



Le rôle de l'inflammasome NRLP3 dans l'activation des plaquettes des patients drépanocytaires et des patents atteints de COVID-19

Livia Claude

► To cite this version:

Livia Claude. Le rôle de l'inflammasome NRLP3 dans l'activation des plaquettes des patients drépanocytaires et des patents atteints de COVID-19. Hématologie. Université des Antilles, 2023. Français. ⟨NNT: 2023ANTI0900⟩. ⟨tel-05069192⟩

HAL Id: tel-05069192

<https://theses.hal.science/tel-05069192v1>

Submitted on 15 May 2025

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

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



HAL Authorization

UNIVERSITE DES ANTILLES

Faculté des Sciences Exactes et Naturelles

Ecole Doctorale ED 636

Dynamique des environnements dans l'espace Caraïbes-Amériques

THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université des Antilles

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Livia CLAUDE

Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'activation des plaquettes des patients drépanocytaires et des patients atteints de COVID-19

Soutenue publiquement le 21 avril 2023, à l'université des Antilles

JURY

Rapporteurs :

M. Loïc GARCON, PU-PH, HEMATIM UR 4666, Université Picardie Jules Verne

M. Bernard PAYRASTRE, PU-PH, Inserm/UPS UMR 1297 - I2MC, Université Toulouse III

Examineurs :

Mme. Séverine FERDINAND, Chercheur, HDR, Unité TRED-Path, Institut Pasteur de la Guadeloupe

Mme. Annie LANNUZEL, PU-PH, Unité Inserm UMR 1127 - ICM, Université de Antilles

M. Marc ROMANA, CRHC, Unité Inserm UMR S_1134 - BIGR, Université de Antilles

Directeur de thèse :

Mme. Véronique BACCINI, PU-PH, Unité Inserm UMR S_1134 - BIGR, Université de Antilles

*“Persistence is what makes the impossible possible,
the possible likely, and the likely definite”*

Robert HALF

*Je dédie cette thèse
à ma famille
et plus particulièrement à ma mère*

Remerciements

La réalisation de cette thèse a été une expérience relativement bénéfique. Ces années m'ont permis de dépasser sans cesse mes limites, dépassement de soi qui n'aurait pas été possible sans tous ceux qui m'ont accompagné durant mon doctorat. Je tiens donc sincèrement à remercier :

Ma directrice de thèse, le Professeur **Véronique BACCINI**, pour ses conseils avisés, son aide, sa disponibilité, la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ma thèse, pour toutes les nouvelles connaissances scientifiques qu'elle m'a apportées. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à lire et à améliorer mon manuscrit. Je vous suis également très reconnaissante de l'attention que vous avez portée et que vous continuez de porter à mon avenir professionnel. Je vous remercie du plus profond de mon cœur.

Le Docteur **Marc ROMANA**, pour ses conseils, son aide, sa disponibilité, ses qualités humaines, son implication, sa rigueur scientifique, pour le temps que vous avez accordé à la lecture mon manuscrit. Toutes vos attentions de père qui m'ont beaucoup touchées. Je vous remercie grandement. Merci Monsieur !

Le Professeur **Loïc GARCON**, le Professeur **Bernard PAYRASTRE**, le Docteur **Séverine FERDINAND**, le professeur **Annie LANNUZEL** pour le temps que vous avez accordé à la lecture de mon manuscrit ainsi qu'à l'évaluation de mon travail de thèse. Je vous témoigne l'expression de ma profonde gratitude.

Le Docteur **Marie-Dominique HARDY-DESSOURCES**, pour sa gentillesse, pour toutes les connaissances qu'elle m'a apportées depuis mon arrivée à l'unité lors de mon stage de Master 2 notamment dans l'apprentissage de la technique de western-blot et pour toute cette connaissance scientifique qu'elle m'a apporté sur la drépanocytose.

Le Docteur **Luc RENINGER**, pour sa gentillesse, son amabilité, son soutien, pour ses nombreux conseils notamment concernant les western-blot et pour les échanges que nous avons eu concernant son travail de recherche.

Le Docteur **Sylvie RAVION**, pour sa bienveillance, sa gentillesse, ses conseils et pour les différents échanges que nous avons pu avoir.

Le Docteur **Yohann GARNIER**, mon frère de sciences, pour ta gentillesse, ton écoute, ton aide, pour les échanges que nous avons eu concernant ton travail de recherche, pour les nombreuses discussions enrichissantes que nous avons pu avoir concernant mon avenir. Merci Yohann !

Le Docteur **Frédéric MARTINO**, pour ta gentillesse, pour tes encouragements, pour l'aide que tu m'as apportée notamment dans les manipulations dans le cadre de la drépanocytose et de la COVID-19. Je te remercie grandement pour ton implication. Merci Fred !

Le Docteur **Yann LAMARRE**, pour ton amabilité, pour nos nombreuses discussions concernant les différentes possibilités envisageables après ma thèse.

Le Docteur **Lisiane KECLARD**, pour sa gentillesse, son amabilité et ses encouragements.

Madame **Aurélie CLAES**, qui m'a aidée à améliorer les expériences de western-blots notamment. Merci pour ce temps que tu m'as accordé durant les mois que tu as passés à l'Inserm.

Madame **Malissa BOECASSE**, notre Stagiaire de Master 2, qui m'a aidé au début de ma thèse dans la mise au point d'expériences. Je retiendrai toujours sa petite phrase « Vois le verre à moitié plein ! » qui m'aura porté durant mon doctorat. Merci Malissa !

Madame **Marie-Laure BLONDEAU** et Madame **Line GARGAR** pour leurs encouragements et leurs nombreuses attentions envers toute l'équipe et moi-même.

Le Docteur **Maryse ETIENNE-JULAN**, le Docteur **Emmanuelle BERNIT**, le Docteur **Scylia ALEXIS-FARDINI**, le Docteur **Vanessa TARER** et les **infirmières** sans qui l'inclusion des patients drépanocytaires et des sujets sains aurait été impossible.

Les docteurs **Frédéric MARTINO**, **Bassel CHAHIM** et **Pierre-Marie ROGER** ainsi que les **infirmières des services de réanimation, de post urgence et de maladies infectieuses** qui ont permis l'inclusion des patients atteints de COVID-19 dans notre étude.

Monsieur **Benoît TRESSIERES**, pour tout le temps qu'il m'a accordé afin de mieux appréhender le monde des statistiques, pour son implication dans l'élaboration des différents projets de recherches et également dans la relecture de l'article sur la COVID-19.

Je tiens également à remercier l'**Université des Antilles**, pour m'avoir accordé une bourse ministérielle afin que je puisse réaliser ma thèse.

Mes collègues du laboratoire d'hématologie du CHU de la Guadeloupe, Madame **Françoise LAROCHE**, Madame **Murielle CHARROUX**, Madame **Francine DARA**, Madame **Valérie DELYON**, Madame **Charlène MORVANY-TRANCHOT**, Madame **Monette DATIL**, Madame **Claude COCO VILOIN**, Madame **Armelle LE JACQ**, Madame **Marcella FLEREAU** et Monsieur **Aurélien BONFRATE**, pour leur gentillesse, pour leur bienveillance et pour leurs encouragements.

Mon papa, Monsieur **Pascal CLAUDE**, de m'avoir permis d'arriver en Guadeloupe dans les meilleures conditions possibles, avec tout le confort nécessaire pour travailler. Je te remercie pour ta curiosité et pour l'intérêt que tu as eu durant ces dernières années pour mon travail de thèse. Merci Papa !

Ma maman, Madame **Carmen CLAUDE**, saches que toutes ces choses n'auraient été possibles sans toi. Je sais au combien je t'ai mise à contribution durant cette thèse, tant dans la relecture de certains écrits que dans mes moments de doute. Tu as su par tes prières me relever plus d'une fois. Lumière de nos vies, tu as su mener mon frère, ma sœur et moi vers le meilleur. Je ne te remercierai jamais assez pour tous tes sacrifices, ton courage ainsi que pour toutes les merveilles apportées dans nos vies.

Ma petite sœur et mon petit frère Madame **Méryl CLAUDE** et Monsieur **Taïno CLAUDE**, pour toute cette bienveillance vis-à-vis de moi. Je vous aime plus que tout au monde.

Ma mamie, Madame **Sophie RENE-LOUIS-ARTHUR**, pour ton soutien, ton amour inconditionnel, pour tes prières, pour tes nombreuses petites surprises concoctées à chaque fois que je rentrais me ressourcer en Martinique. Je te remercie du plus profond de mon cœur.

Mamie et marraine, Madame **Léontine DUCLOS**, pour tout ton amour, ta bienveillance, ta gentillesse, pour toutes tes prières, pour toutes les petites choses que tu préparais pour moi afin que je rentre en Guadeloupe avec. Merci Mamie Marraine !

Ma tante, Madame **Jeanne MAIZEROI**, ma tatie Jeanne, saches que tu es en permanence présente dans ma vie. Je n'oublierai jamais ces petites chansons que tu nous chantais lorsque nous étions que nous étions petits « le travail c'est la santé ».

Ma tatie, Madame **Danielle BRENOC**, pour ton passage en Guadeloupe durant lequel tu as pris soin de moi, notamment en me préparant chaque jour un petit déjeuner équilibré comme tu sais si bien le faire. Merci beaucoup tatie !

Madame **Nadine BARCA**, pour vos qualités humaines, votre gentillesse, vos petites attentions de mère, pour vos encouragements, pour toute cette bienveillance qui émane de vous. Je vous remercie pour tous les petits moments que nous avons passés ensemble qui m'auront fait beaucoup de bien durant ma thèse. Je vous remercie de tout mon cœur.

Madame **Augustine BARCA**, pour votre gentillesse, votre bienveillance inconditionnelle envers moi, pour vos attentions de grand-mère, pour les nombreuses discussions enrichissantes sur la vie que j'ai pu avoir avec vous. Je vous remercie grandement pour tout ce que vous m'avez apporté.

Mon tonton, Monsieur **Jean-Pierre MAIZEROI**, pour ses petits coups de fil, pour ses petites pensées qui me remplissent chaque fois de bonheur.

Mes cousins et cousines et plus particulièrement Madame **Sabrina RAMDANI**, Madame **Nadia LINDOR** et Monsieur **Etienne LINDOR**, pour leurs petites pensées, pour leurs appels vidéo, pour leurs petits messages de soutien et d'encouragement.

Mon amie et Docteur **Léïla CABRERA**, fidèle binôme avec qui j'ai partagé tout mon cursus universitaire. Je me souviens de nos soirées à travailler en Licence et en Master, de nos nuits blanches à stresser, à se dire que l'on ne terminera jamais. Je me souviens qu'à cette époque l'idée de faire une thèse était pour nous inimaginable. Je te remercie d'avoir été aussi présente pour moi jusqu'à aujourd'hui.

Le Docteur **Véronique THIMON-CALLIER**, maître de conférences à l'université des Antilles pôle Martinique, qui m'a beaucoup apporté durant mes années de licence, véritable modèle d'exigence, de rigueur. Je n'oublierai jamais vos petits messages de soutien et d'encouragement qui m'ont boostés plus d'une fois durant ces années de thèse.

Table des matières

Remerciements	4
Abréviations	13
A - Revue de la littérature	17
Les plaquettes	18
I – Des mégacaryocytes aux plaquettes	19
A) Mégacaryocytopoïèse	19
(1) Phase de prolifération	19
(2) Phase d'endomitose	20
B) Thrombopoïèse	22
(1) Formation des proplaquettes	22
(2) Libération des plaquettes	23
(3) Régulation de la Mégacaryocytopoïèse	24
C) Les plaquettes	26
(1) Structure des plaquettes	27
(2) Récepteurs plaquettaires membranaires	29
II – Activation et rôle physiologique des plaquettes	40
A) Rôle des plaquettes dans l'hémostase	40
(1) Hémostase primaire	40
(2) Hémostase secondaire	42
B) Rôle des plaquettes dans l'inflammation et dans l'immunité innée	43
(1) Implication dans l'inflammation	43
(2) Reconnaissance des agents pathogènes et des DAMPs	45
C) Autres rôles des plaquettes	47
L'inflammasome NLRP3	48
I – Les inflammasomes	49
A) NLRA	50
B) NLRB	50
C) NLRC	50
D) NLRP	50
II - Mécanisme d'activation et de régulation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules	52
A) Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules nucléées	52
(1) Signal 1 : Priming	52
(2) Signal 2 : Activation	53
B) Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les plaquettes	56
C) Bruton Tyrosine Kinase (BTK) : régulateur de l'inflammasome NLRP3	57

D) Ibrutinib	61
La drépanocytose	63
I – Historique et épidémiologie	64
A) Découverte et évolution de la connaissance sur la maladie	64
B) Distribution géographique et données épidémiologiques	65
(1) Drépanocytose et paludisme	65
(2) Dans le monde	66
(3) France métropolitaine et aux Antilles	66
II – La drépanocytose : une hémoglobinopathie	67
A) L'hémoglobine	67
(1) Structure et fonction de l'hémoglobine	67
(2) Localisation et expression des gènes globines	67
B) Les hémoglobinopathies	69
C) Les syndromes drépanocytaires	69
III – Une physiopathologie complexe impliquant différents types cellulaires	71
A) Polymérisation de l'hémoglobine S et conséquences	71
(1) Polymérisation et caractéristiques de l'Hémoglobine S	71
(2) Conséquences de la polymérisation : Altération des érythrocytes	72
B) Adhérence des érythrocytes et des leucocytes à l'endothélium vasculaire	75
(1) Adhérence des érythrocytes	75
(2) Adhérence des leucocytes	76
C) Intervention des plaquettes	78
(1) Activation plaquettaire	78
(2) Interactions des plaquettes avec l'endothélium et les cellules circulantes	80
(3) Inflammation et thrombose	81
(4) Les microparticules	84
IV – Les manifestations cliniques	85
A) Sous-phénotypes drépanocytaires	86
(1) Sous-phénotype hypervisqueux/vaso-occlusif	86
(2) Sous phénotype hyperhémolytique/vasculopathie	86
B) Complications cliniques	87
(1) Anémie hémolytique	87
(2) Crise vaso-occlusive	87
(3) Syndrome thoracique aigu	88
(4) Ostéonécrose	88
(5) Accidents vasculaires cérébraux	88
(6) Hypertension artérielle pulmonaire	89
V – Stratégies thérapeutiques	89
A) Traitements préventifs	89
(1) Hydroxycarbamide	89
(2) Crizanlizumab	91
(3) Prasugrel : traitement ciblant les plaquettes	91
(4) Voxelotor	93
	10

(5) Autres traitements	93
B) Traitements curatifs	94
La COVID-19	95
I – Emergence du SARS-CoV-2 dans le monde	96
A) Historique de l'épidémie	96
B) Origine et transmission du SARS-CoV-2	97
II – Structure et réplication du SARS-CoV-2	98
A) Les coronavirus	98
B) Le SARS-CoV-2	98
C) Réplication virale	100
(1) Attachement et entrée du virus dans la cellule hôte	100
(2) Traduction du gène réplicase de l'ARN viral et protéolyse	101
(3) Réplication du génome viral	101
(4) Traduction des protéines structurales et accessoires	101
(5) L'assemblage et la libération de virions	101
III – Symptômes cliniques et complications	102
IV – Activation des plaquettes et activation d'autres types cellulaires	105
A) Les plaquettes	105
B) Les plaquettes et l'endothélium vasculaire	106
B – Objectifs	108
C – Matériels et méthodes	112
I – Patients inclus	113
A) Etude DréPlaquette	113
(1) Critères d'inclusions	113
(2) Critères de non inclusion	113
B) Etude PlaqCOVID	113
(1) Critères d'inclusion	113
(2) Critères de non inclusion	114
II – Méthodes	114
A) Isolation, lavage et lyse des plaquettes	114
B) Western-blots	115
C) Phénotypage des plaquettes	115
D) Caractérisation des agrégats plaquettes-neutrophiles	116
E) Analyses plasmatiques des patients Covid-19	116
F) Stimulation des plaquettes <i>in vitro</i> avec du plasma de patients Covid	116
G) Analyses statistiques	117
D – Résultats	118

Article 1 :	119
Activation de la caspase-1 plaquettaire et surexpression de la P-sélectine chez les patients drépanocytaires : une implication de l'inflammasome NLRP3 ?	119
Article 2 :	147
L'activation de la caspase-1 plaquettaire et de la BTK chez les patients atteints de COVID-19 est associée à la gravité de la maladie et inhibée in vitro par l'ibrutinib	147
E – Discussion générale et perspectives	161
F – Références	170

Abréviations

A

ACE2 : Angiotensin-converting enzyme 2

ADNm : ADN mitochondrial

ADP : Adénosine diphosphate

AFDPHE : Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant

AKT : Protéine Kinase B

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

B

BFU-MK : Unité formant des groupes mégacaryocytaires

BIR : Baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat

BMX : Bone-marrow tyrosine kinase gene on chromosome X

BTK : Bruton tyrosine kinase

C

CARD : Caspase activation and recruitment domain

CFU-MK : Unité formant des colonies mégacaryocytaires

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

COVID-19 : Coronavirus disease-19

CoVs : Coronavirus

CVO : Crise Vaso-Occlusive

D

DAG : Diacylglycérol

DAMPs : Damage associated molecular patterns

DMS : Système de membrane de démarcation

E, F, G

EMA : European Medicines Agency

ESL-1 : E selectin ligand-1

FBN : Fibronectin

FDA : Food and Drug Administration

GPIb : Glycoprotein Ib

GPIIb/IIIa : Glycoprotein IIb/IIIa

GPVI : Glycoprotein VI

GPIX : Glycoprotein IX

GR : Globule rouge

H, I, L

Hb : Hemoglobin

HbA : Hemoglobin adult normal

HbF : Hemoglobin fetal

HbS : Hemoglobin S

HMGB1 : High mobility group box 1

HPP-CFU-MK : Unit forming colonies megakaryocytic with high proliferative potential

HPPC-CFC : Cell forming colonies of cells with high proliferative potential

HSC : Hematopoietic stem cell

HTAP : Hypertension arterial pulmonary

HU : Hydroxyurea

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1

IL : Interleukin

IP3 : Inositol triphosphate

ITK : Interleukin-2 inducible T-cell kinase

LPS : Lipopolysaccharide

M, N

MERS-CoV : Middle east respiratory syndrome coronavirus

MK : Mégacaryocyte

MP : Microparticule

NETs : Pièges extracellulaires des neutrophiles

NLRs : Nucleotide-binding domain leucin-rich repeats containing receptors

NO : Monoxyde d'azote

NOD : Nucleotide-binding oligomerization domain containing

P

PAMPs : Pathogen associated molecular patterns

PAR : Protease-Activated Receptors

PF4 : Facteur plaquettaire 4

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKC : Protéine kinase C

PKG : Protéine kinase G

PLC β : Phospholipase C β

PLC γ 2 : Phospholipase C γ 2

PLT : Plaquette

PS : Phosphatidylsérine

PSGL-1 : P selectine glycoprotéine ligand-1

PYD : Domaine pyrine

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

R

RLK : Resting lymphocyte kinase

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

ROSm : Espèce réactives de l'oxygène provenant des mitochondries

S

SARS-CoV-2 : Severe acute respiratory syndrome coronaVirus-2

SCF : Facteur de croissance des cellules souches

SCO : Système caniculaire ouvert

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

STA : Syndrome thoracique aigu

T

TEC : Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma

TF : Facteur tissulaire

TFKs : Famille des kinases Tec

TLRs : Toll like récepteurs

TMPRSS-2 : Transmembrane serine protease 2

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

TPO : Thrombopoïétine

TSP : Thrombopsomdine

V

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

VLA-4 : Very late antigen-4

vWF : Facteur von Willebrand

A - Revue de la littérature

Les plaquettes

I – Des mégacaryocytes aux plaquettes

La mégacaryocytopoïèse et la thrombopoïèse sont les deux processus physiologiques successifs conduisant à la production des plaquettes (PLTs) sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes situées dans la moelle osseuse.

A) Mégacaryocytopoïèse

La mégacaryocytopoïèse (Figure 1) est le processus permettant l'engagement de la cellule souche vers le lignage mégacaryocytaire entraînant la prolifération et la différenciation des progéniteurs mégacaryocytaires. Cependant, la différenciation mégacaryocytaire est particulière puisqu'elle comprend, en plus de la phase de prolifération classique des progéniteurs, une phase de polyploïdisation visant à augmenter la taille du cytoplasme en vue de la formation des plaquettes.

