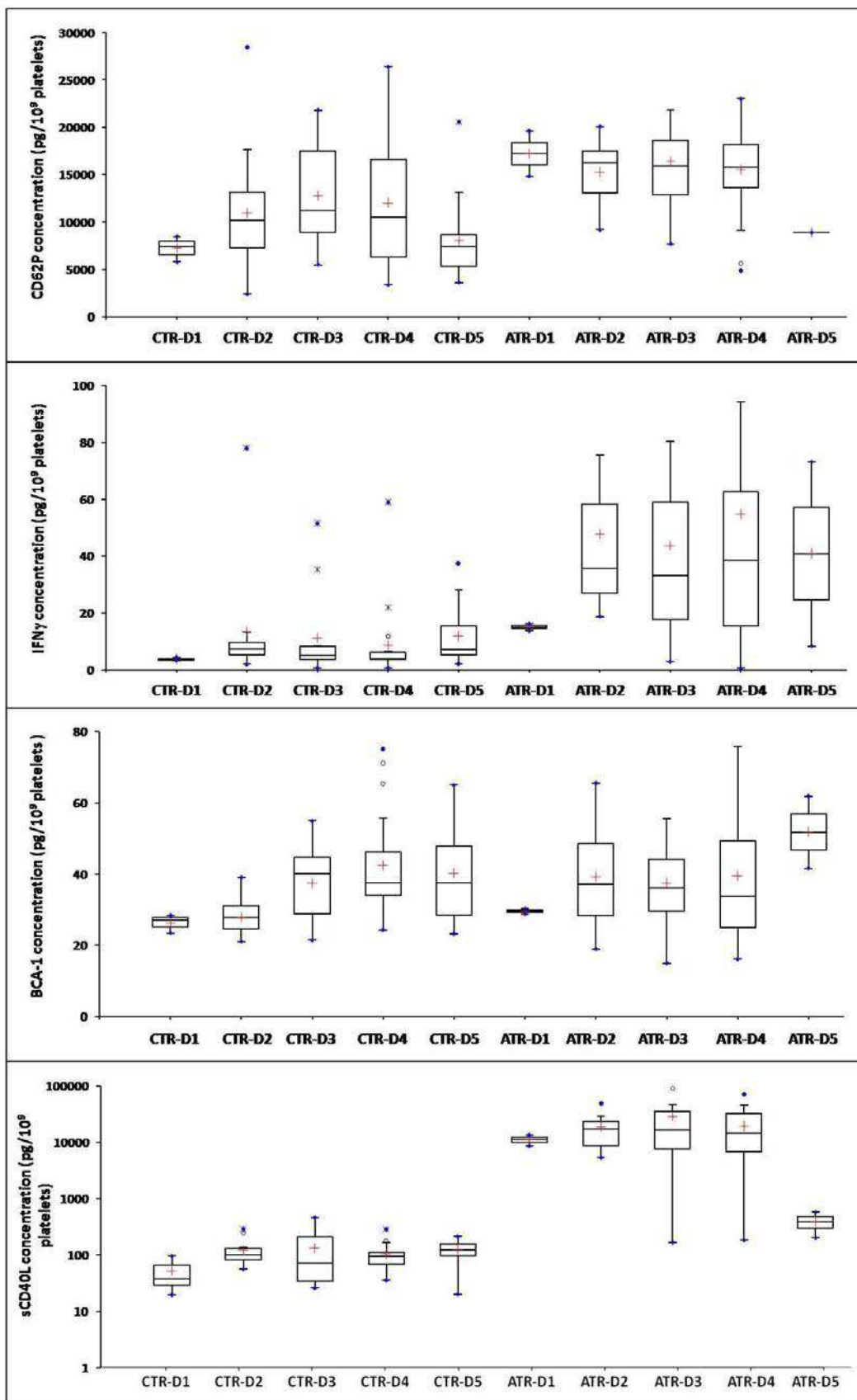


Figure 3B

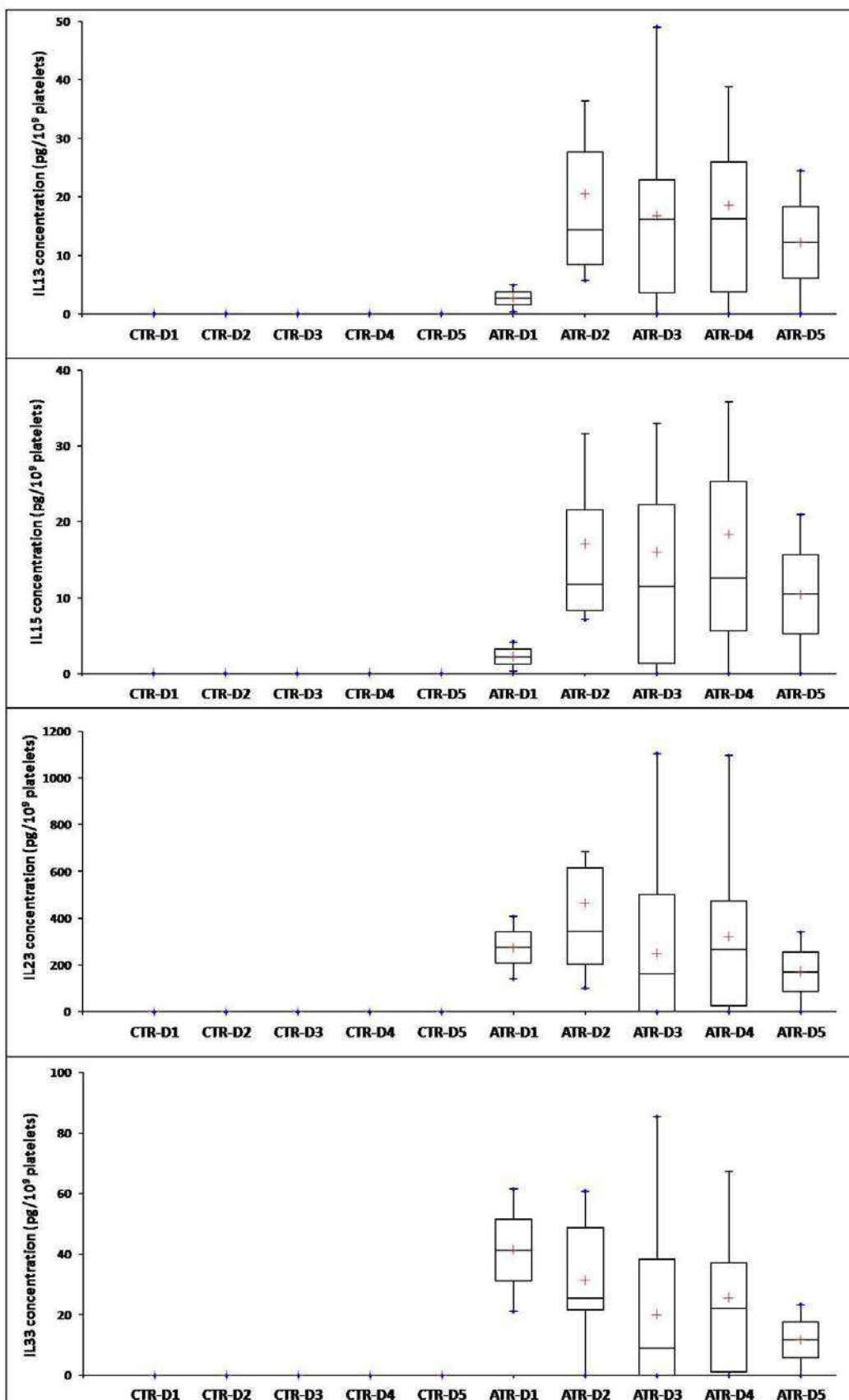
**B**

Figure 3C

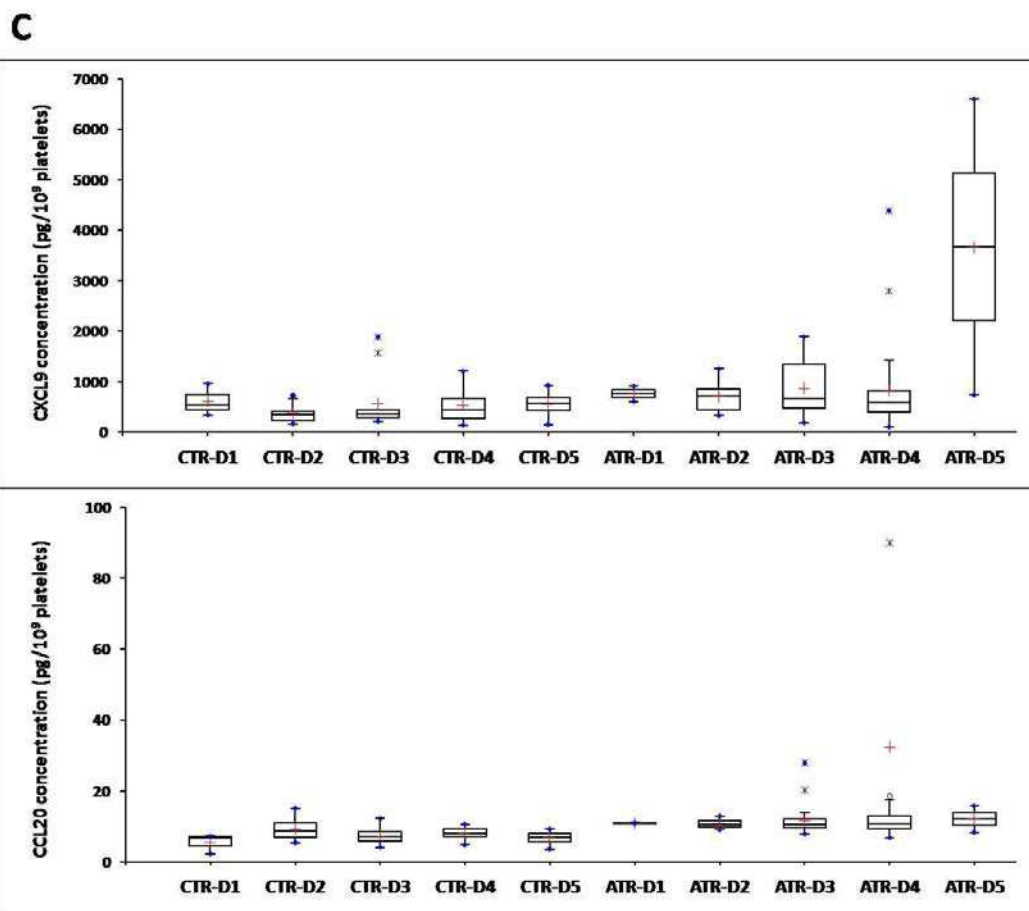




Figure 3D

D

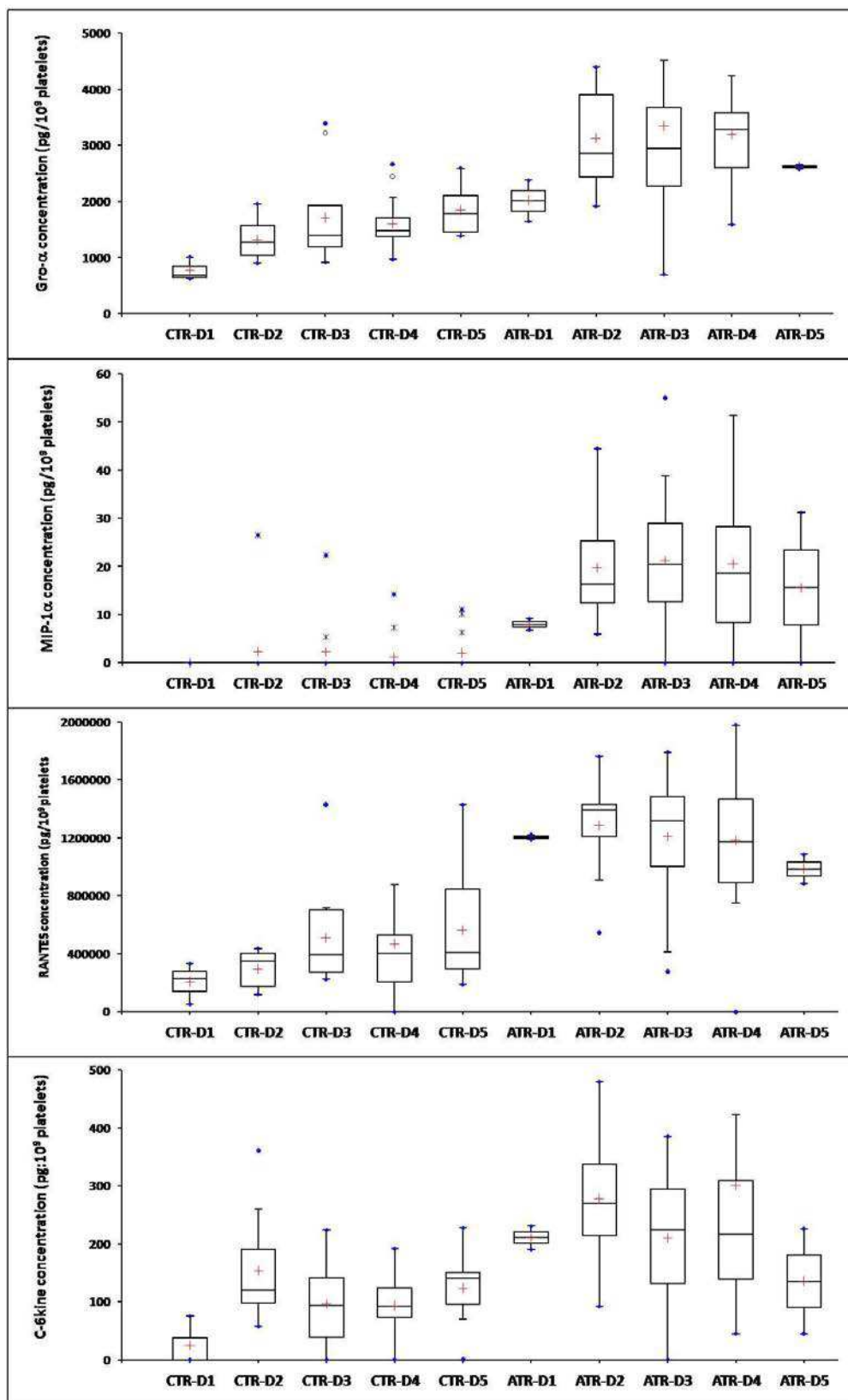


Figure 4.

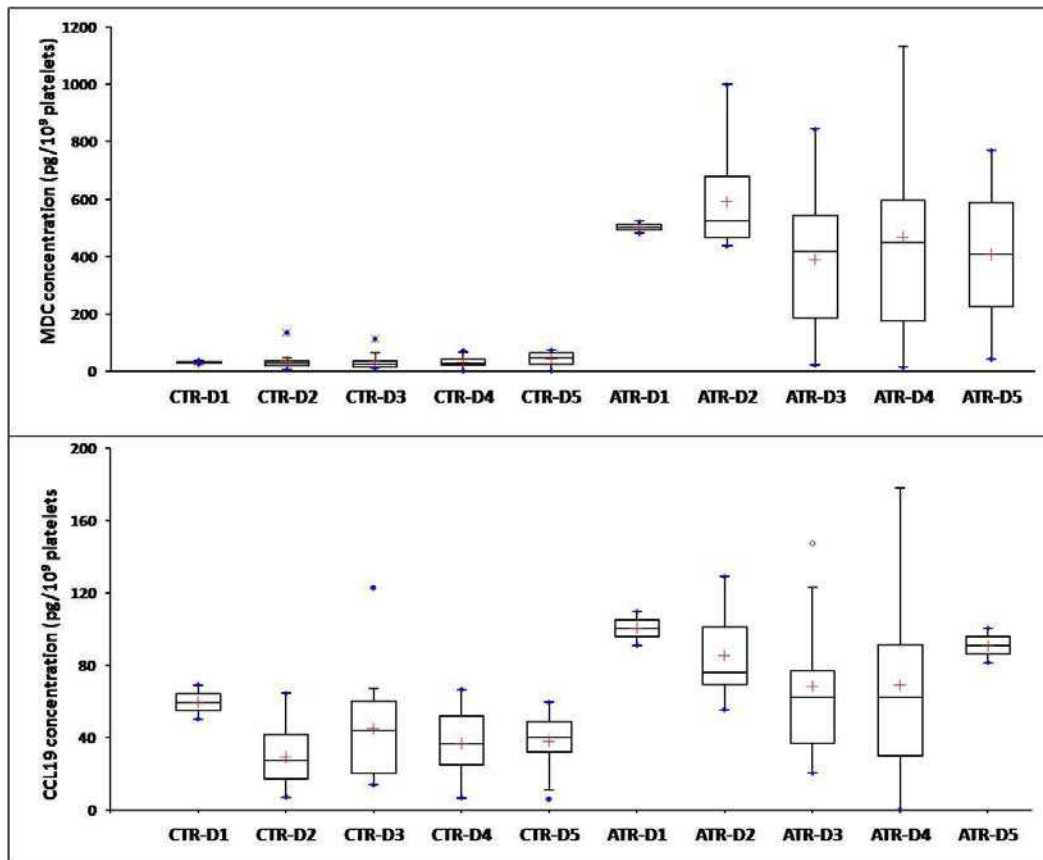


Figure 5

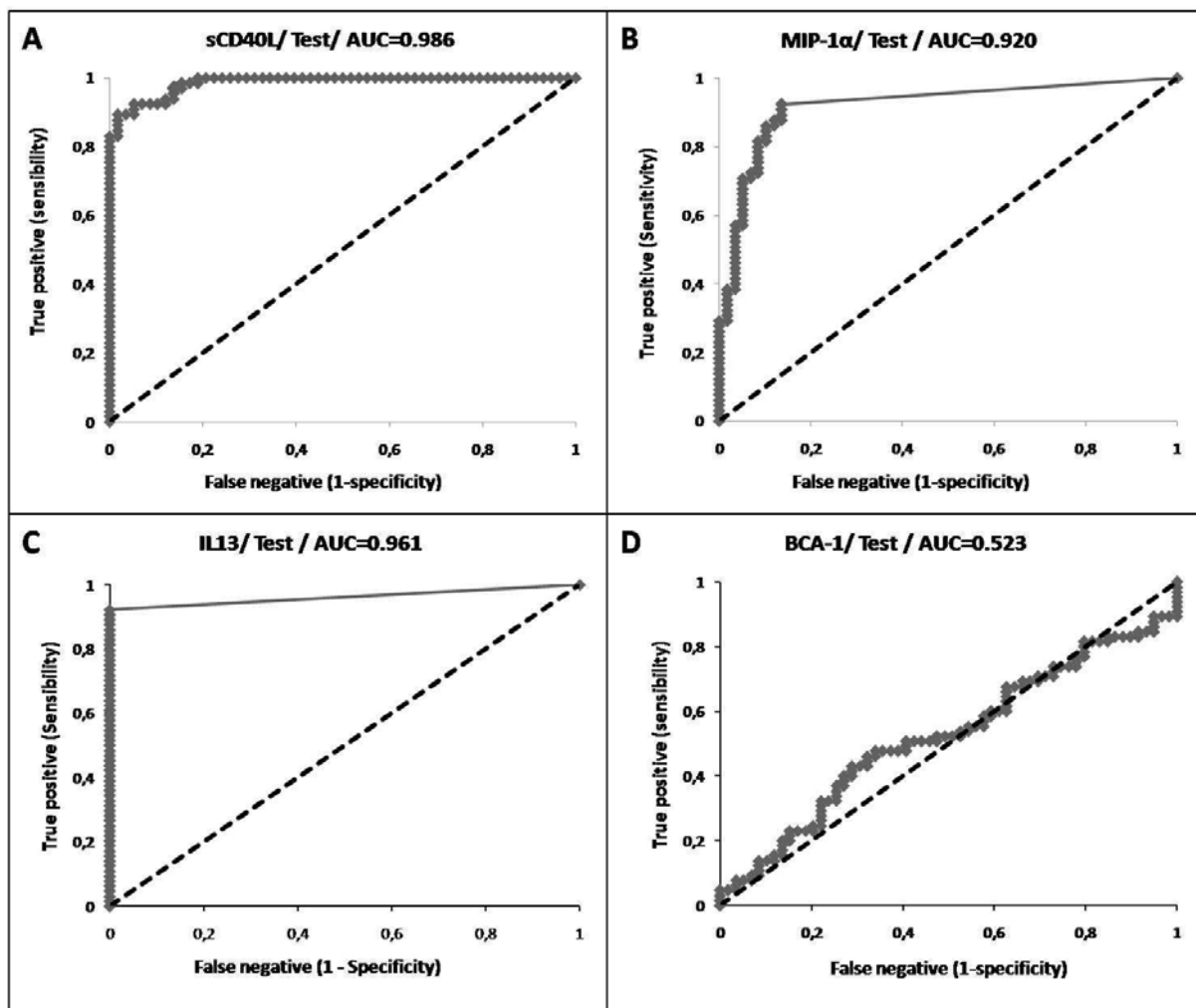


Figure 6.

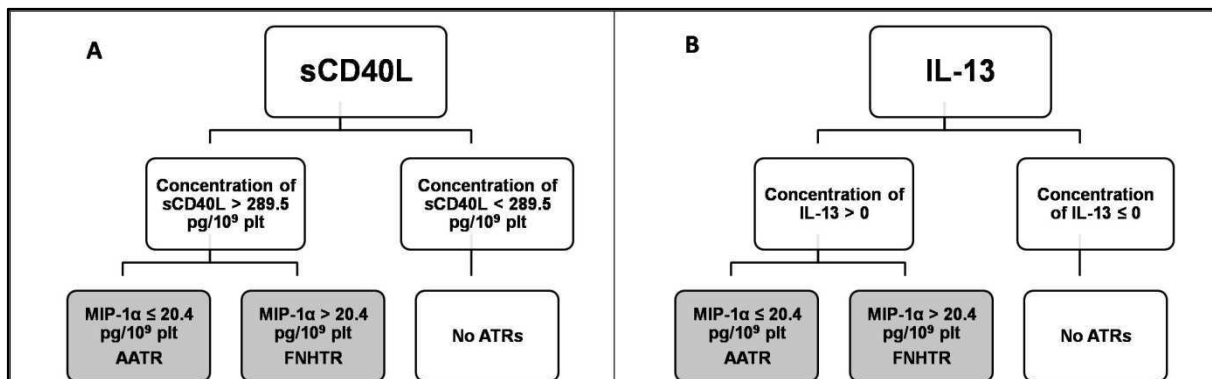


Table 1.

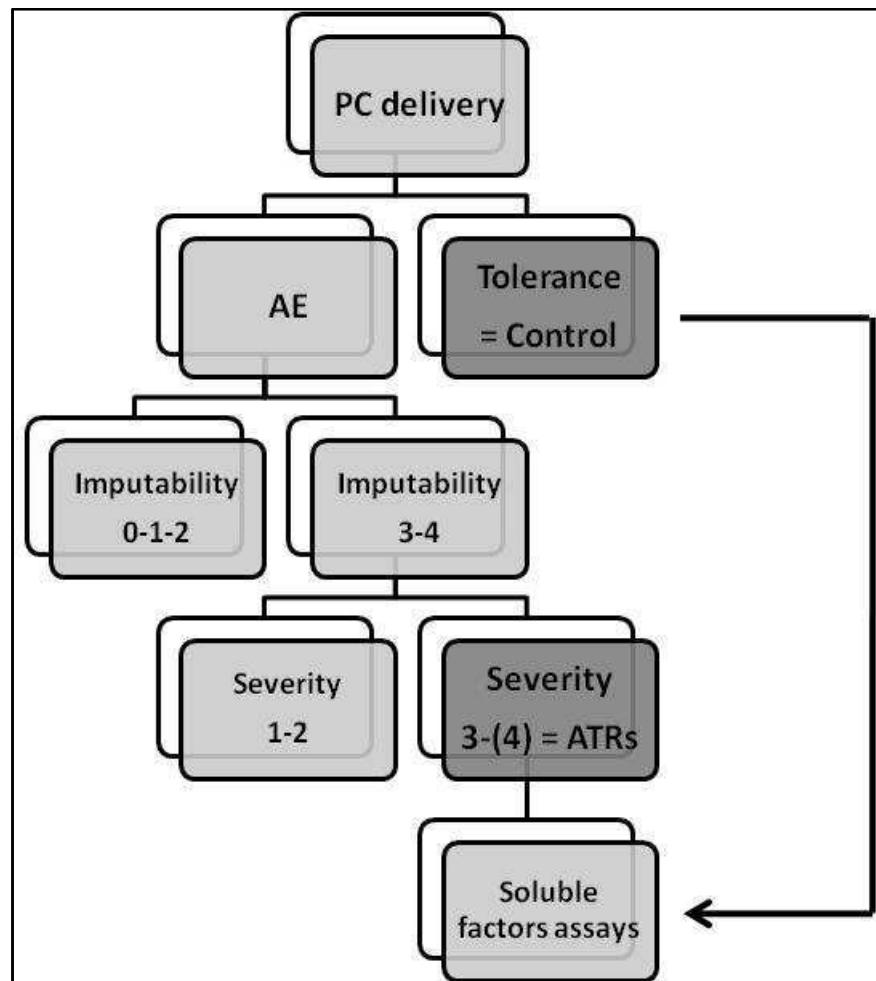
Group		Control (n= 59)	Adverse effects (n=65)
<b>Sex<sup>a</sup></b>	<b>Male</b>	61	60
	<b>Female</b>	39	40
<b>Age (years - mean <math>\pm</math> SEM)</b>		47.25 $\pm$ 1.64 (21-67)	50.95 $\pm$ 1.08 (27-65)
<b>Storage time<sup>a</sup> (days)</b>	< 3	25.42	20
	$\geq$ 3	74.58	80

Table 2.

Factors	Gro $\alpha$	sCD40L	6-Ckine	CXCL9	IL23	MIP-1 $\alpha$	IL13	IFN $\gamma$	IL15	MDC	IL33	CCL19	CD62P	RANTES	CCL20	BCA
Gro $\alpha$	<b>1.00</b>															
sCD40L	0.85	<b>1.00</b>														
6-Ckine	-0.05	0.02	<b>1.00</b>													
CXCL9	0.09	0.04	-0.10	<b>1.00</b>												
IL23	<b>-0.08</b>	<b>-0.07</b>	<b>0.51</b>	<b>-0.13</b>	<b>1.00</b>											
MIP-1 $\alpha$	0.52	0.56	0.05	-0.11	0.14	<b>1.00</b>										
IL13	<b>0.39</b>	<b>0.47</b>	<b>0.07</b>	<b>-0.09</b>	<b>0.22</b>	<b>0.91</b>	<b>1.00</b>									
IFN $\gamma$	0.44	0.46	0.06	0.02	0.16	0.91	0.85	<b>1.00</b>								
IL15	<b>0.46</b>	<b>0.55</b>	<b>0.09</b>	<b>-0.09</b>	<b>0.16</b>	<b>0.90</b>	<b>0.95</b>	<b>0.88</b>	<b>1.00</b>							
MDC	0.45	0.34	0.13	0.08	0.29	0.57	0.50	0.60	0.45	<b>1.00</b>						
IL33	<b>-0.08</b>	<b>-0.02</b>	<b>0.65</b>	<b>-0.12</b>	<b>0.91</b>	<b>0.08</b>	<b>0.16</b>	<b>0.09</b>	<b>0.13</b>	<b>0.28</b>	<b>1.00</b>					
CCL19	0.06	-0.02	0.39	0.20	0.36	-0.07	-0.02	0.01	-0.08	0.48	0.36	<b>1.00</b>				
CD62P	<b>0.56</b>	<b>0.55</b>	<b>0.07</b>	<b>0.04</b>	<b>0.13</b>	<b>0.40</b>	<b>0.30</b>	<b>0.34</b>	<b>0.35</b>	<b>0.53</b>	<b>0.19</b>	<b>0.22</b>	<b>1.00</b>			
RANTES	0.12	0.15	0.12	-0.14	-0.06	0.27	0.33	0.27	0.32	0.17	0.02	0.04	0.16	<b>1.00</b>		
CCL20	<b>0.05</b>	<b>-0.07</b>	<b>-0.06</b>	<b>0.03</b>	<b>-0.07</b>	<b>0.17</b>	<b>-0.07</b>	<b>0.19</b>	<b>-0.07</b>	<b>-0.02</b>	<b>-0.15</b>	<b>0.01</b>	<b>-0.10</b>	<b>-0.10</b>	<b>1.00</b>	
BCA	0.22	0.09	0.13	0.21	0.17	0.29	0.34	0.35	0.30	0.22	0.11	0.36	0.10	0.10	0.31	<b>1.00</b>

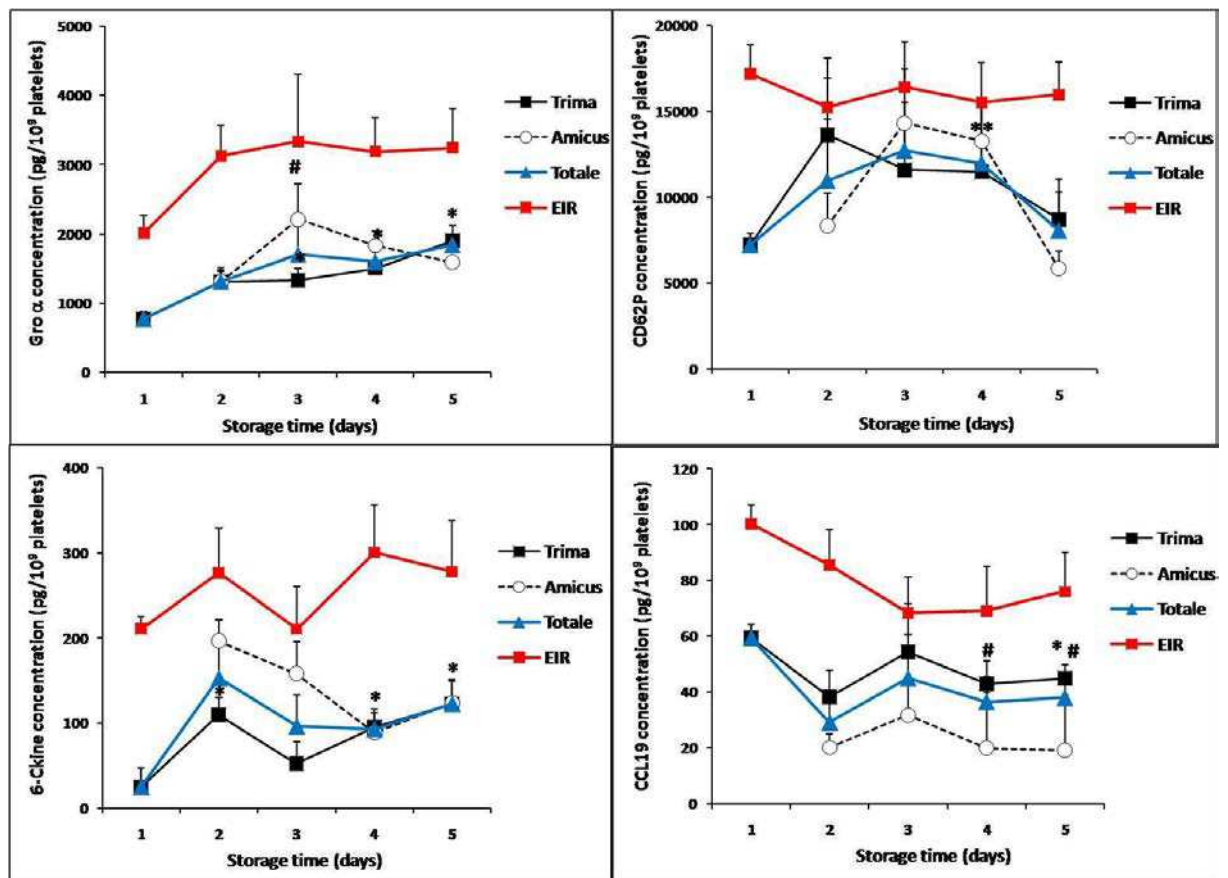
Table 3.