Chez l'adulte, la mégacaryocytopoïèse se déroule essentiellement dans la moelle osseuse, mais il semblerait que le poumon et plus particulièrement les espaces extravasculaires pulmonaires soient aussi un des sièges de la mégacaryocytopoïèse. En effet, une récente étude menée chez la souris montre que l'hématopoïèse se déroule dans les poumons et que cette dernière conduit à la production de mégacaryocytes (Lefrançais *et al.* 2017).

Dans la littérature, la présence des mégacaryocytes au niveau des poumons chez l'homme est évoquée depuis plus d'une centaine d'années avec l'étude d'Aschoff en 1893, suggérant depuis ces années un rôle des poumons dans la mégacaryocytopoïèse (Aschoff 1893).

Toutes ces notions et découvertes seront développées dans les paragraphes suivants.

(1) Phase de prolifération

Au cours de la phase de prolifération, les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes s'engagent dans la différenciation mégacaryocytaire et donnent naissance aux progéniteurs BFU-MK (Burst Forming Unit megakaryocytic cells). Ces cellules ont une grande aptitude à proliférer et donnent naissance aux CFU-MK qui sont des progéniteurs mégacaryocytaires plus tardifs avec une faible capacité de prolifération. Les cellules BFU-MK et CFU-MK expriment à leur surface des marqueurs comme le CD34 caractéristique des cellules progénitrices immatures. Les progéniteurs CFU-MK sont distinguables des BFU-MK par leur forte expression du marqueur HLA-DR et par

l'expression progressive de l'intégrine GPIIb/IIIa (CD41), premier marqueur spécifique des plaquettes exprimé au cours de la différenciation (Chang *et al.* 2007).

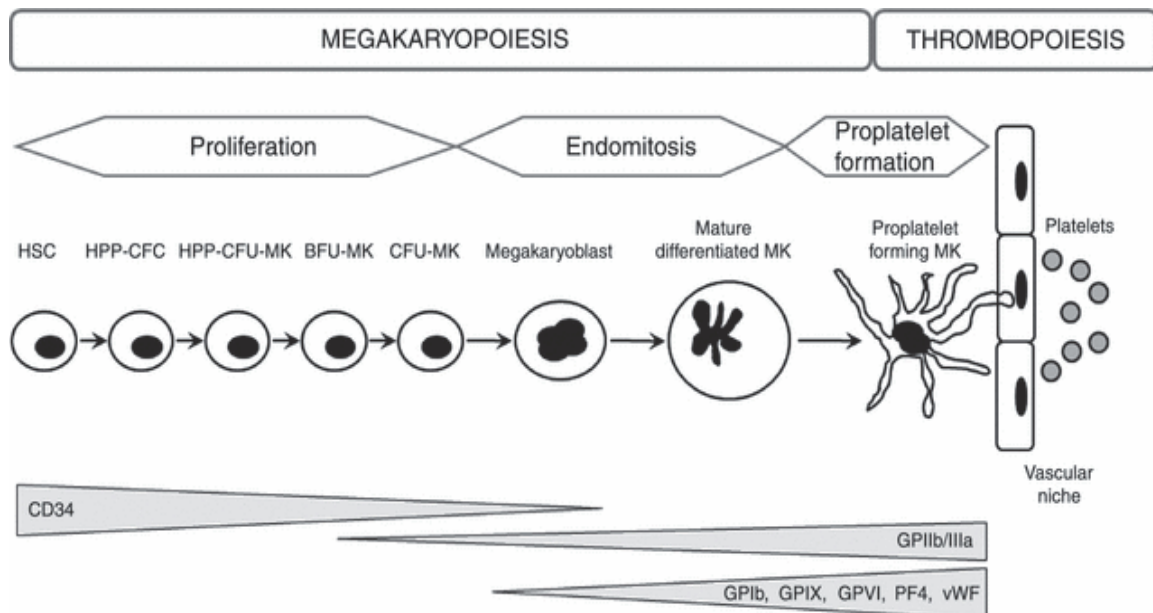


Figure 1. Mégacaryocytopoïèse et formation des plaquettes (Séverin *et al.* 2010). HSC (cellule souche hématopoïétique), HPPC-CFC (cellule formant des colonies de cellules à potentiel prolifératif élevé), HPP-CFU-MK (Unité formant des colonies mégacaryocytaires à potentiel prolifératif élevé), BFU-MK (Unité formant des groupes mégacaryocytaires), CFU-MK (Unité formant des colonies mégacaryocytaires), CD34 (Glycoprotéine transmembranaire exprimée par les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques), GPIIb/IIIa (Glycoprotéine IIb/IIIa), GPIb (Glycoprotéine Ib), GPIX (Glycoprotéine IX), GPVI (Glycoprotéine VI), PF4 (Facteur plaquettaire 4), vWF (Facteur von Willebrand).

(2) Phase d'endomitose

Suite à l'étape de prolifération, les progéniteurs immatures CFU-MK se différencient en promégacaryoblastes, premières cellules morphologiquement identifiables avec un noyau réniforme. C'est à ce stade que débute le processus d'endomitose, au cours duquel les cellules accroissent leur contenu en ADN, entrent en mitose mais ne font pas de cytokinèse ni de karyocynèse (Geddis *et al.* 2007; Lordier *et al.* 2008). A la fin de ce cycle, le noyau de ces cellules devient tétraploïde (Figure 2) donnant naissance aux mégacaryoblastes ou mégacaryocytes de stade I (15 à 50 μ m de diamètre). Au stade promégacaryocytes, ou mégacaryocytes de stade II, (20 à 80 μ m de diamètre), la ploïdie est maximale et marque la fin de la phase d'endomitose. Chez

l'homme, la moitié des mégacaryocytes ont une ploïdie de 16N mais certaines cellules peuvent atteindre une ploïdie de 128N (Deutsch et Tomer 2006).

Au cours de ce processus d'endomitose, les cellules vont progressivement perdre le CD34 et exprimer d'autres marqueurs de surface que la GPIIb/IIIa, à savoir la GPIb (CD42b), la GPVI, la GPXI (CD42a) ainsi que des marqueurs intracellulaires (PF4, facteur vWF) contenues dans les granules alpha (Figure 1) (Chang *et al.* 2007; Séverin *et al.* 2010).

Après les endomitoses, les promégacaryocytes vont subir une phase de maturation durant environ 8 jours (Cramer-Bordé 2008), au cours de laquelle vont s'accumuler progressivement dans le cytoplasme les protéines, les granules, les organites, les membranes de démarcation. Les cellules atteignent alors un diamètre de 50 à 100 μm (Italiano *et al.* 2013).

A la fin de cette étape de maturation, les mégacaryocytes commencent à émettre de longs pseudopodes appelés proplaquettes : c'est la thrombopoïèse.

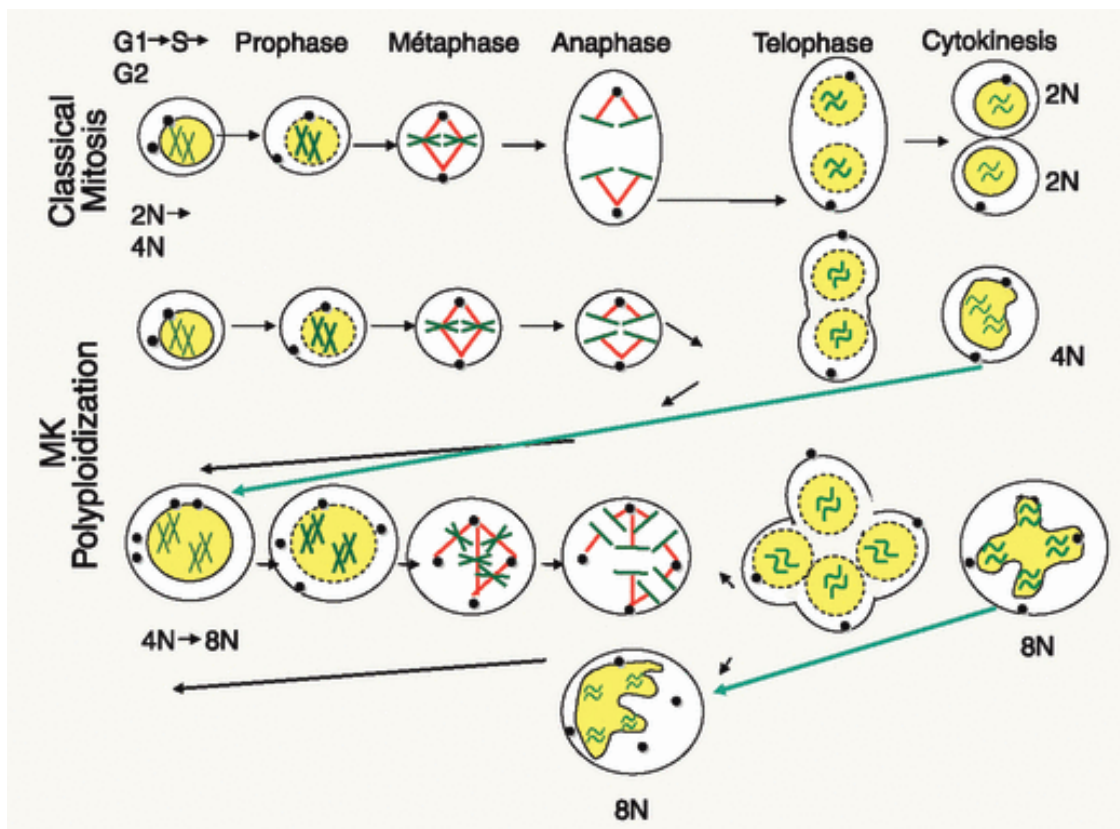


Figure 2. Processus d'endomitose (Chang *et al.* 2007)

B) Thrombopoïèse

La thrombopoïèse est le processus correspondant à la formation et à la libération des plaquettes dans la circulation sanguine à partir des MKs matures.

(1) Formation des proplaquettes

Wright, en 1906, est le premier à proposer la théorie selon laquelle les plaquettes proviendraient du détachement des extensions de MKs matures (Wright 1906).

Par la suite, le concept de proplaquettes a commencé à émerger avec l'étude de Thiery et Bessis, suite à l'observation *in vitro* par cinématographie de l'élongation de proplaquettes (Thiery et Bessis 1956).

Ces proplaquettes sont définies comme étant de longues extensions cytoplasmiques, minces émanant des mégacaryocytes, possédant de multiples gonflements faisant la taille de plaquettes et reliées entre elles par de minces ponts cytoplasmiques.

Les microtubules ainsi que le système de membrane de démarcation (DMS) sont connus pour jouer un rôle clef dans le processus de formation des proplaquettes. En effet, en 1982, Radley *et al.* fournissaient la preuve que l'utilisation d'agent de dépolymérisation des microtubules, entraînait une rétractation des pseudopodes avec un épaissement de ces derniers et la réapparition du DMS (Radley *et al.* 1982).

Ce processus d'élongation a par la suite été étudié plus en détails mettant en évidence plusieurs mécanismes (Figure 3). L'extension des proplaquettes s'effectue par polymérisation des microtubules par ajout de dimères de tubuline libres et formation de nouveaux microtubules. L'allongement de ces dernières dépendant également du glissement des microtubules les uns par rapport aux autres (Italiano *et al.* 1999; Patel *et al.* 2005). Ces derniers vont également jouer un rôle essentiel dans le transport bidirectionnel des organites et des granules dans les proplaquettes jusqu'à ce qu'ils soient capturés aux extrémités des proplaquettes (Italiano *et al.* 1999; Patel *et al.* 2005).

Durant le processus d'allongement, les proplaquettes se plient, se ramifient et forment de nouvelles extensions par un mécanisme dépendant de l'actine (Italiano *et al.* 1999). La découverte de « bobines » de microtubules au niveau des extrémités des proplaquettes similaires à celles

retrouvées dans les plaquettes suggère que celles-ci proviendraient des extrémités des proplaquettes (Italiano *et al.* 1999; Thon *et al.* 2010).

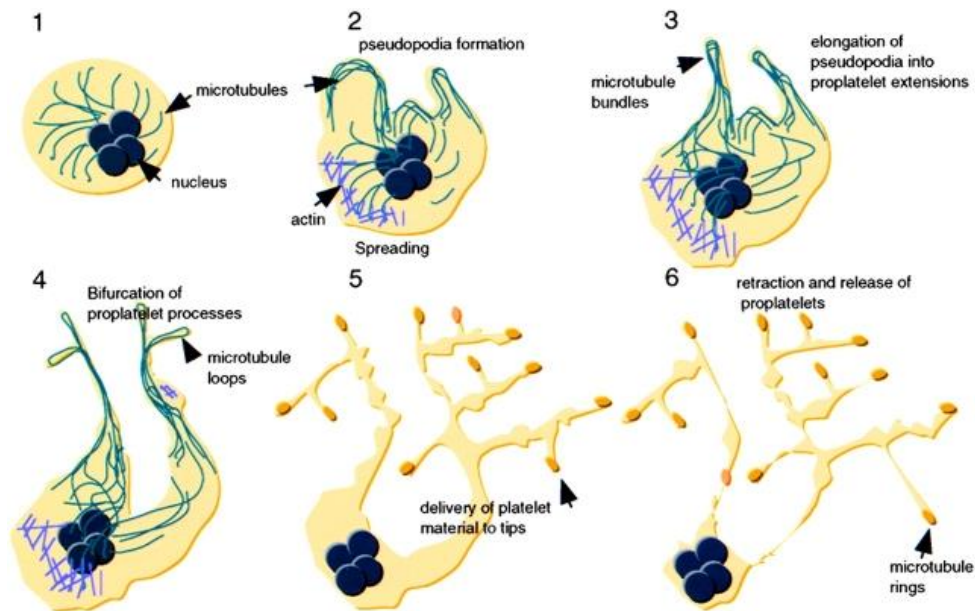


Figure 3. Modèle de formation des proplaquettes (Italiano *et al.* 1999). (1) Après les étapes de prolifération, d'endomitose et de maturation du cytoplasme, les mégacaryocytes matures (2) débutent leur étape de remodelage du cytoplasme caractérisée par l'apparition de pseudopodes épais contenant des microtubules en dessous de la membrane. (3) Les pseudopodes s'allongent et forment progressivement des proplaquettes renfermant un réseau de plus en plus organisé de microtubules avec la formation de boucles aux extrémités distales. (4) Les proplaquettes se plient, se ramifient et forment de nouvelles extensions. (5) Des renflements apparaissent donnant aux proplaquettes un aspect en collier de perles. (6) Les proplaquettes sont libérées après rétractation par la suite, elles vont subir des fragmentations supplémentaires pour donner des plaquettes individuelles.

(2) Libération des plaquettes

La libération des plaquettes passe par le relargage de fragments nommés « pré-plaquettes » dans la circulation sanguine (Thon, 2010) suite à l'émission des proplaquettes à travers les sinusoides médullaires. Si la moelle osseuse est bien connue comme étant impliquée dans la thrombopoïèse, les études montrent que les poumons interviendraient également dans la formation des plaquettes. En effet, selon Lefrançais et ses collaborateurs, les MKs de la moelle migreraient au niveau des poumons et libèreraient les plaquettes dans la circulation pulmonaire. D'après cette étude réalisée chez la souris, 50 % des plaquettes seraient produites au niveau des

poumons (Lefrançois *et al.* 2017). Cette étude est en accord avec celle de 1969 montrant des quantités plus importantes de plaquettes en aval de la circulation pulmonaire (Kallinikos-Maniatis 1969).

Dans la circulation sanguine, le relargage des proplaquettes serait possible grâce aux contraintes de cisaillement appliqué par le flux sur les MKs matures (Junt *et al.* 2007). Le passage de la structure pré-plaquettaire aux plaquettes dépend de la torsion de microtubules (Figure 4). Les préplaquettes contiennent à chacune de leurs extrémités des bobines de microtubules donnant aux préplaquettes une forme d'haltère. Les forces de cisaillement appliquées sur cette structure conduisent à la scission des préplaquettes en deux plaquettes (Thon *et al.* 2010).

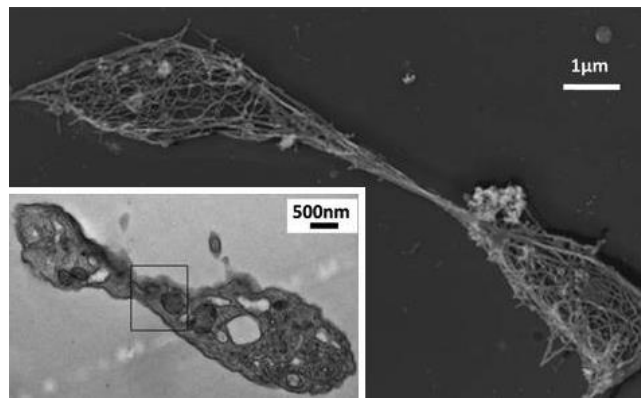


Figure 4. Processus de torsion des microtubules (Thon *et al.* 2010)

(3) Régulation de la Mégacaryocytopoïèse

Le développement de la lignée mégacaryocytaires s'effectue principalement sous l'action de la thrombopoïétine (TPO), mais aussi de cytokines comme l'IL-3, l'IL-6, l'IL-11, de facteurs de croissance comme le SCF (Stem Cell Factor) et de facteurs de transcription tel que GATA-1, FLI-1, GFI-1b, NF-E2. Dans cette partie, seuls les facteurs exogènes impliqués dans cette régulation seront discutés ci-dessous.

a) La thrombopoïétine : TPO

La thrombopoïétine (TPO), également appelée ligand c-Mpl, est connue depuis plusieurs années pour être le principal régulateur du développement des mégacaryocytes par son interaction avec son récepteur c-MPL (myeloproliferative leukemia protein) (Bartley *et al.* 1994).

La TPO joue un rôle fondamental dans chacune des étapes de la mégacaryocytopoïèse. Sa découverte a permis d'améliorer considérablement la compréhension de la mégacaryocytopoïèse et de la thrombopoïèse grâce à la mise au point de systèmes de culture de mégacaryocytes *in vitro*.

Cette hormone est à la fois impliquée dans l'autorenouvellement des cellules souches, dans la prolifération des progéniteurs immatures, dans la maturation cytoplasmique et l'expression de protéines plaquettaires, dans l'augmentation de la production des plaquettes par l'augmentation du nombre de progéniteurs MKs et du nombre de MKs (Kaushansky 2005).

Chez l'individu adulte, cette hormone est essentiellement synthétisée par les hépatocytes. La détection d'ARNm TPO dans les cellules tubulaires des tubules contournés proximaux du rein, les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules de la rate suggère que ces cellules sont aussi capables de produire de la thrombopoïétine (Sungaran *et al.* 1997).

b) Les interleukines 3, 6 et 11

Trois interleukines en plus de la TPO interviennent durant la mégacaryocytopoïèse : IL-3, IL-6 et IL-11. L'interleukine-3 (IL-3) est principalement impliquée dans les phases précoces du développement des mégacaryocytes de part sa capacité à favoriser la prolifération de colonies à partir des BFU-MKs en agissant en synergie avec l'IL-1 α (Briddell *et al.* 1990). L'IL-3 mais aussi l'IL-6 sont connues pour stimuler la production de plaquettes *in vivo* (Carrington *et al.* 1991). Des études montrent que l'IL-6 est également un puissant facteur de croissance favorisant la maturation cytoplasmique des MKs avec l'augmentation de la taille et de la ploïdie des cellules (Ishibashi *et al.* 1989; Kimura *et al.* 1990; Tajika *et al.* 1998). L'IL-9 quant à elle, stimule la formation des plaquettes (Xiao *et al.* 2017).

c) Le facteur de croissance des cellules souches : SCF

Le facteur de croissance des cellules souches (SCF) tout comme l'IL-6 agit durant les stades précoces de la mégacaryocytopoïèse (Debili *et al.* 1993). En effet, de nombreuses études montrent que le SCF favorise la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires primitifs (Erickson-Miller *et al.* 1993; Imai *et al.* 1994). Le SCF agirait également au cours des stades tardifs du développement des MKs mais uniquement en amplifiant l'activité des cytokines comme l'IL-6

et l'IL-3, permettant ainsi une augmentation de la polypléidie et une amélioration de l'étape de maturation des MKs (Debili *et al.* 1993).

C) Les plaquettes

Les plaquettes ou thrombocytes sont de petites cellules anucléées de forme biconvexe de 2 à 5 μM de diamètre (Figure 5A) dont le volume moyen varie entre 7 et 11 femtolitres. Ces cellules circulent dans la circulation sanguine à raison de 150 à 400 $\times 10^9/\text{L}$. L'homme produit environ 1×10^{11} plaquettes par jour (Chang *et al.* 2007) avec une durée de vie d'environ 7 à 10 jours (Cramer-Bordé 2008). Les plaquettes les plus âgées sont éliminées par phagocytose dans la rate. Lorsqu'elles sont activées, ces dernières prennent une forme sphérique et émettent de longs pseudopodes (Figure 5B).

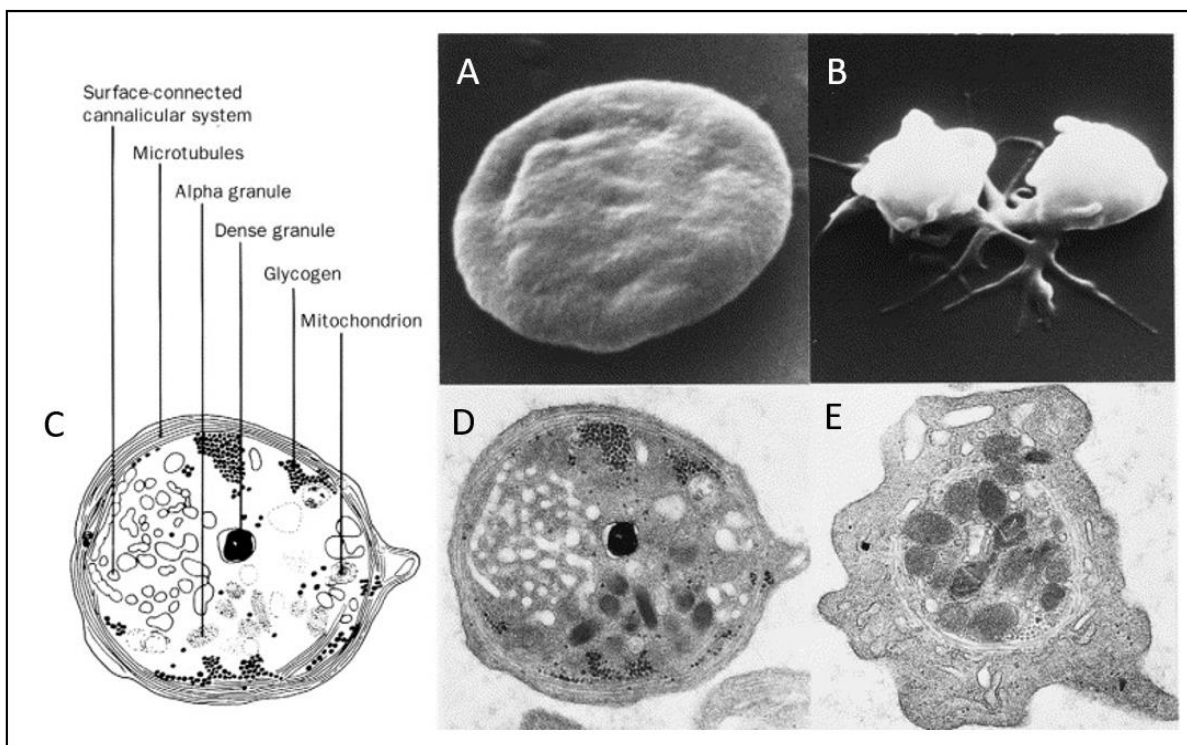


Figure 5. Photographie en microscopie électronique de plaquettes (George 2000). Micrographies (A) d'une plaquette au repos et (B) de plaquettes activées en microscopie électronique à balayage. (C) Représentation schématique en coupe transversale d'une plaquette au repos. Micrographies (D) d'une plaquette au repos et (E) d'une plaquette activée en microscopie électronique à transmission.

(1) Structure des plaquettes

Les plaquettes comme toutes les cellules présentent une membrane plasmique, un cytosquelette fonctionnel et un grand nombre d'organites comme les granules sécrétoires indispensables au bon fonctionnement des plaquettes.

a) Membrane plasmique

La membrane plasmique des plaquettes est composée d'une bicouche phospholipidique dans laquelle s'intercalent du cholestérol, des glycolipides, des glycoprotéines, des radeaux lipidiques ainsi que des canaux ioniques.

Lorsque les plaquettes sont au repos, les phospholipides sont disposés de manière asymétrique. La phosphatidylsérine (PS) à ce moment-là, est principalement retrouvée au niveau du feuillet membranaire interne sous l'action d'une scramblase. Lors de l'activation des plaquettes, la PS est exposée du côté externe de la membrane sous l'action de floppases. Cette exposition de la PS confère à la membrane la capacité de se lier à différents facteurs de coagulation et d'initier la réaction de coagulation (Lentz 2003).

b) Système caniculaire ouvert (SCO)

Le système caniculaire ouvert (SCO), est formé par invagination de la membrane plasmique des plaquettes. Ce système, de composition similaire à la membrane plasmique permet l'augmentation de la surface de contact des plaquettes et l'exposition d'un nombre plus important de glycoprotéines lors de leur activation.

Ce système est aussi impliqué dans les mécanismes de transport de nombreuses molécules de l'intérieur vers l'extérieur des plaquettes, par fusion des granules (α et denses) avec le SCO conduisant à leur libération et à l'amplification du processus d'activation plaquettaire, mais aussi de l'extérieur vers l'intérieur par absorption de certaines molécules plasmatiques (fibrinogène, facteur tissulaire) qui sont ensuite stockées dans les granules (White 2013; Selvadurai *et al.* 2018).

c) Cytoplasme

Le cytoplasme des plaquettes renferme des mitochondries, différents types de granules, des lysosomes, du glycogène, un système tubulaire dense (Figure 5C, D, E), ainsi que tout le matériel

nécessaire à la traduction à savoir des ARNm provenant des mégacaryocytes, des ribosomes et un réticulum endoplasmique granuleux.

d) Granules et Lysosomes

Les granules denses (δ), les granules α et les lysosomes sont de petites vésicules contenant de nombreuses molécules bioactives impliquées dans l'adhésion cellulaire, l'hémostase, l'activation plaquettaire, l'agrégation et dans la dégradation de molécules.

Granules α

Les granules α sont les plus abondantes (50 à 80 par PLT), elles sont volumineuses, de forme sphérique et mesurent 200 à 500 nm de diamètre. Leur contenu est acquis à la fois par la synthèse de protéines endogènes et par endocytose de protéines plasmatiques. Ces granules contiennent principalement des facteurs de croissances (VEGF, EGF, PDGF), des protéines d'adhésion (fibrinogène, facteur von Willebrand, thrombospondine, fibronectine), des facteurs de coagulation (facteur V), des chimiokines (Facteur plaquettaire 4, β -thromboglobuline), des immunoglobulines, des inhibiteurs de protéases et des protéines membranaires essentielles à la fonction plaquettaire comme l'intégrine α IIb β 3, la P-sélectine (CD62P) et le CD36 (Cramer-Bordé 2008; Rivera *et al.* 2009).

Granules denses

Les granules denses ou granules δ sont de petites vésicules de 250 nm présentes en faible nombre dans les plaquettes (3 à 5 par PLT). Ce type de granule est riche en nucléotides (ADP, ATP), calcium, sérotonine, catécholamines, histamine et en pyrophosphate (Rivera *et al.* 2009). Lors de l'activation des plaquettes, la sécrétion du contenu de ces granules renforce l'agrégation plaquettaire et les réactions de coagulation à la surface des plaquettes (George 2000).

Lysosomes

Les lysosomes plaquettaires contiennent des enzymes impliquées dans la dégradation des protéines (cathepsines D et E, élastase, collagénase, carboxypeptidase A et B, proline carboxypeptidase), des glucides (glucosidase, fucosidase, galactosidase etc.) et des lipides (phosphatases acides). Ces vésicules expriment principalement à leur surface le CD63, LAMP1 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1) et LAMP2 (Heijnen *et al.* 2015).

e) Le cytosquelette

La forme discoïde des plaquettes au repos est maintenue grâce au cytosquelette. Celui-ci est constitué principalement de microtubules et de microfilaments d'actine. Le changement de forme des plaquettes, l'émission et la stabilisation des pseudopodes est possible grâce au remodelage du cytosquelette avec l'assemblage de nouveaux filaments d'actine (J. G. White 1969). En plus de son implication dans l'architecture des plaquettes, ce dernier, par sa contraction, faciliterait la libération des granules en favorisant l'interaction des granules entre eux ainsi qu'avec les membranes du SCO (Flaumenhaft *et al.* 2005).

(2) Récepteurs plaquettaires membranaires

Les plaquettes présentent à leur surface de nombreux types de récepteurs tels que les intégrines, les récepteurs LRR (Leucine-Rich Repeat), les récepteurs couplés aux protéines G, les Immunoglobulines, les récepteurs lectines de type C essentiels aux mécanismes d'hémostase, d'agrégation, d'inflammation, de défense de l'hôte notamment contre les virus, les bactéries, les parasites etc. (Figure 6)

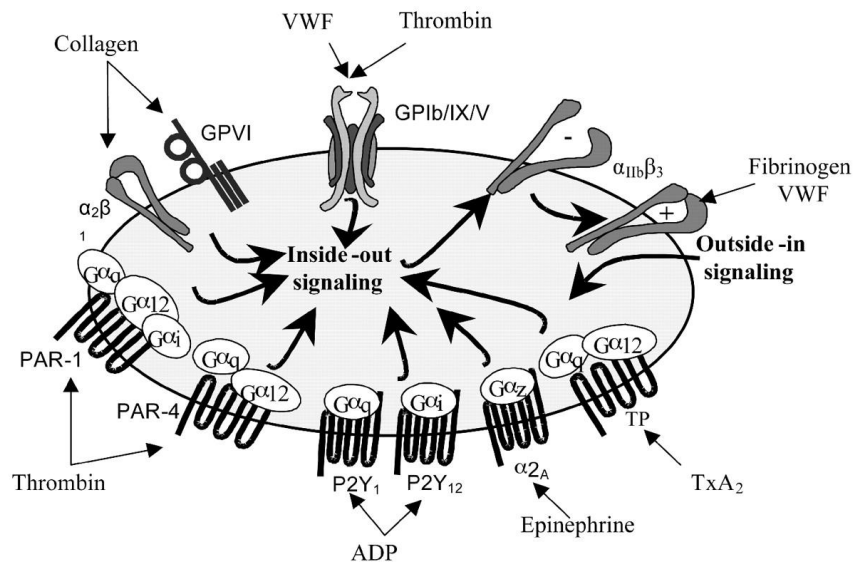


Figure 6. Principaux récepteurs membranaires des plaquettes (Rivera *et al.* 2009)

a) Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranes impliquées principalement dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. Ces protéines sont constituées de deux sous-unités hétérodimériques α et β liées entre elles de manière non-covalente.

Les plaquettes expriment six intégrines différentes à leur surface ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$). Les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$ étant les plus exprimées à la surface des plaquettes et les plus étudiées, celles-ci seront présentées en détails dans les paragraphes suivants.

Intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ aussi appelée glycoprotéine GPIIb/IIIa (Figure 7) est la protéine la plus présente à la surface des plaquettes avec un nombre de récepteurs compris entre 40000 à 80000 par plaquette (Rivera *et al.* 2009).

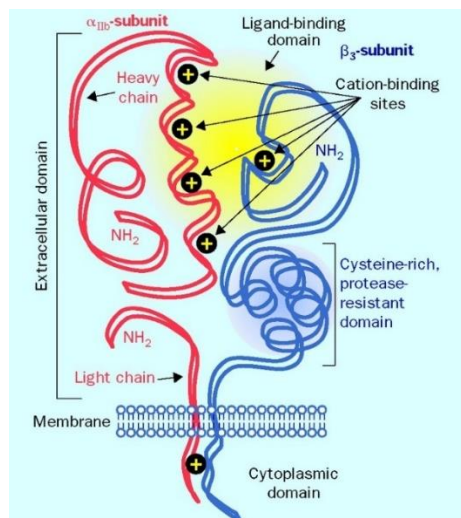


Figure 7. Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Topol *et al.* 1999)

Cette intégrine possède une sous-unité α_{IIb} composée de 1 008 acides aminés (aa) et une sous-unité β_3 contenant 762 acides aminés. Chacune de ces sous-unités possède un grand domaine extracellulaire, une région transmembranaire et une petite queue cytoplasmique (Topol *et al.* 1999). Du côté extracellulaire, ces deux sous-unités forment une poche contenant de nombreux sites de liaison de cations divalents permettant la liaison de ligands tels que le fibrinogène, la fibronectine, la thrombospondine et le facteur von Willebrand (vWF). Du côté intracellulaire, les queues cytoplasmiques des protéines α_{IIb} et β_3 forment aussi un domaine de

liaison au ligand (Topol *et al.* 1999). Les queues cytoplasmiques α IIb et β 3 interagissent avec des protéines du cytosquelette (taline, myosine, filamine, α -actine) et des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire comme les kinases (Src, Syk etc.).

Lorsque les plaquettes sont au repos, l'intégrine α IIb β 3 est sous forme inactive, incapable d'interagir avec ses ligands. Son passage de la forme inactive à une forme active de haute affinité pour ses ligands a lieu lorsque d'autres récepteurs plaquettaires interagissent avec des agonistes tel que le vWF, la thrombine et le collagène. Ces interactions provoquent le déclenchement d'une cascade de réactions intracellulaires à l'origine de l'activation des plaquettes et du changement de conformation de la GPIIb/IIIa lui permettant alors de se lier au fibrinogène, au vWF mais aussi à la fibronectine et à la thrombospondine (George 2000), (Figure 6).

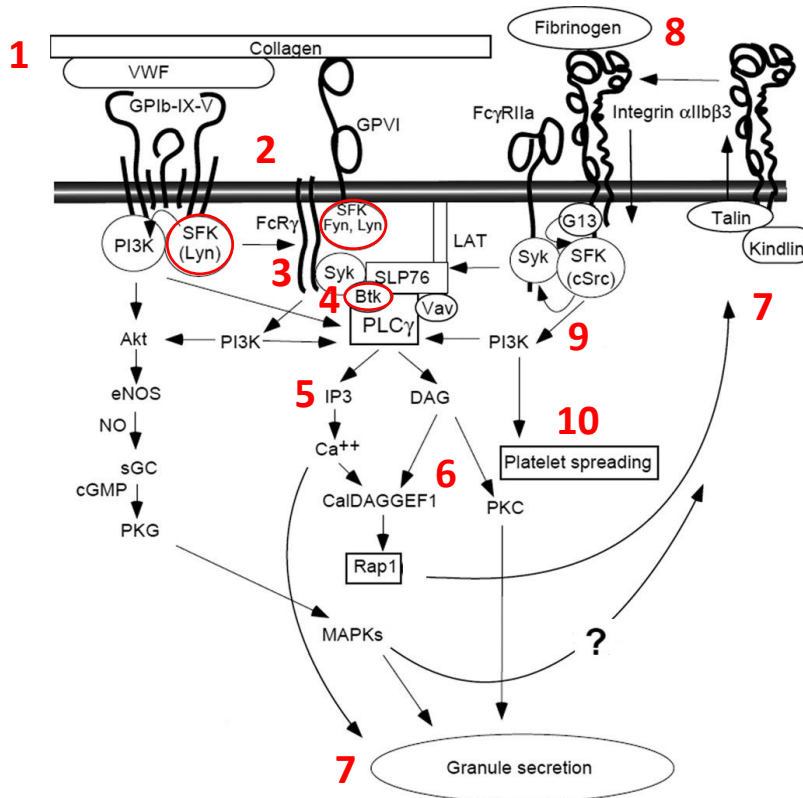


Figure 8. Signalisation des principaux récepteurs de l'adhésion plaquettaire (d'après Li *et al.* 2010). Au niveau de la brèche vasculaire, le vWF et le collagène sont exposés. Sous l'augmentation des forces de cisaillement dues au flux sanguin, le vWF passe de sa forme globulaire à sa forme linéaire permettant l'adhésion initiale des plaquettes. Au niveau intracellulaire, (1) l'interaction du vWF et du collagène avec la GPIb et la GPVI respectivement (2) induit un signal conduisant à l'activation de kinases de la famille Src (Fyn, Lyn). L'activation de ces kinases conduit (3) à la phosphorylation du motif ITAM du FcRγ et aboutit au recrutement puis à l'activation de la tyrosine

kinase Syk par autophosphorylation. (4) L'activation de la BTK médiée par Syk conduit à l'activation de la PLC γ 2 qui, à son tour, (5) induit la formation d'IP3 (Inositol triphosphate) et de DAG (Diacylglycérol) par hydrolyse de PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). (6) IP3 et DAG vont respectivement entraîner la mobilisation des réserves intracellulaires de Ca²⁺ et l'activation de la PKC (Protéine Kinase C), (7) concourant à la sécrétion des granules et à l'activation de la GPIIbIIIa. (8) L'interaction du fibrinogène avec la GPIIbIIIa conduit à (9) l'activation de la kinase cSrc, puis de la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) conduisant à (10) l'étalement des plaquettes et enfin à l'agrégation de ces dernières.

L'interaction du fibrinogène avec la GPIIbIIIa initie le recrutement et l'activation des kinases de la famille Src (SFK), c-Src et Fyn au niveau de la queue cytoplasmique de la sous-unité β_3 (Shen *et al.* 2013; Wu *et al.* 2015). L'activation de ces kinases conduit à une cascade de signalisations aboutissant à la sécrétion de granules et à l'étalement des plaquettes via l'activation de la Phospholipase γ 2 (PLC γ 2) et de la PI3K (Obergfell *et al.* 2002; Wonerow *et al.* 2003; Estevez et Du 2017), (Figure 8).

Intégrine $\alpha_2\beta_1$

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$, aussi appelée GPIa/IIa, est un récepteur au collagène impliqué dans l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale. Les plaquettes présentent à leur surface environ 2000 à 4000 copies de cette intégrine à leur surface (Varga-Szabo *et al.* 2008). Cette intégrine, tout comme l'intégrine $\alpha IIb\beta_3$, nécessite un changement de conformation pour se lier au collagène.

b) Les récepteurs Leucine-Rich Repeat

GPIb-IX-V

La GPIb-IX-V est un complexe glycoprotéique composé de quatre sous-unités différentes à savoir la GPIb α (610 aa), la GPIb β (181 aa), la GP-IX (160 aa) et la GPV (544 aa) chacune caractérisée par un domaine à répétitions riches en leucine. Ces sous-unités sont présentes au niveau du complexe dans les proportions suivantes : 2 GPIb α , 4 GPIb β , 2 GPIX et 1 GPV (Figure 9). La GPIb α est liée à chacune des deux sous-unités GPIb β par un pont disulfure et forme un complexe appelé la GPIb qui interagit de manière non-covalente à la fois avec la GPIX et à la GPV (Andrews *et al.* 2003; Luo *et al.* 2007).

Au repos, les plaquettes expriment approximativement entre 25000 à 30000 copies de ce complexe. Ce récepteur est constitutivement actif et donc capable de se lier spontanément au vWF activé *via* son interaction avec la GPIb α lors d'une lésion vasculaire (Luo *et al.* 2007). Les forces de cisaillement jouent un rôle majeur dans cette interaction. En effet, sous l'augmentation des forces de cisaillement due au flux sanguin, le vWF passe de sa forme globulaire à sa forme linéaire permettant alors l'adhésion initiale des plaquettes par interaction de la GPIb α au vWF puis de la GPVI au collagène. Cette liaison permet d'initier les premières étapes de l'hémostase à savoir le roulement, le ralentissement et l'adhésion des plaquettes qui aboutit *in fine* à l'activation et à l'agrégation des plaquettes (George 2000; Luo *et al.* 2007). Ce complexe est aussi capable de se lier à d'autres protéines comme le collagène, la thrombine et la thrombospondine. Chez l'homme, l'absence ou la perte de fonction de ce complexe est à l'origine du syndrome de Bernard Soulier caractérisé par une macrothrombopénie avec une incapacité des plaquettes à agréger (Stricker *et al.* 1985).