Factors	AUC	p	Theshold pg/10 <sup>9</sup> plt
<b>sCD40L</b>	<b>0.986</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>289.5</b>
<b>IL13</b>	<b>0.961</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0</b>
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<b>0.92</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>9.9</b>
<b>Rantes</b>	<b>0.917</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>877638.3</b>
<b>Gro <math>\alpha</math></b>	<b>0.917</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>2571.6</b>
<b>MDC</b>	<b>0.916</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>70.6</b>
<b>IL15</b>	<b>0.915</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0</b>
<b>CCL20</b>	<b>0.857</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>9.6</b>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>0.854</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>18.1</b>
<b>6-Ckine</b>	<b>0.807</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>150.1</b>
<b>CCL19</b>	<b>0.762</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>53.69</b>
<b>CD62P</b>	<b>0.755</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>13126.9</b>
<b>CXCL9</b>	<b>0.692</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>535</b>
IL23	0.875	0.003	
IL33	0.389	0.0004	
BCA - 1	0.523	0.655	

*Supplemental figures***Figure S1.** Study design for PCs delivered at EFS Auvergne, Loire, France



**Figure S2.** Differences in some soluble factor concentrations in the control PCs prepared by the Trima and Amicus processes during storage



\* and \*\*: significant difference between the concentrations of soluble factors in PC supernatants at days 2-5 vs. day 1 following preparation with the TRIMA<sup>TM</sup> process and at days 3-5 vs. day 2 with the Amicus<sup>TM</sup> respectively (process were compared using ANOVA,  $p < 0.05$ ). #: Significant difference in the concentration of soluble factors between the TRIMA<sup>TM</sup> and Amicus<sup>TM</sup> processes on the same day (t test,  $p < 0.05$ ).

### **Article III: Role of Siglec-7 in apoptosis in human platelets**

## **Role of Siglec-7 in apoptosis in human platelets**

Kim Anh Nguyen<sup>1</sup>, Hind Hamzeh-Cognasse<sup>1</sup>, Sabine Palle<sup>2</sup>, Isabelle Anselme-Bertrand<sup>3</sup>, Charles-Antoine Arthaud<sup>4</sup>, Patricia Chavarin<sup>4</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1</sup>, Olivier Garraud<sup>1,4</sup>, Fabrice Cognasse<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> GIMAP-EA3064, Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>2</sup> 4D Multiphotonic Confocal Microscopy Platform, (Hubert Curien Laboratory and UMR CNRS 5516), Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>3</sup> Centre de Microscopie Electronique Stéphanois - CMES-Saint Etienne, Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>4</sup> EFS Auvergne-Loire, Saint-Etienne, France

Address for correspondence and reprint requests to Fabrice Cognasse, EFS Auvergne-Loire and GIMAP-EA 3064, Université de Saint-Etienne, Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France. Telephone: +33 4 77 42 14 67, Fax: +33 4 77 42 14 86, E-mail address: [fabrice.cognasse@univ-st-etienne.fr](mailto:fabrice.cognasse@univ-st-etienne.fr)

**Running title:** Platelets express functional Siglec-7

**Financial support** was received through grants from the National and Regional Blood Bank-EFS Auvergne-Loire, France, the French “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) under reference ANR-12-JSV1-0012-01, The National

Safety Agency for Drug and Health Products (ANSM - AAP-2012-011), and the “Association Recherche Transfusion” and the Association “Les Amis de Rémi.”

**Key Words:** Platelet, Siglec, Alarmins, Innate Immunity, Apoptosis, Transfusion.

**Word count:** 6222, **Abstract:** 193 **References:** 60, **Figures:** 8, **Table:** 0, **Supplemental figures:** 5, **Supplemental Table:** 1.

**Abstract:**

Platelets participate in tissue repair and innate immune responses. Siglecs (Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins) are well-characterized I-type lectins, which control apoptosis. We characterized expression of the Siglec-7 in human platelets from healthy volunteers using flow cytometry and confocal microscopy. Siglec-7 is primarily expressed on  $\alpha$  granular membranes and colocalized with CD62P. The expression was increased upon platelet activation and correlated closely with CD62P. Cross-linking Siglec-7 with its ligand, ganglioside resulted in platelet apoptosis without any significant effects on activation, aggregation, and secretion. We show that ganglioside trigger four key pathways leading to apoptosis in human platelets: (i) mitochondrial inner transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) depolarization; (ii) elevated expression of pro-apoptotic Bax and Bak proteins along with reduced expression of anti-apoptotic Bcl-2 protein; (iii) phosphatidylserine (PS) exposure and (iv) microparticle (PMPs) formation. Inhibition of NADPH oxidase, PI3K, or PKC rescued platelets from apoptosis induced by Siglec-7 recruitment, suggesting that the platelet receptors P2Y1 and GPIIb/IIIa are essential for ganglioside-induced platelet apoptosis. The present work characterizes the role of Siglec-7 and platelet receptors in regulating apoptosis and death. Because some platelet pathology involves apoptosis (ITP and possibly storage lesions), Siglec-7 can be a molecular target for therapeutic intervention/prevention.

## Introduction

The role of platelets in hemostasis has been well studied; increasing evidence supports their function beyond haemostasis, particularly in innate immunity and inflammation.<sup>1-3</sup> During the past decade, it has become clear that platelets also play a role in host defense against infection and inflammatory processes such as atherosclerosis.<sup>4</sup> Platelets express a plethora of membrane and cytoplasmic molecules with immunomodulatory or inflammatory activity.<sup>2,5</sup> We previously studied both the resting platelets that constitute platelet component (PC) inventory for transfusion purposes as well as platelets capable of *in vitro* stimulation by distinct mechanisms. Our studies showed that platelets secrete cytokines, chemokines, and largely biological response modifiers (BRMs) under a variety of conditions, both during shelf-life and following specific stimulation.<sup>6,7</sup> We further obtained recent evidence suggesting that platelets could recycle a number of BRMs and can express the pairing ligand, sCD40L/sCD154.<sup>8,9</sup> In addition to its central role in immune response, sCD40L has also been shown to be associated with tissue pathology.<sup>9</sup> Similar to that of other cells of the innate immune system, platelets interact with distinct cell types including lymphocytes, to regulate their hallmark functions.<sup>2,10,11</sup> In summary, platelets can be considered as an important component of innate immunity, despite their key role in hemostasis. It is possible that hemostasis and innate immunity are linked closely during tissue repair.

A proposed mechanism of action of platelets in innate immunity involves tissue repair and preparation of immune cells to assist during adaptive immunity and pathological inflammation. This is tightly controlled by the sensors of danger expressed in resting as well as in activated platelets (*i.e.*, several types of immunoglobulin heavy chain receptors and their complement fractions as well as

Toll-like receptors); these sensors referred to as pathogen recognition receptors (PRRs), primarily senses danger signals pathogen associated molecular patterns (PAMPs). As platelets are found in inflamed tissues and are involved in autoimmune disorders, it is possible that they can also be stimulated by internal pathogens. In such cases, platelets can also sense danger signals such as Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs), also known as alarmins, to which the Siglec family of molecules belongs.

Siglecs (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins) are the best characterized I-type lectins, a subset of the immunoglobulin (Ig) superfamily that contains a sialic acid binding site in the amino-terminal Ig-like domain, which mediates the sialic acid recognition.<sup>12</sup> The human Siglec family includes 14 members.<sup>13</sup> They are cell surface proteins found predominantly on immune cells and expressed in diverse patterns. The majority of CD33-related (CD33r) Siglecs comprise two Ig-like extracellular domains and two tyrosine-based (ITIM and ITIM-like) motifs in their cytoplasmic domain. Binding of ligands to Siglecs has been shown to result in inhibitory signals. After phosphorylation, CD33r is capable of recruiting the protein tyrosine phosphatases and Src homology-2-containing tyrosine phosphatase-1 and 2 (SHP-1 and SHP-2).<sup>14</sup> Several studies have showed that, CD33r-receptors trigger release of anti-inflammatory cytokines, induce apoptosis, and inhibit cellular proliferation.<sup>15</sup>

For many years, programmed cell death, apoptosis, was attributed exclusively to nucleated cells. Apoptosis in platelets was described for the first time in 1997<sup>16</sup> and is well documented in later years. Since platelets are anucleate, the apoptosis leading to cell death in this cells can be interesting.<sup>17</sup> Two main pathways lead to apoptosis in platelets: the intrinsic and the extrinsic. These

phenomenon are different from platelet activation and highly regulated by intra-platelet signaling mechanism.<sup>17,18</sup> Platelet apoptosis has been ascribed to play a role in hemostasis, thrombosis as well as inflammatory processes.<sup>17</sup> It has been reported that platelets show increase in apoptosis protein markers during normal storage conditions, prior to delivery for transfusion (at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , gentle rotation) suggesting that the storage conditions probably cause stress induced apoptosis.<sup>17,19-21</sup> Evaluation of the mechanisms leading to apoptosis in platelets within PC for transfusion purposes may provide a basis for developing novel strategies that enhance platelet viability during storage.

The present study reports the expression and localization of Siglec-7 in the  $\alpha$  granules of human platelets. Further, we show evidence suggesting Siglec-7 may regulate intrinsic apoptosis pathways in platelets.

## **Materials and methods**

### ***Reagents and solutions***

Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP), PAR-4 activating peptide, Adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), Tyrode's solution (amount in g/l: NaCl, 8.00; KCl, 0.20;  $\text{CaCl}_2$ , 0.20;  $\text{MgCl}_2$ , 0.10;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.05;  $\text{NaHCO}_3$ , 1.00; Glucose, 1.00, pH 6.5), LY-294002 hydrochloride, a PI3K inhibitor; BAY-11, a NF $\kappa$ B inhibitor; (S)-(+)-Clopidogrel hydrogensulfate, a P2Y<sub>12</sub> antagonist; MRS 2179 ammonium salt hydrate, a P2Y<sub>1</sub> antagonist; and Tirofiban hydrochloride monohydrate, a GPIIb/IIIa antagonist were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Collagen was purchased from Nycomed (Paris,



France); Bis-indolylmaleimide I (BIM I), a PKC inhibitor; SCH 79797 dihydrochloride, a PAR-1 antagonist; *trans*-Cinnamoyl-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-amide trifluoroacetate salt (tcY-NH<sub>2</sub>), a PAR-4 antagonist were from R&D Systems (R&D Systems, Europe, Lille, France). Gangliosides, GD2, GD3, GT1b, Diphenyleneiodonium Chloride (DPI), and A23187 were from Calbiochem (Merck Millipore, Guyancourt, France). Phosphate buffered saline (PBS) was from PAA (Les Mureaux, France).

### ***Preparation of platelet-rich plasma and platelet stimulation***

Peripheral blood samples from healthy subjects were collected in endotoxin-free tubes with 3.2% sodium citrate (Vacutainer<sup>®</sup>, Becton Dickinson, San Jose, California).<sup>22</sup> All donors were provided with informed consent of approval from Auvergne-Loire Regional Blood Bank. The blood samples were centrifuged at 192 g for 10 min at room temperature (RT) to obtain Platelet Rich Plasma (PRP). Platelet count was determined by using a Coulter LH500 (Beckman-Coulter, Villepinte, France).

### ***Analysis of endotoxin levels in platelet concentrates***

The PRP prepared above were examined for bacterial contaminations by conventional hemoculture technique. Endotoxin levels were measured by using limulus amoebocyte lysate kit (QCL-1000) according to the manufacturer's instructions (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD). Briefly, following 10 min incubation at 70°C, platelets were diluted in pyrogen-free water (1:20), and incubated with limulus amoebocyte lysate at 37°C. After 10 min, chromogen was

added and samples were incubated for additional 6 min, and the absorbance at 405 nm was measured. Endotoxin levels were expressed in international units (IU) per mL.<sup>22,23</sup>

### ***Platelet marker analysis***

For platelet marker analysis, PRP was diluted with 1× PBS to the final concentration of  $5 \times 10^6$  platelets per 100  $\mu$ l suspension. For annexin V–APC (allophycocyanin) staining (Mabtag, Friesoythe, Germany), PRP was diluted with 1× binding buffer. Platelets were incubated with appropriate monoclonal antibody (mAb) (**Supplemental table. S1**) for 30 min at RT in dark, and washed once with 1× PBS. Since CD41a is constitutively expressed in platelets independent of activation, the CD41a antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) was used (5  $\mu$ L per test) for all the flow cytometry experiments. To specifically label activated platelets, APC- or PE (phycoerythrin)-conjugated mAbs against human CD62P were used. Flow cytometry was performed on FACSVantage SE device equipped with CellQuestS-Pro software (BD Biosciences).<sup>22</sup>

Platelets from PRP were incubated with 10  $\mu$ g/ml of Siglec-7 antibody (polyclonal antibody, pAb; RD system) at 37°C for 30 min; the pAb used was reported to mediate neutralizing activities.<sup>24</sup> Platelets were stimulated with the human disialoganglioside (GD2) (5  $\mu$ g/ml, in 2:1 Chloroform:methanol) or vehicle control. Alternatively, platelets were stimulated with 30  $\mu$ M A23187 (a positive control for platelet apoptosis<sup>17</sup>), at RT for 30 min. Samples were washed twice with 1× PBS. Cells lysates were prepared by using cell extraction kit (Active motif, La

Hulpe, Belgium) following manufacturer's instruction. Cytosolic proteins were quantified by Bradford assay (Coomassie Blue was purchased from Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Equal amounts of proteins were separated on 9% SDS-PAGE with 1× Laemmli Sample Buffer (Sigma Adrich); Human cell lysates, Hela (epithelioid carcinoma cells) and HuT 78 (T lymphocyte lymphoma cells) were used as positive controls for Bak and Bax respectively. Following transfer to cellulose membrane (Healthcare, Vélizy, France), membrane was stained with rabbit anti-Bax and anti-Bak primary mAbs (Santa Cruz Biotechnology, Yvelines, France) and peroxidase conjugated-goat anti-rabbit secondary antibody (whole molecule; Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The signal from secondary antibody was detected by using enhanced chemiluminescence system (Sigma Aldrich). Peroxidase-conjugated mouse anti-actin mAb (Sigma Aldrich) was used as an internal loading control.

### ***Quantification of platelet soluble factors***

SolubleCD62P, MMP-1, 2, 9, sSiglec-7 and serotonin content in platelet supernatants were quantified using commercial ELISA kits (purchased from R&D Systems Europe Ltd, Lille, France; except for serotonin, which was from IBL International, Hamburg, Germany) by following manufacturers' instructions. Absorbance at 450 nm ( for serotonin, 405 nm) was measured using the ELISA plate reader (Magellan software, Sunrise TM, Tecan group ltd, Lyon, France). Results were normalized to  $2 \times 10^8$  platelets/ml.<sup>22</sup>

The sCD40L and RANTES content in platelet supernatants were quantified by using a LUMINEX™ technology (using a human cytokine/chemokine magnetic

bead panel I, HCYTOMAG-60K, Millipore, Molsheim, France) by following manufacturer's instructions. Results were acquired with the Bioplex 200 system (Bioplex Manager™ software, Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and adjusted to  $pg/2 \times 10^8$  platelets/ml.

### ***Determination of platelet aggregation***

The aggregometer was calibrated by using PRP ( 0% light transmission, 100% aggregation) and platelet poor plasma (PPP, 100% light transmission, 0% aggregation). The PPP was obtained by centrifugation of PRP at 3000 g for 20 min at RT. Samples were treated with Siglec-7 ligand, GD2 (5  $\mu$ g/ml) or vehicle control for 30 min, at 37°C, with constant stirring, followed by stimulating with ADP (10  $\mu$ M). Platelet aggregation was monitored by the Thrombo-aggregometer at 4V using Thrombosoft 1.6 software (SD Medical Throuard, France).

### ***Platelet scanning by electron microscopy***

Platelets were stimulated with GD2, vehicle control, or A23187, as described in above. Stimulated samples were fixed with 2.5% Glutaraldehyde. After 30 min platelets were washed twice with sodium cacodylate buffer and twice with water. Following dehydration, cells were sputter-coated with gold-palladium using Hummer VI Sputtering Polaron SC7620 System (Anatech, Union, USA). Electron microscopy analysis was performed on a Hitachi scanning electron microscope, S3000N (Hitachi, Bron, France) at an accelerated voltage of 12 kV and working distance of 7.3 mM.

## ***Platelet marker analysis by confocal microscopy***

### *Protein staining*

Unless otherwise mentioned, all mAbs were purchased from Abcam (Paris, France). Immunostaining was done by following previously described protocol.<sup>25</sup> In brief, 100  $\mu$ l of unstimulated platelets in PRP were fixed with 4% Paraformaldehyde (PFA), permeabilized with 0.5% Triton X-100, washed twice and blocked with 2% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS for 20 min. Platelets were resuspended in 100  $\mu$ l of 1 $\times$  PBS and incubated with rabbit anti-human Siglec-7 along with one of the following marker antibodies: mouse anti-human CD62P mAb (Clone Psel.KO.2.5) for granules; Serotonin (Clone 5HT-H209) for dense granules; LAMP-1 (Clone FMC46) for lysosomes; M6P (Clone MEM-238) for endosomes and Tubulin (Clone TU-01) for cytoskeleton. Following incubation, primary antibodies were washed and platelets were incubated with Alexa Fluor 555 conjugated-goat anti rabbit IgG and Alexa Fluor 488 conjugated goat-anti mouse IgG (Invitrogen, Saint Aubin, France). For co-staining with CD41a and Siglec-7, following primary and secondary antibody staining against Siglec-7, platelets were incubated with Alexa 488 conjugated CD41a

For co-staining with CD62P, Tubulin, and Siglec-7, prior to staining with Siglec-7 and Tubulin, platelets were incubated with a CD62P mAb, followed by a biotinylated anti-mouse IgG (whole molecule, Sigma), and with Streptavidin/Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen). Alexa Fluor 647 goat-anti mouse IgG was used to stain tubulin. Platelets were washed 3 times and allowed to adhere to polylysine coated cover slips (Labomoderne, Paris, France) at 37°C for 20 min, and fixed in 4% PFA for 10 min. The cover slips were washed twice and mounted

using Vectashield mounting solution (Vector Laboratories, Clinisciences Nanterre, France).

#### *Confocal microscopy: image acquisition and analyses*

Samples were examined with the Leica TCS-SP2 confocal scanning laser inverted microscope (Leica-Microsystem, Heidelberg, Germany). Fluorescence images of two or three colors were captured sequentially using a set of three continuous wave lasers delivering monochromatic light at wavelength equal to 488 (for Alexa Fluor 488), 543 (for Alexa Fluor 555) and 633 nm (for Alexa Fluor 647). For each sample, a series of x-y images were collected along the z-axis at 0.3  $\mu\text{m}$  intervals using an oil immersion objective (HCX PL APO 63X 1.4NA) and an optical zoom of 2x or 4x.

Image stacks were analyzed and processed using ImageJ software.<sup>25</sup> Colocalization analyses were performed both for stacks and merged-images. Pearson's correlation coefficient values were calculated using the Intensity Correlation Analysis plugin;<sup>26</sup> 2D intensity scatter plots were generated using the colocalization threshold macro and frequency scatter plots were obtained with the "red-green correlator" plugin. Representative data from a stack of 5 images for each labeling condition was shown.

#### ***Analyses of the intracellular compartments***

Platelets were treated with the following inhibitors or the appropriate vehicle controls: LY-294002 hydrochloride (PI3K inhibitor;<sup>27</sup> 50  $\mu\text{M}$ ; 30 min at 37°C); BAY 11-7082 (a NF $\kappa$ B inhibitor (IKK);<sup>28</sup> 5  $\mu\text{M}$ ; 1 h at RT); Bisindolylmaleimide I (BIM I,

a PKC inhibitor;<sup>29</sup> 50  $\mu$ M; 15 min at 37°C); Diphenyleneiodonium Chloride (DPI, a NADPH oxidase inhibitor;<sup>30</sup> 1  $\mu$ M; 30 min at 37°C); (S)-(+)-Clopidogrel hydrogen sulfate (a P2Y12 antagonist;<sup>31</sup> 400  $\mu$ M; 30 min at 37°C); MRS 2179 ammonium salt hydrate (a P2Y1 antagonist;<sup>31</sup> 100  $\mu$ M; 30 min RT); Tirofiban hydrochloride monohydrate (a GPIIb/IIIa antagonist;<sup>32</sup> 10  $\mu$ M; 15 min at 37°C); SCH 79797 dihydrochloride (a PAR-1 antagonist;<sup>33</sup> 10  $\mu$ M; 15 min at 37°C); and *trans*-Cinnamoyl-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-amide trifluoroacetate salt (tcY-NH<sub>2</sub>; a PAR-4 antagonist;<sup>34</sup> 400  $\mu$ M; 15 min at 37°C). Following treatment platelets were stimulated with GD2 (as described in earlier section) and analyzed for apoptosis markers.

### ***Death and Apoptosis marker analysis***

Apoptosis was measured by using previously described method.<sup>35</sup>

### ***Platelet count***

COULTER® LH 500 hematology analyser (Beckman Coulter, Villepinte, France) was used to count the platelet number. Pretreatment counts were used to establish the absolute reference (100%) for each sample. PRP samples (300  $\mu$ L) were incubated with or without a blocking anti Siglec-7 pAb, followed by treatment with Siglec-7 ligand, GD2, vehicle control. A23187, a calcium ionophore that is known to induce apoptosis in platelets was used as a positive control.<sup>18</sup>

### ***Analyses of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )***

To measure mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), following stimulation, a suspension of a  $5 \times 10^6$  platelets in 100  $\mu$ L volume were incubated with 40 nm DiOC6(3), a cell-penetratable green-fluorescent cationic dye

(Invitrogen, Saint Aubin, France), for 30 min at RT. The samples were diluted to 500  $\mu$ L in 1 $\times$  PBS and analyzed by flow cytometry. Depolarization of mitochondria results in a decrease in the mean fluorescence intensity of platelet-bound DiOC6(3) in FL1.

#### *Quantification of platelet microparticle assay*

To induce apoptosis, PRPs were treated with A23187 (30  $\mu$ M for 30 min at RT) or Siglec-7 ligand, GD2 (5  $\mu$ g/ml for 30 min at RT) Both the treated and untreated platelets were blocked using anti Siglec-7 pAb (10  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37°C. PRPs were centrifuged at 1000 g for 10 min. The supernatant was separated and centrifuged for 2 min at 13,000 g at room temperature. The resulting supernatant was collected and tested for platelet microparticles (PMPs). PMPs with the exposed PS surface were quantified by using the ZYMUPHEN MP-Activity kit (Hyphen Biomed Neuville-Sur-Oise, France), according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to total platelet number (nM per  $10^7$  platelets).<sup>36</sup>

#### **Statistical analyses**

Comparison of two means was performed by Student's t-test, except in microparticle assay where difference between two concentrations (median) was assessed by using Wilcoxon paired test. ANOVA was used to analyze the differences between group means in multi-factor analysis ( $n \geq 3$ ). The  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant.



Correlation between two variables was assessed by Pearson's coefficient. The  $p$ -values were calculated to test the null hypothesis ( $H_0$ ) that Pearson coefficient was not significantly different from zero; one given correlation was considered significantly different from zero, when  $p$ -values were less than significance level  $\alpha = 0.05$ .

## Results

### *Human platelets express Siglec-7*

Expression of Siglec-7 in resting human platelets was analyzed by flow cytometry. **Figure 1A** shows representative flow cytometry histogram profile for Siglec-7 expression. On average,  $36 \pm 0.84\%$  of  $CD41a^+$  platelets express Siglec-7 in absence of deliberate stimuli. Following stimulation with TRAP, there is an increase in expression of Siglec-7 to about  $70 \pm 2.44\%$ , indicating that platelet stimulation results in mobilization of Siglec-7 ( $p < 0.05$ ,  $n = 20$ ) (**Fig. 1B**). Almost all permeabilized and unstimulated (resting) platelets showed expression of either intracellular and/or membrane-bound Siglec-7 ( $99.66 \pm 0.07\%$  and  $22.7 \pm 0.97\%$  respectively;  $p < 0.05$ ), as well as CD62P ( $97.7 \pm 0.42\%$  and  $9.9 \pm 1.1\%$  respectively;  $p < 0.05$ ), a marker characteristic of platelet activation. There was no gain following TRAP stimulation (**Fig. 1C**).

Absence of CD3-T, CD19-B cells, and CD14-monocytes were confirmed by flow cytometry, suggesting no contaminated leukocytes in our platelet preparations.<sup>7</sup>

As flow cytometry was performed on permeabilized platelets, which does not delineate surface and intracellular protein expression, we aimed to examine

intracellular localization of Siglec-7 using confocal microscopy. Platelets, before and after permeabilization were plated on poly-L-Lysine coated glass cover slips, and stained with Siglec-7 along with CD41a or Tubulin (**Fig. 1D and E**). Confocal microscopy revealed that Siglec-7 is mostly present in the intracellular compartment of human platelets.

To further identify the precise intracellular localization of Siglec-7, platelets were permeabilized and co-stained with the antibodies for the known marker proteins for different organelles: CD62P for  $\alpha$  granules; serotonin for dense granules; M6P for endosomes; TLR-9 for T granules and LAMP-1 for lysosomes. Siglec-7 did not show any colocalization with serotonin [Pearson's correlation coefficient (PCC) = 0.269,  $p > 0.05$ ], M6P (PCC = 0.227,  $p > 0.05$ ), TLR-9 (PCC = 0.272,  $p > 0.05$ ), or LAMP-1 (PCC = 0.286,  $p > 0.05$ ) (**Fig. 2A**, from top to bottom and **Fig. 2B** from left to right). However, Siglec-7 showed significant colocalization with the  $\alpha$  granule marker, CD62P (PCC = 0.87,  $p < 0.05$ ) (**Fig. 2C**), suggesting that Siglec-7 is predominantly localized to  $\alpha$  granules in platelets. Representative maximum Z projection images for Siglec-7 and CD62P (**Fig. S2 Supplemental figures**) further confirmed that Siglec-7 is distributed in the same compartment as that of CD62P.

We also analyzed the expression profiles of other Siglec family proteins in human platelets. Among all the Siglec proteins tested, Siglec-7 appeared to be highly abundant and most consistently expressed; Siglec-9 and Siglec-10 showed a low levels of expression (**Fig. S3 A and B, Supplemental figures**).

### ***Characterization of Siglec-7 as a marker for platelet activation***

Activated platelets from PRP's were analyzed and quantified for P-selectin (CD62P), a hallmark protein expressed during platelet activation and Siglec-7 using flow cytometry (n = 10). Platelet response upon stimulation with TRAP, PAR-4 activator and collagen (5  $\mu$ M, 200  $\mu$ M and 50  $\mu$ g/ml respectively) was measured as mean fluorescence index (MFI, means  $\pm$  SEM). The MFI of platelets bound to CD62P under unstimulated condition was  $13.52 \pm 0.6$ . TRAP treatment resulted in an increase in MFI to  $94.1 \pm 3.04\%$  ( $p < 0.05$ ); PAR-4 activator increased the MFI to  $85 \pm 4$  ( $p < 0.05$ ); and collagen increased it to  $28.56 \pm 2.2$  ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 3A**). Similar to that of CD62P, following stimulation, Siglec-7 showed a significant increase in MFI. The baseline MFI in unstimulated cells was  $301.59 \pm 76.46$ ; TRAP stimulation increased the MFI to  $764.78 \pm 155$  ( $p < 0.05$ ); Stimulating with PAR4 activator resulted an MFI of  $704.15 \pm 189.5$  ( $p < 0.05$ ); and collagen stimulation increased the MFI to  $419.78 \pm 58.3$  ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 3B**). There is a significant correlation between Siglec-7 MFI and CD62P MFI (PCC = 0.995,  $p < 0.05$ ) (**Fig. 3C**). Additionally, there is a close correlation between the expression of CD62P and Siglec-7 over time on membrane surface of unstimulated (PCC = 0.842,  $p = 0.016$ ) and TRAP stimulated platelets (PCC = 0.958,  $p = 0.01$ ) (**Fig. 3D, E**). In TRAP stimulated platelets, the activation marker protein started to decline steadily after reaching a peak expression point at t0 (0 min in **Fig. 3D, E**). This is probably due to the decay of the surface protein or cleavage of the membrane bound protein to a soluble form. This mechanism was earlier described for CD62P, a major component of  $\alpha$  granule membrane in resting platelets. It is expressed on the platelet surface membranes in response to platelet activation, and is subsequently cleaved to a soluble form (sCD62P).<sup>2</sup> To analyse if Siglec-7 also shows similar cleavage and translocate from platelet membranes, we tested levels

of soluble Siglec-7 in TRAP treated platelets at different time points. Incubation of platelets with TRAP (30 min) resulted in a small, but, insignificant changes ( $p = 0.9$ ), in soluble Siglec-7 secretion (3820.1 pg/  $2 \times 10^8$  platelets/ml to 3982.3 pg/  $2 \times 10^8$  platelets/ml). Further, there was no change in the secretion for up to 6 h in both the unstimulated and TRAP stimulated platelets (**Fig. S4, Supplemental figures**).

We next asked if the reduced surface expression of Siglec-7 and CD62P was due to the degradation by any matrix metalloproteinases (MMP), and tested platelets for MMP expression levels. There was no significant correlation between the expression of MMP 1, 2, and 9, and Siglec-7 and CD62P in the corresponding supernatant (**Fig. S5, Supplemental figures**), suggesting matrix metalloproteinases are not involved in cleavage and/or degradation of Siglec-7 on platelet surface membranes.

Together our results suggest that Siglec-7 expression is similar to that of CD62P, a canonical platelet activation marker, indicating a close relationship between Siglec-7 and platelet activation.

#### ***Effect of ligand binding to Siglec-7 on platelet activation***

We next examined if exposure of platelets to GD2, a Siglec-7 ligand, alters platelet activation by analyzing CD62P expression (**Fig. 4A**) and aggregation (**Fig. 4B**). Of note and as described previously, GD2 was soluble in Chloroform:Methanol 2:1; thus this mix was used as GD2 vehicle. The GD2 (3.2 to 80  $\mu$ M) did not induce any statistically significant elevation in CD62P expression levels over its vehicle control. Further, neither the GD2 nor the vehicle treated

platelets showed any aggregates in 30 min. When ADP (10 mM) was added to PRP, after 30 min of GD2 or vehicle treatment, there was a submaximal platelet aggregation.

These results suggest that while GD2 itself is not capable of activating platelets, it does not prevent ADP-induced aggregation. In addition, GD2 did not result in any significant changes in secretion of the soluble factors, compared to that of vehicle control. (**Fig. 4C**). Thus, despite Siglec-7 is expressed and functional in platelets, so far our data shows it is not essential for mediating hemostasis or immunity/inflammation/repair, the two key functions of platelets. However, these two functions could be involved indirectly after implication of another role of platelet Siglec-7 engagement concerning apoptosis as we next investigated thereafter.

### ***Siglec-7 cross-linking induces apoptosis and death in platelets***

Loss of platelets was observed during *in vitro* experiments. This prompted us to examine the role of Siglec-7 in platelet apoptosis following its engagement on to the surface of platelets upon cross-linking with GD2. GD2 induced a significant increase in platelet loss/death compared to the vehicle treated cells ( $29.88 \pm 4.97\%$  vs  $12 \pm 3.21\%$ ); A23187, the canonical inducer of platelet apoptosis, induced platelet loss/death by the range of  $68.4 \pm 0.34\%$  (**Fig. 5A**). Further, GD2 induced platelet death was significantly attenuated ( $29.88 \pm 4.97\%$  vs  $12.69 \pm 3.89\%$  ;  $p < 0.05$ ) when platelets were pre-incubated with the neutralizing anti-Siglec-7 pAb for 30 min, at 3°C, (**Fig.5A**). Electron microscopy analysis on GD2 and vehicle treated platelets (**Fig. 5B and C**) revealed morphological changes

closely resembling a typical apoptosis profiles in GD2 treated platelets, including, blebbing, filopod extrusion (**Fig. 5B.1,2**) and cell shrinkage (**Fig. 5B.1.3**). The morphology in GD2 treated platelets is also similar to that of A23187 treated platelets (**Fig. 5D**). These morphologies are comparable to those reported to occur in platelet apoptosis induced by high shear stress.<sup>37</sup> Thus, engagement of Siglec-7 by its ligand, GD2 showed an increase in platelet loss, displaying features of cell death and apoptosis. To further define whether this observation relates to apoptosis, we sought to explore various apoptosis pathways in platelets in relation to Siglec-7:GD2 ligand interaction.

Three main pathways are responsible for platelet apoptosis:<sup>35</sup> i) extrinsic pathway: initiated by interaction between the death ligands belonging to the tumor-necrosis factor [TNF] superfamily, and the cell surface TNF receptors such as TRAIL receptor; ii) intrinsic pathway: characterized by the expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, Bak, Bax, and depolarization of the mitochondrial inner membrane potential; and iii) cellular pathway: characterized by the exposure of phosphatidylserine (PS), the activation of apoptosis executioner caspase-3, a platelet-derived microparticle (MP) formation.

We first explored the extrinsic apoptosis pathway. To achieve this goal, we attempted to measure if platelets express death receptor, TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1) after engagement of Siglec-7 by GD2 (compared to stimulation by A23187) (**Fig. 6A**). Resting platelets showed a weak expression of TRAIL-R1 ( $0.33 \pm 0.08\%$ ), which varied minimally after stimulation with either vehicle or GD2 ( $0.62 \pm 0.2\%$  and  $1.3 \pm 0.62\%$ , respectively; NS), contrary to control A23187, which induced a significant, though still modest, increase in TRAIL-R1 expression in platelets ( $6.7\% \pm 0.43$ ;  $p < 0.05$ ).

We next explored the extra-mitochondria cellular pathway. For that, we examined whether platelets expose PS following Siglec-7 engagement by GD2 or vehicle control. GD2 stimulated platelets showed a significant increase in expression of PS compared to that of vehicle or A23187 treatments ( $26.35 \pm 3.6\%$ ,  $22.8 \pm 3.15\%$ , and  $13.47 \pm 2.44\%$  respectively;  $p < 0.05$ ) (**Fig. 6B**). However, no significant difference in PS expression was noticed ( $16.45\% \pm 2.33$ ), when platelets were pre-incubated with varying concentrations of neutralizing anti-Siglec-7 pAb. Comparable data were observed regarding PMP formation; PMPs were significantly increased upon GD2 treatment, but not affected by anti-Siglec-7 pAb (**Fig. 6C**).

We finally explored the mitochondria-dependent apoptosis pathway (the intrinsic pathway). We used DiOC6(3) (3,3'-Dihexyloxycarbocyaninelodine), a cell-penetrating green-fluorescing cationic dye, to determine the effect of GD2 on mitochondrial membrane potential. As illustrated in **Fig. 6D**, exposure of platelets to GD2 resulted in a decline of the mitochondrial potential; the baseline DiOC6(3) MFI decreased from 846.2 to  $245 \pm 89.6$  (GD2;  $p < 0.05$ ). The vehicle treated platelets did not show a statistical alteration in MFI ( $571 \pm 106$ ). A23187 treatment on the other hand, almost completely abolished the membrane potential ( $59.1 \pm 26$ ;  $p < 0.05$ ). Of important note, the mitochondrial potential was restored when platelets were pre-incubated with pAb to GD2, prior to GD2 treatment ( $716.4 \pm 151.13$  vs  $245 \pm 89.6$ ;  $p < 0.05$ ). Similar changes were observed in the expression levels of the pro-apoptotic Bcl-2 family proteins (Bak, Bax) that also characterize the mitochondrial apoptosis pathway (**Fig. 6E**).

To further ensure that GD2 binding to Siglec-7 induces apoptosis in platelets, we used anti-Siglec-7 pAb or a control IgG, and also the role of Fc $\gamma$ RII, by using an

anti-CD32 MAb. As expected, none of the control IgGs showed any effect on GD2-induced apoptosis in platelets (**Fig. S6**). Moreover, anti-CD32 mAb had no significant impact on GD2-triggered platelet mitochondrial depolarization or on protective effects induced by anti-Siglec-7 pAb (**Fig. S6**). Platelet exposure to GD2 was followed by a decline in mitochondrial membrane potential. In presence of blocking anti-Fc $\gamma$ RII by using an anti-CD32 MAb increased no significantly this loss of  $\Delta\Psi_m$  depolarization (**Fig. S6**). Our results are similar to those from Martini *et al.*,<sup>38</sup> who showed that GD3 is expressed on the surface of the platelets and internalised rapidly, where it transitorily associates with the Src family tyrosine kinase, Lyn and with the Fc receptor gamma chain. This sequence of events ultimately leads to an enhanced CD32 expression on the platelet membrane.

Our results indicate that GD2-induced apoptosis in platelets involve both the extra-mitochondria cellular pathway and the intrinsic mitochondria-dependent pathway, and is independent of the extrinsic pathway. Neutralizing with anti-Siglec-7 pAb can prevent apoptosis and cell death.

### ***Identification of key pathways in platelet Signaling of Siglec-7 engagement***

To achieve this goal, prior to GD2 treatment, platelets were treated with either varying concentrations of the inhibitors of the intracellular pathway (DPI for NADPH oxidase; LY294,002 for PI3K; BIM I for PKC; and BAY-11 for NF $\kappa$ B) or DMSO control. Inhibition of NADPH oxidase (by DPI), PI3K (by LY294,002), and PKC (by BIM I) resulted in a significant reduction in platelet death in a dose-dependent manner. Significant difference in cell death was observed in: DPI 1  $\mu$ M



(1.4% vs 17.75%,  $p < 0.05$ ), LY294,002 50  $\mu\text{M}$  (11.74% vs 23.74%,  $p < 0.05$ ), BIM 10  $\mu\text{M}$  (9.4% vs 25.6%,  $p < 0.05$ ) compared to the DMSO treated platelets. Inhibition of NF $\kappa$ B (by BAY-11) did not show any significant changes in platelet death (**Fig. 7A**). We measured changes in  $\Delta\Psi_m$  following treatment with the inhibitors. Specific inhibitors of NADPH oxidase (by DPI) and PI3K (by LY294,002), but not PKC (by BIM I) showed a significant increase in  $\Delta\Psi_m$ , further suggesting these inhibitors protect platelets from GD2 induced apoptosis in a mitochondria dependent pathway. DMSO (data presented as mean  $\pm$  SEM): 26.54%  $\pm$  6.65 vs 43.21%  $\pm$  5.38 (1.6-fold decrease) and 18.51%  $\pm$  3.29 vs 37.04%  $\pm$  7.8 (2-fold decrease) ( $p < 0.05$ ; **Fig.7B**). Last, only the specific inhibition of PI3K (by LY294,002) (but neither of NADPH oxidase nor PKC) prevented significantly the exposure of PS, an extra-mitochondria event of GD2-induced platelet apoptosis (27.51%  $\pm$  2.51 vs 32.65%  $\pm$  3.6 in control DMSO,  $p < 0.05$ ) (**Fig. 7C**).

Collectively, our results reveal that NADPH oxidase and PI3K activities are responsible for platelets apoptosis induced by GD2-

### **Cooperation between platelet hemostatic receptors and Siglec-7 to induce platelet apoptosis**

Having shown that Siglec-7 is present on the surface of resting platelets as well as in the activated platelets, and is involved in controlling apoptosis, we next studied the effect of inhibition of platelet surface hemostatic receptors on function of Siglec-7 in mediating apoptosis and cell death.

For this purpose, we investigated the GD2 ganglioside induced platelet apoptosis by treating platelets with the similar concentrations of the following inhibitors for: P2Y1, by using MRS2179 (100  $\mu$ M, **Fig. 8A**); GPIIbIIIa, by using Tirofiban (10  $\mu$ M, **Fig. 8B**); P2Y12, by using Clopidogrel (476  $\mu$ M, **Fig. 8C**); PAR-1, by using SCH79797 (10  $\mu$ M, **Fig. 8D**) and PAR-4, by using tcY-NH2 (400  $\mu$ M, **Fig. 8E**). DMSO was used as a negative control. The platelet count and  $\Delta\Psi$ m (decrease of DIOC6(3) accumulation) were measured. Platelets were first exposed to either inhibitors of the hemostatic receptors or DMSO (negative control), followed by GD2. Inhibition of P2Y12, PAR-1, and PAR-4 was ineffective on GD2-induced platelet death and  $\Delta\Psi$ m depolarization; in contrast, inhibition of P2Y1 and GPIIbIIIa was associated with a reversion of the GD2-induced cell death and  $\Delta\Psi$ m depolarization (P2Y1:  $16.4 \pm 3.6$  and  $14.76 \pm 5.78$  vs  $37.61 \pm 6.29$  and  $40.93 \pm 7.31$  - percentage of diminution in DIOC6(3) MFI and percentage of diminution in platelets count, respectively;  $p < 0.05$  (**Fig. 8A**); GPIIbIIIa:  $37.9 \pm 1.93$  and  $74.19 \pm 6.54$  vs  $4.39 \pm 5.1$  and  $47.98 \pm 2.98$  - percentage of diminution in DIOC6(3) MFI and percentage of diminution in platelets count, respectively;  $p < 0.05$  (**Fig. 8B**).

These data suggest that GD2-induced platelet apoptosis is dependent on P2Y1 and GPIIbIIIa receptor cross-linking.

## Discussion

This study, for the first time, describes the expression and functional role of Siglec-7 in human platelets. In platelets, Siglec-7 appears the most consistently expressed member of the Siglec family proteins. Despite Siglec-7 was shown to be expressed abundantly, and exert a critical role in platelet physiology and

apoptosis regulation, it cannot be ruled out that platelets also express other Siglec family proteins with essential functions.

Siglec-7 is expressed at low levels on human granulocytes and monocytes, and relatively high levels on a major subset of NK cells and a minor subset of CD8<sup>+</sup> T cells. Classically, the accepted description of the function of Siglecs is the detection of the “self sialome” and down regulation of the immune system, because of their ITIM motifs. The CD33-related Siglecs were thus found to inhibit cellular proliferation, induce apoptosis, and inhibit secretion of pro-inflammatory cytokines. Several CD33-related Siglecs were found to interact with sialic acid moieties expressed by various pathogens such as HIV, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, group B *Streptococcus* and *Trypanosoma cruzi*. Siglec-dependent capture of these pathogens has been proposed to assist host response by stimulating innate and adaptive immunity to favor pathogen destruction.<sup>15,39,40</sup>

So far, five CD33-related Siglec members are identified in mice; their structure, expression profile, and functions are quite similar to human CD33-related Siglecs.<sup>41</sup> To our knowledge, there were no reports describing the expression or the function of Siglecs on human or mouse platelets. Despite mouse physiology is not strictly transposable to human physiology, or physiopathology, it cannot be ruled out that if the expression of Siglecs on mouse platelets is confirmed, interesting complementary information can be derived.

In this study, we show that human platelets express Siglec-7 and that this expression is increased upon TRAP stimulation. Siglec-7 is localized in the same compartment of specific makers of  $\alpha$  granules (CD62P). We observed a close correlation between the expression of CD62P and Siglec-7 on the membrane surface of both resting platelets and TRAP-induced activated platelets over time.

Binding of Siglec-7 to its ligand, GD2 did not cause any significant enhancement in platelet CD62P expression, aggregation or soluble factor secretion. However, Siglec-7 cross-linking with GD2 increased apoptosis and platelet death by extra-mitochondrial cellular pathway and the mitochondria-dependent (intrinsic) pathway. Specific inhibitors of NADPH oxidase (DPI), PI3K (LY294,002), and PKC (BIM I) partially but significantly rescued platelets from the apoptosis induced by Siglec-7 engagement; whereas, inhibitor of NFkB (BAY-11) did not show much affect. We show evidence that GD2-induced platelet apoptosis was regulated by receptors, P2Y1 and GPIIb/IIIa. This observation is seminal for platelet physiology, as these receptors are instrumental in primary hemostasis, and the inhibitors used in the current study have previously been shown to reduce hemostasis and thrombosis.

This work further reinforces the concept that platelet receptors link the two well-known functions, hemostasis and innate immunity (with a balance between physiological inflammation and healing, and pathological inflammation, and a role in linking the innate and adaptive immune systems).<sup>2,42</sup> We previously reported the expression of TLRs in human platelets, later other groups have suggested that TLRs in platelets may regulate secretion of pro-inflammatory cytokines, upon exposure to pathogenic microbes.<sup>43-46</sup> We now describe the expression of Siglecs (with particular focus on Siglec-7), which are considered to link hemostasis (this work) and anti-infectious immunity.<sup>39,40</sup> The Siglec-related family members are not only mobilized to interact with external microbial pathogens, but similar to alarmins, they can also interact with pathogenic modified self-motifs.<sup>38,47</sup> This opens a novel function for platelets in pathology beyond their role in physiology

(an issue which was enlightened when platelets and PMPs were found to infiltrate inflamed tissues and strengthen pathology).<sup>48,49</sup>

The present work re-emphasizes and extends the role of platelet receptors in innate immunity and in pathogen sensing. Since 7 years, TLRs have been extensively characterized in platelets. There are classically three TLR-ligand family members. First, the Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), produced specifically by microbes. They are invariant between microorganisms of a particular class and essential for microbial survival.<sup>50,51</sup> Second, the Damage-associated molecular patterns (DAMPs), considered as critical “endogenous danger signals” in extending inflammation.<sup>52</sup> Third, a new class of pathogen associated semaphores or self-associated molecular patterns (SAMPs), proposed by Varki and co-workers”. SAMPs are recognized by intrinsic inhibitory receptors, to preserve the non-activated state of innate immune cells (neutrophils, monocytes etc.), and to reduce their reactivity following an immune response.<sup>53</sup> To detect such SAMPs, there must be cognate self-PRRs (SPPRs); Siglecs (sialic acid recognizing Ig-like lectins) belong to the class of SPPRs. CD33-related subset of inhibitory Siglecs recognize sialic acid ligands as “self-motifs” and deliver inhibitory signals to innate immune cells. The present study extends this repertoire to platelets. Siglec family members are ascribed to as dampeners of immune reactivity and promoters of apoptosis. Here we demonstrate that one member of the Siglec family, Siglec-7 is closely associated with platelet apoptosis. We provide evidence that cell loss and platelet death is due to Siglec-7:Ligand induced apoptosis, and we also show that intrinsic and extrinsic pathways are preferentially involved.

In platelet components stored to make an inventory for transfusion purposes, even though platelets are kept sterile (aseptic), without the acknowledged presence or the deliberate addition of PAMPs, they can generate DAMPs under oxidative stress.<sup>54</sup> Platelets TLR cross-linking by ligands can promote an inflammatory response; besides, Siglecs, by complexing with CD24, a glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored molecule, expressed by immature hematopoietic cells, can recognize DAMPs and dampen the damage.<sup>55</sup> The platelet expression of Siglec-7 may thus be part of a complex mechanism of auto-regulation of the pro-inflammatory platelet propensity.

Various studies have reported incidence of accelerated apoptosis during the storage of platelet concentrates.<sup>19-21</sup> In this regard, a comprehensive knowledge on platelet apoptosis would be beneficial at several levels: first, apoptosis markers could be measured to predict viability of the given platelet component; second, means to rescue platelet apoptosis could be featured to increase platelet lifespan and recirculation in the transfused patient, and to achieve primary hemostasis<sup>56</sup> (indeed, the lifespan of platelets during circulation is 6-10 days;<sup>57</sup> thus, there is a significant decrease of platelet viability during 5 day storage).<sup>58-60</sup> Treatment of diseases such as Immune thrombocytopenia requires a target for improving transfused platelet lifespan, since these are associated with a massive apoptosis, the Siglec pathway would be a possible target.

## **Acknowledgments**

We thank Drs. Christine Aubrège, Alain Lefebvre, Celine de Putter, and Ms. Marie-Ange Eyraud (EFS Auvergne-Loire, France) as well as Pauline Damien (Université de Lyon, GIMAP-EA3064, Saint Etienne) for their assistance with human blood cells preparation. Financial support was received through grants from the National and Regional Blood Bank–EFS Auvergne-Loire, France, the Association “Les Amis de Rémi,” Savigneux, France and the French National Agency for Drug Safety and Health Products (ANSM).

**Authorship and Disclosures:** KAN and FC designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. HHC, CAA, PC, and BP analyzed the data. SP performed and analyzed the confocal microscopy data. IAB produced and analyzed the electronic microscopy data. OG and FC coordinated the study, wrote the manuscript, supervised the project and take responsibility of the paper.

The authors declare no competing financial interests and no conflict of interest regarding this study.

**Figure 1. Expression of Siglec-7 in Human platelets.**

**(A), (B).** Siglec-7 expression in platelets was analyzed by flow cytometry (n = 20). Platelets (stimulated with TRAP or vehicle control) were labeled with anti-CD41a and anti-Siglec-7 mAb. Membrane expression of Siglec-7<sup>+</sup> was increased after TRAP-induced platelet activation (\* significant difference, of %CD41a<sup>+</sup> Siglec-7<sup>+</sup> between TRAP-induced platelets activation vs resting platelets, t-test, p < 0.05).

**(C).** Membrane and intracellular localization of Siglec-7 in platelets. Platelets before and after permeabilization (stimulated with TRAP or vehicle control) were labeled with anti-CD41a, anti-CD62P (positive control for permeabilized platelets) and anti-Siglec-7 mAb. Gating on CD41a<sup>+</sup> population, intra-platelet expression of Siglec-7 is significantly higher than its membrane expression (in both stimulated and unstimulated) (\*, # significant difference (t-test, p < 0.05) between % CD41a<sup>+</sup> CD62P<sup>+</sup> or % CD41a<sup>+</sup> Siglec-7<sup>+</sup> (respectively) vs non-permeabilized resting platelets.

**(D).** Distribution of Siglec-7 in platelets analyzed by confocal microscopy. Immunofluorescence labeling with anti-CD41a, anti-Siglec-7 mAb, and overlay (from top to bottom). Siglec-7 staining in permeabilized (right panel) and non-permeabilized platelets (left panel) showed its intracellular expression is more important than membrane expression. Scale bars represent 6  $\mu\text{m}$ .

**(E).** Labeling with anti-tubulin, anti Siglec-7 antibodies and overlay (from top to bottom). Tubulin was labeled to demarcate platelet border, Siglec-7 is mostly in intracellular compartments. Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$ .



## Figure 2. Siglec-7 localization in human platelets

**(A).** Siglec-7 do not colocalize with markers for dense granules, lysosomes, T-granules or endosomes. From top to bottom: Intra-platelet Siglec-7 was co-stained with serotonin (dense granules), M6P (endosomes), TLR-9 (T-granules), and LAMP-1 (lysosomes) using two distinct colored secondary antibodies. Insets represent magnified regions shown in in yellow boxes. Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$ , except insets where scale bars represent 2  $\mu\text{m}$ .

**(B).** Scattergram, scatter plot, and colocalization analysis of Serotonin/Siglec-7; M6P/Siglec-7; TLR-9/Siglec-7; and LAMP-1/Siglec-7 (From left to right). Siglec-7 did not colocalize with any of these proteins (Pearson correlation analysis,  $p > 0.05$ ).

**(C).** Siglec-7 colocalized with CD62P, an  $\alpha$  granule marker. Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$  except insets bars, which represent 2  $\mu\text{m}$ . Pearson correlation analysis  $p < 0.05$ .

## Figure 3. Characterization of Siglec-7 as a novel marker of platelets activation.

**(A)-(C).** Agonist-induced platelet activation ( $n = 10$ ). Platelets were stimulated with different agonists: TRAP (PAR-1), PAR-4 activator, collagen ( $\beta_2\alpha_1$  integrin and GPVIFcR gamma). Membrane expression of CD62P **(A)** and Siglec-7 **(B)** in MFI was correlated in all experimental conditions (PCC = 0.995,  $p = 0.002$ ) **(C)**.

**(D) and (E).** Kinetics of CD62P **(D)** and Siglec-7 **(E)** expression on platelets membrane ( $n = 5$ ). Membrane expression of Siglec-7 and CD62P in platelets in un-stimulated and TRAP stimulated conditions, analyzed by flow cytometry. MFI

changes between CD62P and Siglec-7 were correlated over time (unstimulated: PCC = 0.842;  $p = 0.016$ ; stimulated by TRAP: PCC = 0.958, 0.01). \*, #, ¥, □ significant difference (ANOVA,  $p < 0.05$ ) between MFI of Siglec-7 or CD62P marker overtime vs 0, 30, 60, and 180 min respectively; ‡ (t test,  $p < 0.05$ ) MFI of Siglec-7 or CD62P marker in TRAP-induced platelets activation vs resting platelets (Expression of CD62P and Siglec-7 in MFI was reported in unstimulated condition at 0 min, which was considered as 100%).

#### **Figure 4. Effects of Siglec-7 ligand, ganglioside, on platelet function.**

**(A).** Platelet activation upon stimulation with GD2 ( $n = 10$ ). (\* significant difference, t- test,  $p < 0.05$ , changes in membrane expression of CD62P in platelets stimulated by TRAP vs resting platelets). There was no significant change in the expression of CD62P between platelets stimulated by GD2 compared to vehicle (t-test  $p > 0.05$ ) treatment. Similar results were observed in GD3 and GT1b stimuli. Thus, gangliosides show no effect on platelet activation.

**(B).** Platelet aggregation ( $n = 3$ ) analyses: Incubation of platelets with either GD2 or vehicle did not induce platelets aggregation and did not alter their response to ADP stimulation (10  $\mu\text{M}$ ).

**(C).** Platelet secretion analysis: Platelets secretion of Serotonin, sCD40L, and RANTES induced by GD2 stimulation ( $n = 10$ ). The secretion of resting platelets seem slightly lower than both the vehicle and GD2-stimulated platelets; however, there no significant difference between the latter two groups was noticed (t-test  $p > 0.05$ ).

### Figure 5. Effect of GD2 on platelet death

**(A).** Cell death induced by GD2 stimulation. Platelets untreated or pre-treated with a blocking anti-Siglec-7 pAb were incubated with vehicle or GD2. A23187 was used as positive control for apoptosis. Cell death rate (%) was measured as the percentage of diminution in platelets count in relation with unstimulated. \*, # significant difference (t- test,  $p < 0.05$ ) vs vehicle or GD2 stimulated condition (respectively). Results are representative from 5 independent experiments.

**(B), (C).** Morphology of platelets analyzed by scanning electron microscopy. **(B)** In platelets stimulated with GD2, morphology resembled an apoptotic cell characterized by blebbing, filopod extrusion (1, 2) and cell shrinkage (3). **(C)** Resting platelets have discoid shape with a smooth cell surface. **(D):** A23187-induced platelets apoptosis.

### Figure 6. Mechanism of GD2-induced platelet apoptosis.

Both untreated and the platelets pretreated with the blocking anti-Siglec-7 PAb were incubated with either vehicle or GD2. A23187 was used as an apoptosis positive control. Different parameters of apoptosis pathways in platelets were analyzed.

**(A).** Expression of TRAIL R1 in platelets stimulated by GD2 ( $n = 12$ ). \* significant difference (t-test,  $p < 0.05$ ) vs resting platelets. Extrinsic pathway may not be involved in platelets apoptosis induced by GD2.

**(B).** Analyses of Phosphatidylserine (PS) exposure ( $n = 13$ ). The extent of PS exposure by GD2 was reduced by the blocking anti-Siglec-7 pAb in a

concentration-dependent manner. \*, # Significant difference (t-test,  $p < 0.05$ ) vs vehicle or GD2 stimulated conditions respectively.

**(C).** Platelet microparticle assay ( $n = 10$ ). PMP formation was calculated with respect to the concentration in vehicle condition (which was considered as 100%). \*, # significant difference (Wilcoxon paired test,  $p < 0.05$ ) vs vehicle or GD2 stimulated condition respectively.

**(D).**  $\Delta\Psi_m$  depolarization.  $\Delta\Psi_m$  depolarization resulted in decrease of DIOC6(3) accumulation. \*, # Significant difference (t-test,  $p < 0.05$ ) vs vehicle or GD2 stimulated condition respectively. Results are representative of 5 independent experiments.

**(E).** Western blot demonstrates strong expression of Bax and Bak in GD2-treated human platelets and this expression was prevented by a blocking anti Siglec-7 pAb. Results are representative of 3 independent experiments.

**Figure 7. PI3K inhibitors reduce GD2-induced platelet apoptosis ( $n = 15$ ).**

**(A).** Platelets were pre-treated with the varying concentration of the inhibitors of the intracellular pathways (DPI for NADPH oxidase, LY294,002 for PI3K, BIM I for PKC and BAY-11 for NF $\kappa$ B) or DMSO (for negative control) followed by stimulating with GD2. Cell death rate (%) was calculated by the percentage of diminution in platelet number in comparison to unstimulated. DPI, BIM I, and LY294,002 prevented the cell death in a concentration dependent manner. \* Significant difference (t-test,  $p < 0.05$ ) between inhibitor vs DMSO treated.

The lowest concentration of inhibitors with significant effect (DPI 1  $\mu$ M, LY294,002 50  $\mu$ M, BIM I 10  $\mu$ M) (no difference at a higher concentration) was

selected to treat platelets. **(B)**. Loss of  $\Delta\Psi_m$  resulted in reduced accumulation of DIOC6(3), was calculated as the percentage of diminution in DIOC6(3) MFI in comparison with unstimulated platelets. **(C)**. Phosphatidylserine exposure (left panel: percentage of CD41a<sup>+</sup>, Annexin V<sup>+</sup>; right panel: MFI). \* Significant difference (t-test,  $p < 0.05$ ) between inhibitor vs DMSO pretreated. Thus, PI3K inhibitor prevented both  $\Delta\Psi_m$  depolarization and PS exposure in platelets, while NADPH oxidase inhibitor prevented only  $\Delta\Psi_m$  depolarization.

**Figure 8. Ganglioside- induced platelet apoptosis is regulated by platelet P2Y1 and GPIIb/IIIa antagonists (n = 10).**

Platelets were pre-treated with antagonists of the corresponding platelets receptor **(A)**. MRS2179 100  $\mu\text{M}$ : P2Y1 antagonist, **(B)**. Tirofiban 10  $\mu\text{M}$ : GPIIb/IIIa antagonist, **(C)**. Clopidogrel 476  $\mu\text{M}$ : P2Y12 antagonist, **(D)**. SCH79797 10  $\mu\text{M}$ : PAR-1 antagonist, **(E)**. tcY-NH2 400  $\mu\text{M}$ : PAR-4 antagonist) or DMSO at the same dilution (for negative control) followed by stimulating with GD2. Cell death rate (percentage of diminution in platelets count) and  $\Delta\Psi_m$  depolarization (percentage of diminution in DIOC6(3) MFI) were prevented by P2Y1 and GPIIb/IIIa antagonist. Significant difference (\* t-test,  $p < 0.05$ ) between antagonist vs DMSO pretreated.

## Supplemental figures

**Table S1.** Monoclonal antibodies used in Flow Cytometry to analyze the membrane expression of platelets.

**Figure S2.** Representative maximum projection confocal microscopy z series images of Siglec-7 (Red) and CD62P (Green), demonstrating colocalization (z tack = 0.6  $\mu\text{m}$ ) (5 series for each platelet sample: n = 3).

**Figure S3.** Expression of CD33r Siglecs on membrane surface of unstimulated and TRAP-stimulated platelets analyzed by flow cytometry. **A.** Representative Scattergram from platelet samples of 10 healthy donors. Data expressed in percentage of CD41<sup>+</sup>, Siglec<sup>+</sup>. **B.** Percentage of CD41<sup>+</sup> Siglec<sup>+</sup> [Data expressed by mean  $\pm$  SEM, (n = 10)]. \*: Significant difference (Student t-test, p < 0.05) between TRAP-stimulated platelets vs unstimulated platelets

**Figure S4.** Concentration of soluble CD62P (A) and soluble Siglec-7 (B) in supernatants (n = 10) of resting and TRAP-induced platelets activation overtime. Data was shown in pg/2  $\times$  10<sup>8</sup> platelets/ml and expressed in mean  $\pm$  SEM. \* Significant differences in sCD62P levels in supernatants of TRAP-stimulated platelets vs unstimulated platelets (Student t-test, p < 0.05), ¥ and #: significant difference of sCD62P concentration in supernatants overtime vs 0 min (Anova, p < 0.05)

**Figure S5.** Concentration of soluble MMP-1 (A), MMP-2 (B), and MMP-9 (C) in supernatants (n = 5) of resting and TRAP-induced platelets activation overtime. Data was adjusted to pg/200 000 plot and expressed in mean  $\pm$  SEM. \*significant difference (ANOVA,  $p < 0.05$ ) between MMP-1 concentration overtime vs 0 min.

**Figure S6. GD2-induced mitochondrial depolarization in platelets** upon treatment with anti-Fc $\gamma$ RII MAb or PBS (for control). \* and \*\* significant difference (Student t-test  $p < 0.05$ ) of  $\Delta\Psi_m$  between GD2 stimulated platelets vs unstimulated platelets in the present of anti- Fc $\gamma$ RII MAb or not (respectively). # and ¥: Anti-Siglec-7 PAb + GD2 vs only-GD2 stimulated platelets in the present of anti- Fc $\gamma$ RII MAb or not (respectively) (n = 5). NS: Not significant

## References

1. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(1):34-45. 10.1038/nri3345.
2. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):264-274. 10.1038/nri2956.
3. Garraud O, Damien P, Berthet J, Arthaud CA, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F. [Blood platelets and biological response to 'danger' signals and subsequent inflammation: towards a new paradigm?]. *Transfusion clinique et biologique: journal de la Société française de transfusion sanguine*. 2011;18(2):165-173. 10.1016/j.tracli.2011.02.012.
4. Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2012;92(6):1167-1175. 10.1189/jlb.0312151.
5. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105 Suppl 1:S13-33. 10.1160/THS10-11-0720.
6. Schubert P, Devine DV. Proteomics meets blood banking: identification of protein targets for the improvement of platelet quality. *Journal of proteomics*. 2010;73(3):436-444. 10.1016/j.jprot.2009.08.002.
7. Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, et al. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clinical Immunology*. 2012;145(3):189-200. 10.1016/j.clim.2012.09.004.
8. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591-594.
9. André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106(8):896-899.
10. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*. 2003;19(1):9-19.
11. Cognasse F. Platelets as potential immunomodulators: is there a role for platelet toll-like receptors?
12. Crocker PR, Clark EA, Filbin M, et al. Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology*. 1998;8(2).
13. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1253:16-36. 10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x.
14. Ulyanova T, Shah DD, Thomas ML. Molecular cloning of MIS, a myeloid inhibitory siglec, that binds protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(17):14451-14458. 10.1074/jbc.M011650200.
15. Crocker PR, McMillan SJ, Richards HE. CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1253:102-111. 10.1111/j.1749-6632.2011.06449.x.
16. Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *British journal of haematology*. 1997;99(4):824-831.
17. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood reviews*. 2012;26(2):51-63. 10.1016/j.blre.2011.10.002.



18. Gyulxhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *British journal of haematology*. 2013;161(2):245-254. 10.1111/bjh.12237.
19. Li J, Xia Y, Bertino AM, Coburn JP, Kuter DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion*. 2000;40(11):1320-1329. 10.1046/j.1537-2995.2000.40111320.x.
20. Kuter DJ. Apoptosis in Platelets During Ex Vivo Storage. *Vox Sanguinis*. 2002;83:311-313. 10.1111/j.1423-0410.2002.tb05325.x.
21. Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Mykhalov S, Lyubimov E, Freedman J. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. *British journal of haematology*. 2008;142(3):494-497. 10.1111/j.1365-2141.2008.07209.x.
22. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, et al. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *British journal of haematology*. 2008;141(1):84-91. 10.1111/j.1365-2141.2008.06999.x.
23. Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F, Palle S, et al. Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC immunology*. 2008;9. 10.1186/1471-2172-9-54.
24. Varchetta S, Brunetta E, Roberto A, et al. Engagement of Siglec-7 receptor induces a pro-inflammatory response selectively in monocytes. *PloS one*. 2012;7(9). 10.1371/journal.pone.0045821.
25. Thon JN, Peters CG, Machlus KR, et al. T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *The Journal of Cell Biology*. 2012;198(4):561-574. 10.1083/jcb.201111136.
26. Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(16):4070-4081. 10.1523/JNEUROSCI.0346-04.2004.
27. Zhang S, Ye J, Zhang Y, et al. P2Y12 protects platelets from apoptosis via PI3k-dependent bak/bax inactivation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;no-no. 10.1111/jth.12063.
28. Lee J, Rhee MH, Kim E, Cho JY. BAY 11-7082 Is a Broad-Spectrum Inhibitor with Anti-Inflammatory Activity against Multiple Targets. *Mediators of Inflammation*. 2012;2012. 10.1155/2012/416036.
29. Harper MT, Poole AW. PKC inhibition markedly enhances Ca<sup>2+</sup> signaling and phosphatidyserine exposure downstream of protease-activated receptor-1 but not protease-activated receptor-4 in human platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(8):1599-1607. 10.1111/j.1538-7836.2011.04393.x.
30. Choo H-J, Saafir TB, Mkumba L, Wagner MB, Jobe SM. Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidyserine exposure. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(12):2946-2955. 10.1161/ATVBAHA.112.300433.
31. Labarthe B, Babin J, Bryckaert M, Th roux P, Bonnefoy A. Effects of P2Y(1) receptor antagonism on the reactivity of platelets from patients with stable coronary artery disease using aspirin and clopidogrel. *British journal of pharmacology*. 2012;166(1):221-231. 10.1111/j.1476-5381.2011.01683.x.

32. Leytin V, Mutlu A, Mykhaylov S, Allen DJ, Gyulkhandanyan AV, Freedman J. The GPIIb/IIIa antagonist drugs eptifibatid and tirofiban do not induce activation of apoptosis executioner caspase-3 in resting platelets but inhibit caspase-3 activation in platelets stimulated with thrombin or calcium ionophore A23187. *Haematologica*. 2009;94(12):1783-1784. 10.3324/haematol.2009.012708.
33. Lee H, Hamilton JR. The PAR1 antagonist, SCH79797, alters platelet morphology and function independently of PARs. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;109(1):164-167. 10.1160/TH12-06-0389.
34. Ma L, Perini R, McKnight W, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(1):216-220. 10.1073/pnas.0406682102.
35. Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2012;33(4):397-411. 10.1007/s11239-012-0688-8.
36. Hellum M, Øvstebø R, Trøseid A-MS, Berg JP, Brandtzaeg P, Henriksson CE. Microparticle-associated tissue factor activity measured with the Zymuphen MP-TF kit and the calibrated automated thrombogram assay. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2012;23(6):520-526. 10.1097/MBC.0b013e328354a256.
37. Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, et al. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;320(2):303-310. 10.1016/j.bbrc.2004.05.166.
38. Martini F, Riondino S, Pignatelli P, Gazzaniga PP, Ferroni P, Lenti L. Involvement of GD3 in platelet activation. A novel association with Fcγ3 receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002;1583(3):297-304. 10.1016/S1388-1981(02)00250-0.
39. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(4):255-266. 10.1038/nri2056.
40. Brunetta E, Fogli M, Varchetta S, et al. The decreased expression of Siglec-7 represents an early marker of dysfunctional natural killer-cell subsets associated with high levels of HIV-1 viremia. *Blood*. 2009;114(18):3822-3830. 10.1182/blood-2009-06-226332.
41. Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H. Siglecs and immune regulation. *Annual review of immunology*. 2012;30:357-392. 10.1146/annurev-immunol-020711-075018.
42. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cavaillon JM, Cognasse F. Platelets and active immune functions: new clues for immunopathology? *Intensive care medicine*. 2013.
43. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and cell biology*. 2005;83(2):196-198. 10.1111/j.1440-1711.2005.01314.x.
44. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005;106(7):2417-2423. 10.1182/blood-2005-03-0916.
45. Aslam R, Speck ER, Kim M, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*. 2006;107(2):637-641. 10.1182/blood-2005-06-2202.

46. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thrombosis research*. 2004;113(6):379-385. 10.1016/j.thromres.2004.03.023.
47. Ito A, Handa K, Withers DA, Satoh M, Hakomori S. Binding specificity of siglec7 to disialogangliosides of renal cell carcinoma: possible role of disialogangliosides in tumor progression. *FEBS letters*. 2001;504(1-2):82-86.
48. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5965):580-583. 10.1126/science.1181928.
49. Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets as Cellular Effectors of Inflammation in Vascular Diseases. *Circulation Research*. 2013;112(11):1506-1519. 10.1161/CIRCRESAHA.113.300512.
50. Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(5):749-755. 10.1189/jlb.1103543.
51. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(2):240-273, Table of Contents. 10.1128/CMR.00046-08.
52. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(3). 10.1101/cshperspect.a006049.
53. Varki A. Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. *Glycobiology*. 2011;21(9):1121-1124.
54. Alexandru N, Popov D, Georgescu A. Intraplatelet oxidative/nitrative stress: inducers, consequences, and control. *Trends in cardiovascular medicine*. 2010;20(7):232-238. 10.1016/j.tcm.2011.11.007.
55. Chen G-Y, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science (New York, NY)*. 2009;323(5922):1722-1725. 10.1126/science.1168988.
56. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*. 2007;128(6):1173-1186. 10.1016/j.cell.2007.01.037.
57. Morrell CN. Immunomodulatory mediators in platelet transfusion reactions. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2011;2011:470-474. 10.1182/asheducation-2011.1.470.
58. Perrotta PL, Perrotta CL, Snyder EL. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion*. 2003;43(4):526-535.
59. Seghatchian J. Platelet storage lesion: an update on the impact of various leukoreduction processes on the biological response modifiers. *Transfusion and apheresis science: official journal of the World Apheresis Association: official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2006;34(1):125-130. 10.1016/j.transci.2005.09.002.
60. Ohto H, Nollet KE. Overview on platelet preservation: better controls over storage lesion. *Transfusion and apheresis science: official journal of the World Apheresis Association: official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2011;44(3):321-325. 10.1016/j.transci.2011.03.008.

Figure 1

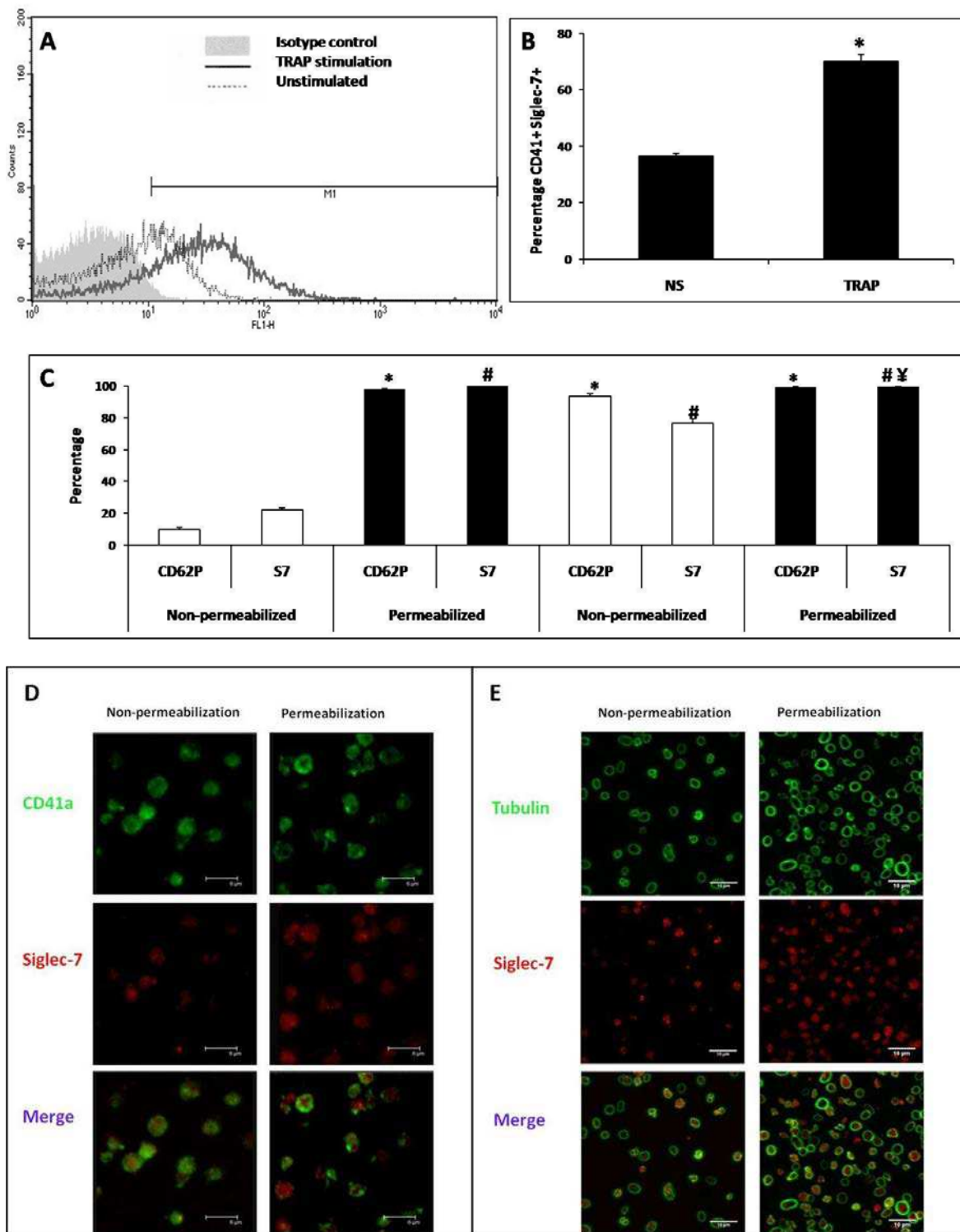
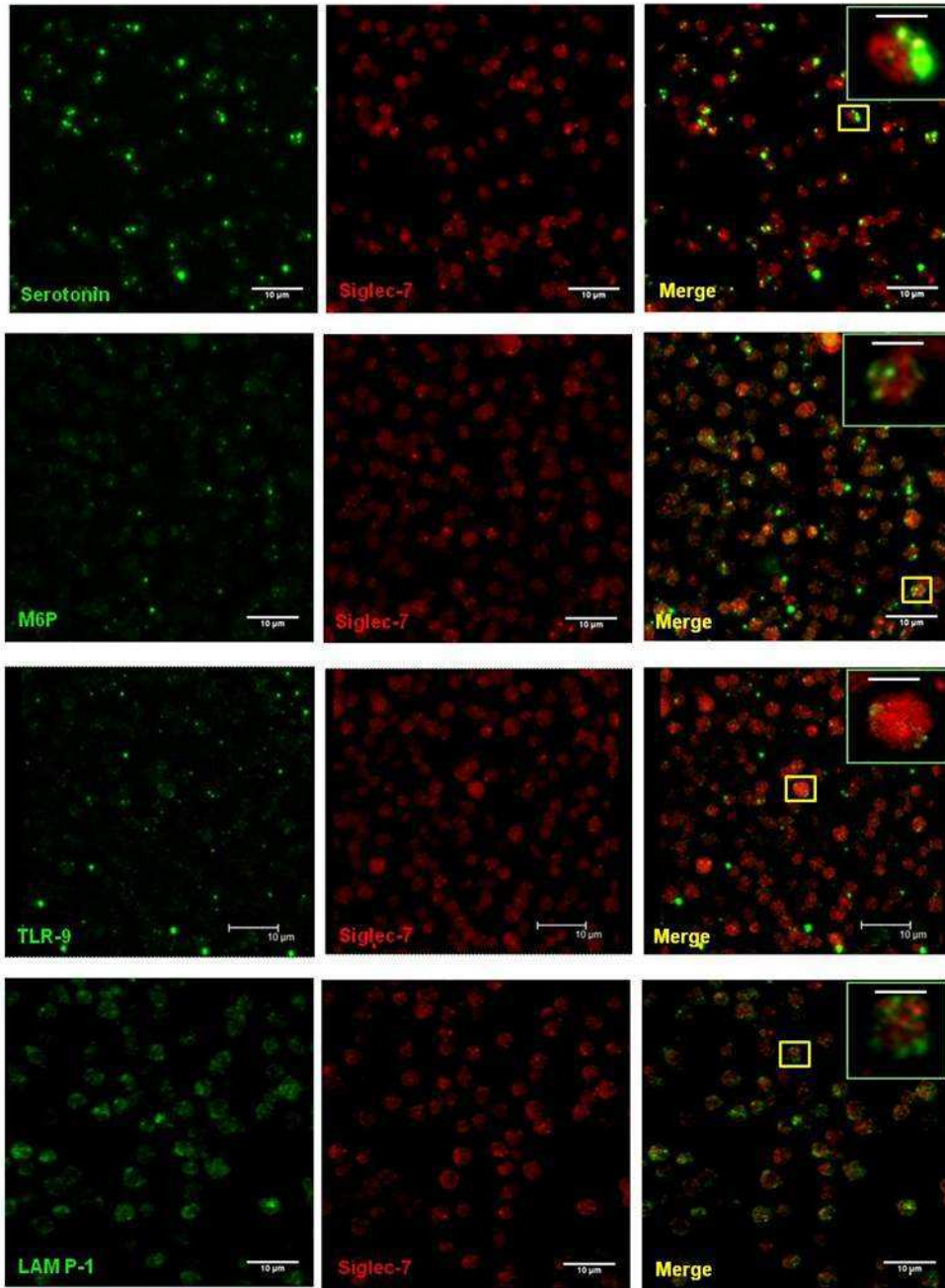


Figure 2

A



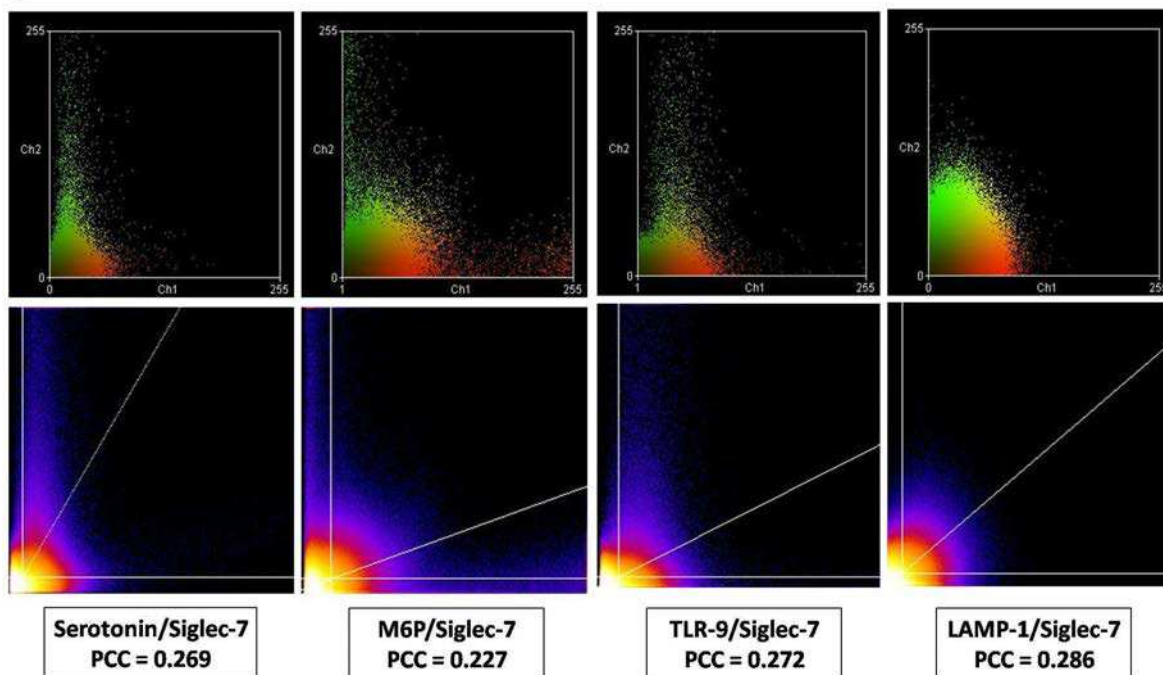
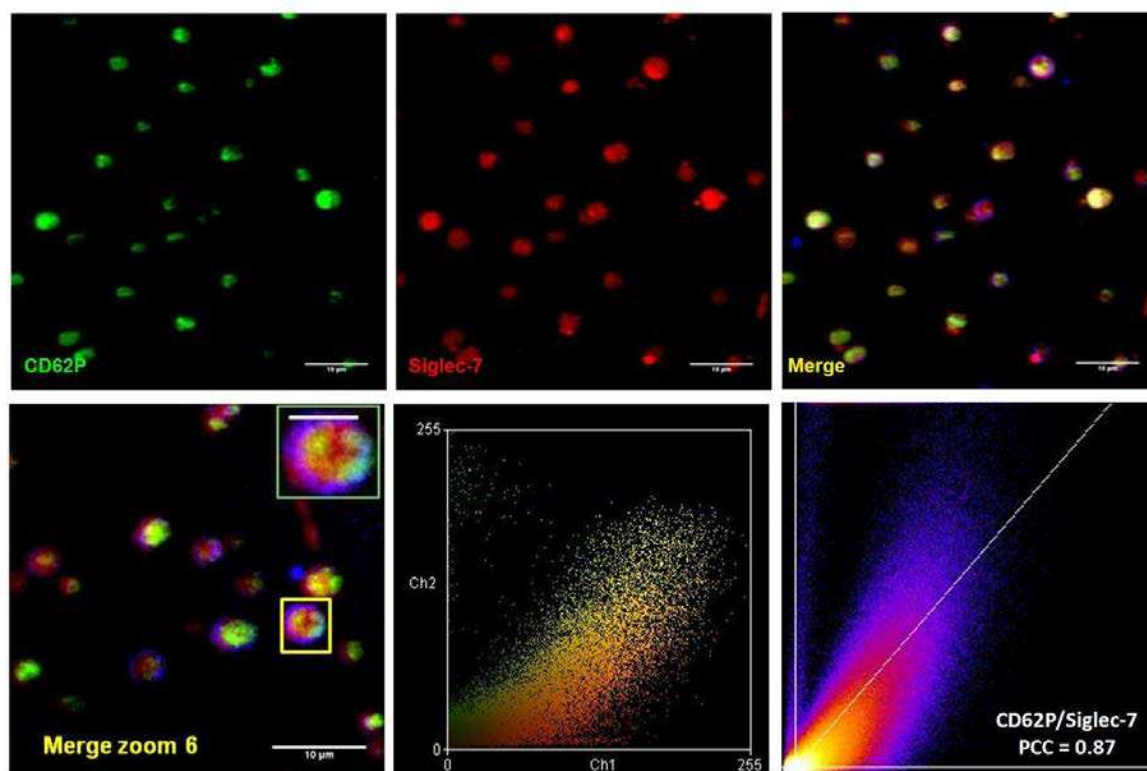
**B****C**

Figure 3

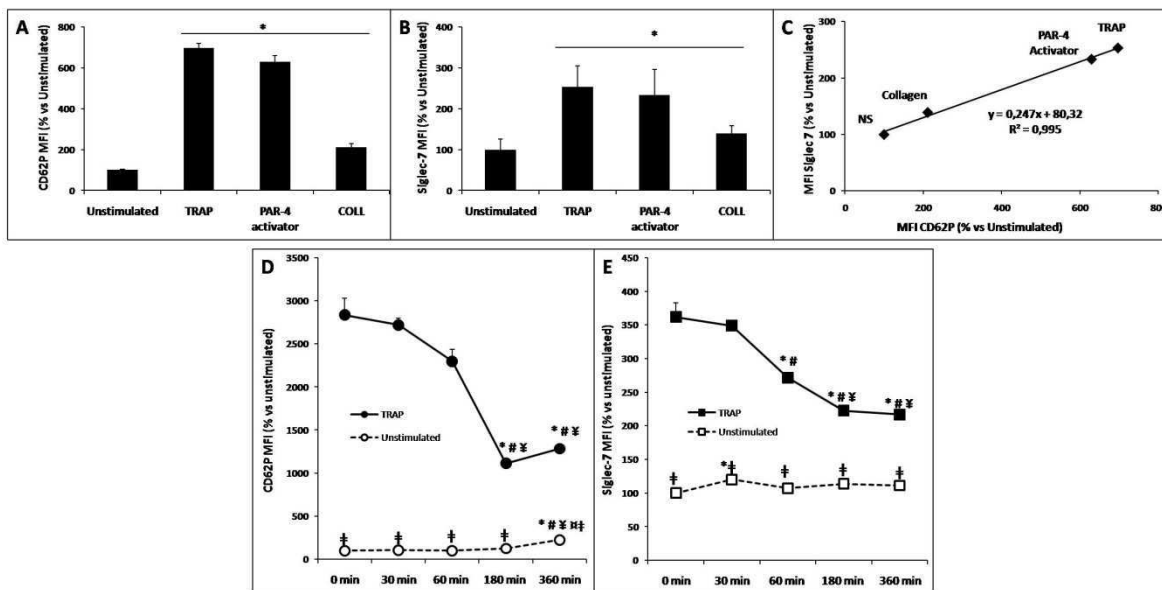


Figure 4

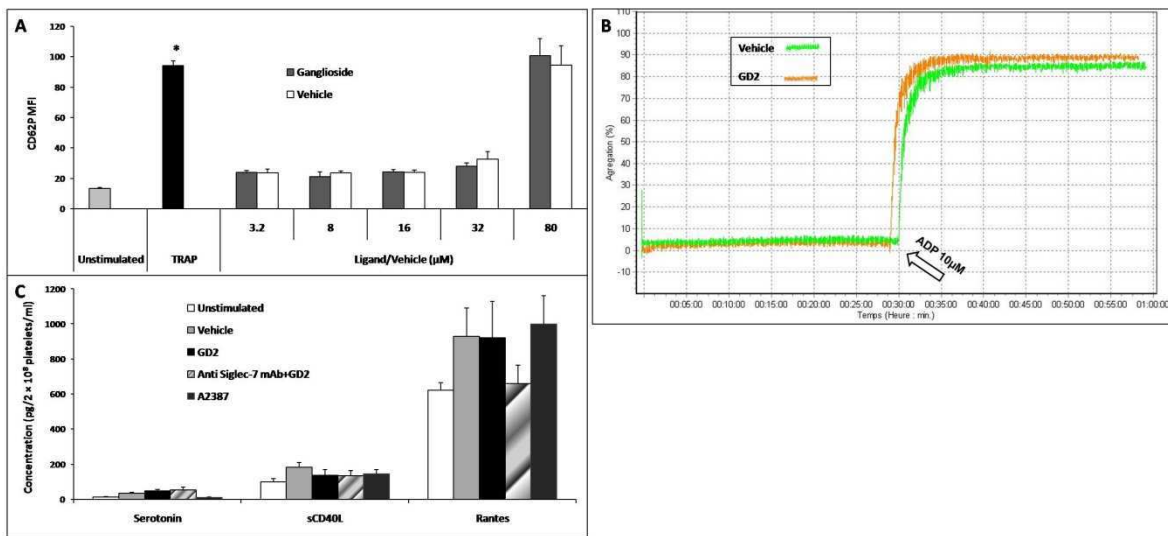




Figure 5

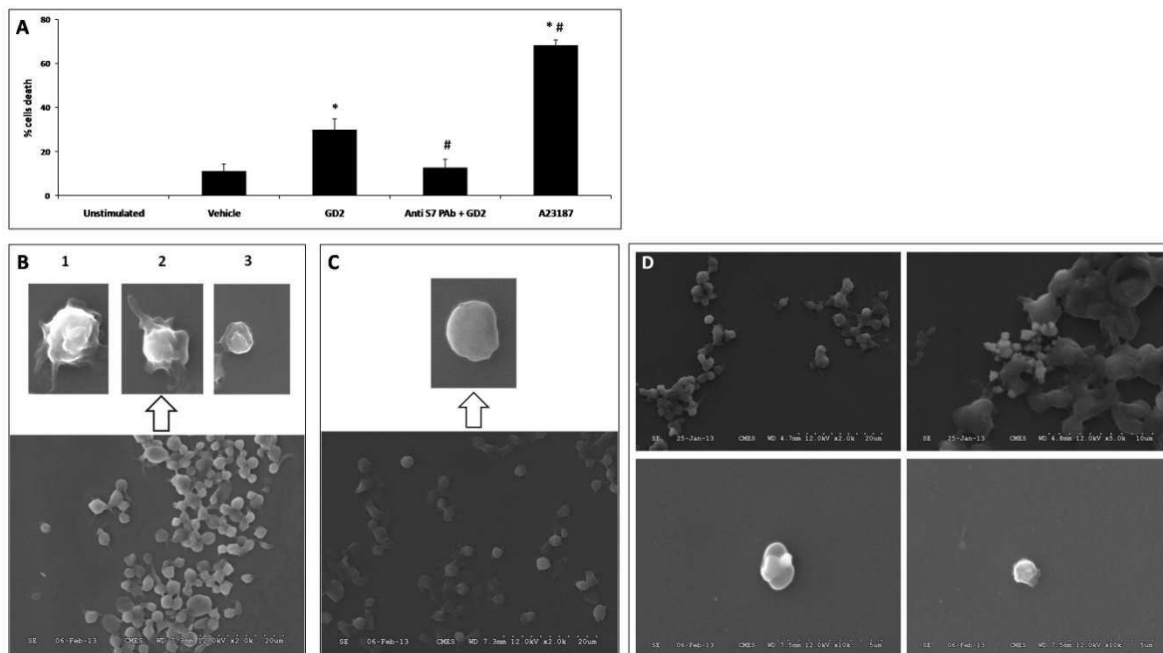


Figure 6

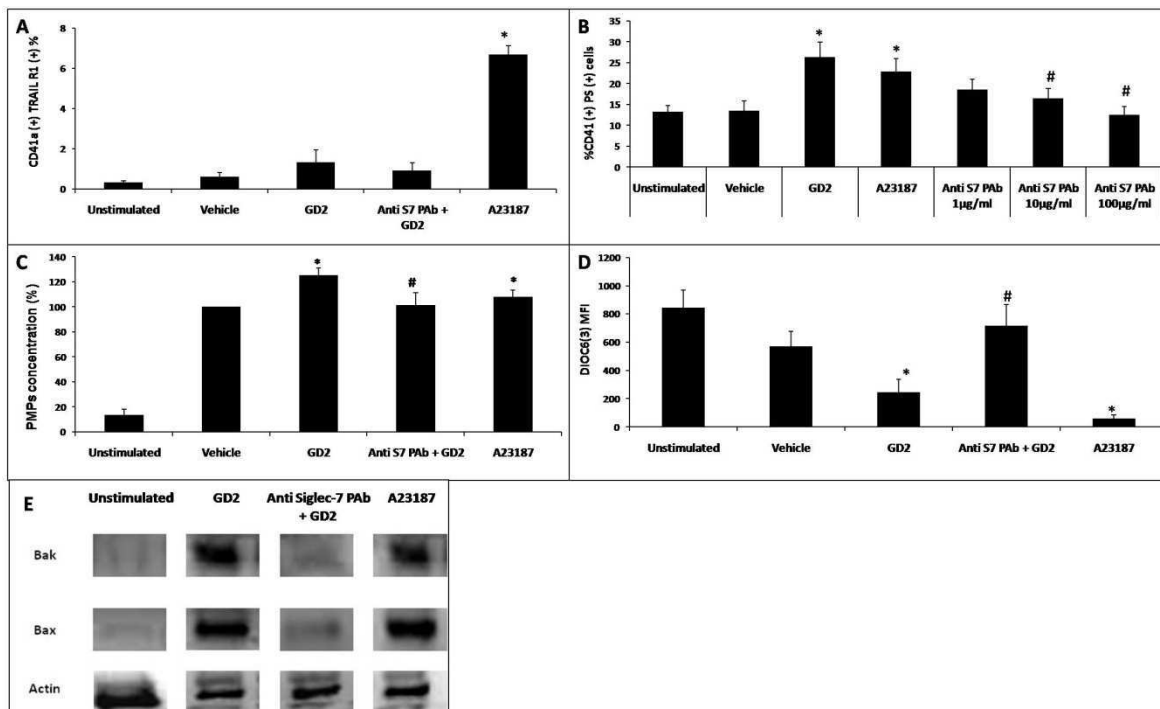


Figure 7

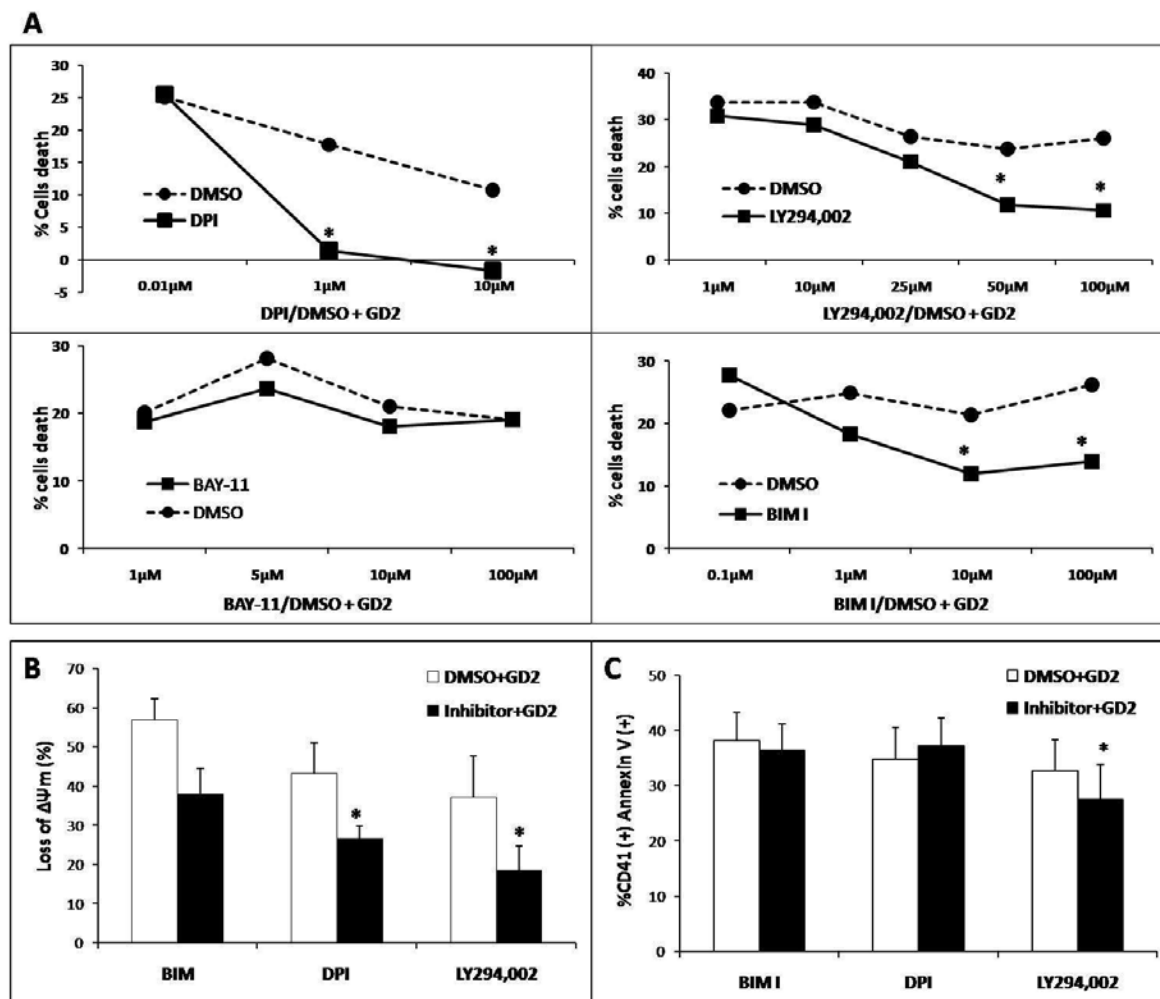
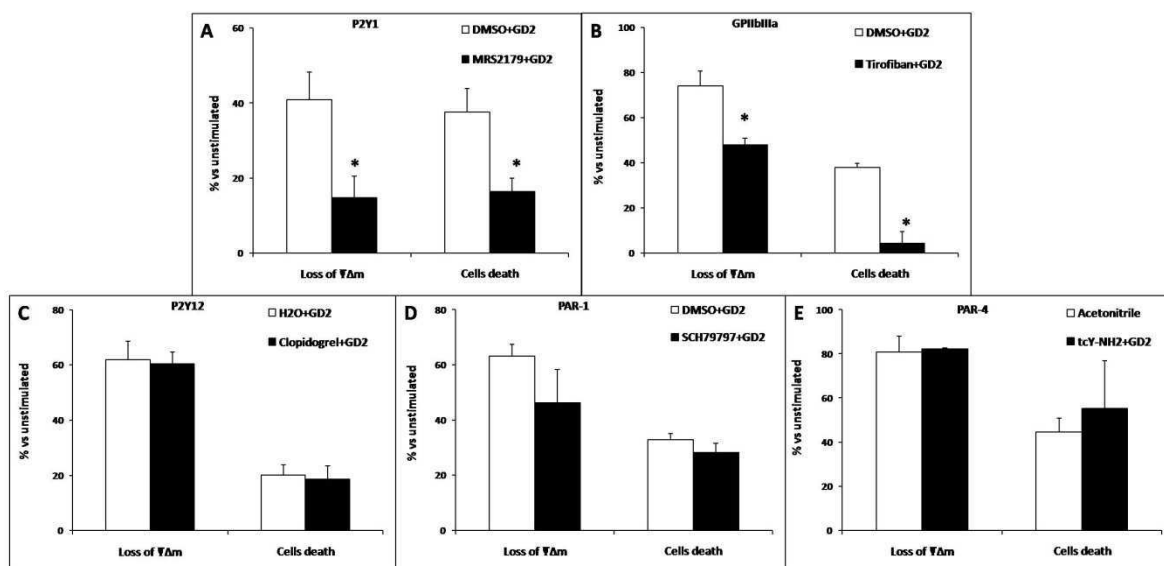