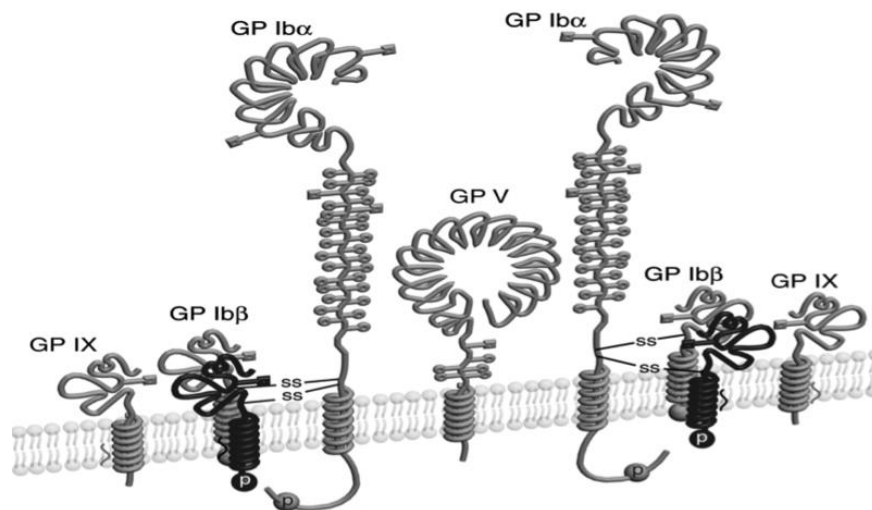


Figure 9. Complexe GPIb-IX-V (Luo *et al.* 2007)

L'activation de la GPIb α par le vWF permet le recrutement des SFK, c-Src et Lyn au niveau de la queue cytoplasmique de la GPIb conduisant à leur activation (Kroll *et al.* 1991; Wu *et al.* 2003). Lyn activée va ensuite médier l'activation de la voie PI3K/AKT (Delaney *et al.* 2012) qui aboutit à l'activation de la protéine kinase G (PKG). La PKG activée déclenche alors l'activation de la voie des MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) qui permet *in fine* l'activation de la GPIIb/IIIa, la

sécrétion de granules et l'agrégation des plaquettes (Li *et al.* 2001; Li *et al.* 2006; Stojanovic *et al.* 2006; Estevez *et al.* 2017). L'activation de la voie MAPKs lors de l'activation de la GPIIb-IX-V contribue à l'activation de la PLA2 et à la synthèse du thromboxane A2 (TXA2) et permet l'amplification de l'activation plaquettaire dépendante de la TXA2 (Estevez *et al.* 2013). Toutes ces voies de signalisation sont présentées à la figure 8.

Récepteurs Toll-Like (TLRs)

Les toll like récepteurs (TLRs) sont des récepteurs qui jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée. En effet, ces derniers interviennent dans la reconnaissance de structures particulières qui peuvent être soit d'origine exogène, on parle alors de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), ou d'origine endogène, on parle alors de DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern). Ces TLRs sont exprimés par les cellules de l'immunité mais également par les cellules non-immunes comme les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules épithéliales (Iwasaki *et al.* 2004). Actuellement, 10 TLRs (TLR1-TLR10) ont été identifiés chez l'homme (Kawasaki *et al.* 2014). Certains sont exprimés à la surface des cellules (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10) et d'autres au niveau des endosomes (TLR3, 7, 8, 9), (Kawai *et al.* 2010). Les plaquettes sont connues pour exprimer fortement les TLR2 et 4 et plus faiblement les TLR1, 6 et 9 (Andonegui *et al.* 2005; Estevez *et al.* 2017; Hally *et al.* 2020).

Les TLRs membranaires sont composés d'un domaine extracellulaire LRR (leucine rich repeats) permettant la reconnaissance des DAMPs et des PAMPs, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique comprenant une séquence TIR (Toll/IL-1 receptor) responsable de la transduction du signal. La stimulation de ces TLRs par leurs agonistes conduit à l'activation des plaquettes, à l'agrégation, à la sécrétion de granules et à la formation de thrombus. Les voies de signalisation des TLRs dans les plaquettes seront développées plus loin.

c) Les récepteurs couplés aux protéines G

Les plaquettes comportent à leur surface un certain nombre de récepteurs couplés aux protéines G dont le rôle principal est d'amplifier l'activation plaquettaire. Parmi ceux-ci, on retrouve les récepteurs au TXA2 (TP), à la sérotonine, aux prostaglandines, à l'épinéphrine ($\alpha 2A$), à l'ADP et à la thrombine.

Dans cette partie, seuls les récepteurs P2Y₁, P2Y₁₂, PAR1 et PAR4, seront présentés dans les paragraphes suivants.

Récepteurs à l'ADP : P2Y₁ et P2Y₁₂

Les plaquettes expriment deux récepteurs purinergiques à l'ADP : P2Y₁ et P2Y₁₂. Ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires et sont couplés respectivement aux protéines Gq et Gi (Gachet *et al.* 1995; Jantzen *et al.* 1999).

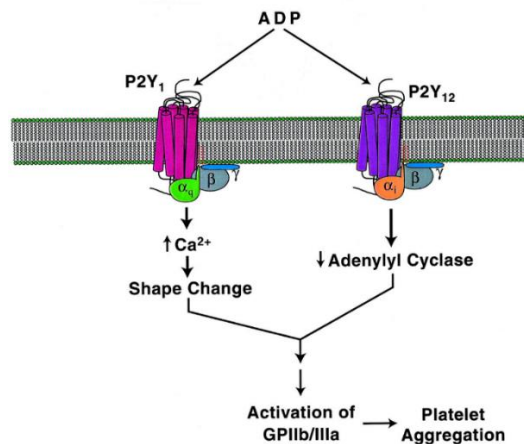


Figure 10. Les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ (Nicholas 2001)

L'activation des récepteurs P₂Y₁ et P₂Y₁₂ couplés à leurs protéines G induit une augmentation transitoire du Ca²⁺ intracellulaire, un changement de forme des plaquettes et une inhibition de l'adénylate cyclase (Figure 10). L'activation concomitante de ces deux récepteurs est essentielle pour initier les voies de signalisation conduisant à l'activation de la GPIIb/IIIa et *in fine* à l'agrégation irréversible des plaquettes (Nicholas 2001).

Récepteurs à la thrombine : PAR1 et PAR4

PAR1 (Protease-Activated Receptors 1) et PAR4 sont les principaux récepteurs à la thrombine couplés aux protéines G (G12/13, Gq et Gi) exprimés par les plaquettes. L'activation de PAR1 ou de PAR4 conduit à la sécrétion de granules et à l'agrégation des plaquettes. PAR1 contrairement à PAR4 est activé à de faibles concentrations de thrombine (Coughlin 2000).

L'activation de ces PARs se produit lorsque la thrombine se fixe et clive l'exodomaine N-terminale du domaine extracellulaire au niveau d'un site spécifique (Arg41-Ser42 pour PAR1, Arg47-Gly48

pour PAR4) permettant l'apparition d'une nouvelle extrémité N-terminal qui se lie ensuite de manière intramoléculaire au niveau de la deuxième boucle extracellulaire du récepteur (Figure 11) (Kahn *et al.* 1999; Ossovskaya *et al.* 2004; French *et al.* 2016). Cette liaison génère une cascade de signalisation qui active la phospholipase C β (PLC β) aboutissant à la génération d'Inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) qui provoquent respectivement une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Ossovskaya *et al.* 2004).

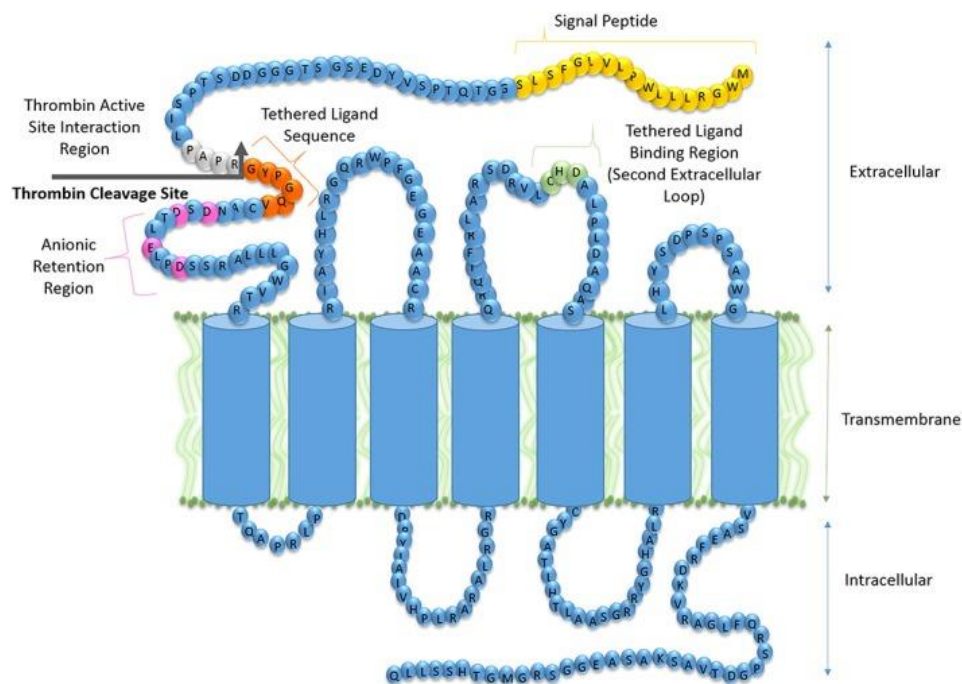


Figure 11. Structure du récepteur PAR4 (French et Hamilton 2016)

d) Les immunoglobulines

GPVI

La GPVI est une protéine de 62KDa appartenant à la super famille des immunoglobulines dont le nombre de copies varie entre 3000 à 5000 par plaquette (Best *et al.* 2003). Elle est exprimée uniquement par les mégacaryocytes et les plaquettes (Jandrot-Perrus *et al.* 2000) et est associée de manière constitutive au récepteur FcR- γ . C'est un récepteur de faible affinité pour le collagène mais à haut potentiel d'induction de signal (Rivera *et al.* 2009).

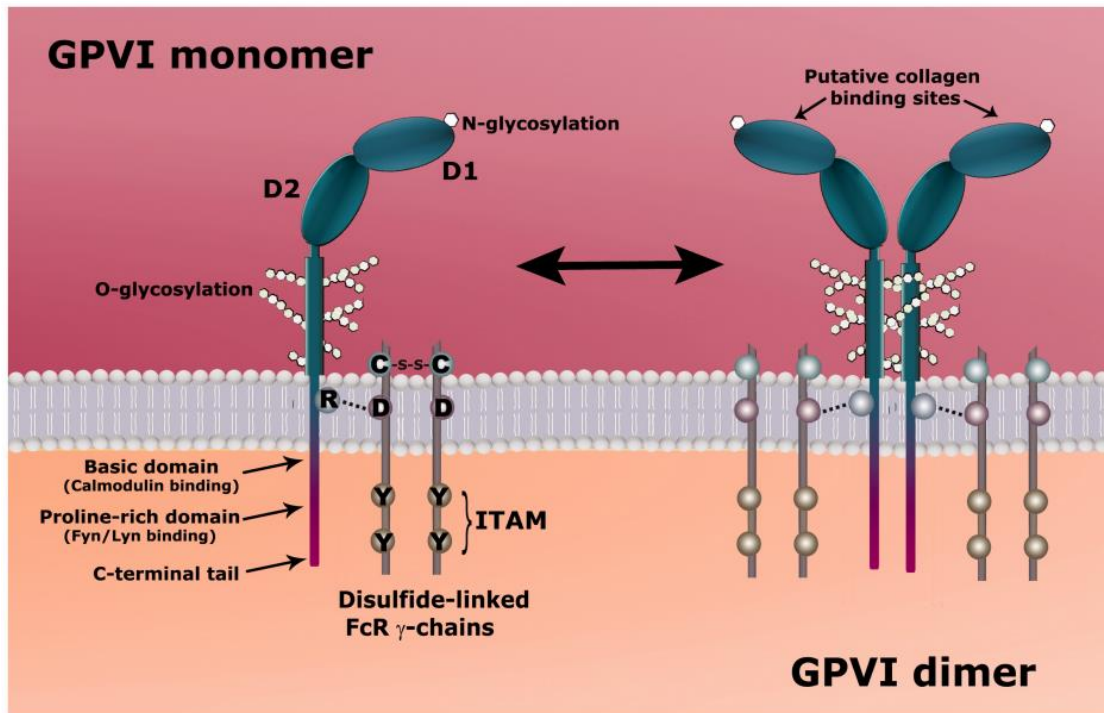


Figure 12. Structure de la GPVI (Induruwa *et al.* 2016)

Cette glycoprotéine possède deux domaines immunoglobuline extracellulaires (D1 et D2), un domaine mucin-like riche en sérine et thréonine contenant plusieurs sites de O-glycosylation, un domaine transmembranaire au niveau duquel est lié de manière non covalente le récepteur FcR- γ et une petite queue cytoplasmique (Figure 12). Une portion de cette queue cytoplasmique possède une région riche en proline où sont liées de manière constitutive les protéines Fyn et Lyn appartenant à la famille des Kinases Src (Suzuki-Inoue *et al.* 2002).

La GPVI est exprimée principalement sous forme de monomère dans les plaquettes au repos. En effet, la quantification des dimères de GPVI par cytométrie en flux a révélé qu'au repos, cette forme ne représente que 29 % de la GPVI totale (Jung *et al.* 2012). La proportion de cette forme dimérique augmente entre 39 à 44 % lorsque les plaquettes sont activées (Jung *et al.* 2012).

L'activation de la GPVI par le collagène conduit à la phosphorylation du motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) du FcR γ par les SFK, Fyn et Lyn (Quek *et al.* 2000) qui aboutit au recrutement et à l'activation de la tyrosine kinase Syk par autophosphorylation (Suzuki-Inoue *et al.* 2002), (Figure 8). L'activation de la BTK (bruton tyrosine kinase) médiée par Syk conduit à l'activation de la PLC γ 2 (Watanabe *et al.* 2001) qui à son tour,

induit la formation d'IP3 et de DAG après hydrolyse de PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). IP3 et DAG vont respectivement entraîner la mobilisation des réserves intracellulaires de Ca^{2+} et l'activation de la PKC, concourant à la sécrétion des granules α et denses, à l'activation des intégrines plaquettaires et à l'agrégation des plaquettes (Watson *et al.* 2005; Rayes *et al.* 2019). Toutes ces voies de signalisation sont présentées à la figure 8.

FcγRIIa

Le récepteur FcγRIIa (CD32a) est un récepteur de faible affinité pour la partie Fc des immunoglobulines G (IgG) monomériques mais de forte affinité pour les complexes immuns (Karas *et al.* 1982). FcγRIIa est largement exprimé par les plaquettes, les monocytes, les neutrophiles et les macrophages. Les plaquettes humaines expriment environ 1000 à 4000 copies de ce récepteur (Qiao *et al.* 2015). Cette protéine transmembranaire est constituée de deux domaines extracellulaires Ig-like (D1 et D2), d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique contenant un domaine ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). La partie Fc des IgG se lie au récepteur FcγRIIa *via* son domaine extracellulaire D2 (Maxwell *et al.* 1999). Cette liaison conduit à une dimérisation rapide du récepteur (Ramsland *et al.* 2011) puis à la phosphorylation du domaine ITAM par les kinases Fyn et Lyn. Le domaine ITAM phosphorylé permet le recrutement et l'activation de Syk (Yanaga *et al.* 1995) qui active à son tour la PLCγ2 (Arman *et al.* 2015). L'activation des plaquettes par ce récepteur serait principalement induite lors de réponses inflammatoires et immunitaires.

e) Les récepteurs lectines de types-C

CLEC-2

CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2) est une protéine transmembranaire connue pour avoir une forte affinité pour la rhodocytine (une toxine du venin de serpent). La podoplanine, une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les cellules endothéliales lymphatiques, les podocytes rénaux, le plexus choroïde et les cellules épithéliales pulmonaire (Williams *et al.* 1996; Breiteneder-Geleff *et al.* 1997; 1999) est le seul ligand endogène connu pour le récepteur CLEC-2. Les plaquettes humaines expriment environ 2000 à 4000 copies (Gitz *et al.* 2014; Rayes *et al.* 2019). Ce récepteur comprend quatre domaines : un domaine extracellulaire lectin de type C, un domaine intermédiaire, une hélice transmembranaire et une petite queue cytoplasmique

contenant un domaine à motif hemITAM. La cascade de signalisation induit par la liaison de la podolanine à CLEC-2 est sensiblement similaire à celle observée suite à la stimulation de la GPVI et de FcγRIIa. L'activation de CLEC-2 par la podolanine conduit également à une clusterisation du récepteur suite à l'activation des tyrosines kinases Src et Syk (Hughes *et al.* 2010; Pollitt *et al.* 2014).

Ce récepteur est principalement impliqué dans le développement du système lymphatique, de la vascularisation cérébrale. Il favorise également le maintien de l'intégrité vasculaire mais ne joue pas de rôle majeur dans l'hémostase (Rayes *et al.* 2019).

P-Selectine

La P-selectine (CD62P) est une glycoprotéine de la famille des récepteurs lectine de type C exprimée par les cellules endothéliales et les plaquettes. Cette protéine est constituée de cinq domaines différents, un domaine lectine de type C, un domaine EGF (epidermal growth factor-like domain) et un domaine SCR (short consensus repeat), une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Tedder *et al.* 1995). Dans les plaquettes, cette glycoprotéine est stockée au niveau des granules α et exposée à leur surface par fusion des granules avec la membrane plasmique des plaquettes lors de leur activation (McEver *et al.* 1984; Stenberg *et al.* 1985).

La P-selectine présente une forte affinité pour son ligand, le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), exprimé à la surface des neutrophiles, des monocytes, des cellules dendritiques et des plaquettes (Sako *et al.* 1993; Frenette *et al.* 2000). L'expression de la P-selectine à la surface des plaquettes activées favorise donc la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles, plaquettes-monocytes, ainsi que le recrutement efficace de ces leucocytes au niveau du site de la lésion vasculaire. Cette liaison de la P-sélectine au PSGL-1 est dépendante du calcium et nécessite un flux (Lawrence *et al.* 1997).

Au cours de ces interactions, les plaquettes déclenchent une signalisation intracellulaire dans les cellules immunes et boostent ainsi la réponse immuno-inflammatoire des leucocytes (Totani *et al.* 2010). L'interaction des plaquettes avec les neutrophiles stimulerait la génération de pièges extracellulaires des neutrophiles (NET : neutrophil extracellular traps) permettant la défense de l'hôte, en piégeant les agents pathogènes (Clark *et al.* 2007; Sreeramkumar *et al.* 2014).

II – Activation et rôle physiologique des plaquettes

Le rôle physiologique principal des plaquettes est d'assurer l'hémostase. Elles interviennent également dans la thrombose, dans l'inflammation, dans l'immunité innée, dans l'angiogenèse et également dans la biologie tumorale (croissance tumorale, métastase).

A) Rôle des plaquettes dans l'hémostase

L'hémostase regroupe un ensemble de processus qui permet l'arrêt du saignement lors d'une lésion vasculaire. La première étape, l'hémostase primaire est assurée par les plaquettes. Le clou plaquettaire formé lors de l'hémostase primaire est par la suite consolidé lors de l'étape de coagulation aussi appelé hémostase secondaire. A l'issue de ces deux étapes, vient le processus de fibrinolyse qui permet d'éliminer le caillot sanguin formé afin d'éviter tout risque de thrombose. Dans cette partie, seules les étapes d'hémostase primaire et de coagulation seront détaillées.

(1) Hémostase primaire

L'hémostase primaire se déroule en plusieurs étapes à savoir l'adhérence des plaquettes au sous-endothélium, l'activation des plaquettes au contact de la paroi lésée aboutissant à la sécrétion du contenu des granules, l'amplification de l'activation et enfin, l'agrégation des plaquettes entre elles.

Lors d'une lésion vasculaire, le sous-endothélium est exposé au sang circulant. Ce dernier ainsi que les couches plus profondes de la paroi vasculaire renferment un grand nombre de protéines notamment le vWF, le collagène, la fibronectine, la laminine, qui vont permettre l'adhésion des plaquettes à l'endothélium lésé (Figure 13).

L'adhésion initiale des plaquettes se fait par interaction du vWF au domaine extracellulaire de la sous-unité GPIIb du complexe glycoprotéique GPIb-IX-V plaquettaire (Versteeg *et al.* 2013). Cette adhésion initiale est de nature transitoire et nécessite l'implication d'autres récepteurs plaquettaires. L'adhérence stable des plaquettes nécessite l'interaction du collagène à la GPVI et à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, de la fibronectine à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, de la laminine à l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ (Jackson 2011; Harrison 2005). L'intégrine GPIIb/IIIa participe également à l'adhérence stable des plaquettes par sa liaison au vWF et à la fibronectine sous-endothéliale (Figure 13).

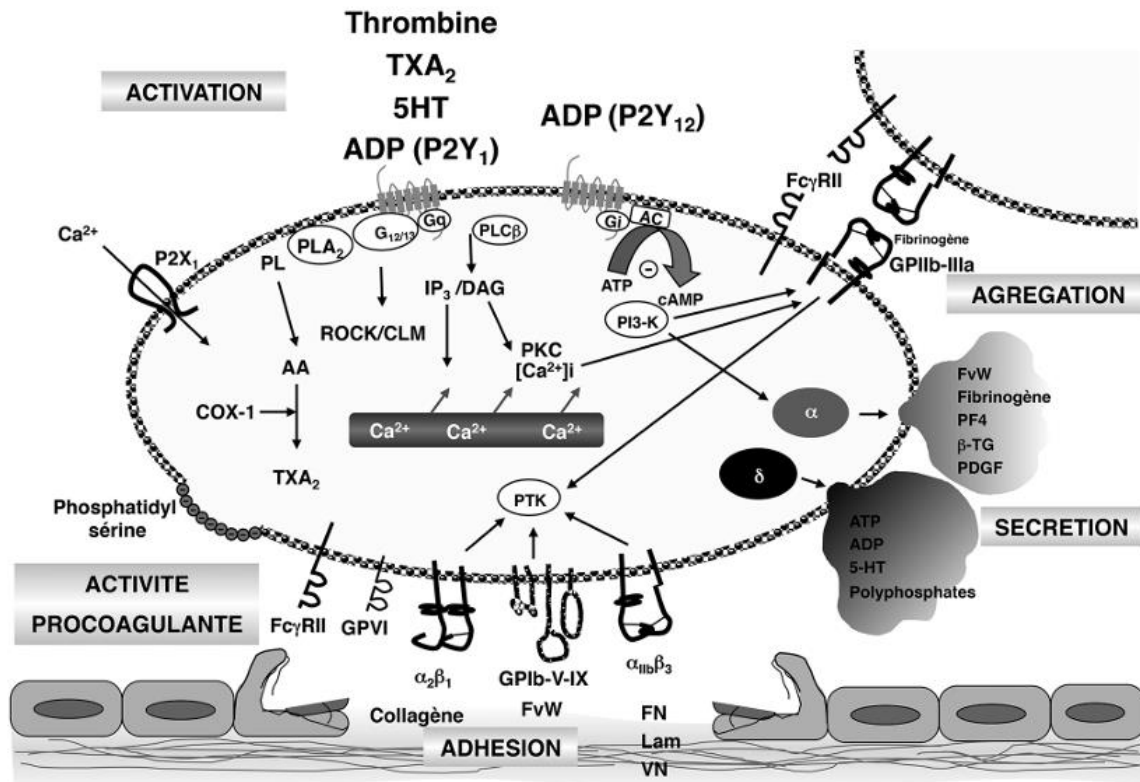


Figure 13. Mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire (Gachet 2013). Les plaquettes adhèrent à la paroi vasculaire lésée, s'activent, changent de forme, sécrètent le contenu de leurs granules. Ce relargage conduit à une amplification de l'activation des plaquettes et enfin à l'agrégation de ces dernières entre elles. Les plaquettes activées exposent également la PS à leur surface permettant le recrutement de facteurs de la coagulation.

La liaison au vWF et au collagène déclenche une cascade de réactions intracellulaires, à l'origine de l'activation des plaquettes. Cette activation est caractérisée par un changement de leur forme, par l'émission de pseudopodes et par leur étalement au niveau de la brèche vasculaire. L'activation des voies de signalisation plaquettaire conduit à l'activation de la GPIIb/IIIa et à la sécrétion du contenu de leurs granules. Le relargage d'ADP, d'ATP, de sérotonine (5-HT) et la génération de TXA2 aboutit à l'amplification de l'activation des plaquettes. L'augmentation de l'affinité de la GPIIb/IIIa pour le fibrinogène conduit à l'agrégation des plaquettes entre elles et permet la formation de ce que l'on appelle le clou hémostatique (Gachet 2013; Versteeg *et al.* 2013). L'exposition de la phosphatidylsérine à la surface de certaines plaquettes activées va permettre le recrutement de facteurs de coagulation, c'est le début de l'hémostase secondaire.

(2) Hémostase secondaire

L'hémostase secondaire, plus connue sous le nom de coagulation, permet de consolider le thrombus plaquettaire formé au cours de l'hémostase primaire par la génération de fibrine. Au cours de l'étape d'agrégation, les plaquettes activées exposent la PS à leur surface conférant aux facteurs de coagulation une surface catalytique pour la cascade de coagulation. L'hémostase secondaire comprend deux voies :

- la voie intrinsèque, qui implique des facteurs présents dans la circulation. Elle débute par l'activation du FXII (FXIIa) qui se produit généralement au contact du collagène.
- la voie extrinsèque, qui nécessite la présence du facteur tissulaire (TF). Le TF étant exprimé principalement par le sous-endothélium, il sera donc exposé suite à une lésion vasculaire. Le facteur VII (FVII) peut alors se lier au TF ce qui conduit à son activation (FVIIa).

Ces deux voies de coagulation convergent vers une voie commune de coagulation permettant l'activation du FX qui, par la suite, clive la prothrombine en thrombine. A l'issue de cette voie commune de coagulation, le fibrinogène soluble est transformé en brins de fibrine insolubles grâce à la thrombine (Figure 14), (Versteeg *et al.* 2013; Sang *et al.* 2021).

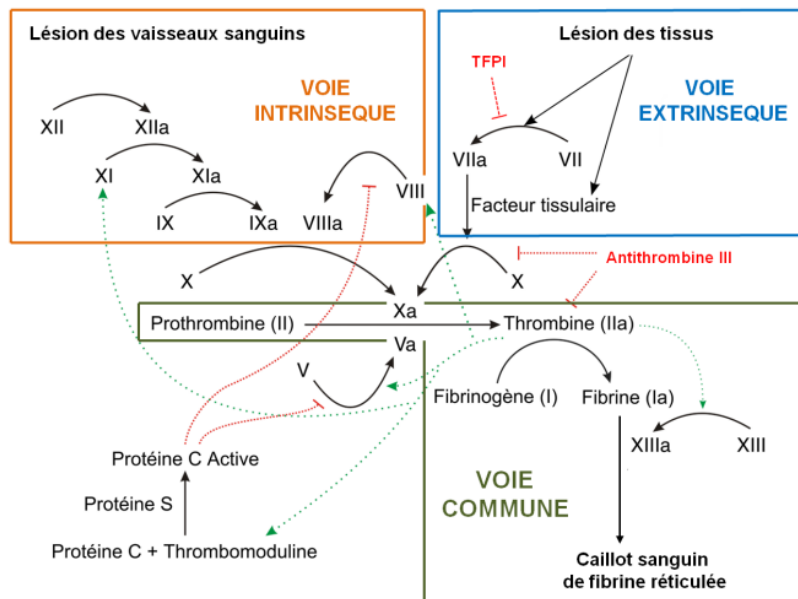


Figure 14. Cascade de la coagulation

La coagulation est régulée négativement par différentes protéines comme la protéine S, la protéine C (PC), l'antithrombine (AT) et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), limitant ainsi les risques de thrombose.

B) Rôle des plaquettes dans l'inflammation et dans l'immunité innée

L'inflammation est définie comme étant une réponse immunitaire essentielle à la survie de l'organisme lors d'une infection ou d'une blessure (Medzhitov 2010). Elle permet de maintenir l'homéostasie tissulaire en éliminant les agents pathogènes ou les molécules toxiques d'origine endogène ou exogène. Toutefois, une réponse inflammatoire non contrôlée peut conduire à des lésions tissulaires irréversibles.

Les plaquettes sont aujourd'hui de mieux en mieux connues pour leurs rôles dans l'inflammation et dans la réponse immunitaire innée.

Leur implication dans l'inflammation résulte de leur capacité à :

- sécréter des cytokines et des chimiokines suite à leur activation,
- induire indirectement l'activation des cellules immunitaires et endothéliales par la sécrétion de cytokines et de chimiokines,
- induire par contact direct l'activation des cellules immunitaires et endothéliales.

Sur le plan immunitaire, les plaquettes peuvent interagir avec un certain nombre de PAMPs et de DAMPs *via* ses récepteurs et participent donc à la réponse immunitaire innée.

(1) Implication dans l'inflammation

Les plaquettes activées peuvent relarguer diverses chimiokines et cytokines telles que CXCL1, PF4 (platelet factor 4), CXCL5, CXCL7, IL-8, CXCL12, MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) et RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) (Jenne *et al.* 2013). Elles peuvent également synthétiser et libérer de l'IL-1 β (interleukine-1 β), de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF- α (tumor necrosis factor- α) sous forme soluble ou contenues dans de microvésicules (Lindemann *et al.* 2001; Denis *et al.* 2005). Ces molécules libérées par les plaquettes sont capables d'induire l'activation, la migration et le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium vasculaire et d'induire la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de cytokines par les leucocytes.

En effet, le relargage de PF4 par les plaquettes induit le recrutement des monocytes et des neutrophiles par chimiotaxie (Deuel *et al.* 1981), favorise la dégranulation des neutrophiles et leur adhésion aux cellules endothéliales. Il empêche aussi l'apoptose des monocytes, favorise leur différenciation en macrophages (Scheuerer *et al.* 2000) et induit la génération de ROS et de cytokines par les monocytes (Kasper *et al.* 2007). Cette génération excessive de ROS provoque l'apoptose des cellules endothéliales (Woller *et al.* 2008).

Les plaquettes permettent aussi le recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium enflammé *via* la sécrétion de RANTES (von Hundelshausen *et al.* 2005).

La libération d'IL-1 β plaquettaire est connue pour provoquer une surexpression de molécules d'adhésion comme ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) au niveau des cellules endothéliales *via* le récepteur IL-1R (Dinarello 1996). L'IL-1 va donc favoriser l'adhérence des monocytes et des neutrophiles à l'endothélium (Bevilacqua *et al.* 1985; Sheikh *et al.* 2005). Les plaquettes activées peuvent également dans certains contextes induire une perméabilité vasculaire par relargage de MPs riches en IL-1 β . En effet, les microparticules plaquettaires riches en IL-1 β provenant de patients infectés par le virus de la dengue induisent une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales *in-vitro* (Hottz *et al.* 2013).

L'activation des plaquettes conduit aussi à l'exposition à leur surface de protéines comme la P-selectine et le CD40-L permettant la liaison des plaquettes avec les leucocytes *via* leurs récepteurs respectifs, PSGL-1 et CD40.

L'interaction des plaquettes avec les leucocytes *via* la liaison P-selectine/PSGL-1 provoque la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles, plaquettes-monocytes et induit la diapédèse des leucocytes (Mine *et al.* 2001). Les plaquettes provoquent ainsi l'activation des intégrines des neutrophiles et des monocytes leur conférant un phénotype pro-adhérent qui favorise leur interaction aux cellules endothéliales (Ma *et al.* 2004; Martins *et al.* 2006).

Les plaquettes activées induisent l'expression de facteur tissulaire (TF) au niveau des monocytes *via* la liaison CD40L/CD40 (Lindmark *et al.* 2000). Cette surexpression de TF permet ainsi l'initiation de la voie extrinsèque de la coagulation.

Le CD40L plaquettaire stimule la sécrétion de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion (E-selectine, VCAM-1 et ICAM-1) par les cellules endothéliales (Henn *et al.* 1998).

Tous ces mécanismes décrits précédemment participent à la réponse inflammatoire et permettent le recrutement et l'extravasation des leucocytes au niveau du site inflammatoire.

(2) Reconnaissance des agents pathogènes et des DAMPs

Les agents pathogènes peuvent interagir directement avec les récepteurs plaquettaires provoquant ainsi l'activation des plaquettes et le relargage de cytokines pro-inflammatoires. Les principaux récepteurs plaquettaires, capables d'interagir avec les bactéries et les virus sont présentés ci-dessous (Figure 15).

L'ensemble des interactions récepteurs plaquettaires-pathogènes et les voies de signalisation conduisant à l'activation des plaquettes ne seront pas toutes détaillées. Cette partie, se concentrera uniquement sur les voies de signalisation faisant intervenir le récepteur TLR4, celui-ci étant un des récepteurs les plus étudiés dans la réponse immunitaire des plaquettes.

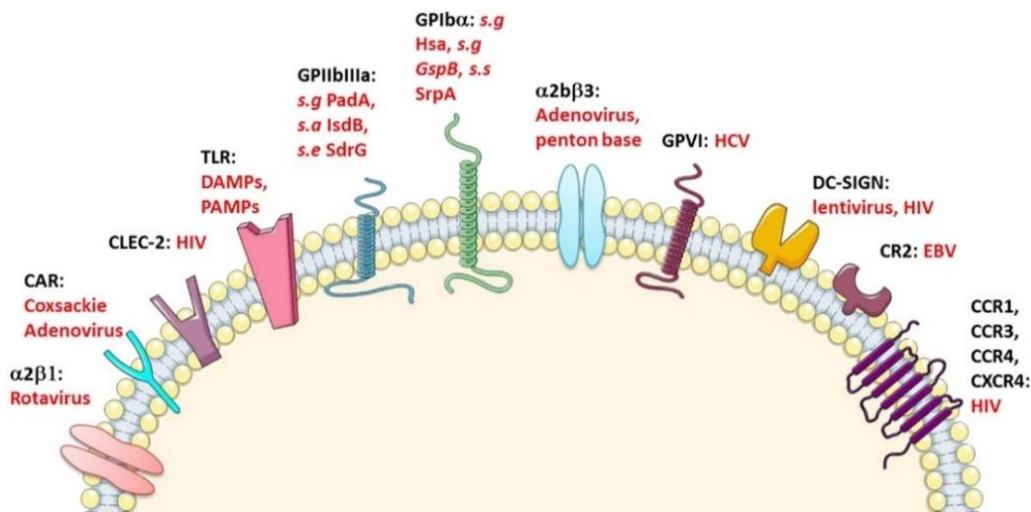


Figure 15. Principaux récepteurs membranaires immuns des plaquettes (Cognasse *et al.* 2015)

L'activation des plaquettes médiée par le LPS (lipopolysaccharides), composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, a été relativement étudiée durant ces dernières années. Le LPS est un des ligands majeurs interagissant avec le récepteur TLR4. Il est connu pour stimuler l'épissage de transcrits d'ARNm et pour favoriser l'accumulation d'IL-1 β dans les plaquettes (Shashkin *et al.* 2008). Le LPS permet aussi d'activer des voies de signalisation conduisant à la sécrétion des granules plaquettaires et à l'agrégation (Figure 16A), (Zhang *et al.* 2009).

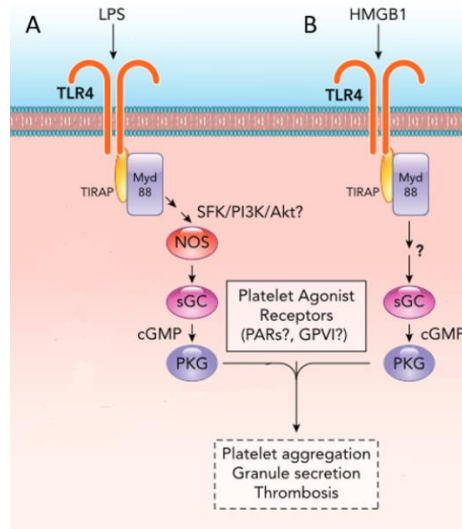


Figure 16. Voie de signalisation du TLR4 adaptée de (Estevez *et al.* 2017)

En effet, l'étude de Zhang et de ses collaborateurs a montré que la liaison du LPS au TLR4 induit la production de GMPc par activation de la voie NO/GMPc, aboutissant *in fine* à l'activation de la PKG. L'activation de la voie NO/GMPc par le LPS pourrait être induite par l'activation des SFKs et de la voie PI3K/AKT (Lopes Pires *et al.* 2017).

Zhang *et al.* ont également montré que la signalisation du LPS *via* TLR4 était dépendante de Myd88 (myeloid differentiation factor 88) et que cette dernière favorise l'activation des plaquettes et stimule la sécrétion des granules (α et denses) permettant une amplification de l'agrégation plaquettaire (Zhang *et al.* 2009).

En plus de stimuler l'activation plaquettaire, d'autres études montrent que l'activation de TLR4 par le LPS conduit à une exacerbation de l'adhésion des plaquettes au fibrinogène (Andonegui *et al.* 2005) et à la formation de NETs (Pièges extracellulaires des neutrophiles) (Clark *et al.* 2007).

Ce récepteur est également stimulé par des DAMPs comme HMGB1 (High Mobility Group Box 1), (Figure 16B). HMGB1 en se liant au TLR4 provoque une réponse plaquettaire comparable à celle induite par le LPS. En effet, HMGB1 par interaction avec le TLR4 plaquettaire conduit à l'activation de la voie NO/GMPc, PKG de manière dépendante de MyD88 (Vogel *et al.* 2015). Dans cette étude, les souris n'exprimant pas la protéine HMGB1 plaquettaire ont présenté des temps de saignement accrus ainsi qu'une réduction de la formation du thrombus, de l'agrégation

plaquettaire et de l'inflammation. HMGB1 serait donc un médiateur essentiel à la formation du thrombus.

Les plaquettes activées seraient également capables de présenter HMGB1 aux neutrophiles, ce qui induit la formation de NETs (Maugeri *et al.* 2014).

C) Autres rôles des plaquettes

Aujourd'hui, le développement croissant de la recherche a permis de mettre en lumière d'autres fonctions physiologiques des plaquettes en plus de leurs rôles dans l'hémostase, l'inflammation et dans l'immunité innée. En effet, des études réalisées chez la souris ont montré que celles-ci seraient impliquées dans la formation des vaisseaux lymphatiques et dans la séparation entre les vaisseaux sanguins et lymphatiques durant le développement embryonnaire (Bertozzi *et al.* 2010; Osada *et al.* 2012). Elles sont aussi connues pour participer au processus d'angiogenèse (Kisucka *et al.* 2006).

Les plaquettes joueraient également un rôle dans un certain nombre de pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde (Boilard *et al.* 2010), l'athérosclérose (Huo *et al.* 2004) et l'asthme allergique (Idzko *et al.* 2015), ainsi que dans le cancer, avec une implication dans la croissance tumorale et dans la dissémination des métastases (Gay *et al.* 2011).

L'inflammasome NLRP3

I – Les inflammasomes

Les NLRs (Nucleotide-binding domain Leucin-rich repeats containing Receptors) sont des protéines possédant de multiples domaines avec une architecture en trois parties. Ces protéines sont constituées généralement d'un domaine LRR (Leucine-Rich Repeat) riche en leucine en C-terminal, d'un domaine central NACHT (NAIP, CIITA, HET-E, TP1) possédant une activité ATPase et impliqué dans l'oligomérisation des NLR en hexamères ou heptamères pour la formation d'inflammasomes (complexes multiprotéiques) et d'un domaine en N-Terminal qui varie d'un NLR à l'autre. Ces protéines interviennent dans la réponse immunitaire innée, avec la reconnaissance et la détection de diverses molécules et agents pathogènes. Elles sont aussi impliquées dans les voies de signalisation de mort et de survie cellulaire (Ting *et al.* 2008) et jouent également un rôle important dans la reproduction et le développement embryonnaire (Zhong *et al.* 2013).

En 2008, une nouvelle nomenclature permet de classer les 22 protéines NLR en quatre sous-familles chez l'homme en fonction de leur domaine effecteur N-Terminal (Ting *et al.* 2008; Kersse *et al.* 2011). La sous famille NLRA est caractérisée par un domaine de transactivation acide, les NLRB par un domaine de type BIR (Baculoviral Inhibitor of apoptosis protein Repeat), les NLRC par un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) et enfin les NLRP par un domaine Pyrine (PYD) (Tableau 1).

NLRA	
CIITA	AD-NACHT- LRR
NLRB	
NAIP	BIR-BIR-BIR-NACHT
NLRC	
NOD1	CARD-NACHT-LRR
NOD2	CARD-CARD-NACHT-LRR
NLRC3	NACHT-LRR
NLRC4	CARD-NACHT-LRR
NLRC5	NACHT-LRR
NLRX	X-NACHT-LRR
NLRP	
NRLP1	PYD-NACHT-LRR-CARD
NLRP2-9, NLRP 11-14	PYD-NACHT-LRR
NLRP10	PYD-NACHT

Tableau 1. Famille des NLRs Humain (d'après Kersse K, 2011)

A) NLRA

La sous-famille NLRA regroupe une unique protéine nommée CIITA (class II, major histocompatibility complex, transactivator) dont le domaine de transactivation acide est impliqué dans la régulation de la transcription des gènes du CMH de classe II (Kersse *et al.* 2011).

B) NLRB

Le NAIP (NLR family, apoptosis inhibitory protein) est le seul membre de la sous-famille des NLRB chez l'homme, il contient un domaine BIR en N-terminal. NAIP a un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes.

Chez l'homme, le NAIP va reconnaître de façon spécifique le système de sécrétion de type III (T3SS) retrouvé chez de nombreuses bactéries à Gram négatif utilisé pour injecter des protéines « effectrices » dans le cytosol des cellules hôtes. Le NAIP activé s'associe avec NLRC4 pour former un inflammasome NAIP/NLRC4 qui recrute et active la caspase-1 (Vance 2015).