Figure 8



## Supplemental figures

Table S1

Name	Clone	Format	Isotype	Brand
<b>CD41a</b>	<b>HIP8</b>	<b>FITC</b>	<b>Ms IgG<sub>1</sub>, κ</b>	<b>BD Sciences</b>
CD62P	AK-4	APC/PE	Ms IgG <sub>1</sub> , κ	BD Sciences
<b>CD63</b>	<b>H5C6</b>	<b>PE</b>	<b>Ms IgG<sub>1</sub>, κ</b>	<b>BD Sciences</b>
CD40L	TRAP1	APC	Ms IgG <sub>1</sub> , κ	BD Sciences
<b>Siglec-7</b>	<b>194212</b>	<b>Alexa Fluor 488</b>	<b>IgG2B</b>	<b>RD system</b>
Siglec-9	191240	PE	IgG2A	RD system
<b>Siglec-5/14</b>	<b>194128</b>	<b>PE</b>	<b>IgG1</b>	<b>RD system</b>
Siglec-10	PAb	PE	IgG	RD system
<b>Siglec-11</b>	<b>PAb</b>	<b>PE</b>	<b>IgG</b>	<b>RD system</b>
TRAIL R1	69036	PE	IgG1	RD system
<b>Annexin V</b>		<b>APC</b>		<b>Mabtag</b>
<b>Isotype control</b>	MOPC-21	FITC/PE/APC/Alexa Fluor 488	Ms IgG <sub>1</sub> , κ	BD Sciences

Figure S2

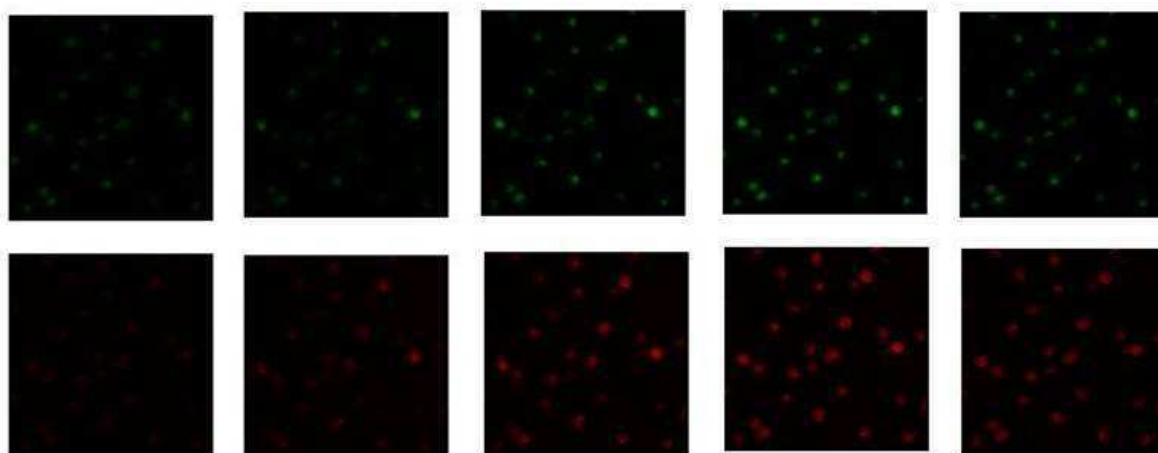


Figure S3

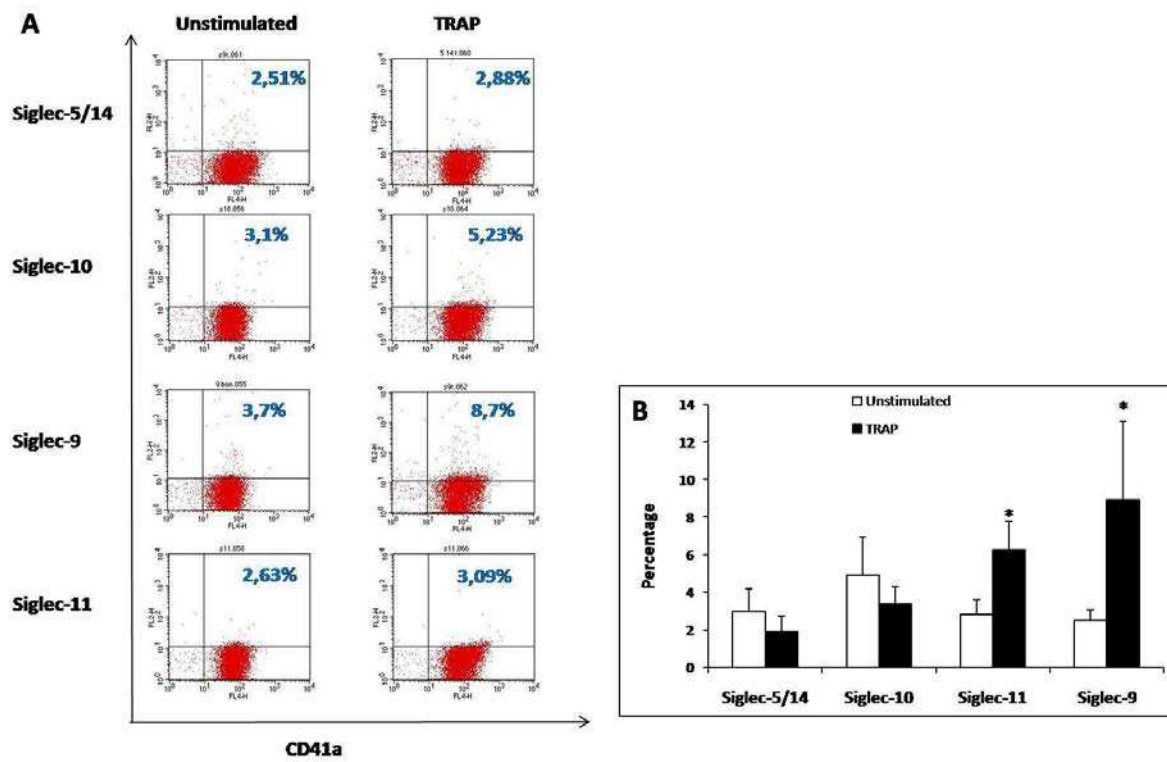


Figure S4

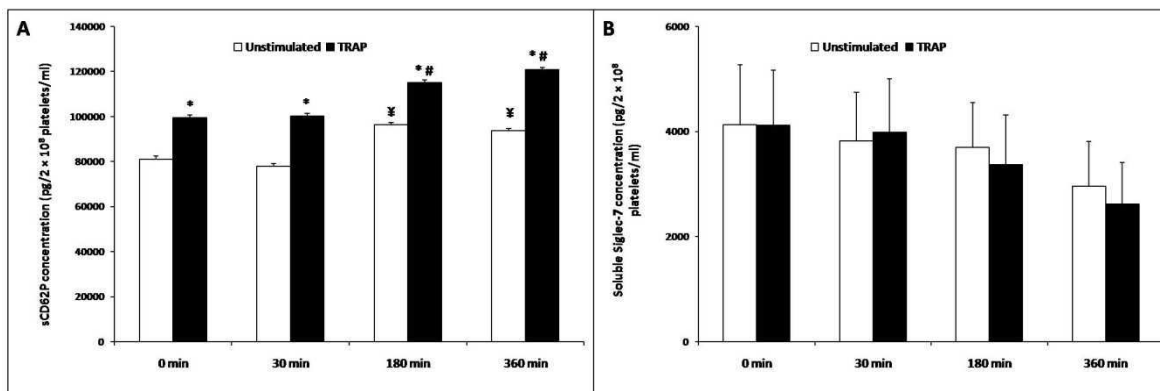




Figure S5

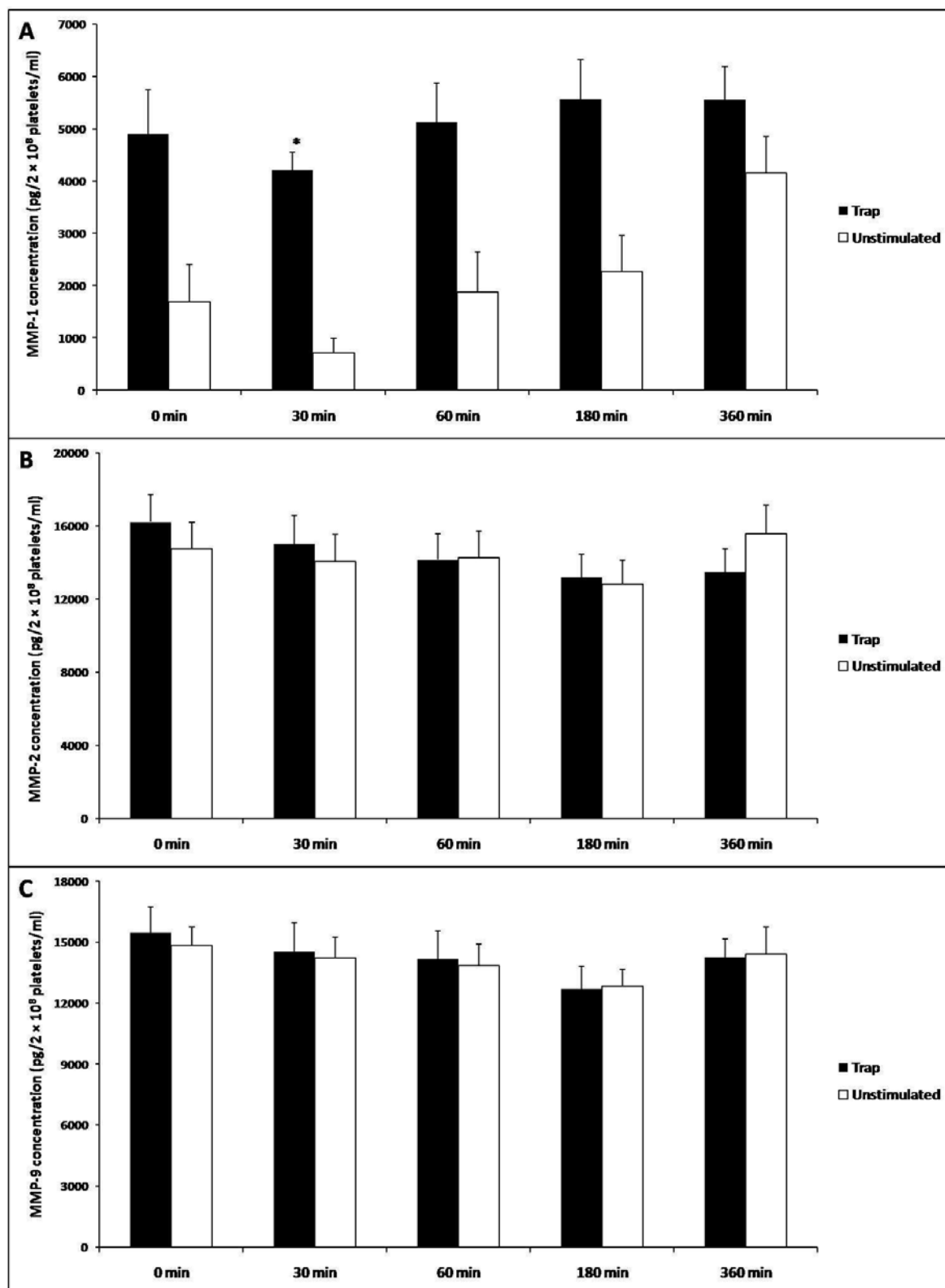
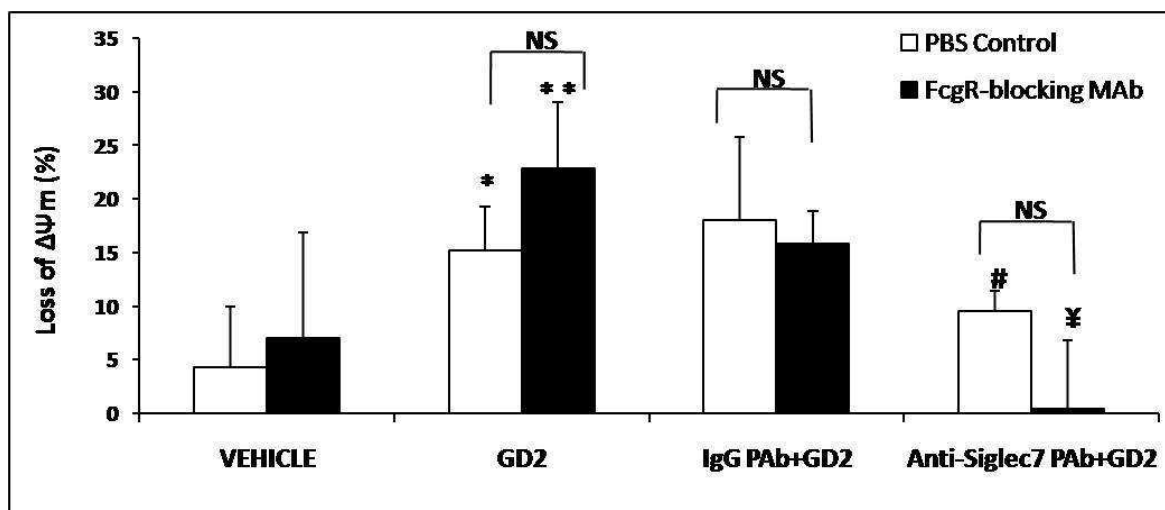


Figure S6



## **Discussion et perspectives**

Les plaquettes sanguines sont connues depuis longtemps pour leur rôle crucial dans le maintien de l'hémostase notamment l'hémostase primaire et au cours des processus de réparation vasculaire [261]. Au cours de cette dernière décennie, on note un engouement de la communauté scientifique concernant le rôle inflammatoire des plaquettes sanguines. Actuellement, de nombreux travaux montrent que ces petites cellules anucléées sont à considérer comme des cellules immunitaires jouant un rôle majeur dans le « continuum immunitaire » [43].

Des travaux récents, dont les nôtres, ont montré que les plaquettes expriment des TLR et qu'elles possèdent les molécules nécessaires pour la transduction des signaux afin d'assurer les rôles fonctionnels de ces récepteurs [262]–[264]. Ces récepteurs permettent aux plaquettes de reconnaître, notamment, les PAMP [74], [75], [102] ainsi que les DAMP [245] et de déclencher ou participer à une réponse inflammatoire [83]. De plus, il a été suggéré un mécanisme de reconnaissance des molécules endogènes (les SAMP) par les récepteurs intrinsèques de type inhibiteur dont les Siglec qui reconnaissent les ligands sialylés du soi et délivrent des signaux d'inhibition aux cellules immunitaires [104], [105], afin de réguler les réponses et réduire la réactivité des cellules.

Parmi 14 Siglec identifiés chez l'humain - dont 4 sont apparentés au CD22 et 10 au CD33 - nous avons mis en évidence une expression importante du Siglec-7 – un Siglec apparenté au CD33, sur la membrane des plaquettes notamment dans le compartiment intraplaquettaire. Au cours de nos travaux, le marquage par des anticorps spécifiques a confirmé la localisation du Siglec-7 dans les granules  $\alpha$  plaquettaires. Nous avons noté également que l'expression membranaire de cette molécule est augmentée significativement après l'activation des plaquettes et de façon corrélée avec leur niveau activé, au regard de l'expression du CD62P membranaire. En effet, la cinétique d'expression sur la membrane plaquettaire du Siglec-7 au cours du temps est très similaire à celle du CD62P. Ces résultats suggèrent que l'expression membranaire du Siglec-7 est probablement un marqueur d'activation des plaquettes.

Nous avons également détecté une quantité importante du Siglec-7 dans les surnageants des plaquettes non stimulées ainsi qu'après la stimulation par TRAP, suggérant l'existence d'un clivage de cette molécule depuis la surface membranaire ou

d'un relargage direct depuis les granules  $\alpha$  plaquettaires. Cependant, le clivage du Siglec-7 ne semble pas corrélé avec la diminution de l'expression de cette molécule sur la membrane plaquettaire, comme c'est le cas pour le CD62p. Par ailleurs, contrairement avec la sécrétion du CD62P, qui est plus importante dans les plaquettes stimulées avec du TRAP vs les plaquettes non stimulées, nous n'avons observé aucune différence significative de la quantité du Siglec-7 sécrétée dans ces deux cas. Mais cette concentration qui semble diminuée au cours du temps, peut être expliquée probablement par la dégradation induite par les protéases endogènes.

L'engagement de ce récepteur par son ligand spécifique, le ganglioside GD2 (ainsi que le GD3 et le GT1b) n'induit pas d'activation, ni d'agrégation ni la sécrétion plaquettaire, mais conduit à l'apoptose plaquettaire par la voie intrinsèque et extra-mitochondriale. Ce résultat dans notre étude semble compatible avec celle de Martini et al, qui ont aussi montré que l'incubation des plaquettes avec le GD3 exogène n'a pas d'effet sur le changement morphologique, ni la fonction plaquettaire ainsi que l'agrégation de ces cellules induite par l'ADP [265]. Les auteurs ont également indiqué que le GD3 fonctionne comme une molécule de second messenger qui augmente l'expression du CD32 (Fc $\gamma$ RII, l'isoforme du FcR plaquettaire), ensuite il s'associe avec ce récepteur et conduisant à l'adhésion plaquettaire sur la matrice sous-endothéliale [265]. Cependant, dans notre étude, les effets apoptogéniques du GD2 sur les plaquettes sont indépendants avec l'engagement du CD32 alors que ces effets sont réduits en présence de l'anticorps bloquant spécifique du Siglec-7. Ces résultats ont montré que l'engagement du Siglec-7 est indispensable pour l'apoptose plaquettaire induite par le GD2. La présence des inhibiteurs du NAPDH oxydase, du PI3k ou de la PKC peut prévenir cet effet. Cependant un inhibiteur du NF- $\kappa$ B n'a eu aucun impact sur ce processus. Nous avons observé également que l'engagement du récepteur plaquettaire P2Y1 et de l'intégrine GPIIb/IIIa est requis pour une fonction complète du Siglec-7. Ainsi, en plus des fonctions plaquettaires assurées par les TLR, l'expression fonctionnelle du Siglec-7 suggère un rôle complexe des plaquettes dans l'immunité grâce à leur capacité d'élaborer et d'autoréguler la réponse inflammatoire après contact avec un ligand endogène ou exogène.

Le Siglec-7 dont l'expression importante est trouvée sur la majorité des cellules NK et une sous-population des cellules T-CD8<sup>+</sup>, est classé dans un groupe des récepteurs inhibiteurs des fonctions cytolytique et cytotoxique de ces cellules. [122], [167]. L'apoptose cellulaire est un processus qui est strictement contrôlé, par lequel les cellules sont physiologiquement éliminées par les phagocytes, mécanisme permettant d'éviter une sur-activation de système immunitaire [174]. Effectivement, la cellule apoptotique est bien altérée par les caspases, son cytoplasme et son noyau (pour les cellules nucléées) sont condensés. Mis à part des fragmentations en microparticules, le reste de la cellule, sans rupture de la membrane plasmique, est emballée dans le corps apoptotique ; ces corps ainsi que les microparticules sont reconnus et phagocytés par les phagocytes [174]. L'apoptose plaquettaire induite par l'engagement du Siglec-7 est probablement un mécanisme de régulation négative des réponses inflammatoires plaquettaires. Ce mécanisme permettrait de limiter les réactions excessives responsables de la destruction des tissus ou des cellules lors de l'inflammation et ainsi de favoriser la cicatrisation des plaies. Au cours du stockage, bien que les plaquettes soient stockées dans les conditions conventionnelles optimales en termes de température, d'échanges gazeux et d'absence de stimulations (exogène tel que des pathogènes entiers ou des fragments de pathogène), leurs marqueurs d'apoptose surviennent et augmentent de façon indépendante de l'activation plaquettaire [177], [180], [182]. Ce phénomène fait partie des lésions de stockage important qui réduit la viabilité et le nombre des plaquettes dans les PC après une conservation prolongée. Potentiellement, l'apoptose plaquettaire pourrait avoir des impacts négatifs pour les receveurs lors de la transfusion comme la diminution de la fonction des plaquettes transfusées et du CCI (Corrected Count Increment) [177] et probablement des réactions indésirables dues aux propriétés pro-inflammatoire et pro-thrombotique des PMP générés au cours de l'apoptose [208]. Notre étude a mis en évidence un des mécanismes d'apoptose plaquettaires et suggéré un moyen pour réduire le taux des plaquettes apoptotiques, permettant probablement le développement de nouvelles stratégies pour améliorer la viabilité et la fonction des plaquettes pendant le stockage.

Cependant, une limite expérimentale de notre étude est que nous avons obtenu ces résultats dans un modèle *in vitro*. Cependant, sur 9 Siglec identifiés chez les souris (4

Siglec apparentés au CD22 et 5 Siglec apparentés au CD33), la structure, l'expression et les fonctions de ces récepteurs sont très différentes par rapport avec ceux caractérisés chez humain [118]. Ainsi les modèles Siglec murins, apportant de nombreuses informations quand la fonctionnalité de ces récepteurs, semble très peu comparable avec le modèle humain notamment pour les études des maladies inflammatoires humaines [266].

En prolongement de cette étude, nous pourrions envisager d'étudier le mécanisme de translocation de cette molécule sur la membrane plaquettaire humaine ainsi que de son clivage en forme soluble dans le surnageant. D'une part, il sera intéressant de savoir si cette augmentation est un événement précoce pour déclencher l'activation plaquettaire ou elle est secondaire après l'activation plaquettaire pour contrôler négativement la réponse inflammatoire suite à ce processus (autorégulation). D'autre part il sera important aussi d'étudier si le clivage du Siglec-7 soluble est associé avec cette translocation. Finalement, le rôle du Siglec-7 soluble est encore très peu étudié dans les réactions inflammatoires notamment au niveau des cellules immunitaires, EC et plaquettaires, ou les perspectives importantes dans la compréhension de la physiologie et des interactions plaquettaire du système immunitaire.

Aussi l'engagement du Siglec-7 – exprimé sur les plaquettes – pourrait être le facteur initial de l'induction des mécanismes cruciaux d'apoptose plaquettaire au cours du stockage. Dès lors, replacer nos travaux dans une perspective transfusionnelle permettrait d'envisager une étude permettant d'augmenter la viabilité ou prolonger la durée de vie des plaquettes (en limitant les phénomènes d'apoptose) en utilisant les anticorps bloquants spécifiques de ce récepteur qui ne pourrait plus être engagé en présence des DAMP et SAMP, sous réserve d'une absence de toxicité, chez le receveur, des agents bloquant la fonction du Siglec-7. De façon similaire, dans certains cas de thrombocytopenies immunes associées à une apoptose massive des plaquettes, il sera intéressant de savoir si ce phénomène est lié à une surexpression du Siglec-7 plaquettaire, ce qui permettra d'ouvrir de possibles nouvelles voies thérapeutiques et d'améliorer le pronostic.

Par ailleurs, il serait intéressant aussi de déterminer par la suite, si l'engagement du Siglec-7 est aussi spécifiquement lié à la reconnaissance par les plaquettes des DAMP. Autrement dit, nous pourrions étudier si le Siglec-7 plaquettaire est capable de distinguer les PAMP (pathogènes infectieux) et les DAMP (générés soit lors de réactions inflammatoires induites par les PAMP soit aux stress oxydatifs intraplaquettaires liés à la condition de préparation et/ou stockage) et la modulation de leur réponse inflammatoire grâce cette distinction. Plusieurs travaux montrent que les plaquettes, en exprimant un très grand nombre de récepteurs dont les TLR, les RCPG, les RTK, les intégrines et les récepteurs des CK/CH, semblent être capables de faire la différence d'une part entre un stimulus hémostatique et un stimulus infectieux et d'autre part entre les signaux de dangers endogènes (DAMP) et exogènes PAMP [43], [267]. Cette détection différentielles des pathogènes provoque des variations dans l'expression membranaire de molécules d'adhérence, d'activation et notamment dans le relargage du contenu des granules des plaquettes ainsi que leur cinétique de sécrétion, conduisant aux différentes réponses plaquettaires : de type hémostatique, inflammatoire ou réparatrice, de façon immédiate ou tardive [43], [73]–[75], [245]. En ce qui concerne les Siglec, dans un modèle *in vitro*, Chen *et al* ont montré que le Siglec-10 exprimé principalement sur les leucocytes, en association avec le CD24, est capable de distinguer les PAMP et les DAMP afin établir une régulation négative de la réponse inflammatoire ; ce résultat a été également confirmé par le Siglec-G, exprimé sur les cellules B1 – un homologue du Siglec-10 dans le modèle murin [149]. Une bonne compréhension sur la capacité de distinction des signaux de danger des plaquettes nous permettrait de mieux maîtriser voir contrôler le rôle inflammatoire de ces cellules.

Pour conclure, pour toutes les études de nouvelles molécules, il est nécessaire d'étudier les voies de signalisations qui sont responsables de leurs fonctions. Sur les cellules eucaryotes, la liaison des protéines de type SH2 (SHP1, SHP2) avec le motif ITIM/ITIM-like après leur phosphorylation joue un rôle central dans les fonctions inhibitrices des Siglec ayant les domaines ITIM/ITIM-like dont le Siglec-7 [118]. La protéine SOCS3 est capable de se lier avec l'ITIM du Siglec-7 en compétition avec le SHP1 et SHP2 grâce à un domaine similaire avec le SH2, conduisant à la dégradation et au blocage de la fonction de ce récepteur [145]. Par ailleurs, les protéines SHP1 et SHP2 sont



exprimées sur les plaquettes et représente des molécules indispensables dans la cascade de signalisation des RTK (mécanisme similaire avec les récepteurs Siglec) [37]. Récemment, l'expression du SOCS3 a été identifiée au niveau des plaquettes humaines [268]. La signalisation du Siglec-7 plaquettaire ressemble-t-elle à celle des cellules eucaryotes ? De plus, il serait intéressant d'étudier le signalosome plaquettaire du Siglec-7 en présence de différents stimuli : de type hémostatique comme présenté dans l'annexe, des agents infectieux (les PAMP) ou les DAMP. De nombreuses études, en ce sens, compléteraient la caractérisation du rôle fonctionnel des Siglec, dont le Siglec-7, plaquettaire.

Le rôle inflammatoire des plaquettes n'est pas seulement limité sur leur expression membranaire des récepteurs qui peuvent détecter les signaux de danger, mais aussi sur leur capacité de sécrétion d'un très grand nombre des facteurs solubles comme des CK/CH et des facteurs immunomodulateurs, qui sont capable de moduler les interactions plaquettaires avec les pathogènes et/ou avec les autres cellules immunitaires ou non, telles que les EC, et d'initier la régulation de la réponse inflammatoire [13], [14]. Parmi ces facteurs, le sCD40L dont 95% de la forme circulante est d'origine plaquettaire est considéré comme une molécule « chef d'orchestre » de l'inflammation permettant, notamment, de faire le lien entre l'immunité innée et adaptative [13], [53], [54].

De façon intéressante, toutes les études récentes concernant la sécrétion plaquettaire montrent que ces cellules ne libèrent pas la totalité de leur contenu en facteurs solubles lorsqu'elles sont activées. En effet, cette sécrétion est hautement programmée et variée en fonction de situation inflammatoire (par exemple le type de pathogènes infectieux [75]) et/ou de stimulation, et/ou leur intensité [26], [269] et/ou du temps en contact avec les agonistes [269]. Il en est de même, concernant l'activation plaquettaire, en réponse aux forces de cisaillement [270] ou les stress oxydatifs [246] auxquels elles sont soumises. Par ailleurs les plaquettes expriment un nombre important des récepteurs liés au phénomène d'hémostase (comme les intégrines GPIIb/IIIa, GPIb-IX-V et GPVI) et immunitaire (comme les PRR, les récepteurs des CK/CH) pour reconnaître spécifiquement ces signaux, caractérisés de signaux de danger. Ces récepteurs plaquettaires sont contrôlés par des voies de signalisation intraplaquettaire complexe au même titre que les cellules nucléées (Figure 6).

Nous supposons que l'engagement de chaque voie de signalisation, au regard de l'engagement d'un récepteur des signaux de danger ou à l'homéostasie sera lié à un profil de sécrétion plaquettaire respectif. Nous avons étudié (article en cours de rédaction, présenté dans la première partie de des annexes), le lien entre les activateurs, les voies de signalisation intraplaquettaire et les facteurs solubles plaquettaires libérés. Les résultats que nous avons obtenus ont montré que la sécrétion plaquettaire est réalisée en programme qui dépend de la stimulation. De plus, ce programme semble être spécifique pour chaque stimulus et régulé par les voies de signalisation intraplaquettaires elles-mêmes. La propriété des stimuli, l'existence des sous-populations plaquettaires et l'épissage d'ARN pré-messager préexistant dans les plaquettes lors de la stimulation sont des mécanismes possibles de la régulation de sécrétion plaquettaire (voir l'annexe).