C) NLRC

La sous famille NLRC caractérisée par un domaine CARD en N-Terminal compte 6 membres : NOD1 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 1), NOD2, NLRC3 (NLR family, CARD domain containing 3), NLRC4, NLRC5, et NLRX. NLRC4 est le seul membre de cette famille à former un inflammasome fonctionnel capable de recruter et d'activer directement la caspase 1 ou indirectement *via* une protéine adaptatrice l'ASC (apoptosis-associated speck-like protein) composée deux domaines PYD et CARD (Vance 2015).

D) NLRP

La sous famille NLRP est caractérisée par la présence d'un domaine PYD en N-Terminal. Cette sous famille compte 14 membres dont certains comme NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 sont impliqués dans la formation d'inflammasomes fonctionnels conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18). Dans cette famille, le NLRP10 est le seul à présenter une structure particulière avec l'absence en C-terminal du domaine LRR et aurait un rôle de régulateur négatif de NF- κ B, de la mort cellulaire et de la libération de l'IL-1 β (Zhong *et al.* 2013; Damm *et al.* 2013).

Parmi tous les NLR, NLRP3 (Nucleotide-binding domain Leucine Rich repeat containing Protein 3) est actuellement le plus étudié et le mieux caractérisé. Cette protéine est codée par le gène NLRP3 (chromosome 1) et est principalement exprimée dans les neutrophiles, les macrophages, les monocytes et dans les cellules dendritiques. Plusieurs études font également état de la présence de NLRP3 dans les plaquettes (Hottz *et al.* 2013; Murthy *et al.* 2017; Qiao *et al.* 2018).

La protéine NLRP3 se compose d'un domaine PYD en N-Terminal, d'un domaine central NACHT et d'un domaine LRR en C-Terminal. La reconnaissance de molécules activatrices provoque un changement de sa conformation, permettant la liaison de NLRP3 avec l'ASC par interaction de leurs domaines PYD respectifs et le recrutement de la procaspase-1 par l'ASC par association de leurs domaines CARD, (Shao *et al.* 2015). L'assemblage de ces trois protéines forme l'inflammasome NLRP3 (Figure 17). La formation de ce complexe déclenche le clivage de la procaspase-1 en caspase-1 active qui à son tour clive les cytokines pro-inflammatoires immatures pro-IL-1 β et pro-IL-18. Ce clivage aboutit à la génération de cytokines bioactives qui sont ensuite sécrétées.

La formation de l'inflammasome déclenche également un processus de mort cellulaire lié à l'inflammation appelé pyroptose (Shao *et al.* 2015).

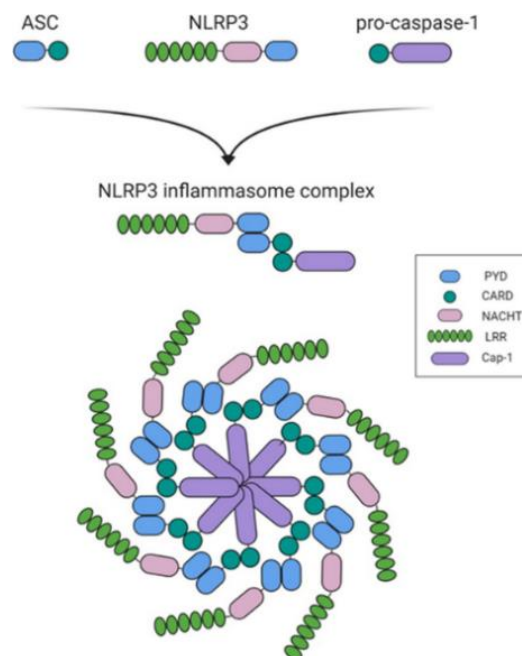


Figure 17. Structure de l'inflammasome NLRP3 (Seok *et al.* 2021)

Aujourd'hui, l'inflammasome NLRP3 est bien connu pour son implication dans la réponse immunitaire innée et dans la survenue de maladies auto-immunes et inflammatoires comme le Syndrome Muckle–Wells (Martinon, Burns, et Tschopp 2002), l'arthrite goutteuse, le diabète de type 2, la polyarthrite rhumatoïde, les inflammasomopathies, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et de Parkinson etc. (Zhong, Kinio, et Saleh 2013; Gicquel *et al.* 2014; Gros Lambert et Py 2018).

II - Mécanisme d'activation et de régulation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules

A) Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules nucléées

Les nombreuses études menées sur les monocytes et les macrophages ont permis de montrer que l'inflammasome NLRP3 pouvait être activé par une grande variété de signaux de dangers comme les PAMPs et les DAMPs (Swanson, Deng, et Ting 2019). L'assemblage de la protéine NLRP3, de la protéine adaptatrice ASC et de la caspase-1 en un inflammasome NLRP3 fonctionnel nécessite deux signaux (Bauernfeind *et al.* 2009). Le premier, nommé « priming signal » permet l'induction de la transcription de certains gènes *via* la voie NF- κ B suite à la fixation de DAMPs ou de PAMPs au niveau de certains récepteurs. Le second, nommé « activation signal » conduit à l'oligomérisation des différentes protéines impliquées dans la formation de l'inflammasome suite à divers stress cellulaires.

(1) Signal 1 : Priming

Dans les cellules nucléées, un grand nombre de récepteurs comme les TLRs, IL-1R, TNFR peuvent initier le « priming » de NLRP3 (Figure 20). La stimulation de ces récepteurs par des cytokines ou des PAMPs permet l'activation de la voie NF- κ B permettant *in fine* la production et l'accumulation de pro-IL-1 β et de NLRP3 (Bauernfeind *et al.* 2009; He *et al.* Núñez 2016). Les espèces réactives de l'oxygène seraient également impliquées dans cette étape de priming de NLRP3 (Bauernfeind *et al.* 2011).

(2) Signal 2 : Activation

Le deuxième signal est initié par des molécules associées au danger, les DAMPs, et par de multiples agents pathogènes, les PAMPs.

Les DAMPs peuvent être classées en deux catégories selon leur origine endogène ou exogène. Les DAMPs endogènes proviennent de cellules activées, endommagées ou en apoptose. On retrouve l'ATP (Mariathasan *et al.* 2006), les cristaux de cholestérol (Düwell *et al.* 2010) et d'acide urique (Martinon *et al.* 2006), les ROS mitochondriaux (R. Zhou *et al.* 2011), les NETs (Lin *et al.* 2022), le HMGB1 (Vogel *et al.* 2018), l'hème (Dutra *et al.* 2014), l'hémoglobine oxydée (Nyakundi *et al.* 2019), l'ADN mitochondrial oxydé (Shimada *et al.* 2012), les peptides d'amyloïde- β (Halle *et al.* 2008), l'amyline (Masters *et al.* 2010) etc. Les DAMPs exogènes elles, sont plutôt d'origine environnementale avec des substances comme l'amiante (Dostert *et al.* 2008), la silice (Hornung *et al.* 2008), l'Alun (Eisenbarth *et al.* 2008) etc.

Comme autres signaux exogènes, on retrouve les PAMPs d'origine bactérienne et virale tels que le LPS (Lipopolysaccharide), la nigéricine (Mariathasan *et al.* 2006), les acides nucléiques bactériens (Sha *et al.* 2014) et viraux par exemple. Le virus de la dengue (Hottz *et al.* 2013) ainsi que les composés issus de champignons (Kankkunen *et al.* 2010) sont aussi connus pour conduire à l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3.

Durant de longues années, de nombreuses études présentaient des modèles en faveur d'une activation de l'inflammasome par interaction directe des PAMPs avec le domaine LRR de NLRP3. Aujourd'hui, compte tenu de la grande variabilité connue des activateurs de l'inflammasome NLRP3, les nouveaux modèles excluent cette possibilité et suggèrent plutôt une activation de l'inflammasome induite par un ou plusieurs événements cellulaires et moléculaires détectés par l'inflammasome (Gros Lambert *et al.* 2018). Trois processus d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont généralement proposés :

- Les flux d'ions, principalement l'efflux de K^+ et l'influx de Ca^{2+}
- La rupture lysosomale
- Le dysfonctionnement des mitochondries

a) Flux ioniques

Efflux de potassium (K^+)

L'efflux de potassium K^+ est nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3. En effet, différentes études réalisées sur des macrophages péritonéaux de souris et des monocytes humains (cellules THP1) *in vitro* ont montré que l'utilisation de fortes concentrations en K^+ extracellulaires bloquant l'efflux de K^+ , inhibaient l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Perregaux *et al.* 1994; Pétrilli *et al.* 2007). Ces études mettent en évidence le rôle indispensable de l'efflux de K^+ dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 et montrent que de faibles concentrations cytoplasmiques en K^+ sont nécessaires à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Pétrilli *et al.* 2007).

Cet efflux de K^+ est induit par différentes molécules comme l'ATP, la nigéricine, l'alun, la silice parmi d'autres. (Muñoz-Planillo *et al.* 2013). La stimulation du récepteur P2X7 par l'ATP par exemple provoque un efflux de K^+ *via* ce récepteur (Ferrari *et al.* 2006) et aboutit également au recrutement et à la formation de pores de pannexine-1 permettant également cet efflux de K^+ (Pelegri *et al.* 2006). La stimulation du récepteur P2X7 par l'ATP ne serait pas le seul mécanisme permettant l'efflux de K^+ . En effet, les toxines porogènes de certaines bactéries interviendraient elles aussi dans la formation de pores au niveau de la membrane plasmique des cellules (Los *et al.* 2013) (Figure 18).

Influx de calcium (Ca^{2+})

L'influx de calcium est induit par de nombreux activateurs de l'inflammasome NLRP3. Ce dernier serait lui aussi nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lee *et al.* 2012; Murakami *et al.* 2012). En effet, les études montrent que l'inhibition de la signalisation Ca^{2+} bloque l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lee *et al.* 2012; Murakami *et al.* 2012).

Le réticulum endoplasmique, réservoir majeur du Ca^{2+} , serait impliqué dans ce processus de relargage du Ca^{2+} . En effet, l'inhibition des canaux calciques IP_3R (inositol 1,4,5-triphosphate receptor) du réticulum diminue la mobilisation de Ca^{2+} et l'activation de NLRP3 (Lee *et al.* 2012) (Figure 18).

b) Rupture lysosomale

Les DAMPs telles que l'acide urique, les cristaux de cholestérol, l'alun, la silice et l'amiante sont des particules phagocytées par les lysosomes. L'accumulation de ces particules provoquerait des lésions de la membrane conduisant à la rupture du lysosome et au relargage d'enzymes lysosomales dont la cathepsine B dans le cytoplasme qui provoque l'activation de l'inflammasome (Hornung *et al.* 2008). En effet, des expériences réalisées sur des cellules humaines montrent que l'inhibition de la cathepsine B altère l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Hornung *et al.* 2008). Ces travaux suggèrent que la rupture des lysosomes et la libération de la cathepsine B seraient donc également impliquées dans le processus d'activation de l'inflammasome NLRP3 (Figure 18).

c) Dysfonctionnement mitochondrial

Le dysfonctionnement mitochondrial induit lors d'un stress cellulaire est connu pour provoquer une augmentation des quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'ADN mitochondrial (ADNm) oxydé dans le cytoplasme des cellules. Cette accumulation excessive de ROS mitochondriaux (ROSm) (R. Zhou *et al.* 2011; Heid *et al.* 2013; Dutra *et al.* 2014) et d'ADNm oxydé (Shimada *et al.* 2012) conduit à une activation de l'inflammasome NLRP3 (Figure 18).

En effet, l'inhibition de certains complexes de la chaîne respiratoire et de la mitophagie conduit à une augmentation de ROSm et à une accumulation de mitochondries endommagées dans le cytoplasme aboutissant à une activation de l'inflammasome NLRP3 (R. Zhou *et al.* 2011). La mitophagie serait un mécanisme par lequel la cellule pourrait moduler l'activation de l'inflammasome. L'utilisation d'inhibiteurs de ROSm a également permis de limiter l'activation de l'inflammasome induit par divers activateurs (Heid *et al.* 2013; Hottz *et al.* 2013; Dutra *et al.* 2014).

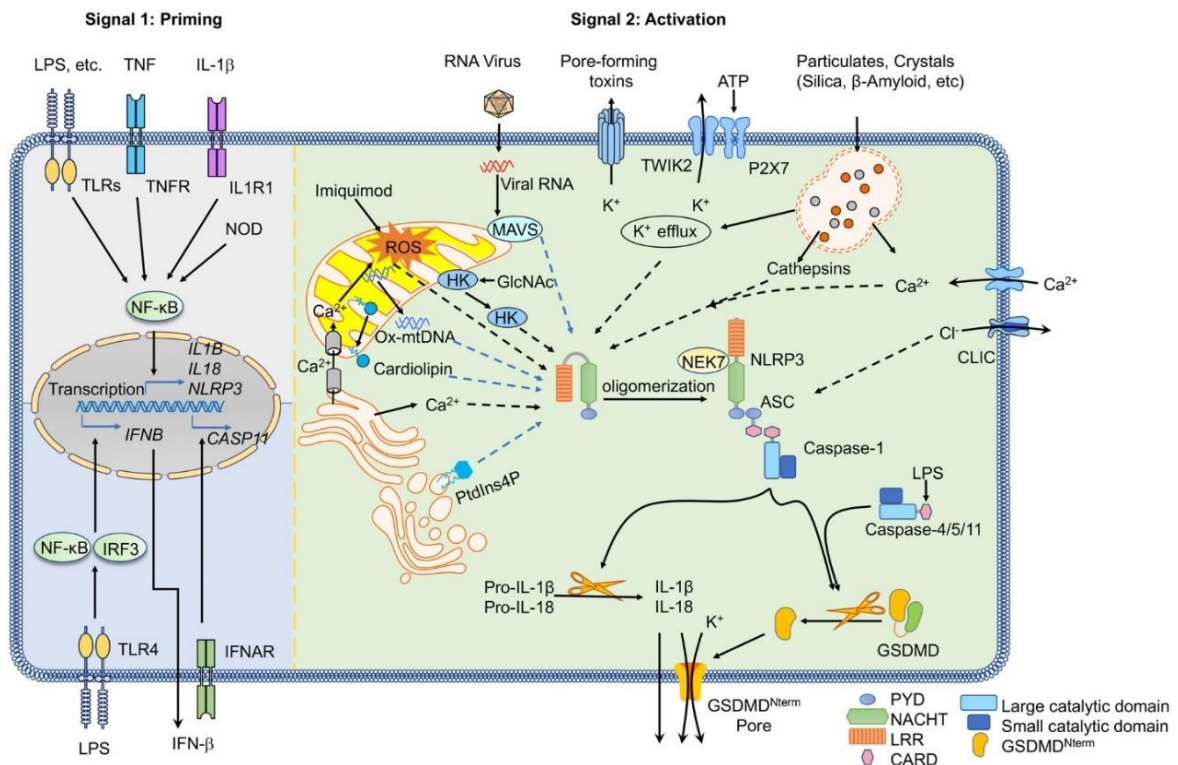


Figure 18. Priming et activation de l'inflammasome NLRP3 (Swanson *et al.* 2019). Dans les cellules nucléées, l'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux. Le 1^{er} signal (à gauche) appelé priming signal est induit par la stimulation de récepteurs (TNF, TLR, IL1R1 etc.) par des cytokines ou des PAMPs. La stimulation de ces récepteurs permet l'activation de la voie NF-κB induisant la transcription des gènes codant pour la protéine NLRP3, la pro IL-1b et la pro IL-18. Le 2^{ème} signal (à droite) permet l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cette activation est induite par divers stimuli notamment par la libération de cathepsine B suite à la rupture lysosomale pouvant être induite par des particules et des cristaux ; par l'efflux de K⁺ induit par l'interaction de l'ATP avec son récepteur purinergique P2X7 ; par la génération de ROSm et par l'interaction de PAMPs (LPS) et de DAMPs (Hb, Hème etc.) avec les TLRs.

B) Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les plaquettes

Bien que les plaquettes soient des cellules anucléées, ces cellules ont la capacité d'épissier les pré-ARNm IL-1β présents de manière constitutive et de synthétiser de la pro-IL-1β lorsqu'elles sont activées (Denis *et al.* 2005; Shashkin *et al.* 2008).

L'intérêt d'étudier l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les plaquettes est assez récent et découle des travaux d'Hottz et de ses collaborateurs visant à mieux comprendre l'implication des plaquettes dans la physiopathologie de la dengue (Hottz *et al.* 2013). En 2013, Hottz *et al.* sont les premiers à mettre en évidence la présence des composés de l'inflammasome NLRP3 dans

les plaquettes humaines. Ils montrent également *in vivo* et *in vitro* que l'infection des plaquettes par le virus de la dengue conduit à l'activation de l'inflammasome NLRP3, au relargage de microparticules plaquettaires riche en IL-1 β et *in fine* à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Hottz *et al.* 2013) (Figure 19). Cet assemblage de l'inflammasome serait induit par l'augmentation de la production de ROS mitochondriaux (ROSm) médiée par les kinases RIP1/RIP3.

Les plaquettes étant des cellules anucléées et en raison de l'expression constitutive des protéines NLRP3 et ASC, il n'est pas encore clair si un « priming signal » serait nécessaire, comme pour les cellules nucléées (Hottz *et al.* 2013; Murthy *et al.* 2017).

In vitro, l'infection de macrophages par le virus de la dengue a provoqué l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Wu *et al.* 2013).

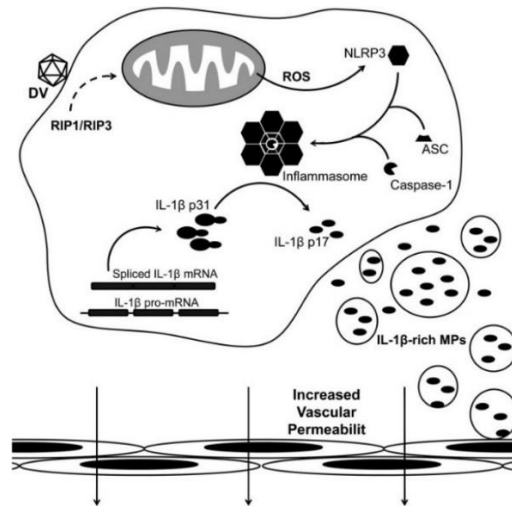


Figure 19. Mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3 plaquettaire dans la dengue (Hottz *et al.* 2013). L'exposition des plaquettes au virus de la dengue (DV) aboutit à l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'activation de l'inflammasome est induite par la génération de ROS mitochondriaux médiée par RIP1/RIP3. Les microparticules (MPs) riches en IL-1 β relarguées suite à cette activation conduisent à l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium.

C) Bruton Tyrosine Kinase (BTK) : régulateur de l'inflammasome NLRP3

La Bruton Tyrosine Kinase (BTK) est une protéine kinase cytoplasmique de 76 KDa principalement exprimée par les cellules hématopoïétiques : cellules lymphoïdes B, cellules myéloïdes, plaquettes etc. Elle appartient à la famille des kinases Tec (TFKs) qui comprend cinq membres : BTK, TEC (tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma), ITK (interleukin-2

inducible T-cell kinase), BMX (bone-marrow tyrosine kinase gene on chromosome X) et RLK (resting lymphocyte kinase). Chez l'homme, le gène codant pour la protéine BTK est situé sur le chromosome X (Smith *et al.* 1998). Les mutations au niveau de ce gène sont à l'origine d'une maladie appelée agammaglobulinémie liée à l'X (XLA) (Bruton 1952). Elle est caractérisée par un manque de cellules B matures (Smith *et al.* 1998), de production d'immunoglobulines et donc par une réponse immunitaire humorale déficiente. Les malades sont sujets à des infections bactériennes récurrentes (Ochs et Smith 1996).

L'étude de cette maladie et des mutations associées ont permis de mettre en évidence le rôle primordial de la BTK dans le développement, la différenciation et la signalisation des cellules B (Vetrie *et al.* 1993; Smith *et al.* 1998; Mohamed *et al.* 1999). Cette protéine joue également un rôle essentiel dans le système immunitaire inné, notamment dans la voie de signalisation des TLRs (López-Herrera *et al.* 2014; Pal Singh *et al.* 2018). Elle intervient aussi dans les mécanismes physiopathologiques de certaines hémopathies lymphoïdes malignes comme la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome du manteau.

La BTK est constituée de 5 domaines (Figure 20) dont un domaine Pleckstrin-Homology (PH) en N-Terminal, un domaine Tec Homology (TH) riche en proline, de deux domaines SRC Homology SH2 et SH3 qui possède un site d'autophosphorylation (Y223) et enfin, en C-Terminal d'un domaine kinase présentant à la fois un site de phosphorylation (Y551) ainsi qu'un site permettant la liaison de l'ibrutinib (C481), un inhibiteur de la BTK (López-Herrera *et al.* 2014; Pal Singh *et al.* 2018).

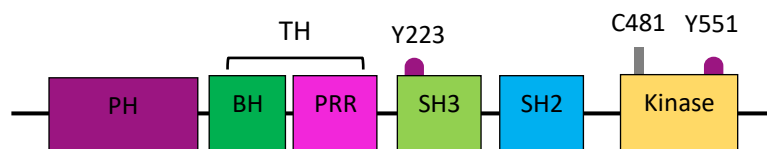


Figure 20. Structure de la Bruton Tyrosine Kinase (d'après Pal Singh *et al.* 2018)

Chacun de ces domaines peut interagir avec une grande variété de protéines essentielles à la signalisation intracellulaire, à l'activation et à la régulation de la BTK. Les sites d'interactions et les différentes protéines interagissant avec la BTK sont présentés ci-dessous (Figure 21).

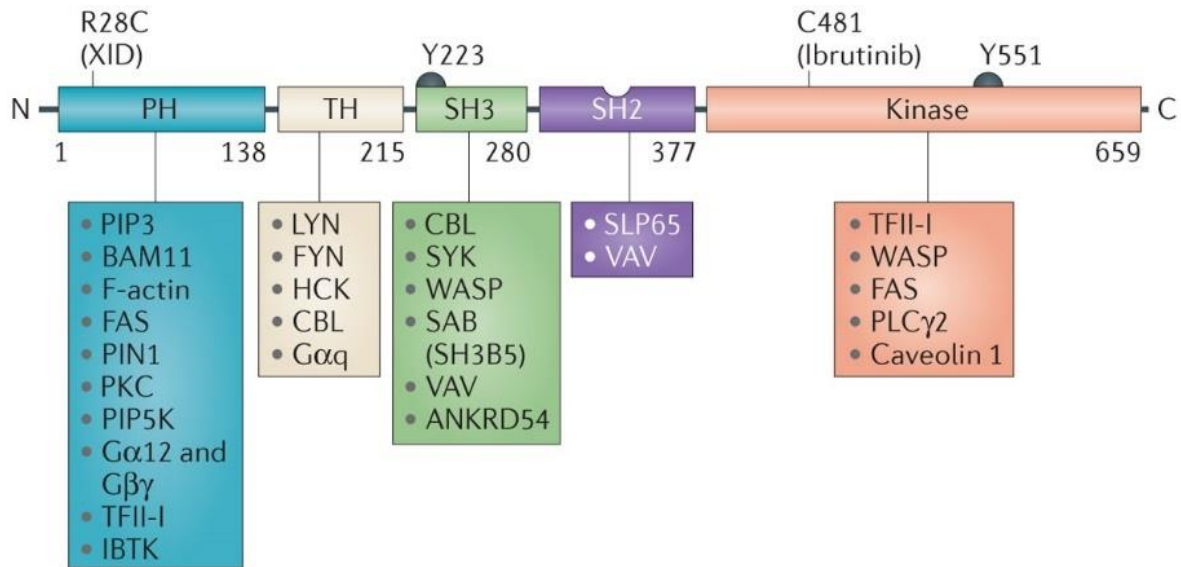


Figure 21. Bruton Tyrosine Kinase et interactions (Hendriks *et al.* 2014)

La forme inactive de la BTK est localisée dans le cytoplasme de la cellule. Suite à l'activation des récepteurs BCRs ou FcγRs, cette dernière est recrutée au niveau de la membrane plasmique par la phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) *via* son domaine PH (Saito *et al.* 2001). Une fois au niveau de la membrane, la BTK est transphosphorylée par les kinases Lyn et Syk (Spleen tyrosine kinase) au niveau du résidu Y551 situé au niveau du domaine kinase (Rawlings *et al.* 1996). Cette phosphorylation du domaine catalytique conduit à l'autophosphorylation du résidu Y223 localisé dans le domaine SH3 (Wahl *et al.* 1997) et permet l'activation complète de la protéine. La phospholipase Cγ2 (PLCγ2) est ensuite phosphorylée par la BTK. Cette étape est indispensable à l'activation de la PKC et au déclenchement de l'influx de Ca^{2+} (Watanabe *et al.* 2001) et permet par la suite l'activation des facteurs de transcription NFAT et NF-κB. L'activation de ces voies par la BTK permet *in fine* la synthèse d'un grand nombre de protéines à l'origine de la sécrétion d'anticorps, de la production de cytokines et de la prolifération des cellules B (Figure 22).

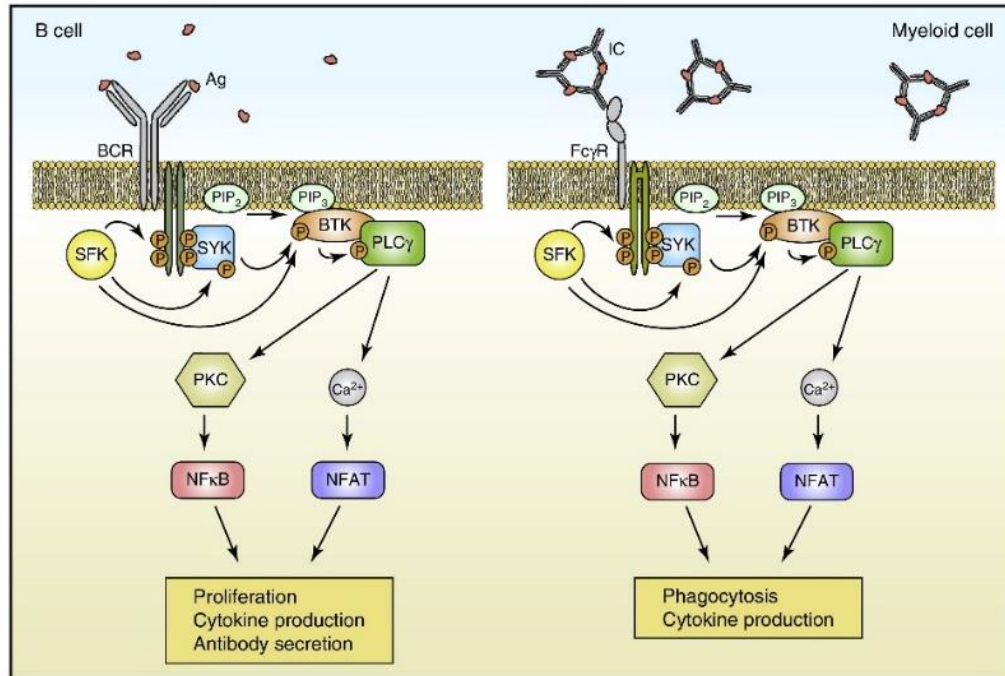


Figure 22. Voies de signalisations des récepteurs BCR et FcγR (Whang *et al.* 2014)

La BTK joue aussi un rôle clef dans la voie de signalisation des TLRs (Figure 23). En effet, de nombreuses études montrent que la BTK interagit avec les TLR4, 6, 8 et 9 *via* leur domaine TIR (Jefferies *et al.* 2003; Doyle *et al.* 2007) ainsi qu'avec MyD88, Mal et TIRAP en aval de ces TLRs. La BTK s'est révélée être indispensable dans cette voie dans l'induction de l'activation de NFκB et dans la production de cytokines inflammatoires comme TNF-α (Jefferies *et al.* 2003; Horwood *et al.* 2006; Doyle *et al.* 2007).

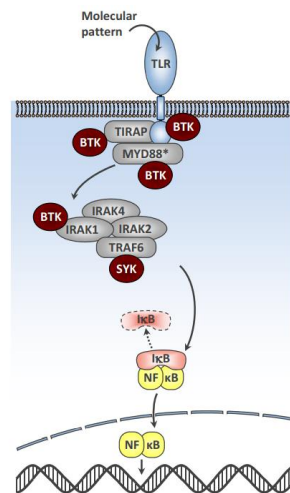


Figure 23. Voie de signalisation des TLRs (Muggen *et al.* 2016)

Plus récemment, des études ont montré que la BTK était essentielle à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Ito *et al.* 2015; X. Liu *et al.* 2017; Murthy *et al.* 2017), que cette dernière pouvait se lier à l'ASC et à NLRP3 par liaison de son domaine kinase au domaine PYD de l'ASC et au domaine NACHT de NLRP3 (Ito *et al.* 2015).

En effet, l'utilisation de macrophages péritonéaux provenant de souris Xid (présentant une mutation ponctuelle de la BTK) d'une part et l'utilisation d'inhibiteur de la BTK d'autre part ont montré une baisse importante de la sécrétion d'IL-1 β suggérant une implication de la BTK dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Ito *et al.* 2015). Ces différentes études suggèrent fortement que la BTK pourrait réguler l'activation de l'inflammasome NLRP3 et donc l'inflammation.

Ce rôle de régulateur de l'inflammasome NLRP3 est également observé dans des cellules comme les plaquettes (Murthy *et al.* 2017; Vogel *et al.* 2018). En effet, l'inhibition de la BTK a permis de limiter l'activation plaquettaire, l'agrégation et la formation de thrombus *in vitro* induit par l'activation de l'inflammasome NLRP3 suite à la stimulation des plaquettes par le collagène ou la thrombine (Murthy *et al.* 2017).

La Bruton Tyrosine Kinase tient donc un rôle central dans de multiples voies de signalisation. De nombreuses approches thérapeutiques ciblant cette kinase ont par conséquent été développées. L'utilisation d'inhibiteurs de la BTK dans des maladies auto-immunes et inflammatoires impliquant l'inflammasome NLRP3 serait donc une perspective thérapeutique intéressante d'autant plus qu'il existe déjà des inhibiteurs de la BTK comme l'ibrutinib utilisés pour le traitement d'hémopathies malignes.

D) Ibrutinib

L'ibrutinib® ou le PCI-32765 est le premier inhibiteur de la BTK à avoir été développé. Il est capable de se lier de manière covalente et irréversible à la BTK au niveau du résidu C481. Son utilisation fut acceptée pour la première fois par la FDA (Food and Drug Administration) en 2013 pour le traitement du lymphome du manteau. Aujourd'hui, l'ibrutinib est également utilisé pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et dans la macroglobulinémie de Waldenström (Zhang *et al.* 2021).

De nombreuses études ont mis en évidence l'intérêt de l'utilisation de cet inhibiteur dans d'autres pathologies comme l'arthrite rhumatoïde (Whang *et al.* 2014).

Cette molécule entraîne toutefois quelques effets secondaires comme les éruptions cutanées, la fibrillation auriculaire, des saignements, des diarrhées et de la fatigue. Certains de ces effets seraient causés par de potentielles interactions de l'ibrutinib avec d'autres membres de la famille des Tec Kinases. Désormais, il existe des inhibiteurs de BTK de deuxième génération plus spécifiques de la BTK comme l'acalabrutinib (Series *et al.* 2019; Byrd *et al.* 2021).

La drépanocytose

I – Historique et épidémiologie

A) Découverte et évolution de la connaissance sur la maladie

Les « *globules rouges falciformes* » furent évoqués pour la première fois dans la littérature par le cardiologue James Herrick, en 1910 suite à la réalisation d'un frottis sanguin chez un patient Antillais anémique de 20 ans originaire de Grenade (Herrick 1910), (Figure 24).

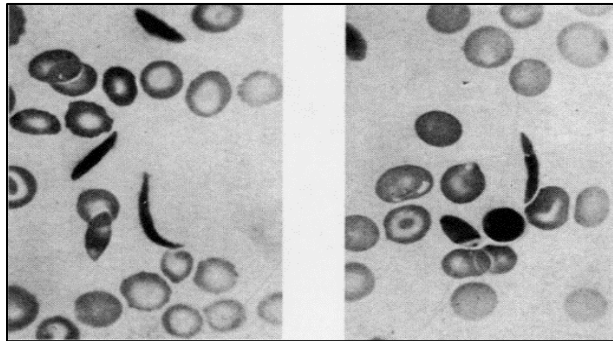


Figure 24. Globules rouges normaux et globules rouges falciformes (Herrick 1910)

Un an plus tard, Washburn évoque le cas d'une femme de 25 ans admise à l'hôpital universitaire de Virginie présentant des globules comparables à ceux décrits par Herrick (Serjeant 2010).

Puis, Cook et Meyer en 1915 ont mis en évidence ces mêmes anomalies sur un frottis sanguin chez une patiente de 21 ans. L'investigation menée dans la famille a révélé que les frères et sœurs de la patiente avaient souffert de graves anémies. Le père de cette famille, non malade, avait un frottis sanguin frais normal mais, l'observation plusieurs jours après de la préparation scellée a révélé que ce dernier présentait lui aussi des globules anormaux (Cook et Meyer 1915). C'est à partir de ce moment qu'est suggérée pour la première fois l'hypothèse d'une transmission héréditaire de la maladie.

Ce n'est qu'en 1949, que le mode de transmission est élucidé, grâce à l'étude de Neel (Neel 1949) qui évoque la présence d'un gène récessif dans la population noire aboutissant à des formes asymptomatiques « sickle cell trait », « sickle cell trait » dans le cas d'individus hétérozygotes et à des formes symptomatiques « sickle cell anemia » dans le cas d'individus homozygotes.

Dans cette même année, avec l'évolution de la technique d'électrophorèse, Linus Pauling et son groupe découvrent que l'hémoglobine (Hb) anormale porte une charge électrique plus positive que l'hémoglobine normale.

C'est la première fois qu'une maladie d'origine « moléculaire » est décrite dans la littérature. Dans cette même étude, les chercheurs suggèrent la présence d'hémoglobines anormales interagissant entre elles et causant la falciformation des globules rouges (GRs) (Pauling et Itano 1949). Puis, en 1957, Vernon Ingram montre que la drépanocytose est due à un simple remplacement d'un acide glutamique par une valine en position 6 de la chaîne β^S de la globine (Ingram 1957).

B) Distribution géographique et données épidémiologiques

(1) Drépanocytose et paludisme

Haldane fut le premier en 1949 à être intrigué par la correspondance de répartition entre le paludisme et la drépanocytose en Afrique (Lederberg 1999). Le paludisme ou malaria est une maladie parasitaire causée par un parasite du genre *Plasmodium* transmis à l'homme lors d'une pique par un *anophèle* infecté. L'espèce *Plasmodium falciparum* est responsable des formes graves du paludisme conduisant parfois au décès.

Parallèlement, dans ces zones palustres, on observe un maintien relativement élevé de la fréquence allélique du gène β^S dont la forme homozygote est connue pour conduire à des décès précoces en absence de soins médicaux. Cette forte mortalité des individus homozygotes aurait dû conduire à la disparition de cet allèle létal.

Dès 1954, Allison émet la possibilité que les individus porteurs du trait drépanocytaire (β^S/β^A) puissent, dans certaines conditions, avoir un avantage sélectif par rapport aux individus sains (β^A/β^A) et aux drépanocytaire (β^S/β^S) (Allison 1954). En effet, les porteurs du trait drépanocytaire résistent mieux au paludisme que les sujets sains grâce à un développement limité du parasite dans les GRs AS (Friedman 1978; Pasvol *et al.* 1978; Friedman 1979).

Certaines hypothèses suggèrent que la génération accrue de ROS dans les GRs AS et la polymérisation de l'Hb dans les GRs AS parasités pourraient être à l'origine de l'inhibition de la croissance du parasite (Bunn 2013). Ces mécanismes conduisent ainsi à une survie préférentielle

des hétérozygotes AS lors des épisodes de paludisme et à un maintien de l'allèle létal à une fréquence élevée dans ces zones.

(2) Dans le monde

Cette maladie serait apparue de façon indépendante en Afrique et en Inde et s'est répandue aux Antilles, au Brésil ainsi qu'aux Etats-Unis *via* le commerce triangulaire puis plus récemment en Europe de l'Ouest avec les migrations liées aux conflits armés ou à des raisons économiques (Figure 25).

Aujourd'hui, la drépanocytose est une maladie très fréquente qui affecte des millions de personnes dans le monde. Chaque année dans le monde, plus de 300000 bébés naissent avec une forme grave de cette maladie (OMS). Elle constitue un véritable problème de santé publique dans certaines parties du monde.

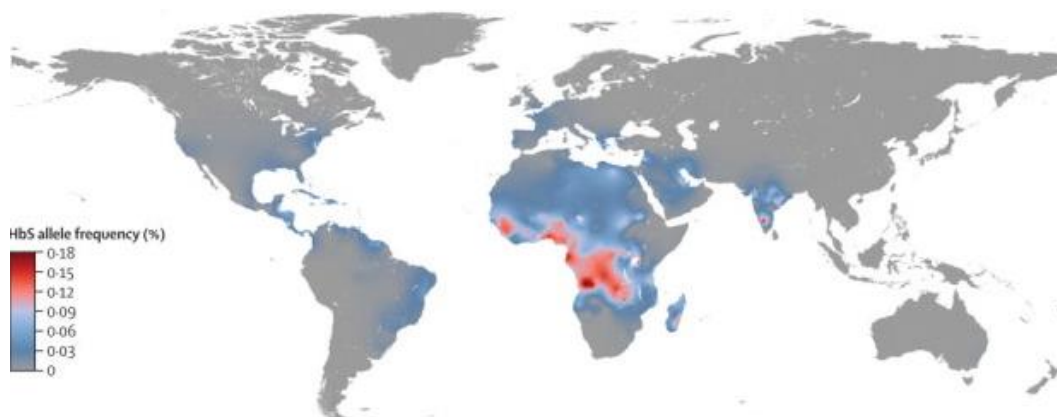


Figure 25. Fréquence de l'allèle HbS dans le monde (Piel *et al.* 2013)

(3) France métropolitaine et aux Antilles

En France, elle est la maladie génétique la plus fréquente avec une prévalence d'une naissance sur deux mille pour l'hexagone (AFDPHE 2016) et d'une naissance sur trois cents en Guadeloupe (Saint-Martin *et al.* 2013).

Aux Antilles, l'étude de cette maladie a débuté dans les années 1980 avec l'arrivée de Guy Méréault en Guadeloupe. A cette époque, si la présence de la drépanocytose en Guadeloupe était documentée, sa fréquence n'était pas connue. Le docteur Guy Méréault va dans un premier temps réaliser une étude épidémiologique en Guadeloupe et en Martinique, avec l'aide du docteur

Nicole Monplaisir, étude qui va aboutir en 1983 à la mise en place du dépistage systématique à la naissance en Guadeloupe puis en Martinique, en Guyane et à la Réunion. En France hexagonale, le dépistage néonatal de la Drépanocytose est ciblé, c'est-à-dire qu'il ne concerne que les enfants de couple dont un au moins des parents est originaire de régions à forte prévalence de la maladie.

II – La drépanocytose : une hémoglobinopathie

A) L'hémoglobine

(1) Structure et fonction de l'hémoglobine

L'hémoglobine est une protéine tétramérique de 68 kDa contenue dans les globules rouges. Elle est formée de deux chaînes de types α et de deux chaînes de types β identiques deux à deux. Les sous-unités α sont composées de 141 acides aminés et les sous-unités β de 146. Chacune de ses sous unités possède une molécule d'hème au niveau de laquelle se trouve un atome de fer (Figure 26). C'est au niveau de cet atome de fer que viennent se fixer l'oxygène (O_2) puis le dioxyde de carbone (CO_2) au cours du processus de respiration.

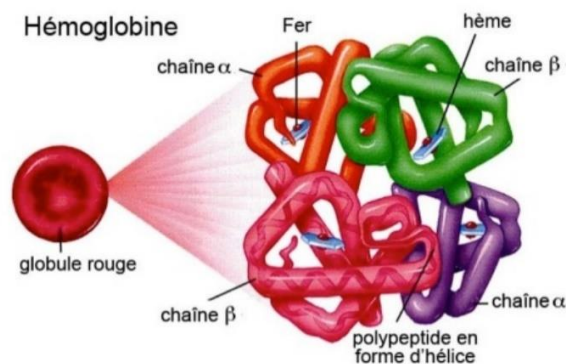


Figure 26. Structure de l'hémoglobine

(2) Localisation et expression des gènes globines

Les gènes de type alpha et de type bêta-globine sont regroupés respectivement sur les chromosomes 16 et 11 chez l'homme (Figure 27).

Le cluster de la famille α -globine comprend trois gènes ζ , α_2 , α_1 et le cluster de la famille β -globine comprend cinq gènes ϵ , γ , γ , δ , β orientés dans les deux cas dans le sens 5' - 3'.