Dans un contexte transfusionnel, au cours des processus de préparation et du stockage des PC, les plaquettes sont soumises à de multiples stimulations ou stress comme les processus de préparation variables et les différents PAS utilisés. Ces phénomènes peuvent conduire aux différentes propriétés inflammatoires des produits en termes d'expression de récepteur et de sécrétion des facteurs pro-inflammatoires plaquettaires.

Nous avons étudié l'expression membranaire et la concentration du CD62P et du CD40L dans le surnageant des mélanges de concentrés plaquettaires (MCP) préparés avec une technique manuelle ou automatisée (système TACSI) dans le PAS-III et PAS-IIIM [271]. Ces quatre types de produits semblent conformes aux normes concernant les paramètres *in vitro*. Cependant, l'expression membranaire des molécules et la concentration des facteurs solubles étudiés dans chaque MCP étaient significativement différentes. Ces résultats suggèrent que la réponse plaquettaire est différentielle en fonction des processus de préparation. Cependant, ces produits semblent exploitables en pratique transfusionnelle, au regard des paramètres *in vitro* étudiés, car quel que soit la variabilité des profils de sécrétion plaquettaire, la quantité des facteurs pro-inflammatoires (comme le sCD40L) détectée est bien inférieure comparée avec le seuil estimé, dans les CP ayant induit des EIR (Nguyen *et al* soumis) ou la concentration détectée expérimentalement dans d'autres études *in vitro*, dans le cadre d'EIR [55], [247]. L'évaluation de l'impact des facteurs pouvant stimuler les plaquettes pendant leur préparation et leur conservation

permettra de réduire la propriété pro-inflammatoire de ces produits et participer à l'améliorer la sécurité transfusionnelle.

Toujours dans le contexte transfusionnel, certains profils de sécrétion plaquettaire peuvent être responsables pour partie, de certaines réactions inflammatoires du receveur, tel que les EIR, observés lors d'une transfusion en plaquettes. Cette hypothèse fut l'objet de mon second travail de thèse investigué au laboratoire.

Notre étude « cas – témoins » concerne le rôle inflammatoire plaquettaire dans le cadre d'EIR reliés à une transfusion plaquettaire d'imputabilité de 2 à 4. Parmi les 3 étiologies possibles des EIR encore appelés la triade de la transfusion : le donneur – le produit et le receveur, nous nous sommes concentrés uniquement sur le rôle des produits plaquettaires. Ici, pour réduire la variabilité des paramètres de l'étude nous n'avons inclus dans notre étude que les CPA, issus donc d'un seul donneur de plaquettes qui représentent environ 50% de produits plaquettaires transfusés [272]. Les CPA inclus dans notre étude sont conformes aux normes de transfusion [273] et transfusés aux patients. Pour les cas d'EIR (n=65), les receveurs ont présenté au moins une des réactions suivantes : la réaction fébrile non hémolytique (FNHTR), l'allergie atypique (AATR) ou les troubles hémodynamiques (HT). Les contrôles (n=59) sont comparables aux cas d'EIR en termes de la compatibilité du groupe ABO, le processus de préparation et l'âge des plaquettes. Nous avons exclu les possibles EIR d'origine infectieuse et d'allo-immunisation pour focaliser nos travaux sur la composante inflammatoire liée aux facteurs solubles présents dans les surnageants plaquettaires. Nous avons donc dosé 17 facteurs : CD62P, RANTES, Gro- $\alpha$ , sCD40L, 6-Ckine (CCL21), CXCL9 (MIG), IL-13, IL-15, IL-23, IL-33, MIP-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MDC, CCL19 (MIP-3 $\beta$ ), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), BCA-1 et TSLP. Ces facteurs représentent des CK/CH et certains facteurs immunomodulateurs connus dans les réactions inflammatoires, tel que le RANTES, le CCL20 et CD40L soluble.

Nous avons constaté que dans certains cas, les EIR peuvent survenir avec des CPA dès 1 jour de stockage, même si cela représente un faible pourcentage des cas de notre étude (3%). Ceci suggère qu'une possible différence de molécules solubles caractérisant une composante plaquettaire inflammatoire est probablement générée pendant le processus de préparation (cette composante est hypothétiquement dépendante du profil

généétique et de l'utilisation médicamenteuse du donneur que nous n'avons pas étudié ici). Cependant, le taux d'EIR augmente significativement au cours de temps de stockage des plaquettes, ce qui est compatible, au cours du stockage, avec l'augmentation de la concentration de certains facteurs solubles pro-inflammatoires dans les CPA comme le sCD40L, le RANTES, le Gro- $\alpha$  et le sCD62P.

Au cours des processus de préparation des PC non déleucocytés, ces facteurs sont de trois origines : soit ils sont dérivés des leucocytes résiduels, soit ce sont des facteurs plasmatiques ou des facteurs plaquettaires. La déleucocytation permet de réduire nettement la concentration de la plupart de facteurs solubles (comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-8) dans les PC [274] et réduire donc significativement l'incidence d'EIR liés à la composante inflammatoire des PC. Cependant les plaquettes sont aussi capables de sécréter des CK/CH et cette sécrétion augmente au cours du stockage des PC ce qui explique l'augmentation significative de la concentration de ces facteurs, notamment le sCD40L, des PC après 3 jours de stockage et l'augmentation du pourcentage des EIR au cours du stockage. Les résultats que nous avons obtenus sont similaires avec ceux d'autres études de différents pays [55], [275].

Cependant, dans notre étude (Nguyen KA *et al* soumis), nous n'avons noté aucun lien entre l'incidence de l'EIR et les paramètres observés chez les donneurs comme le sexe, l'âge qui renforce donc le rôle inflammatoire des produits eux-mêmes dans la survenue des EIR.

En effet, nous avons observé une augmentation de la concentration de plusieurs CK/CH dans les CPA ayant induit un EIR par rapport au contrôle comme le sCD40L, le RANTES, le sCD62P, le Gro- $\alpha$ , le MIP-1 $\alpha$ , le CXCL9 (MIG), le 6-Ckine, le MDC, le CCL19 (MIP-3 $\beta$ ) et le IFN- $\gamma$ . En particulier, les facteurs comme l'IL-13, l'IL-15, l'IL-23 et l'IL-33 n'ont été détectés uniquement que dans les CPA ayant induit des EIR. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence le rôle de ces CK/CH dans la survenue des EIR, en plus des CH/CH montrés précédemment au laboratoire comme l'IL-27 et l'Ox40L [276].

La plupart de ces facteurs ont une origine plaquettaire. Effectivement, les plaquettes contiennent un millier de molécules dans leurs granules notamment les granules  $\alpha$  [14]. La sécrétion plaquettaire, comme présentée dans les paragraphes

précédents, est réalisée en programme et est finement régulée notamment par des signaux de transduction intraplaquettaire. Au cours de la conservation des PC, ce programme de sécrétion pourrait être dépendant des stimuli endogènes comme les DAMP (structures moléculaires produites par des cellules stressées ou en nécrosées) [267] ainsi que les lésions de stockages [246]. En effet, les plaquettes reconnaissent ces signaux initiaux par leurs récepteurs de type PRR tel que les TLR et libèrent les facteurs solubles de façon différentielle en fonction de l'engagement de ces récepteurs [75]. Dès lors, les produits sécrétés, à leur tour, sont aussi des stimuli pour les plaquettes en favorisant la sécrétion plaquettaire, c'est le cas notamment du sCD40L.

Nous avons également montré que la composante inflammatoire des plaquettes dans les EIR est multifactorielle. Effectivement, il y a une corrélation significative des facteurs solubles sécrétés dans les surnageants des CPA ayant induit des EIR. Ainsi, l'analyse du coefficient de corrélation de Pearson (PCC), par exemple du sCD40L (localisé dans les granules  $\alpha$  plaquettaires) a montré que cette molécule est significativement associée avec le MIP-1 $\alpha$  (PCC =0,56), l'IL-13 (PCC=0,472), l'IFN- $\gamma$  (PCC=0,461), l'IL-15 (PCC=0,545), le MDC (PCC=0,336) et le sCD62P (PCC=0,549). Cependant, nos travaux montre que ce n'est pas le cas concernant les facteurs solubles de type 6-Ckine, le CXCL9 (MIG), l'IL-23, l'IL-33, le CCL19 (MIP-3 $\beta$ ), le RANTES, le CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) et le BCA-1. A noter que certains de ces dernières CK/CH comme le CXCL9 (MIG) ou le RANTES soient aussi contenus dans les granules  $\alpha$ . Ces résultats montrent que la corrélation des facteurs solubles plaquettaires n'est pas due à leur localisation dans les plaquettes (en fonction des différents granules), autrement dit la libération de ces facteurs semble être strictement programmée.

L'originalité de notre travail est que nous avons pu calculer la valeur de prédiction de chacun de ces facteurs pour la survenue d'EIR et estimer une concentration seuil en utilisant l'AUC - l'aire sous la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic). À partir des concentrations de chaque facteur soluble dans les CPA contrôle ou ayant induit des EIR, la courbe ROC nous permet de savoir le taux de vrais positifs (la sensibilité) en fonction du taux de faux positifs (1-Spécificité du test) lorsque le seuil du test varie. L'AUC (compris entre 0-1) représente la probabilité qu'un CPA, ayant un marqueur dont la concentration

est plus élevée que le seuil, puisse induire des EIR. Le seuil est choisi pour avoir le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité.

Selon les résultats obtenus, le sCD40L a une valeur d'AUC plus élevée que les autres facteurs solubles dosés. Le CD40L plaquettaire permet donc de discriminer les CPA contrôle et ceux ayant induit des EIR. Effectivement, le sCD40L semble être impliqué dans plusieurs types d'EIR [55], [247], [249], [277]. Notre résultat confirme la propriété pro-inflammatoire des plaquettes ; qui au cours du stockage, sécrètent une quantité importante de sCD40L [55].

La limite des études *in vitro* est due notamment à l'évaluation individuelle du rôle de chaque facteur dans la réponse inflammatoire vs leur rôle combiné de l'ensemble des facteurs solubles. D'autre part, bien que le nombre de facteurs dosés, dans notre étude, soit très important, cette liste n'est pas exhaustive. Nous avons voulu donc construire un modèle d'étude fiable de la prédiction de la survenue des EIR, qui serait capable de prendre en compte tous les dosages des facteurs solubles que nous avons testés dans notre étude. Le modèle mathématique associé à une technique d' « arbre de décision » nous a permis d'identifier 2 facteurs discriminants des CPA ayant induit des EIR ou non : le sCD40L et l'IL-13 dont le taux de réussite, dans notre modèle mathématique, est important. Ce résultat confirme les résultats obtenus dans le calcul de l'AUC, pour lequel, le seuil pathologique de sCD40L détecté est de 289,5 pg/10<sup>9</sup> plaquettes (la sensibilité = 89,2%, la spécificité = 98,3% et le taux de réussite = 78% - ces résultats étant probablement dépendants de la technique de dosage utilisée). Cette quantité est plus faible par rapport au seuil du sCD40L recombinant suffisant pour activer les PMNC dans le développement du TRALI *in vitro* comme dans l'étude de Khan *et al* qui utilisent le sCD40L à 10ng/ml [55]. Cela suggère que l'effet de sCD40L *in vivo* est beaucoup plus important en comparaison avec son effet *in vitro*. L'effet important du sCD40L *in vivo* est probablement expliqué par i), sa multi-interaction avec les cellules exprimant son récepteur - le CD40 (comme les neutrophiles, les lymphocytes et les DC, conduisant à l'initialisation de la réponse inflammatoire de ces cellules ainsi qu'à la sécrétion des CK/CH pro-inflammatoire comme l'IFN- $\gamma$ , le CCL2, l'IL-6 et l'IL-8 [53], [54] (voir partie A.III.2.2) ; ii), son effet synergique avec d'autres facteurs. Effectivement, dans cette étude, comme présentée ci-dessus, nous avons noté une corrélation significative entre sCD40L et le MIP-1 $\alpha$ , l'IL-13,

l'IFN- $\gamma$ , l'IL-15, le MDC et le sCD62P. Ce résultat confirme la propriété multifactorielle de la composante inflammatoire plaquettaire dans le cas d'EIR.

En plus du sCD40L, nous avons également mis en évidence dans notre modèle prédictif des EIR, l'importance de l'IL-13. Cette cytokine est intéressante, car elle est, dans notre étude, absente dans les PC n'ayant pas induit d'EIR, quel que soit le jour de délivrance. Contrairement au sCD40L qui apparaît avec une quantité importante dans les CP ayant induit des EIR mais qui existe en quantité plus faible, dans le PC contrôle. De plus nous avons montré que, la valeur de prédiction des EIR au regard de l'IL-13 est plus élevée par rapport au modèle relatif au sCD40L.

De façon intéressante, le MIP-1 $\alpha$  est présent dans ces deux modèles et ce facteur semble capable de distinguer le type d'EIR. Aussi, concernant les CPA ayant induit des EIR, si la concentration de ce facteur est supérieure de 20,4 pg/10<sup>9</sup> plaquettes, l'EIR semble être de type FNHTR et à l'inverse pour les allergies. Ce résultat suggère que le MIP-1 $\alpha$  semble jouer un rôle important dans les FNHTR. À ce jour, comme le RANTES, le MIP-1 $\alpha$  est présent et potentiellement relargué à partir des granules  $\alpha$  plaquettaire et semble associé avec les réactions allergiques [275]. Car outre leurs activités chimiotactiques sur les éosinophiles et des basophiles, le MIP-1 $\alpha$  et le RANTES sont capables d'induire la libération des médiateurs inflammatoires comme l'histamine, l'IgE et le C5a en tant qu'agoniste direct de ces cellules. Aussi, nos travaux permettent d'ouvrir un nouveau champ d'étude des mécanismes d'action du MIP-1 $\alpha$  dans l'étude des pathologies et/ou syndrome caractéristique des EIR lors de la transfusion plaquettaire.

Notre étude complète d'autres travaux [55], [247], [249], [274] qui associent les EIR avec une composante inflammatoire des produits transfusés (les CK/CH et BRM). Ainsi, en plus des caractéristiques des donneurs et du receveur, les EIR semblent également être dépendants du produit (processus de préparation, durée de stockage, DMU utilisé). Cependant, le taux de survenu de ces réactions est très faible (environ 0.09% de PC transfusés [272]), aussi la transfusion reste malgré tout, une thérapeutique très sécurisée.

En perspective de ces travaux et bien que les modèles mathématiques obtenus dans notre étude soient très puissants statistiquement, il sera nécessaire de les confirmer dans une étude dont l'effectif est plus important (sur une population randomisée,

représentative et multicentrique si possible) et de type cohorte prospective pour réduire les biais de l'étude cas-témoin notamment le biais de sélection. Par ailleurs, il serait aussi important d'élargir la liste des facteurs solubles plaquettaire associés avec la survenue d'EIR. Ces travaux pourraient permettre de mettre en place, en routine (en mesurant bien toute les difficultés de mettre en place un tel test), le dosage d'un (des) bio-marqueur(s) de prédiction pour éliminer les produits à fort risque d'induction d'EIR. En parallèle, ces travaux permettront également d'optimiser les processus de préparation et de conservation des plaquettes afin de réduire la sécrétion, d'un (des) bio-marqueur(s) de prédiction, dans les PC. Outre la sécrétion des facteurs solubles, le rôle inflammatoire des plaquettes est également assuré par l'expression d'un grand nombre des récepteurs notamment ceux de l'immunité innée qui caractérise les plaquettes comme une cellule immunitaire complexe, étant capable de reconnaître les signaux de dangers et de participer à l'activation ainsi qu'à la régulation de la réponse inflammatoire.

Suite aux travaux de cette thèse, nous proposons de faire une étude complète afin d'identifier les signaux de dangers susceptibles de survenir pendant la préparation et le stockage des CP, qui sont capables de modifier les fonctions plaquettaires notamment leur rôle inflammatoire (que ce soit les impacts des processus automatisés, les stress oxydatifs, les lésions de stockages, les agents infectieux (PAMP), les molécules libérées depuis les plaquettes elles-mêmes (DAMP) ou les stimuli provenant de l'environnement). Ensuite, il sera important d'étudier le lien entre ces signaux et l'engagement de leur récepteur plaquettaire respectif (de type hémostatique ou les PRR, les Siglec) pour identifier en fin la composante inflammatoire plaquettaire correspondante avec chaque stimulation. L'impact de ces composantes sur l'activation des cellules « reportrices » (modèle in vitro) ou du système d'immunité (modèle animal in vivo) est aussi nécessaire à étudier pour confirmer les résultats des études statistiques. Cette étude complexe nous permettra de trouver les points clés pour améliorer les processus de préparation et de stockage des CP en vue d'une transfusion ainsi que de trouver les bio-marqueurs qui peuvent refléter exactement la qualité des poches afin de réduire l'incidence d'EIR.



# Annexes

## **I) Article en cours de préparation**

### **Étude de la physiologie du rôle inflammatoire plaquettaire : Phénotype/Signalisation/Facteurs solubles.**

L'objectif de cette étude est d'étudier le profil de sécrétion plaquettaire après mobilisation du signalosome, au regard de l'engagement d'un récepteur des signaux de danger ou à l'homéostasie et le lien de ces trois éléments plaquettaires. Nos conditions expérimentales *in vitro* - plasmas riches en plaquettes (PRP) - se rapprochent de celles retrouvées dans la circulation sanguine. Les 7 stimuli choisis (le TRAP, l'activateur du PAR-4, l'ADP, le Collagène, le Fg, le sCD40L et le VAP-1) sont les ligands respectifs des récepteurs (PAR-1, PAR-4, récepteur P2Y, GPVI, CD40, Siglec-9) qui sont très impliqués dans les fonctions plaquettaires. Afin de comparer l'effet de ces ligands sur la sécrétion spécifique plaquettaire en lien avec les voies de signalisation intraplaquettaire, nous avons tout d'abord déterminé chaque concentration minimale capable d'induire une activation optimale des plaquettes en utilisant comme marqueurs d'activation plaquettaire, le CD62P membranaire et soluble. Notre étude concerne 8 conditions d'activation (les conditions « plaquettes stimulées » et une condition « plaquettes non stimulées ») chez 10 individus. Nous avons testé la concentration de 32 molécules intracellulaires impliquées dans la transduction des signaux détectés dans les lysats plaquettaires et 18 facteurs solubles, impliqués dans plusieurs processus inflammatoires, tous ces facteurs ont été dosés dans les surnageants plaquettaires. Tous les paramètres étudiés sont appariés pour les 10 individus, ce qui renforce la puissance statistique de l'étude.

Concernant les facteurs solubles, les résultats ont montré que certains sont fortement sécrétés après l'activation plaquettaire tels que l'IFN- $\gamma$ , le Gro  $\alpha$ , le RANTES, le sCD40L et le sCD62P, notamment après stimulations par TRAP (PAR-1), l'activateur de PAR-4 et le collagène (GPVI). Ces activateurs ont un profil de sécrétion assez similaire et distinct avec les autres activateurs de l'étude. Parmi ces 3 activateurs, le collagène semble moins puissant par rapport avec les deux premiers récepteurs. Ainsi, l'ADP/ATP, la thromboxane A2 – sécrétés par les plaquettes activées par la thrombine – générée sur la surface des plaquettes activées sont des médiateurs qui agissent via les RCPG. L'activation

des voies de signalisation induite par ces récepteurs (Figure 6) amplifie la sécrétion et la formation de ces facteurs (boucle autocrine) et amplifie les signaux d'activation plaquettaire initiaux [25]. Par ailleurs, le système des signalisations reliées aux RCPG est polyvalent [25], cela explique pourquoi ces ligands sont responsables pour une deuxième vague d'activation plaquettaire et donc une sécrétion plus importante des facteurs solubles.

Le TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) n'a jamais été observé dans les sécrétions plaquettaires ; cependant, dans notre étude, nous avons constaté que ce facteur semble relargué en quantité importante après l'activation plaquettaire avec plusieurs types d'activateurs notamment le Fg, mais à l'exception de l'ADP. Le TSLP est un facteur soluble dont le récepteur (TSLPR) est exprimé sur plusieurs types de cellules immunitaires (les DC, les LyT, LyB, les cellules NK et les monocytes), qui joue un rôle essentiel dans l'inflammation médiée par la réponse immunitaire de type TH2 [278]. Cette sécrétion plaquettaire du TSLP permettrait aux plaquettes d'interagir avec un grand nombre de cellules de l'environnement conduisant à une réponse inflammatoire en parallèle avec leur agrégation lors du contact avec le Fg.

Le sCD40L dont 95% de la forme libre plasmatique est libéré par les plaquettes activées, peut auto-activer les plaquettes car elles expriment le contre-ligand du sCD40L (CD154) qui est le CD40 et induire la libération des facteurs inflammatoires plaquettaires [53]. Ce phénomène consolide l'hypothèse que l'activation des plaquettes entretient la réponse inflammatoire. Les molécules d'intérêt de notre travail ne sont pas exhaustives et il y a certainement des profils de sécrétion différents, ainsi que d'autres molécules plaquettaires qui participent à l'entretien de l'inflammation comme CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78) et IL-1 $\beta$  que nous n'avons pas dosés dans cette étude. *A contrario*, d'autres facteurs comme BCA-1, 6-Ckine, CXCL9 (MIG), CCL19 (MIP-3 $\beta$ ) et CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), testés dans le cadre de notre étude, ne sont pas sécrétés lors de l'activation des plaquettes, quel que soit l'activateur utilisé.

Concernant les molécules des voies de signalisation intraplaquettaire, nous avons observé une hyperactivité de l'IKKa et l'IKBa après la stimulation des plaquettes avec l'activateur de PAR-4 et le VAP-1, des molécules SYK après la stimulation par le TRAP et

l'activateur de PAR-4. De plus, la stimulation des plaquettes par l'ADP et le collagène implique la phosphorylation du Rap GEF1 GRF2. *A contrario*, le Fg induit la phosphorylation de TEC – une protéine de l'activité tyrosine kinase qui est probablement responsable pour la signalisation « outside-in » de son récepteur GPIIb/IIIa qui conduit à la libération des facteurs solubles plaquettaires suite à cette stimulation [41].

Par ailleurs, la réponse différentielle *in vitro* et *ex vivo* des plaquettes en présence d'agonistes hétérogènes peut être également expliquée par la mise en évidence de différentes sous-populations plaquettaires, notamment les plaquettes « coated » démontrées dans plusieurs études [79]–[83]. Ces plaquettes présentent une meilleure capacité de fixation des protéines sécrétées elles-mêmes et des protéines plasmatiques au cours de leur activation plaquettaire sous certaines stimulations [83], et peuvent favoriser une deuxième vague d'activation plaquettaire. Dans notre étude, c'est le cas lorsque les protéines fixées sont également des protéines activatrices des plaquettes (comme le Fg, le collagène et le sCD40L), promouvant une sécrétion plus abondante. Ce phénomène est probablement un des mécanismes responsables des réponses sécrétoires plaquettaires hétérogènes lors des stimulations. Il est important donc de vérifier si des sous-populations existent lors de la stimulation des plaquettes avec les autres activateurs comme l'ADP, le Fg et le sCD40L. Aussi, il serait intéressant d'investiguer d'autres caractères capables de distinguer les sous-populations plaquettaires et susceptibles d'être à l'origine des réponses différentielles après stimulation. Parmi ces caractéristiques, on peut penser à l'expression de principaux récepteurs membranaires plaquettaire (les PRR, les RPCG, les intégrines et les RTK) ainsi que les molécules importantes des voies de signalisation intraplaquettaires (PKC, PI3k, Rap et IKK).

Enfin, les différentes stimulations peuvent conduire aux profils d'épissage respectifs d'ARN pré-messager plaquettaire, ce qui explique la différence de la sécrétion plaquettaire. Effectivement, la découverte récente en grande quantité d'ARN pré-messager provenant des MK ainsi que des composantes du spliceosome et ses protéines associées dans le cytoplasme des plaquettes matures [20] a suggéré que ces cellules anucléées peuvent épisser ces ARN pré-messagers en ARN messagers traduisibles pour réguler la quantité de ses protéines par exemple l'IL-1 $\beta$  lors de leur activation [21]. Il a été rapporté que cet épissage plaquettaire est strictement dépendant d'une stimulation

appropriée. Ainsi l'ARN pré-messager de l'IL-1 $\beta$  est réprimé sauf après stimulation des plaquettes par la thrombine [21]. Le lien entre la transduction des signaux et la régulation d'épissage est assuré par les molécules intraplaquettaires comme le Sam68 (cible de la voie ERK) [279]. De plus, la régulation de cet épissage est aussi effectuée par la répartition spécifique des facteurs du spliceosome [20]. Des travaux récents ont montré la synthèse plaquettaire *de novo* de certaines protéines, après leur activation par la thrombine ou le collagène, telle que le Fg, la GPIIb/IIIa, le facteur tissulaire et le vWF [22]. Ces résultats suggèrent un autre mécanisme de sécrétion en programme des plaquettes. De nouvelles investigations permettraient de rechercher une possible corrélation entre les stimuli plaquettaires et l'expression d'ARN messager des facteurs solubles dosés et/ou protéines intraplaquettaires et/ou membranaires exprimées.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que la sécrétion plaquettaire est réalisée en « programme » qui dépend de la stimulation. Ce programme semble être spécifique pour chaque stimulus et régulé par les voies de signalisation intraplaquettaires elles-mêmes. La composante inflammatoire des plaquettes est dépendante des signaux qu'elles reçoivent depuis l'environnement. Ces travaux ont donc un rôle important pour les études des facteurs solubles plaquettaires. En effet, cela nous permettra d'avoir une bonne orientation sur l'identification du profil de stimulus et de la signalisation intraplaquettaire responsables pour la sécrétion des facteurs soluble d'intérêt. Ces travaux, encore inachevés, feront l'objet d'un projet de publication.

## II) Publications

1. **K. A. Nguyen**, P. Chavarin, C.-A. Arthaud, F. Cognasse, et O. Garraud, « Do manual and automated processes with distinct additive solutions affect whole blood-derived platelet components differently? », *Blood Transfus*, vol. 11, p. 152-153, janv. 2013.
2. S. Poirault-Chassac, **K. A. Nguyen**, A. Pietrzyk, C. Casari, A. Veyradier, C. V. Denis, et D. Baruch, « Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 5, p. e63810, mai 2013.
3. H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, **K. A. Nguyen**, C.-A. Arthaud, M.-A. Eyraud, P. Chavarin, L. Absi, J.-C. Osselaer, B. Pozzetto, F. Cognasse, et O. Garraud, « Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously oversecreted in platelet components associated with acute transfusion reactions », *Transfusion*, août 2013.
4. H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, **K. A. Nguyen**, F. Zeni, B. Pozzetto, F. Cognasse, et O. Garraud, « Contribution of activated platelets to plasma IL-27 levels », *Crit Care*, vol. 17, n° 1, p. 411, févr. 2013.
5. F. Cognasse, O. Garraud, H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, **K. A. Nguyen**, B. Pozzetto, et J.-M. Payrat, « Investigative In Vitro Study about Red Blood Cell Concentrate Processing and Storage », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 187, n° 2, p. 216-217, janv. 2013.

## III) Communications affichées et orales

### 1. Do manual and automated processes with distinct additive solutions affect whole blood-derived platelet components differently

*Poster et communication orale présentés à :*

- Journée scientifique de l'ED488, St Etienne 2011
- Journée scientifique de l'IFRESIS, Saint-Etienne 2011
- XIIth European Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology, Warsaw Poland 2012
- Annual Meeting of American Association of Blood Banks, Boston USA 2012.
- XXVIe congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Paris 2013

### 2. Set up of a computerized prediction model of hazardous—inflammatory—outcome of platelet transfusion

*Poster et communication orale présentés à :*

- Journée scientifique de l'ED488, St Etienne 2012

- Journée scientifique de l'IFRESIS, Saint-Etienne 2012, 2013-08-08
- XXVIe congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Paris 2013

### **3. Investigative In Vitro Study about Red Blood Cell Concentrate Processing and Storage**

*Communication orale présentés à :*

- Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie, Paris 2013
- XXVIe congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Paris 2013

## Références bibliographiques



- [1] J. N. George, « Platelets », *The Lancet*, vol. 355, n° 9214, p. 1531-1539, avr. 2000.
- [2] J. H. Hartwig, « The Platelet: Form and Function », *Seminars in Hematology*, vol. 43, Supplement 1, p. S94-S100, janv. 2006.
- [3] J. N. Thon et J. E. Italiano, « Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure », in *Antiplatelet Agents*, vol. 210, P. Gresele, G. V. R. Born, C. Patrono, et C. P. Page, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, p. 3-22.
- [4] P. Blair et R. Flaumenhaft, « Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates », *Blood Rev.*, vol. 23, n° 4, p. 177-189, juill. 2009.
- [5] B. T. Colvin, « ES04.01 Physiology of haemostasis », *Vox Sanguinis*, vol. 87, p. 43-46, 2004.
- [6] S. Bodin, H. Tronchère, et B. Payrastre, « Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1610, n° 2, p. 247-257, mars 2003.
- [7] J. G. White et C. C. Clawson, « The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system », *Am. J. Pathol.*, vol. 101, n° 2, p. 353-364, nov. 1980.
- [8] S. Patel-Hett, J. L. Richardson, H. Schulze, K. Drabek, N. A. Isaac, K. Hoffmeister, R. A. Shivdasani, J. C. Bulinski, N. Galjart, J. H. Hartwig, et J. E. Italiano Jr, « Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules », *Blood*, vol. 111, n° 9, p. 4605-4616, mai 2008.
- [9] J. E. Italiano Jr, W. Bergmeier, S. Tiwari, H. Falet, J. H. Hartwig, K. M. Hoffmeister, P. André, D. D. Wagner, et R. A. Shivdasani, « Mechanisms and implications of platelet discoid shape », *Blood*, vol. 101, n° 12, p. 4789-4796, juin 2003.
- [10] J. H. Hartwig et M. DeSisto, « The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. », *J Cell Biol*, vol. 112, n° 3, p. 407-425, janv. 1991.
- [11] R. Flaumenhaft, « Molecular basis of platelet granule secretion », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, n° 7, p. 1152-1160, juill. 2003.
- [12] S. M. King et G. L. Reed, « Development of platelet secretory granules », *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 13, n° 4, p. 293-302, août 2002.
- [13] O. Garraud et F. Cognasse, « [Platelet immunology and the immune response] », *Transfus Clin Biol*, vol. 16, n° 2, p. 106-117, mai 2009.
- [14] K. P. Fong, C. Barry, A. N. Tran, E. A. Traxler, K. M. Wannemacher, H.-Y. Tang, K. D. Speicher, I. A. Blair, D. W. Speicher, T. Grosser, et L. F. Brass, « Deciphering the human platelet sheddome », *Blood*, vol. 117, n° 1, p. e15-26, janv. 2011.
- [15] J. E. Italiano Jr, J. L. Richardson, S. Patel-Hett, E. Battinelli, A. Zaslavsky, S. Short, S. Ryeom, J. Folkman, et G. L. Klement, « Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released », *Blood*, vol. 111, n° 3, p. 1227-1233, févr. 2008.

- [16] A. McNicol et S. J. Israels, « Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis », *Thromb. Res.*, vol. 95, n° 1, p. 1-18, juill. 1999.
- [17] M. E. Bentfeld-Barker et D. F. Bainton, « Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets », *Blood*, vol. 59, n° 3, p. 472-481, janv. 1982.
- [18] J. N. Thon, C. G. Peters, K. R. Machlus, R. Aslam, J. Rowley, H. Macleod, M. T. Devine, T. A. Fuchs, A. S. Weyrich, J. W. Semple, R. Flaumenhaft, et J. E. Italiano, « T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling », *J Cell Biol*, vol. 198, n° 4, p. 561-574, août 2012.
- [19] S. Panigrahi, Y. Ma, L. Hong, D. Gao, X. Z. West, R. G. Salomon, T. V. Byzova, et E. A. Podrez, « Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyperreactivity and thrombosis », *Circ. Res.*, vol. 112, n° 1, p. 103-112, janv. 2013.
- [20] M. M. Denis, N. D. Tolley, M. Bunting, H. Schwertz, H. Jiang, S. Lindemann, C. C. Yost, F. J. Rubner, K. H. Albertine, K. J. Swoboda, C. M. Fratto, E. Tolley, L. W. Kraiss, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, et A. S. Weyrich, « Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets », *Cell*, vol. 122, n° 3, p. 379-391, août 2005.
- [21] S. Lindemann, N. D. Tolley, D. A. Dixon, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman, et A. S. Weyrich, « Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis », *J. Cell Biol.*, vol. 154, n° 3, p. 485-490, août 2001.
- [22] P. Schubert et D. V. Devine, « De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine », *Vox Sang.*, vol. 99, n° 2, p. 112-122, août 2010.
- [23] S. P. Jackson, « The growing complexity of platelet aggregation », *Blood*, vol. 109, n° 12, p. 5087-5095, juin 2007.
- [24] B. Nieswandt et S. P. Watson, « Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? », *Blood*, vol. 102, n° 2, p. 449-461, juill. 2003.
- [25] S. Offermanns, « Activation of platelet function through G protein-coupled receptors », *Circ. Res.*, vol. 99, n° 12, p. 1293-1304, déc. 2006.
- [26] S. R. Coughlin, « Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, n° 8, p. 1800-1814, 2005.
- [27] B. Voss, J. N. McLaughlin, M. Holinstat, R. Zent, et H. E. Hamm, « PAR1, but Not PAR4, Activates Human Platelets through a Gi/o/Phosphoinositide-3 Kinase Signaling Axis », *Mol Pharmacol*, vol. 71, n° 5, p. 1399-1406, janv. 2007.
- [28] S. Murugappa et S. P. Kunapuli, « The role of ADP receptors in platelet function », *Front. Biosci.*, vol. 11, p. 1977-1986, 2006.
- [29] G. F. Guidetti, P. Lova, B. Bernardi, F. Campus, G. Baldanzi, A. Graziani, C. Balduini, et M. Torti, « The Gi-coupled P2Y12 receptor regulates diacylglycerol-mediated signaling in human platelets », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 43, p. 28795-28805, oct. 2008.

- [30] P. Savi, P. Beauverger, C. Labouret, M. Delfaud, V. Salel, M. Kaghad, et J. . Herbert, « Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation », *FEBS Letters*, vol. 422, n° 3, p. 291-295, févr. 1998.
- [31] S. Offermanns, C. F. Toombs, Y.-H. Hu, et M. I. Simon, « Defective platelet activation in Gαq-deficient mice », *Nature*, vol. 389, n° 6647, p. 183-186, sept. 1997.
- [32] G. J. Johnson, L. A. Leis, et P. C. Dunlop, « Specificity of G alpha q and G alpha 11 gene expression in platelets and erythrocytes. Expressions of cellular differentiation and species differences », *Biochem. J.*, vol. 318 ( Pt 3), p. 1023-1031, sept. 1996.
- [33] S. M. Cifuni, D. D. Wagner, et W. Bergmeier, « CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets », *Blood*, vol. 112, n° 5, p. 1696-1703, sept. 2008.
- [34] M. J. Hart, X. Jiang, T. Kozasa, W. Roscoe, W. D. Singer, A. G. Gilman, P. C. Sternweis, et G. Bollag, « Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13 », *Science*, vol. 280, n° 5372, p. 2112-2114, juin 1998.
- [35] D. E. Clapham et E. J. Neer, « G protein beta gamma subunits », *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 37, p. 167-203, 1997.
- [36] S. P. Jackson et S. M. Schoenwaelder, « PI 3-Kinase p110β regulation of platelet integrin α(IIb)β3 », *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 346, p. 203-224, 2010.
- [37] S. P. Watson, N. Asazuma, B. Atkinson, O. Berlanga, D. Best, R. Bobe, G. Jarvis, S. Marshall, D. Snell, M. Stafford, D. Tulasne, J. Wilde, P. Wonerow, et J. Frampton, « The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen », *Thromb. Haemost.*, vol. 86, n° 1, p. 276-288, juill. 2001.
- [38] S. P. Watson, J. M. Auger, O. J. T. McCarty, et A. C. Pearce, « GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 3, n° 8, p. 1752-1762, août 2005.
- [39] B. Nieswandt, D. Varga-Szabo, et M. Elvers, « Integrins in platelet activation », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7 Suppl 1, p. 206-209, juill. 2009.
- [40] S. J. Shattil et P. J. Newman, « Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets », *Blood*, vol. 104, n° 6, p. 1606-1615, sept. 2004.
- [41] Z. Li, M. K. Delaney, K. A. O'Brien, et X. Du, « Signaling during platelet adhesion and activation », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, n° 12, p. 2341-2349, déc. 2010.
- [42] E. L. Bearer, J. M. Prakash, et Z. Li, « Actin dynamics in platelets », *Int. Rev. Cytol.*, vol. 217, p. 137-182, 2002.
- [43] J. W. Semple, J. E. Italiano, et J. Freedman, « Platelets and the immune continuum », *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, n° 4, p. 264-274, avr. 2011.
- [44] J. W. Semple et J. Freedman, « Platelets and innate immunity », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, n° 4, p. 499-511, févr. 2010.
- [45] D. Cox, S. W. Kerrigan, et S. P. Watson, « Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n° 6, p. 1097-1107, juin 2011.

- [46] P. Haselmayer, L. Grosse-Hovest, P. von Landenberg, H. Schild, et M. P. Radsak, « TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation », *Blood*, vol. 110, n° 3, p. 1029-1035, janv. 2007.
- [47] K. J. Clemetson, J. M. Clemetson, A. E. I. Proudfoot, C. A. Power, M. Baggiolini, et T. N. C. Wells, « Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets », *Blood*, vol. 96, n° 13, p. 4046-4054, déc. 2000.
- [48] H. D. Schaufelberger, M. R. Uhr, C. McGuckin, R. P. Logan, J. J. Misiewicz, E. C. Gordon-Smith, et C. Beglinger, « Platelets in ulcerative colitis and Crohn's disease express functional interleukin-1 and interleukin-8 receptors », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 24, n° 10, p. 656-663, oct. 1994.
- [49] F. Boehlen et K. J. Clemetson, « Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? », *Transfusion Medicine*, vol. 11, n° 6, p. 403-417, 2001.
- [50] C. Flaujac, S. Boukour, et E. Cramer-Bordé, « Platelets and viruses: an ambivalent relationship », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, n° 4, p. 545-556, févr. 2010.
- [51] R. A. Flavell, S. Sanjabi, S. H. Wrzesinski, et P. Licona-Limón, « The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF $\beta$  », *Nat Rev Immunol*, vol. 10, n° 8, p. 554-567, août 2010.
- [52] P. Saas et S. Perruche, « Functions of TGF- $\beta$ -Exposed Plasmacytoid Dendritic Cells », *Critical Reviews in Immunology*, vol. 32, n° 6, p. 529-553, 2012.
- [53] P. André, L. Nannizzi-Alaimo, S. K. Prasad, et D. R. Phillips, « Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease », *Circulation*, vol. 106, n° 8, p. 896-899, août 2002.
- [54] B. D. Elzey, T. L. Ratliff, J. M. Sowa, et S. A. Crist, « Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity », *Thromb. Res.*, vol. 127, n° 3, p. 180-183, mars 2011.
- [55] S. Y. Khan, M. R. Kelher, J. M. Heal, N. Blumberg, L. K. Boshkov, R. Phipps, K. F. Gettings, N. J. McLaughlin, et C. C. Silliman, « Soluble CD40 Ligand Accumulates in Stored Blood Components, Primes Neutrophils Through CD40, and Is a Potential Cofactor in the Development of Transfusion-Related Acute Lung Injury », *Blood*, vol. 108, n° 7, p. 2455-2462, janv. 2006.
- [56] H. Hamzeh-Cognasse, F. Cognasse, S. Palle, P. Chavarin, T. Olivier, O. Delézay, B. Pozzetto, et O. Garraud, « Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation », *BMC Immunol.*, vol. 9, p. 54, 2008.
- [57] J. Martinson, J. Bae, H.-G. Klingemann, et Y. Tam, « Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous ex vivo differentiated DC », *Cytotherapy*, vol. 6, n° 5, p. 487-497, 2004.
- [58] P. Duffau, J. Seneschal, C. Nicco, C. Richez, E. Lazaro, I. Douchet, C. Bordes, J.-F. Viallard, C. Goulvestre, J.-L. Pellegrin, B. Weil, J.-F. Moreau, F. Batteux, et P. Blanco, « Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus », *Sci Transl Med*, vol. 2, n° 47, p. 47ra63, sept. 2010.

- [59] B. D. Elzey, N. W. Schmidt, S. A. Crist, T. P. Kresowik, J. T. Harty, B. Nieswandt, et T. L. Ratliff, « Platelet-derived CD154 enables T-cell priming and protection against *Listeria monocytogenes* challenge », *Blood*, vol. 111, n° 7, p. 3684-3691, avr. 2008.
- [60] M. Iannacone, G. Sitia, M. Isogawa, J. K. Whitmire, P. Marchese, F. V. Chisari, Z. M. Ruggeri, et L. G. Guidotti, « Platelets prevent IFN-alpha/beta-induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, n° 2, p. 629-634, janv. 2008.
- [61] A. Zarbock, R. K. Polanowska-Grabowska, et K. Ley, « Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation », *Blood Reviews*, vol. 21, n° 2, p. 99-111, mars 2007.
- [62] A. Caudrillier, K. Kessenbrock, B. M. Gilliss, J. X. Nguyen, M. B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb, et M. R. Looney, « Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury », *Journal of Clinical Investigation*, juin 2012.
- [63] G. de Gaetano, C. Cerletti, et V. Evangelista, « Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction », *Haemostasis*, vol. 29, n° 1, p. 41-49, sept. 1999.
- [64] A. C. Ma et P. Kubes, « Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 6, n° 3, p. 415-420, mars 2008.
- [65] N. Li, « Platelet-lymphocyte cross-talk », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 83, n° 5, p. 1069-1078, mai 2008.
- [66] J. M. Sowa, S. A. Crist, T. L. Ratliff, et B. D. Elzey, « Platelet influence on T- and B-cell responses », *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 57, n° 4, p. 235-241, août 2009.
- [67] C. Y. Liu, M. Battaglia, S. H. Lee, Q.-H. Sun, R. H. Aster, et G. P. Visentin, « Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells », *J. Immunol.*, vol. 174, n° 5, p. 2680-2686, mars 2005.
- [68] L. M. Chapman, A. A. Aggrey, D. J. Field, K. Srivastava, S. Ture, K. Yui, D. J. Topham, W. M. Baldwin, et C. N. Morrell, « Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I », *J Immunol*, vol. 189, n° 2, p. 916-923, juill. 2012.
- [69] H. Matsuda, H. Ushio, G. P. Geba, et P. W. Askenase, « Human platelets can initiate T cell-dependent contact sensitivity through local serotonin release mediated by IgE antibodies », *J. Immunol.*, vol. 158, n° 6, p. 2891-2897, mars 1997.
- [70] J. S. Palumbo, K. E. Talmage, J. V. Massari, C. M. La Jeunesse, M. J. Flick, K. W. Kombrinck, M. Jirousková, et J. L. Degen, « Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells », *Blood*, vol. 105, n° 1, p. 178-185, janv. 2005.
- [71] P. S. Frenette, C. V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J. H. Hartwig, D. Vestweber, et D. D. Wagner, « P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (Psgl-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions in Vivo », *J Exp Med*, vol. 191, n° 8, p. 1413-1422, avr. 2000.

- [72] V. Henn, J. R. Slupsky, M. Gräfe, I. Anagnostopoulos, R. Förster, G. Müller-Berghaus, et R. A. Kroczek, « CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells », *Nature*, vol. 391, n° 6667, p. 591-594, févr. 1998.
- [73] K. Clemetson, « Platelets and pathogens », *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 67, n° 4, p. 495-498, 2010.
- [74] F. Cognasse, H. Hamzeh-Cognasse, S. Lafarge, O. Delezay, B. Pozzetto, A. McNicol, et O. Garraud, « Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets », *Br. J. Haematol.*, vol. 141, n° 1, p. 84-91, avr. 2008.
- [75] J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, C.-A. Arthaud, M.-A. Eyraud, F. Zéni, B. Pozzetto, A. McNicol, O. Garraud, et F. Cognasse, « Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion », *Clinical Immunology*, vol. 145, n° 3, p. 189-200, déc. 2012.
- [76] T. Youssefian, A. Drouin, J.-M. Massé, J. Guichard, et E. M. Cramer, « Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation », *Blood*, vol. 99, n° 11, p. 4021-4029, juin 2002.
- [77] D. Cox et S. McConkey, « The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, n° 4, p. 557-568, févr. 2010.
- [78] B. J. McMorran, V. M. Marshall, C. de Graaf, K. E. Drysdale, M. Shabbar, G. K. Smyth, J. E. Corbin, W. S. Alexander, et S. J. Foote, « Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection », *Science*, vol. 323, n° 5915, p. 797-800, févr. 2009.
- [79] A. J. Webber et B. G. Firkin, « Two Populations of Platelets », *Nature*, vol. 205, n° 4978, p. 1332-1332, mars 1965.
- [80] O. Behnke, « Blood platelet heterogeneity: a functional hierarchy in the platelet population », *Br. J. Haematol.*, vol. 91, n° 4, p. 991-999, déc. 1995.
- [81] J. M. Pasquet, J. Dachary-Prigent, et A. T. Nurden, « Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen », *Biochem. J.*, vol. 333 ( Pt 3), p. 591-599, août 1998.
- [82] L. Alberio, O. Safa, K. J. Clemetson, C. T. Esmon, et G. L. Dale, « Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin », *Blood*, vol. 95, n° 5, p. 1694-1702, mars 2000.
- [83] G. L. Dale, P. Friese, P. Batar, S. F. Hamilton, G. L. Reed, K. W. Jackson, K. J. Clemetson, et L. Alberio, « Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface », *Nature*, vol. 415, n° 6868, p. 175-179, janv. 2002.
- [84] M. Yu et A. B. Cantor, « Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: an update on cytokines and lineage surface markers », *Methods Mol. Biol.*, vol. 788, p. 291-303, 2012.

- [85] D. Bluteau, L. Lordier, A. Di Stefano, Y. Chang, H. Raslova, N. Debili, et W. Vainchenker, « Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7 Suppl 1, p. 227-234, juill. 2009.
- [86] H. Schulze, M. Korpál, J. Hurov, S.-W. Kim, J. Zhang, L. C. Cantley, T. Graf, et R. A. Shivdasani, « Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis », *Blood*, vol. 107, n° 10, p. 3868-3875, mai 2006.
- [87] J. E. Italiano, P. Lecine, R. A. Shivdasani, et J. H. Hartwig, « Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes », *J Cell Biol*, vol. 147, n° 6, p. 1299-1312, déc. 1999.
- [88] J. E. Italiano, S. Patel-Hett, et J. H. Hartwig, « Mechanics of proplatelet elaboration », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, p. 18-23, 2007.
- [89] J. H. Hartwig et J. E. Italiano Jr, « Cytoskeletal mechanisms for platelet production », *Blood Cells Mol. Dis.*, vol. 36, n° 2, p. 99-103, avr. 2006.
- [90] T. Junt, H. Schulze, Z. Chen, S. Massberg, T. Goerge, A. Krueger, D. D. Wagner, T. Graf, J. E. Italiano Jr, R. A. Shivdasani, et U. H. von Andrian, « Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow », *Science*, vol. 317, n° 5845, p. 1767-1770, sept. 2007.
- [91] C. Dunois-Lardé, C. Capron, S. Fichelson, T. Bauer, E. Cramer-Bordé, et D. Baruch, « Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production », *Blood*, vol. 114, n° 9, p. 1875-1883, août 2009.
- [92] M. K. Larson et S. P. Watson, « Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3 », *Blood*, vol. 108, n° 5, p. 1509-1514, sept. 2006.
- [93] H. Schwertz, S. Köster, W. H. A. Kahr, N. Michetti, B. F. Kraemer, D. A. Weitz, R. C. Blaylock, L. W. Kraiss, A. Greinacher, G. A. Zimmerman, et A. S. Weyrich, « Anucleate platelets generate progeny », *Blood*, vol. 115, n° 18, p. 3801-3809, mai 2010.
- [94] S. Poirault-Chassac, K. A. Nguyen, A. Pietrzyk, C. Casari, A. Veyradier, C. V. Denis, et D. Baruch, « Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 5, p. e63810, mai 2013.
- [95] D. Zucker-Franklin et C. S. Philipp, « Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept », *Am. J. Pathol.*, vol. 157, n° 1, p. 69-74, juill. 2000.
- [96] G. Zauli, M. Vitale, E. Falcieri, D. Gibellini, A. Bassini, C. Celeghini, M. Columbaro, et S. Capitani, « In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes », *Blood*, vol. 90, n° 6, p. 2234-2243, sept. 1997.
- [97] S. De Botton, S. Sabri, E. Daugas, Y. Zermati, J. E. Guidotti, O. Hermine, G. Kroemer, W. Vainchenker, et N. Debili, « Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes », *Blood*, vol. 100, n° 4, p. 1310-1317, août 2002.
- [98] V. R. Deutsch et A. Tomer, « Megakaryocyte development and platelet production », *Br. J. Haematol.*, vol. 134, n° 5, p. 453-466, sept. 2006.
- [99] S. Gordon, « Elie Metchnikoff: Father of natural immunity », *European Journal of Immunology*, vol. 38, n° 12, p. 3257-3264, 2008.

- [100] P. Matzinger, « Tolerance, Danger, and the Extended Family », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, n° 1, p. 991-1045, avr. 1994.
- [101] S. Gallucci et P. Matzinger, « Danger signals: SOS to the immune system », *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 13, n° 1, p. 114-119, févr. 2001.
- [102] K. Newton et V. M. Dixit, « Signaling in innate immunity and inflammation », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 4, n° 3, mars 2012.
- [103] J. J. Oppenheim et D. Yang, « Alarmins: chemotactic activators of immune responses », *Current Opinion in Immunology*, vol. 17, n° 4, p. 359-365, août 2005.
- [104] A. Varki, « Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them », *Glycobiology*, vol. 21, n° 9, p. 1121-1124, sept. 2011.
- [105] A. Varki et T. Angata, « Siglecs--the major subfamily of I-type lectins », *Glycobiology*, vol. 16, n° 1, p. 1R-27R, janv. 2006.
- [106] P. R. Crocker, J. C. Paulson, et A. Varki, « Siglecs and their roles in the immune system », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, n° 4, p. 255-266, avr. 2007.
- [107] T. Kaisho et S. Akira, « Toll-like receptor function and signaling », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 117, n° 5, p. 979-987; quiz 988, mai 2006.
- [108] N. Kayagaki, M. T. Wong, I. B. Stowe, S. R. Ramani, L. C. Gonzalez, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, J. Zhang, W. P. Lee, A. Muszyński, L. S. Forsberg, R. W. Carlson, et V. M. Dixit, « Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4 », *Science*, vol. 341, n° 6151, p. 1246-1249, sept. 2013.
- [109] K. Kersse, M. J. M. Bertrand, M. Lamkanfi, et P. Vandenabeele, « NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 22, n° 5-6, p. 257-276, déc. 2011.
- [110] A. F. Williams et A. N. Barclay, « The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 6, p. 381-405, 1988.
- [111] H. Cao et P. R. Crocker, « Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? », *Immunology*, vol. 132, n° 1, p. 18-26, janv. 2011.
- [112] S. Kelm, A. Pelz, R. Schauer, M. T. Filbin, S. Tang, M. E. de Bellard, R. L. Schnaar, J. A. Mahoney, A. Hartnell, et P. Bradfield, « Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily », *Curr. Biol.*, vol. 4, n° 11, p. 965-972, nov. 1994.
- [113] J. Zhang, A. Raper, N. Sugita, R. Hingorani, M. Salio, M. J. Palmowski, V. Cerundolo, et P. R. Crocker, « Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors », *Blood*, vol. 107, n° 9, p. 3600-3608, mai 2006.
- [114] T. Angata, T. Hayakawa, M. Yamanaka, A. Varki, et M. Nakamura, « Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates », *FASEB J.*, vol. 20, n° 12, p. 1964-1973, oct. 2006.



- [115] T. Angata, Y. Tabuchi, K. Nakamura, et M. Nakamura, « Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution », *Glycobiology*, vol. 17, n° 8, p. 838-846, août 2007.
- [116] H. Cao, U. Lakner, B. de Bono, J. A. Traherne, J. Trowsdale, et A. D. Barrow, « SIGLEC16 encodes a DAP12-associated receptor expressed in macrophages that evolved from its inhibitory counterpart SIGLEC11 and has functional and non-functional alleles in humans », *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, n° 8, p. 2303-2315, août 2008.
- [117] M. K. O'Reilly et J. C. Paulson, « Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 30, n° 5, p. 240-248, mai 2009.
- [118] S. Pillai, I. A. Netravali, A. Cariappa, et H. Mattoo, « Siglecs and immune regulation », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, p. 357-392, 2012.
- [119] S. D. Freeman, S. Kelm, E. K. Barber, et P. R. Crocker, « Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules », *Blood*, vol. 85, n° 8, p. 2005-2012, avr. 1995.
- [120] A. L. Cornish, S. Freeman, G. Forbes, J. Ni, M. Zhang, M. Cepeda, R. Gentz, M. Augustus, K. C. Carter, et P. R. Crocker, « Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33 », *Blood*, vol. 92, n° 6, p. 2123-2132, sept. 1998.
- [121] N. Patel, E. C. Brinkman-Van der Linden, S. W. Altmann, K. Gish, S. Balasubramanian, J. C. Timans, D. Peterson, M. P. Bell, J. F. Bazan, A. Varki, et R. A. Kastelein, « OB-BP1/Siglec-6. a leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 32, p. 22729-22738, août 1999.
- [122] G. Nicoll, J. Ni, D. Liu, P. Klenerman, J. Munday, S. Dubock, M. G. Mattei, et P. R. Crocker, « Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 48, p. 34089-34095, nov. 1999.
- [123] H. Floyd, J. Ni, A. L. Cornish, Z. Zeng, D. Liu, K. C. Carter, J. Steel, et P. R. Crocker, « Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 2, p. 861-866, janv. 2000.
- [124] J. Q. Zhang, G. Nicoll, C. Jones, et P. R. Crocker, « Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 29, p. 22121-22126, juill. 2000.
- [125] J. Munday, S. Kerr, J. Ni, A. L. Cornish, J. Q. Zhang, G. Nicoll, H. Floyd, M. G. Mattei, P. Moore, D. Liu, et P. R. Crocker, « Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor », *Biochem. J.*, vol. 355, n° Pt 2, p. 489-497, avr. 2001.
- [126] T. Angata, S. C. Kerr, D. R. Greaves, N. M. Varki, P. R. Crocker, et A. Varki, « Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling molecule that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue

- macrophages, including brain microglia », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 27, p. 24466-24474, juill. 2002.
- [127] E. C. M. Brinkman-Van der Linden, T. Angata, S. A. Reynolds, L. D. Powell, S. M. Hedrick, et A. Varki, « CD33/Siglec-3 binding specificity, expression pattern, and consequences of gene deletion in mice », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, n° 12, p. 4199-4206, juin 2003.
- [128] Z. Yu, M. Maoui, L. Wu, D. Banville, et S. Shen, « mSiglec-E, a novel mouse CD33-related siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) that recruits Src homology 2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 », *Biochem. J.*, vol. 353, n° Pt 3, p. 483-492, févr. 2001.
- [129] M. Zhang, T. Angata, J. Y. Cho, M. Miller, D. H. Broide, et A. Varki, « Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils », *Blood*, vol. 109, n° 10, p. 4280-4287, mai 2007.
- [130] A. Hoffmann, S. Kerr, J. Jellusova, J. Zhang, F. Weisel, U. Wellmann, T. H. Winkler, B. Kneitz, P. R. Crocker, et L. Nitschke, « Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population », *Nat. Immunol.*, vol. 8, n° 7, p. 695-704, juill. 2007.
- [131] J. C. Paulson, M. S. Macauley, et N. Kawasaki, « Sigelecs as sensors of self in innate and adaptive immune responses », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1253, p. 37-48, avr. 2012.
- [132] Y. Ikehara, S. K. Ikehara, et J. C. Paulson, « Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9 », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 41, p. 43117-43125, oct. 2004.
- [133] A. F. Carlin, A. L. Lewis, A. Varki, et V. Nizet, « Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes », *J. Bacteriol.*, vol. 189, n° 4, p. 1231-1237, févr. 2007.
- [134] A. Varki, « Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins », *Nature*, vol. 446, n° 7139, p. 1023-1029, avr. 2007.
- [135] A. Varki et P. Gagneux, « Multifarious roles of sialic acids in immunity », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1253, p. 16-36, avr. 2012.
- [136] Y. Liu, G.-Y. Chen, et P. Zheng, « Sialoside-based pattern recognitions discriminating infections from tissue injuries », *Current Opinion in Immunology*, vol. 23, n° 1, p. 41-45, févr. 2011.
- [137] E. Rapoport, I. Mikhalyov, J. Zhang, P. Crocker, et N. Bovin, « Ganglioside binding pattern of CD33-related siglecs », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 13, n° 4, p. 675-678, févr. 2003.
- [138] H. Attrill, A. Imamura, R. S. Sharma, M. Kiso, P. R. Crocker, et D. M. F. van Aalten, « Siglec-7 undergoes a major conformational change when complexed with the alpha(2,8)-disialylganglioside GT1b », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 43, p. 32774-32783, oct. 2006.

- [139] G. Nicoll, T. Avril, K. Lock, K. Furukawa, N. Bovin, et P. R. Crocker, « Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms », *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, n° 6, p. 1642-1648, juin 2003.
- [140] A. Ito, K. Handa, D. A. Withers, M. Satoh, et S. Hakomori, « Binding specificity of siglec7 to disialogangliosides of renal cell carcinoma: possible role of disialogangliosides in tumor progression », *FEBS Lett.*, vol. 504, n° 1-2, p. 82-86, août 2001.
- [141] M. Bax, M. L. Kuijf, A. P. Heikema, W. van Rijs, S. C. M. Bruijns, J. J. García-Vallejo, P. R. Crocker, B. C. Jacobs, S. J. van Vliet, et Y. van Kooyk, « Campylobacter jejuni Lipooligosaccharides Modulate Dendritic Cell-Mediated T Cell Polarization in a Sialic Acid Linkage-Dependent Manner », *Infect. Immun.*, vol. 79, n° 7, p. 2681-2689, janv. 2011.
- [142] A. F. Carlin, S. Uchiyama, Y.-C. Chang, A. L. Lewis, V. Nizet, et A. Varki, « Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response », *Blood*, vol. 113, n° 14, p. 3333-3336, févr. 2009.
- [143] C. Jones, M. Virji, et P. R. Crocker, « Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake », *Molecular Microbiology*, vol. 49, n° 5, p. 1213-1225, 2003.
- [144] V. C. Taylor, C. D. Buckley, M. Douglas, A. J. Cody, D. L. Simmons, et S. D. Freeman, « The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2 », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 17, p. 11505-11512, avr. 1999.
- [145] S. J. Orr, N. M. Morgan, R. J. Buick, C. R. Boyd, J. Elliott, J. F. Burrows, C. A. Jefferies, P. R. Crocker, et J. A. Johnston, « SOCS3 targets Siglec 7 for proteasomal degradation and blocks Siglec 7-mediated responses », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 6, p. 3418-3422, févr. 2007.
- [146] S. J. Orr, N. M. Morgan, J. Elliott, J. F. Burrows, C. J. Scott, D. W. McVicar, et J. A. Johnston, « CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover », *Blood*, vol. 109, n° 3, p. 1061-1068, févr. 2007.
- [147] N. Kawasaki, C. Rademacher, et J. C. Paulson, « CD22 regulates adaptive and innate immune responses of B cells », *J Innate Immun*, vol. 3, n° 4, p. 411-419, 2011.
- [148] Y. Wang et H. Neumann, « Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11 », *J. Neurosci.*, vol. 30, n° 9, p. 3482-3488, mars 2010.
- [149] G.-Y. Chen, J. Tang, P. Zheng, et Y. Liu, « CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses », *Science*, vol. 323, n° 5922, p. 1722-1725, mars 2009.
- [150] B. H. Duong, H. Tian, T. Ota, G. Completo, S. Han, J. L. Vela, M. Ota, M. Kubitz, N. Bovin, J. C. Paulson, J. Paulson, et D. Nemazee, « Decoration of T-independent antigen with ligands for CD22 and Siglec-G can suppress immunity and induce B cell tolerance in vivo », *J. Exp. Med.*, vol. 207, n° 1, p. 173-187, janv. 2010.

- [151] J. Jellusova, U. Wellmann, K. Amann, T. H. Winkler, et L. Nitschke, « CD22 x Siglec-G double-deficient mice have massively increased B1 cell numbers and develop systemic autoimmunity », *J. Immunol.*, vol. 184, n° 7, p. 3618-3627, avr. 2010.
- [152] T. Avril, H. Floyd, F. Lopez, E. Vivier, et P. R. Crocker, « The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells », *J. Immunol.*, vol. 173, n° 11, p. 6841-6849, déc. 2004.
- [153] K. A. Cheong, Y.-S. Chang, J. Y. Roh, B.-J. Kim, M.-N. Kim, Y. M. Park, H. J. Park, N.-D. Kim, C.-H. Lee, et A.-Y. Lee, « A novel function of Siglec-9 A391C polymorphism on T cell receptor signaling », *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 154, n° 2, p. 111-118, 2011.
- [154] C. Vitale, C. Romagnani, M. Falco, M. Ponte, M. Vitale, A. Moretta, A. Bacigalupo, L. Moretta, et M. C. Mingari, « Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 96, n° 26, p. 15091-15096, déc. 1999.
- [155] E. Nutku, H. Aizawa, S. A. Hudson, et B. S. Bochner, « Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis », *Blood*, vol. 101, n° 12, p. 5014-5020, juin 2003.
- [156] S. von Gunten, S. Yousefi, M. Seitz, S. M. Jakob, T. Schaffner, R. Seger, J. Takala, P. M. Villiger, et H.-U. Simon, « Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment », *Blood*, vol. 106, n° 4, p. 1423-1431, août 2005.
- [157] R. B. Walter, B. W. Raden, D. M. Kamikura, J. A. Cooper, et I. D. Bernstein, « Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity », *Blood*, vol. 105, n° 3, p. 1295-1302, févr. 2005.
- [158] P. K. K. Wong, P. J. Egan, B. A. Croker, K. O'Donnell, N. A. Sims, S. Drake, H. Kiu, E. J. McManus, W. S. Alexander, A. W. Roberts, et I. P. Wicks, « SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis », *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n° 6, p. 1571-1581, juin 2006.
- [159] A. L. Blasius, M. Cella, J. Maldonado, T. Takai, et M. Colonna, « Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12 », *Blood*, vol. 107, n° 6, p. 2474-2476, mars 2006.
- [160] D. Y. Mason, H. Stein, J. Gerdes, K. A. Pulford, E. Ralfkiaer, B. Falini, W. N. Erber, K. Micklem, et K. C. Gatter, « Value of monoclonal anti-CD22 (p135) antibodies for the detection of normal and neoplastic B lymphoid cells », *Blood*, vol. 69, n° 3, p. 836-840, mars 1987.
- [161] A. Hartnell, J. Steel, H. Turley, M. Jones, D. G. Jackson, et P. R. Crocker, « Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations », *Blood*, vol. 97, n° 1, p. 288-296, janv. 2001.

- [162] S. V. Kaveri, M. S. Maddur, P. Hegde, S. Lacroix-Desmazes, et J. Bayry, « Intravenous immunoglobulins in immunodeficiencies: more than mere replacement therapy », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 164 Suppl 2, p. 2-5, juin 2011.
- [163] S. von Gunten, M. Vogel, A. Schaub, B. M. Stadler, S. Miescher, P. R. Crocker, et H.-U. Simon, « Intravenous immunoglobulin preparations contain anti-Siglec-8 autoantibodies », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 119, n° 4, p. 1005-1011, avr. 2007.
- [164] S. von Gunten, A. Schaub, M. Vogel, B. M. Stadler, S. Miescher, et H.-U. Simon, « Immunologic and functional evidence for anti-Siglec-9 autoantibodies in intravenous immunoglobulin preparations », *Blood*, vol. 108, n° 13, p. 4255-4259, déc. 2006.
- [165] M. S. Alpey, H. Attrill, P. R. Crocker, et D. M. F. van Aalten, « High resolution crystal structures of Siglec-7. Insights into ligand specificity in the Siglec family », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 5, p. 3372-3377, janv. 2003.
- [166] T. Yamaji, T. Teranishi, M. S. Alpey, P. R. Crocker, et Y. Hashimoto, « A small region of the natural killer cell receptor, Siglec-7, is responsible for its preferred binding to alpha 2,8-disialyl and branched alpha 2,6-sialyl residues. A comparison with Siglec-9 », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 8, p. 6324-6332, févr. 2002.
- [167] M. Falco, R. Biassoni, C. Bottino, M. Vitale, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Moretta, et A. Moretta, « Identification and molecular cloning of p75/AIRM1, a novel member of the sialoadhesin family that functions as an inhibitory receptor in human natural killer cells », *J. Exp. Med.*, vol. 190, n° 6, p. 793-802, sept. 1999.
- [168] E. Brunetta, M. Fogli, S. Varchetta, L. Bozzo, K. L. Hudspeth, E. Marcenaro, A. Moretta, et D. Mavilio, « The decreased expression of Siglec-7 represents an early marker of dysfunctional natural killer-cell subsets associated with high levels of HIV-1 viremia », *Blood*, vol. 114, n° 18, p. 3822-3830, oct. 2009.
- [169] S. Varchetta, E. Brunetta, A. Roberto, J. Mikulak, K. L. Hudspeth, M. U. Mondelli, et D. Mavilio, « Engagement of Siglec-7 receptor induces a pro-inflammatory response selectively in monocytes », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 9, p. e45821, 2012.
- [170] M. Mitsuki, K. Nara, T. Yamaji, A. Enomoto, M. Kanno, Y. Yamaguchi, A. Yamada, S. Waguri, et Y. Hashimoto, « Siglec-7 mediates nonapoptotic cell death independently of its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in monocytic cell line U937 », *Glycobiology*, vol. 20, n° 3, p. 395-402, mars 2010.
- [171] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, et A. R. Currie, « Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics », *Br. J. Cancer*, vol. 26, n° 4, p. 239-257, août 1972.
- [172] G. Kroemer, W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, et G. Melino, « Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death », *Cell Death Differ*, vol. 12, n° S2, p. 1463-1467, 2005.
- [173] L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F.

- Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H.-U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, et G. Kroemer, « Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 », *Cell Death Differ.*, vol. 19, n° 1, p. 107-120, janv. 2012.
- [174] A. L. Edinger et C. B. Thompson, « Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy », *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 16, n° 6, p. 663-669, déc. 2004.
- [175] M. C. Cummings, C. M. Winterford, et N. I. Walker, « Apoptosis », *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 21, n° 1, p. 88-101, janv. 1997.
- [176] D. M. Vanags, S. Orrenius, et M. Aguilar-Santelises, « Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis », *Br. J. Haematol.*, vol. 99, n° 4, p. 824-831, déc. 1997.
- [177] J. Li, Y. Xia, A. M. Bertino, J. P. Coburn, et D. J. Kuter, « The mechanism of apoptosis in human platelets during storage », *Transfusion*, vol. 40, n° 11, p. 1320-1329, 2000.
- [178] L. M. Currie, J. R. Harper, H. Allan, et J. Connor, « Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity », *Transfusion*, vol. 37, n° 1, p. 18-24, janv. 1997.
- [179] P. F. Piguet, C. Vesin, et C. Da Kan, « Activation of platelet caspases by TNF and its consequences for kinetics », *Cytokine*, vol. 18, n° 4, p. 222-230, mai 2002.
- [180] V. Leytin, D. J. Allen, A. Mutlu, S. Mykhaylov, E. Lyubimov, et J. Freedman, « Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage », *Br. J. Haematol.*, vol. 142, n° 3, p. 494-497, juill. 2008.
- [181] J. Pereira, M. Soto, I. Palomo, M. Ocqueteau, L.-M. Coetzee, S. Astudillo, E. Aranda, et D. Mezzano, « Platelet aging in vivo is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs », *Thromb. Haemost.*, vol. 87, n° 5, p. 905-909, mai 2002.
- [182] V. Leytin, « Apoptosis in the anucleate platelet », *Blood Rev.*, vol. 26, n° 2, p. 51-63, mars 2012.
- [183] V. Leytin, D. J. Allen, S. Mykhaylov, E. Lyubimov, et J. Freedman, « Thrombin-triggered platelet apoptosis », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 4, n° 12, p. 2656-2663, 2006.
- [184] D. E. Connor, T. Exner, D. D. F. Ma, et J. E. Joseph, « The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib », *Thromb. Haemost.*, vol. 103, n° 5, p. 1044-1052, mai 2010.
- [185] V. Leytin, D. J. Allen, S. Mykhaylov, L. Mis, E. V. Lyubimov, B. Garvey, et J. Freedman, « Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 320, n° 2, p. 303-310, juill. 2004.

- [186] A. M. Bertino, X. Q. Qi, J. Li, Y. Xia, et D. J. Kuter, « Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37 degrees C », *Transfusion*, vol. 43, n° 7, p. 857-866, juill. 2003.
- [187] D. E. Van Der Wal, V. X. Du, K. S. L. Lo, J. T. Rasmussen, S. Verhoef, et J. W. N. Akkerman, « Platelet apoptosis by cold-induced glycoprotein Iba clustering », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 8, n° 11, p. 2554-2562, 2010.
- [188] L. Catani, M. E. Fagioli, P. L. Tazzari, F. Ricci, A. Curti, M. Rovito, P. Preda, G. Chirumbolo, M. Amabile, R. M. Lemoli, S. Tura, R. Conte, M. Baccharani, et N. Vianelli, « Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes », *Exp. Hematol.*, vol. 34, n° 7, p. 879-887, juill. 2006.
- [189] P. F. Piguet et C. Vesin, « Modulation of platelet caspases and life-span by anti-platelet antibodies in mice », *Eur. J. Haematol.*, vol. 68, n° 5, p. 253-261, mai 2002.
- [190] M. L. Rand, H. Wang, K. W. A. Bang, J. M. Teitel, V. S. Blanchette, J. Freedman, et A. T. Nurden, « Phosphatidylserine exposure and other apoptotic-like events in Bernard-Soulier syndrome platelets », *Am. J. Hematol.*, vol. 85, n° 8, p. 584-592, août 2010.
- [191] M. Bonomini, S. Dottori, L. Amoroso, A. Arduini, et V. Siroli, « Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 2, n° 8, p. 1275-1281, août 2004.
- [192] J.-J. Yeh, S. Tsai, D.-C. Wu, J.-Y. Wu, T.-C. Liu, et A. Chen, « P-selectin-dependent platelet aggregation and apoptosis may explain the decrease in platelet count during Helicobacter pylori infection », *Blood*, vol. 115, n° 21, p. 4247-4253, mai 2010.
- [193] Z. Cohen, R. F. Gonzales, G. F. Davis-Gorman, J. G. Copeland, et P. F. McDonagh, « Thrombin activity and platelet microparticle formation are increased in type 2 diabetic platelets: a potential correlation with caspase activation », *Thromb. Res.*, vol. 107, n° 5, p. 217-221, sept. 2002.
- [194] B. T. Kile, « The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7 Suppl 1, p. 214-217, juill. 2009.
- [195] A. Kelekar et C. B. Thompson, « Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis », *Trends in Cell Biology*, vol. 8, n° 8, p. 324-330, août 1998.
- [196] S. Javadov et M. Karmazyn, « Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection », *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 20, n° 1-4, p. 1-22, 2007.
- [197] A. W. C. Leung et A. P. Halestrap, « Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1777, n° 7-8, p. 946-952, juill. 2008.
- [198] S. K. Dasgupta, E. R. Argaz, J. E. C. Mercado, H. O. E. Maul, J. Garza, A. B. Enriquez, H. Abdel-Monem, A. Prakasam, M. Andreeff, et P. Thiagarajan, « Platelet senescence and phosphatidylserine exposure », *Transfusion*, vol. 50, n° 10, p. 2167-2175, oct. 2010.

- [199] B. B. Wolf, J. C. Goldstein, H. R. Stennicke, H. Beere, G. P. Amarante-Mendes, G. S. Salvesen, et D. R. Green, « Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation », *Blood*, vol. 94, n° 5, p. 1683-1692, sept. 1999.
- [200] L. Scorrano et S. J. Korsmeyer, « Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 304, n° 3, p. 437-444, mai 2003.
- [201] M. G. Grütter, « Caspases: key players in programmed cell death », *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 10, n° 6, p. 649-655, déc. 2000.
- [202] C. Richter, « Pro-oxidants and mitochondrial Ca<sup>2+</sup>: their relationship to apoptosis and oncogenesis », *FEBS Lett.*, vol. 325, n° 1-2, p. 104-107, juin 1993.
- [203] T. Lhermusier, H. Chap, et B. Payrastre, « Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 9, n° 10, p. 1883-1891, 2011.
- [204] J. L. N. Wolfs, P. Comfurius, J. T. Rasmussen, J. F. W. Keuren, T. Lindhout, R. F. A. Zwaal, et E. M. Bevers, « Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, n° 13, p. 1514-1525, juill. 2005.
- [205] H.-J. Choo, T. B. Saafir, L. Mkumba, M. B. Wagner, et S. M. Jobe, « Mitochondrial Calcium and Reactive Oxygen Species Regulate Agonist-Initiated Platelet Phosphatidylserine Exposure », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, oct. 2012.
- [206] S. M. Schoenwaelder, Y. Yuan, E. C. Josefsson, M. J. White, Y. Yao, K. D. Mason, L. A. O'Reilly, K. J. Henley, A. Ono, S. Hsiao, A. Willcox, A. W. Roberts, D. C. S. Huang, H. H. Salem, B. T. Kile, et S. P. Jackson, « Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function », *Blood*, vol. 114, n° 3, p. 663-666, juill. 2009.
- [207] K. S. Ravichandran, « Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways », *Immunity*, vol. 35, n° 4, p. 445-455, oct. 2011.
- [208] L. Burnier, P. Fontana, B. R. Kwak, et A. Angelillo-Scherrer, « Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine », *Thromb. Haemost.*, vol. 101, n° 3, p. 439-451, mars 2009.
- [209] R. Flaumenhaft, « Formation and fate of platelet microparticles », *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 36, n° 2, p. 182-187, mars 2006.
- [210] P. J. Sims, E. M. Faioni, T. Wiedmer, et S. J. Shattil, « Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity », *J. Biol. Chem.*, vol. 263, n° 34, p. 18205-18212, déc. 1988.
- [211] T. Wiedmer et P. J. Sims, « Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles », *Blood*, vol. 78, n° 11, p. 2880-2886, déc. 1991.



- [212] S. Plenchette, M. Moutet, M. Benguella, J. P. N'Gondara, F. Guigner, C. Coffe, L. Corcos, A. Bettaieb, et E. Solary, « Early increase in DcR2 expression and late activation of caspases in the platelet storage lesion », *Leukemia*, vol. 15, n° 10, p. 1572-1581, oct. 2001.
- [213] A. Mutlu, A. V. Gyulkhandanyan, J. Freedman, et V. Leytin, « Activation of caspases-9, -3 and -8 in human platelets triggered by BH3-only mimetic ABT-737 and calcium ionophore A23187: caspase-8 is activated via bypass of the death receptors », *British Journal of Haematology*, vol. 159, n° 5, p. 565-571, 2012.
- [214] C. Kantari et H. Walczak, « Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1813, n° 4, p. 558-563, avr. 2011.
- [215] C. D. Gregory et J. D. Pound, « Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues », *J. Pathol.*, vol. 223, n° 2, p. 177-194, janv. 2011.
- [216] I. Tennant, J. D. Pound, L. A. Marr, J. J. L. P. Willems, S. Petrova, C. A. Ford, M. Paterson, A. Devitt, et C. D. Gregory, « Innate recognition of apoptotic cells: novel apoptotic cell-associated molecular patterns revealed by crossreactivity of anti-LPS antibodies », *Cell Death Differ.*, vol. 20, n° 5, p. 698-708, mai 2013.
- [217] E. M. Vasina, S. Cauwenberghs, M. A. H. Feijge, J. W. M. Heemskerk, C. Weber, et R. R. Koenen, « Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation », *Cell Death Dis*, vol. 2, p. e211, 2011.
- [218] G. Tans, J. Rosing, M. C. Thomassen, M. J. Heeb, R. F. Zwaal, et J. H. Griffin, « Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles », *Blood*, vol. 77, n° 12, p. 2641-2648, juin 1991.
- [219] S. F. Mause, P. von Hundelshausen, A. Zerneck, R. R. Koenen, et C. Weber, « Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, n° 7, p. 1512-1518, juill. 2005.
- [220] D. L. Sprague, B. D. Elzey, S. A. Crist, T. J. Waldschmidt, R. J. Jensen, et T. L. Ratliff, « Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles », *Blood*, vol. 111, n° 10, p. 5028-5036, mai 2008.
- [221] A. Janowska-Wieczorek, M. Majka, J. Kijowski, M. Baj-Krzyworzeka, R. Reca, A. R. Turner, J. Ratajczak, S. G. Emerson, M. A. Kowalska, et M. Z. Ratajczak, « Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment », *Blood*, vol. 98, n° 10, p. 3143-3149, nov. 2001.
- [222] O. P. Barry, D. Praticò, R. C. Savani, et G. A. FitzGerald, « Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles », *J. Clin. Invest.*, vol. 102, n° 1, p. 136-144, juill. 1998.
- [223] V. Leytin, S. Mykhaylov, A. F. Starkey, D. J. Allen, H. Lau, H. Ni, J. W. Semple, A. H. Lazarus, et J. Freedman, « Intravenous immunoglobulin inhibits anti-glycoprotein IIb-

- induced platelet apoptosis in a murine model of immune thrombocytopenia », *British Journal of Haematology*, vol. 133, n° 1, p. 78–82, 2006.
- [224] B. Nieswandt, W. Bergmeier, K. Rackebrandt, J. E. Gessner, et H. Zirngibl, « Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice », *Blood*, vol. 96, n° 7, p. 2520–2527, janv. 2000.
- [225] V. Leytin, A. Mutlu, S. Mykhaylov, D. J. Allen, A. V. Gyulkhandanyan, et J. Freedman, « The GPIIb/IIIa antagonist drugs eptifibatid and tirofiban do not induce activation of apoptosis executioner caspase-3 in resting platelets but inhibit caspase-3 activation in platelets stimulated with thrombin or calcium ionophore A23187 », *Haematologica*, vol. 94, n° 12, p. 1783–1784, déc. 2009.
- [226] S. R. Adderley et D. J. Fitzgerald, « Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists Induce Apoptosis in Rat Cardiomyocytes by Caspase-3 Activation », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 8, p. 5760–5766, févr. 2000.
- [227] C. D. Buckley, D. Pilling, N. V. Henriquez, G. Parsonage, K. Threlfall, D. Scheel-Toellner, D. L. Simmons, A. N. Akbar, J. M. Lord, et M. Salmon, « RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation », *Nature*, vol. 397, n° 6719, p. 534–539, févr. 1999.
- [228] M. L. Webster, E. Sayeh, M. Crow, P. Chen, B. Nieswandt, J. Freedman, et H. Ni, « Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GPIIb/IIIa versus GPIIb/IIIa antibodies », *Blood*, vol. 108, n° 3, p. 943–946, août 2006.
- [229] A. R. Crow, S. Song, J. W. Semple, J. Freedman, et A. H. Lazarus, « IVIg inhibits reticuloendothelial system function and ameliorates murine passive-immune thrombocytopenia independent of anti-idiotypic reactivity », *Br. J. Haematol.*, vol. 115, n° 3, p. 679–686, déc. 2001.
- [230] S. Li, Z. Wang, Y. Liao, W. Zhang, Q. Shi, R. Yan, C. Ruan, et K. Dai, « The glycoprotein Ibalphavon Willebrand factor interaction induces platelet apoptosis », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 8, n° 2, p. 341–350, févr. 2010.
- [231] M. T. Harper et A. W. Poole, « Store-operated calcium entry and non-capacitative calcium entry have distinct roles in thrombin-induced calcium signalling in human platelets », *Cell Calcium*, vol. 50, n° 4, p. 351–358, oct. 2011.
- [232] P. Pinton, D. Ferrari, E. Rapizzi, F. Di Virgilio, T. Pozzan, et R. Rizzuto, « The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action », *EMBO J.*, vol. 20, n° 11, p. 2690–2701, juin 2001.
- [233] L. Scorrano, S. A. Oakes, J. T. Opferman, E. H. Cheng, M. D. Sorcinelli, T. Pozzan, et S. J. Korsmeyer, « BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>: A Control Point for Apoptosis », *Science*, vol. 300, n° 5616, p. 135–139, avr. 2003.
- [234] M. Giacomello, I. Drago, P. Pizzo, et T. Pozzan, « Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of cell life and death », *Cell Death Differ.*, vol. 14, n° 7, p. 1267–1274, juill. 2007.

- [235] N. B. Amor, J. A. Pariente, G. M. Salido, J. A. Rosado, et A. Bartegi, « Thrombin-induced caspases 3 and 9 translocation to the cytoskeleton is independent of changes in cytosolic calcium in human platelets », *Blood Cells Mol. Dis.*, vol. 36, n° 3, p. 392-401, juin 2006.
- [236] J. J. Lopez, G. M. Salido, E. Gómez-Arteta, J. A. Rosado, et J. A. Pariente, « Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 5, n° 6, p. 1283-1291, juin 2007.
- [237] C. P. Baines, R. A. Kaiser, N. H. Purcell, N. S. Blair, H. Osinska, M. A. Hambleton, E. W. Brunskill, M. R. Sayen, R. A. Gottlieb, G. W. Dorn, J. Robbins, et J. D. Molkenin, « Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death », *Nature*, vol. 434, n° 7033, p. 658-662, mars 2005.
- [238] F. Krötz, H.-Y. Sohn, et U. Pohl, « Reactive oxygen species: players in the platelet game », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, n° 11, p. 1988-1996, nov. 2004.
- [239] J. A. Rosado, P. C. Redondo, G. M. Salido, E. Gómez-Arteta, S. O. Sage, et J. A. Pariente, « Hydrogen Peroxide Generation Induces pp60src Activation in Human Platelets EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF THIS PATHWAY IN STORE-MEDIATED CALCIUM ENTRY », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 3, p. 1665-1675, janv. 2004.
- [240] M. E. Reyland, « Protein kinase Cdelta and apoptosis », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, n° Pt 5, p. 1001-1004, nov. 2007.
- [241] M. T. Harper et A. W. Poole, « PKC inhibition markedly enhances Ca<sup>2+</sup> signaling and phosphatidylserine exposure downstream of protease-activated receptor-1 but not protease-activated receptor-4 in human platelets », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 9, n° 8, p. 1599-1607, 2011.
- [242] S. Zhang, J. Ye, Y. Zhang, X. Xu, J. Liu, S. h. Zhang, S. p. Kunapuli, et Z. Ding, « P2Y<sub>12</sub> protects platelets from apoptosis via PI3k-dependent bak/bax inactivation », *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, p. no-no, 2012.
- [243] A. V. Gyulkhandanyan, A. Mutlu, J. Freedman, et V. Leytin, « Markers of platelet apoptosis: methodology and applications », *J Thromb Thrombolysis*, vol. 33, n° 4, p. 397-411, mai 2012.
- [244] R. Y. Dodd, « Emerging pathogens and their implications for the blood supply and transfusion transmitted infections », *Br. J. Haematol.*, vol. 159, n° 2, p. 135-142, oct. 2012.
- [245] R. Gill, A. Tsung, et T. R. Billiar, « LINKING OXIDATIVE STRESS TO INFLAMMATION: TOLL-LIKE RECEPTORS », *Free Radic Biol Med*, vol. 48, n° 9, p. 1121-1132, mai 2010.
- [246] N. Alexandru, D. Popov, et A. Georgescu, « Intraplatelet oxidative/nitrative stress: inductors, consequences, and control », *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 20, n° 7, p. 232-238, oct. 2010.
- [247] F. Cognasse, J. M. Payrat, L. Corash, J. C. Osselaer, et O. Garraud, « Platelet components associated with acute transfusion reactions: the role of platelet-derived soluble CD40 ligand », *Blood*, vol. 112, n° 12, p. 4779-4780, déc. 2008.

- [248] W. J. Savage, J. H. Savage, A. A. R. Tobian, C. Thoburn, R. G. Hamilton, J. T. Schroeder, et P. M. Ness, « Allergic agonists in apheresis platelet products are associated with allergic transfusion reactions », *Transfusion*, vol. 52, n° 3, p. 575-581, mars 2012.
- [249] N. Blumberg, K. F. Gettings, C. Turner, J. M. Heal, et R. P. Phipps, « An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions », *Transfusion*, vol. 46, n° 10, p. 1813-1821, oct. 2006.
- [250] M. Wadhwa, J. Seghatchian, et R. Thorpe, « Are cytokines in platelet concentrates responsible for febrile transfusion reactions? », *Transfus Sci*, vol. 18, n° 3, p. 367-371, sept. 1997.
- [251] A. P. J. Vlaar, « Transfusion-related acute lung injury: Current understanding and preventive strategies », *Transfus Clin Biol*, vol. 19, n° 3, p. 117-124, juin 2012.
- [252] O. Gajic, R. Rana, J. L. Winters, M. Yilmaz, J. L. Mendez, O. B. Rickman, M. M. O'Byrne, L. K. Evenson, M. Malinchoc, S. R. DeGoey, B. Afessa, R. D. Hubmayr, et S. B. Moore, « Transfusion-related acute lung injury in the critically ill: prospective nested case-control study », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 176, n° 9, p. 886-891, nov. 2007.
- [253] A. P. J. Vlaar, J. M. Binnekade, D. Prins, D. van Stein, J. J. Hofstra, M. J. Schultz, et N. P. Juffermans, « Risk factors and outcome of transfusion-related acute lung injury in the critically ill: a nested case-control study », *Crit. Care Med.*, vol. 38, n° 3, p. 771-778, mars 2010.
- [254] A. P. J. Vlaar, J. J. Hofstra, R. M. Determann, D. P. Veelo, F. Paulus, W. Kulik, J. Korevaar, B. A. de Mol, M. M. W. Koopman, L. Porcelijn, J. M. Binnekade, M. B. Vroom, M. J. Schultz, et N. P. Juffermans, « The incidence, risk factors, and outcome of transfusion-related acute lung injury in a cohort of cardiac surgery patients: a prospective nested case-control study », *Blood*, vol. 117, n° 16, p. 4218-4225, avr. 2011.
- [255] N. Cloutier, A. Paré, R. W. Farndale, H. R. Schumacher, P. A. Nigrovic, S. Lacroix, et E. Boilard, « Platelets can enhance vascular permeability », *Blood*, vol. 120, n° 6, p. 1334-1343, sept. 2012.
- [256] A. Caudrillier et M. R. Looney, « Platelet-neutrophil interactions as a target for prevention and treatment of transfusion-related acute lung injury », *Curr. Pharm. Des.*, vol. 18, n° 22, p. 3260-3266, 2012.
- [257] J.-P. Cazenave, « Inactivation photochimique des pathogènes des plaquettes et du plasma : cinq ans d'utilisation clinique de routine et d'hémovigilance. Vers un changement de paradigme de la sécurité en transfusion », *Transfusion Clinique et Biologique*, vol. 18, n° 2, p. 53-61, avr. 2011.
- [258] T. Hervig, J. Seghatchian, et T. O. Apolseth, « Current debate on pathogen inactivation of platelet concentrates--to use or not to use? », *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 43, n° 3, p. 411-414, déc. 2010.

- [259] S. Reid, L. Johnson, N. Woodland, et D. C. Marks, « Pathogen reduction treatment of buffy coat platelet concentrates in additive solution induces proapoptotic signaling », *Transfusion*, vol. 52, n° 10, p. 2094–2103, 2012.
- [260] F. Cognasse, J.-C. Osselaer, J. M. Payrat, P. Chavarin, L. Corash, et O. Garraud, « Release of immune modulation factors from platelet concentrates during storage after photochemical pathogen inactivation treatment », *Transfusion*, vol. 48, n° 5, p. 809–813, 2008.
- [261] A. H. Wei, S. M. Schoenwaelder, R. K. Andrews, et S. P. Jackson, « New insights into the haemostatic function of platelets », *British Journal of Haematology*, vol. 147, n° 4, p. 415–430, 2009.
- [262] F. Cognasse, H. Hamzeh, P. Chavarin, S. Acquart, C. Genin, et O. Garraud, « Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets », *Immunol. Cell Biol.*, vol. 83, n° 2, p. 196–198, avr. 2005.
- [263] R. Shiraki, N. Inoue, S. Kawasaki, A. Takei, M. Kadotani, Y. Ohnishi, J. Ejiri, S. Kobayashi, K.-I. Hirata, S. Kawashima, et M. Yokoyama, « Expression of Toll-like receptors on human platelets », *Thromb. Res.*, vol. 113, n° 6, p. 379–385, 2004.
- [264] J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, et F. Cognasse, « Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways », *Br. J. Haematol.*, vol. 151, n° 1, p. 89–92, oct. 2010.
- [265] F. Martini, S. Rioldino, P. Pignatelli, P. . Gazzaniga, P. Ferroni, et L. Lenti, « Involvement of GD3 in platelet activation. A novel association with Fcγ3 receptor », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1583, n° 3, p. 297–304, août 2002.
- [266] J. Seok, H. S. Warren, A. G. Cuenca, M. N. Mindrinos, H. V. Baker, W. Xu, D. R. Richards, G. P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C. C. Finnerty, C. M. López, S. Honari, E. E. Moore, J. P. Minei, J. Cuschieri, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, M. G. Jeschke, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S. E. Calvano, P. H. Mason, J. P. Cobb, L. G. Rahme, S. F. Lowry, R. V. Maier, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, R. W. Davis, W. Xiao, R. G. Tompkins, et Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program, « Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 110, n° 9, p. 3507–3512, févr. 2013.
- [267] O. Garraud, J. Berthet, H. Hamzeh-Cognasse, et F. Cognasse, « Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets », *Thromb. Res.*, vol. 127, n° 4, p. 283–286, avr. 2011.
- [268] C. Dellas, K. Schäfer, I. Rohm, M. Lankeit, T. Ellrott, V. Faustin, J. Riggert, G. Hasenfuss, et S. Konstantinides, « Absence of leptin resistance in platelets from morbidly obese individuals may contribute to the increased thrombosis risk in obesity », *Thromb. Haemost.*, vol. 100, n° 6, p. 1123–1129, déc. 2008.
- [269] D. Jonnalagadda, L. T. Izu, et S. W. Whiteheart, « Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner », *Blood*, oct. 2012.

- [270] D. Viisoreanu et A. Gear, « Effect of physiologic shear stresses and calcium on agonist-induced platelet aggregation, secretion, and thromboxane A2 formation », *Thromb. Res.*, vol. 120, n° 6, p. 885-892, 2007.
- [271] K. A. Nguyen, P. Chavarin, C.-A. Arthaud, F. Cognasse, et O. Garraud, « Do manual and automated processes with distinct additive solutions affect whole blood-derived platelet components differently? », *Blood Transfus.*, vol. 11, p. 152-153, janv. 2013.
- [272] « Rapport d'activité hémovigilance 2011 ». ANSM, juill-2012.
- [273] « Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Strasbourg: Council of Europe », 2005.
- [274] M. Wadhwa, P. Krailadsiri, P. Dilger, R. Gaines Das, M. J. Seghatchian, et R. Thorpe, « Cytokine levels as performance indicators for white blood cell reduction of platelet concentrates », *Vox Sanguinis*, vol. 83, n° 2, p. 125-136, 2002.
- [275] M. H. Klinger, D. Wilhelm, S. Bubel, M. Sticherling, J. M. Schröder, et W. Kühnel, « Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage », *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 107, n° 4, p. 541-546, août 1995.
- [276] H. Hamzeh-Cognasse, P. Damien, K. A. Nguyen, C.-A. Arthaud, M.-A. Eyraud, P. Chavarin, L. Absi, J.-C. Osselaer, B. Pozzetto, F. Cognasse, et O. Garraud, « Immune-reactive soluble OX40 ligand, soluble CD40 ligand, and interleukin-27 are simultaneously oversecreted in platelet components associated with acute transfusion reactions », *Transfusion*, août 2013.
- [277] R. P. Phipps, J. Kaufmann, et N. Blumberg, « Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion », *The Lancet*, vol. 357, n° 9273, p. 2023-2024, juin 2001.
- [278] R. He et R. S. Geha, « Thymic stromal lymphopoietin », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1183, n° 1, p. 13-24, 2010.
- [279] N. Matter, P. Herrlich, et H. König, « Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68 », *Nature*, vol. 420, n° 6916, p. 691-695, déc. 2002.

## Abstract

Blood platelets are non-nucleated cells and play a major role in primary hemostasis and a key role in inflammation, innate and adaptive immunity. They secrete a large variety of soluble factors including cytokines/chemokines (CK/CH) and immunomodulator factors. The emergence of their inflammatory role has raised numerous questions based on the ability of platelets to respond to complex stimuli. Our investigations to answer these questions were realized in the context of platelet component transfusion.

In our study, we demonstrated the correlation between the platelet secretion of soluble factors with their membrane receptors and the signaling pathways involved. Platelets express many immune receptors on their surface, including "Pattern recognition receptors" (PRRs) and receptor for CK/CH. We discovered and characterized the function of a new platelet receptor, the Siglec-7. This receptor is located in the granules  $\alpha$  and its expression is correlated to the platelet activation level. The Siglec -7 has a high avidity with the molecules composed of  $\alpha$ 2,8-disialyl (NeuAc $\alpha$ 2,8NeuAc $\alpha$ 2,3Gal) and of  $\alpha$ 2,6-sialyl (Gal- $\beta$ 1,3[NeuAc $\alpha$ 2,6]HexNAc) (ganglioside GD2 , GD3 and GT1b). Stimulation of this platelet receptor may induce platelet apoptosis by the intrinsic and extramitochondrial pathway. This process requires the engagement of GPIIb/IIIa and P2Y1 receptor and the PI3K pathway.

We also demonstrated a multifactorial inflammatory component in adverse effects issuing from platelets transfusion, and identified many soluble factors which have a high predictive value of Acute Transfusion Reactions (ATR) occurrence, such as sCD40L and IL-13. We confirmed that the concentration of these factors increases during storage time of platelet component (PC), being partly responsible for the high rate of ATR by old PC. Finally, in addition to the PC conservation, the process of PC preparation may also have impacts on the inflammatory properties of platelets.

These studies showed that the platelet inflammatory response is regulated by the stimulus, explaining the sentinel role of human blood platelets. Therefore, my work contributes to the re-exploration of inflammatory function of these cells and studies their role as an immune cell with an inflammatory component.