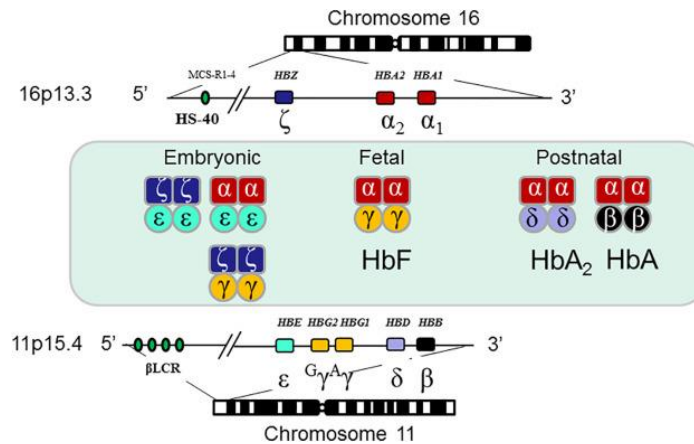


Figure 27. Les gènes alpha et bêta globines (Farashi *et al.* 2018)

Durant l'ontogénèse, différents types d'hémoglobines sont produites : l'hémoglobine embryonnaire, l'hémoglobine fœtale et l'hémoglobine adulte. Elles correspondent à l'association de différentes chaînes de type α et de chaînes de type β (Figure 28) :

- Au stade embryonnaire, l'Hb formée résulte de l'association soit des chaînes zêta et epsilon, soit alpha et epsilon, soit zêta et gamma menant à la formation d'hémoglobine Gower 1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) et Portland ($\zeta_2 \gamma_2$).
- Au stade fœtal, l'Hb est formée par l'association de chaînes alpha et de chaînes gamma ($\alpha_2 \gamma_2$), on parle d'HbF.
- Après la naissance, deux formes d'hémoglobines sont produites : la forme majoritaire constituée des chaînes alpha et bêta ($\alpha_2 \beta_2$), l'HbA, et une forme minoritaire constituée des chaînes alpha et delta ($\alpha_2 \delta_2$), c'est l'HbA₂.

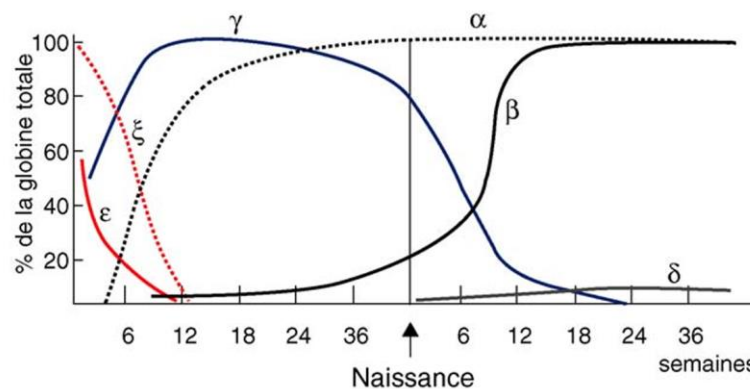


Figure 28. Switch de l'hémoglobine durant l'ontogénèse (Labie *et al.* 2005)

B) Les hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies sont des maladies génétiques qui affectent la structure ou la production de la molécule d'hémoglobine. Ces hémoglobinopathies sont dues à des mutations au niveau des gènes alpha ou bêta globines. Il existe deux types d'hémoglobinopathies :

- Les hémoglobinopathies qualitatives, l'hémoglobine est produite en quantité normale, mais cette dernière présente une structure anormale (on parle d'hémoglobines anormales).
- Les hémoglobinopathies quantitatives, l'hémoglobine produite est une hémoglobine normale, mais cette dernière est produite en quantité insuffisante, avec un déficit de synthèse de chaîne de type alpha ou de type bêta (on parle de thalassémies) (Williams *et al.* 2012).

C) Les syndromes drépanocytaires

La notion de « syndromes drépanocytaires » regroupe l'ensemble des hémoglobinopathies résultant de la transmission par les parents soit de deux allèles β^S ou à la fois d'un allèle β^S et d'une autre mutation du gène β -globine (Tableau 2) pour les cas les plus fréquemment rencontrés.

L'hémoglobinopathie la plus sévère et la plus répandue est la drépanocytose SS, qui résulte de l'état d'homozygotie de l'allèle β^S . La mutation β^S (rs334 A/T) entraîne la substitution d'un acide glutamique par une valine au niveau du codon 6 du gène β -globine et la production d'une hémoglobine anormale, l'HbS (Hémoglobine Sickle). En Guadeloupe, ce génotype représente la moitié des cas de syndromes drépanocytaires (53%) (Saint-Martin *et al.* 2013).

L'autre hémoglobinopathie couramment retrouvée est la forme hétérozygote composite SC. Ce syndrome représente 39,5% des cas en Guadeloupe (Saint-Martin *et al.* 2013). L'hémoglobine C résulte d'une mutation par substitution d'un acide glutamique par une lysine au niveau du codon 6 du gène β -globine (β^C).

Les autres syndromes drépanocytaires, présentés dans le tableau ci-dessous sont beaucoup moins fréquents en Guadeloupe. On retrouve les hétérozygotes composites SO^{Arab} , SD^{Punjab} , SC^{Harlem} et SE associant l'allèle β^S et un mutant qualitatif du gène β -globine. Les allèles β^{OArab} ,

β^{DPunjab} , β^{E} et β^{Charlem} sont caractérisés respectivement par une mutation entraînant les substitutions $\beta^{121}\text{Glu}>\text{Lys}$, $\beta^{121}\text{Glu}>\text{Gln}$, $\beta^{26}\text{Glu}>\text{Lys}$ et enfin une double mutation $\beta^{6}\text{Glu}>\text{Val}$, $\beta^{73}\text{Asp}>\text{Asn}$. D'autres syndromes drépanocytaires sont causés par l'association d'un allèle β^{S} avec différents variants β -thalassémiques. Le génotype $\text{S}\beta^0$ *thalassémie* est la forme la plus sévère, caractérisée par une absence totale de production d'HbA. Le génotype $\text{S}\beta^+$ *thalassémie* est lui, caractérisé par une production plus ou moins réduite d'HbA conduisant à des syndromes drépanocytaires allant de la forme modérée à sévère en fonction du taux d'HbA produit. Enfin, d'autres génotypes plus rares sont caractérisés par l'association d'un allèle β^{A} normal avec un allèle présentant une double mutation. C'est le cas des génotypes $\text{AS}^{\text{Antilles}}$ et AS^{Oman} . Dans ces deux derniers cas, l'expression de la maladie se fait suivant un mode autosomal dominant.

Génotypes	Caractéristiques	Mutations
Formes sévères de la drépanocytose		
SS	Homozygote SS	$\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$
$\text{S}\beta^0$ thalassémie	Allèle β^S associé à un mutant quantitatif du gène β -globine	
$\text{S}\beta^+$ thalassémie		
SO^{Arab}	Allèle β^S associé à un mutant qualitatif du gène β -globine	$\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^{121}\text{Glu}>\text{Lys}$
$\text{SD}^{\text{Punjab}}$		$\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^{121}\text{Glu}>\text{Gln}$
$\text{SC}^{\text{Harlem}}$		$\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$, $\beta^{73}\text{Asp}>\text{Asn}$
Formes modérées de la drépanocytose		
SC	Allèle β^S associé à un mutant qualitatif du gène β -globine	$\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^6\text{Glu}>\text{Lys}$
SE		$\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^{26}\text{Glu}>\text{Lys}$
$\text{S}\beta^+$ thalassémie	Allèle β^S associé à un mutant quantitatif du gène β -globine	
$\text{AS}^{\text{Antilles}}$	Syndromes drépanocytaires dominants	$\beta^A/\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$, $\beta^{23}\text{Val}>\text{Ile}$
AS^{Oman}		$\beta^A/\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$, $\beta^{121}\text{Glu}>\text{Lys}$

Tableau 2. Exemples de syndromes drépanocytaires (adapté de Rees *et al.* 2010)

III – Une physiopathologie complexe impliquant différents types cellulaires

Il y a plusieurs années, la compréhension de la physiopathologie de la drépanocytose était concentrée sur le rôle des globules rouges. Mais, aujourd'hui, grâce à de nombreuses études, cette dernière se révèle être bien plus complexe, avec la mise en lumière de l'implication de plusieurs autres types cellulaires comme les cellules endothéliales, les leucocytes, les plaquettes mais aussi les vésicules provenant de l'activation de ces cellules : les microparticules.

Les cellules sanguines en circulation chez les patients drépanocytaires interagissent de manière anormale entre elles, mais aussi avec les cellules endothéliales (Figure 29). Ces différents mécanismes seront discutés dans les paragraphes suivants.

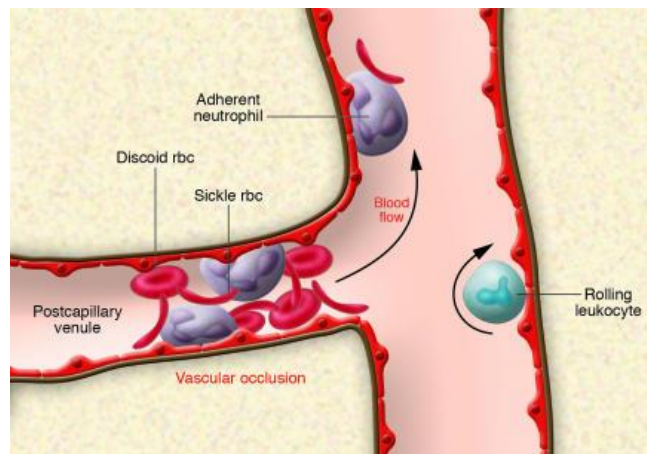


Figure 29. Interactions cellulaires conduisant à la vaso-occlusion (Frenette *et al.* 2007)

A) Polymérisation de l'hémoglobine S et conséquences

(1) Polymérisation et caractéristiques de l'Hémoglobine S

La polymérisation de l'HbS est le point de départ de la physiopathologie de la drépanocytose. Elle produit lorsque l'HbS est sous sa forme désoxygénée.

Cette polymérisation de l'Hb S est due à l'établissement d'interactions non-covalentes entre la chaîne latérale hydrophobe de la valine mutée en position 6, avec la phénylalanine en position 85 et la leucine en position 88, localisées sur la chaîne β d'une autre molécule d'HbS (Figure 30).

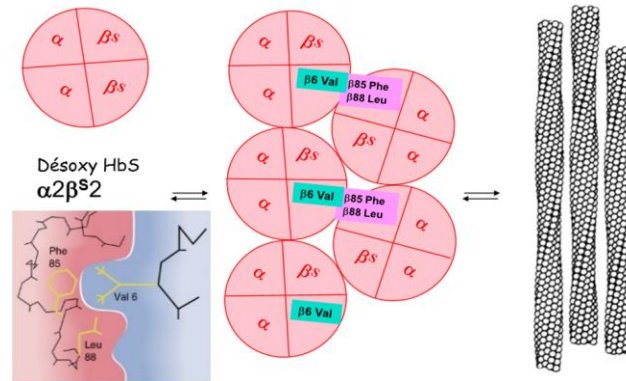


Figure 30. Processus de polymérisation de l'hémoglobine S

Lorsque l'Hb passe de l'état oxygéné à l'état désoxygéné, ces deux acides aminés forment une poche hydrophobe qui va attirer la valine hydrophobe créant ainsi de fortes interactions entre les différents tétramères. D'autres acides aminés vont contribuer à la consolidation de ces interactions et favoriser la polymérisation de l'Hb. Le polymère formé est constitué de sept paires de brins stabilisées par des interactions entre chaque double brin (Figure 31).

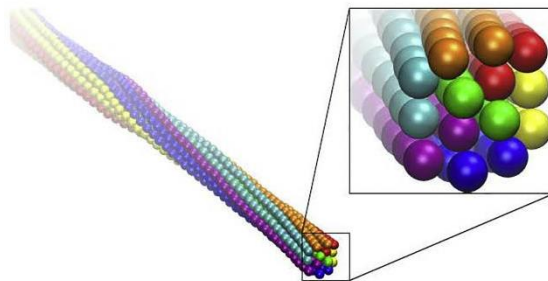


Figure 31. Structure d'un polymère d'hémoglobine S (Lu *et al.* 2016)

(2) Conséquences de la polymérisation : Altération des érythrocytes

a) Falciformation des érythrocytes

Les globules rouges des patients drépanocytaires ont une forme quasiment normale lorsque l'Hb est sous forme oxygénée mais ont toutefois une déformabilité réduite par rapport aux sujets sains (Brandão *et al.* 2003). Cette diminution de la capacité à se déformer est également retrouvée chez les patients SC (Tripette *et al.* 2009). La falciformation des GRs chez ces patients

se produit lors de la diminution de la pression partielle en oxygène (Hahn et Gillespie 1927), principalement lors du passage des GRs au niveau des veinules post-capillaires. Durant leur cycle de vie, les GRs des patients drépanocytaires SS vont subir des cycles de falciformations et de défalciformations jusqu'à ce que certains GRs soient falciformés de manière irréversible et cela quel que soit l'état d'oxygénation de l'Hb.

b) Déshydratation des érythrocytes

La déshydratation des globules rouges drépanocytaires en condition désoxygénée résulte de l'augmentation de la perméabilité membranaire et de l'activation de transporteurs comme le canal Gardos et le cotransporteur K-Cl (Figure 32).

L'augmentation de la perméabilité membranaire des GRs drépanocytaires aux cations serait la conséquence de l'altération membranaire causée la polymérisation de l'HbS. Cette perméabilité cationique appelée « Psickle » est connue pour favoriser l'entrée de Ca^{2+} dans les GRs. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire active le canal Gardos conduisant à un efflux de K^+ . Pour maintenir l'électroneutralité et l'osmolarité du GR, cette perte de K^+ s'accompagne respectivement d'une perte d'ions Cl^- et d'une perte d' H_2O conduisant à une déshydratation du GR.

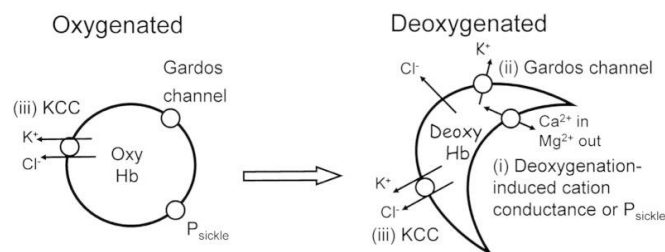


Figure 32. Mécanisme de déshydratation des globules rouges (Hannemann *et al.* 2015)

Le cotransporteur K-Cl (KCC) est également impliqué dans le mécanisme de déshydratation des GRs en condition désoxygénée. En effet, ce cotransporteur est hyperactivé dans les GRs des patients SS conduisant à un efflux important de K^+ , de Cl^- aboutissant à une perte d' H_2O . Cette déshydratation du GR entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en HbS favorisant la polymérisation de cette dernière. Les GRs deviennent alors plus denses et plus rigides conduisant à une obstruction des veinules post-capillaires. Ces cycles de falciformations et de déshydratation aboutissent *In fine* à une falciformation irréversible des GRs et à leur lyse.

c) Altérations membranaires des érythrocytes

La polymérisation de l'HbS, les cycles de falciformations et défalciformations des GRs provoquent des altérations membranaires (Figure 33). En effet, la polymérisation de l'HbS conduit à un détachement du cytosquelette à la membrane favorisant l'exposition anormale de la phosphatidylsérine (PS) (Lubin *et al.* 1981) et de la portion transmembranaire de certaines protéines (Frenette *et al.* 2007) du côté du feuillet externe de la membrane. L'exposition de la PS résulte également de l'augmentation du calcium intracellulaire dans les GRs qui entraîne l'inhibition de l'activité de la flippase dont le rôle est d'assurer le transport de la PS de la couche externe vers la couche interne de la membrane (DeJong *et al.* 2006).

- la Flippase : assure le transport de la PS de la couche externe vers la couche interne. Son action est inhibée par l'augmentation des ions Ca^{2+} .

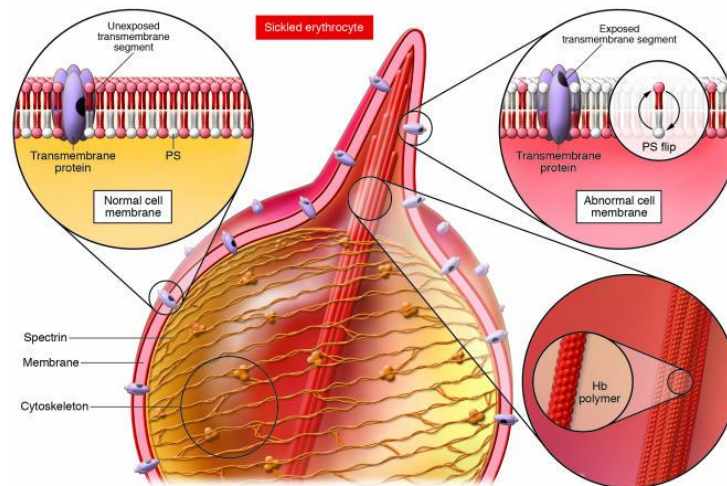


Figure 33. Altération membranaire des érythrocytes causée par la polymérisation de l'hémoglobine S (Frenette *et al.* 2007)

Cette externalisation de la PS favoriserait la destruction des GRs en circulation par les macrophages (Fadok *et al.* 2001). L'externalisation de la PS est également connue pour favoriser l'adhérence des GRs à l'endothélium vasculaire (Setty *et al.* 2002) et pour activer la coagulation (Chiu *et al.* 1981). Ces propriétés pro-adhérentes et pro-coagulantes des GRs des patients drépanocytaires, dues à la surexpression de la PS participeraient à l'obstruction de la microcirculation et à la vaso-occlusion (Chiu *et al.* 1981; Setty *et al.* 2002).

La répétition des cycles de falciformations des GRs couplée à l'instabilité de l'HbS favorisent son auto-oxydation qui conduit à la production de ROS. Ces ROS sont responsables de l'altération des constituants de la membrane du GR comme la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines membranaires (Voskou *et al.* 2015). La peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines entraînent une perte de l'organisation des lipides membranaires et de la déformabilité des GRs (Barodka *et al.* 2014).

B) Adhérence des érythrocytes et des leucocytes à l'endothélium vasculaire

(1) Adhérence des érythrocytes

Le phénotype pro-adhérent des GRs résulte en partie de l'anémie hémolytique chronique caractéristique des patients drépanocytaires. Dès les années 1979, les études de Hoover *et al.* et de Hebbel *et al.* ont montré que les GRs falciformes étaient plus aptes à adhérer aux cellules endothéliales que les GRs des sujets sains (Hoover *et al.* 1979; Hebbel *et al.* 1980).

En effet, les GRs matures adhèrent à l'endothélium par le biais d'immunoglobuline G (IgG) présentes à la surface des GRs dont le taux est exacerbé chez les drépanocytaires (Hebbel *et al.* 1984; Hebbel *et al.* 1987). L'externalisation de la PS au niveau des GRs permet également une interaction de ces derniers à l'endothélium *via* un récepteur spécifique à la PS exprimée lors de l'activation des cellules endothéliales (Setty *et al.* 2008). Les GRs peuvent aussi se lier à la matrice sous-endothéliale au niveau de l'endothélium endommagé par interaction entre sa protéine Lu-BCAM et la laminine. En plus des GRs matures (biconcaves et falciformes), les patients présentent également en circulation des GRs immatures.

En effet, l'hémolyse accrue est responsable de la stimulation de la moelle osseuse avec pour conséquence, un relargage important de GRs immatures appelés les réticulocytes de stress qui expriment le CD71. Dans des conditions physiologiques, les réticulocytes de stress sont retenus dans la moelle grâce à des molécules d'adhérence. Leur phénotype pro-adhérent favorise donc leur interaction avec d'autres types cellulaires lors de leur passage dans les vaisseaux sanguins. Les réticulocytes expriment des protéines de surface telles que le CD36 et VLA-4 (Very late antigen-4) (Joneckis *et al.* 1993) capables de se lier respectivement, au CD36 de l'endothélium, par l'intermédiaire d'une molécule de thrombospondine et à la protéine VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) des cellules endothéliales activées (Gee *et al.* 1995). La protéine VLA-4 est

capable d'interagir avec d'autres ligands comme la fibronectine plasmatique et la fibronectine de la matrice sous-endothéliale.

L'ensemble des interactions mentionnées précédemment sont représentées dans la figure ci-dessous (Figure 34).

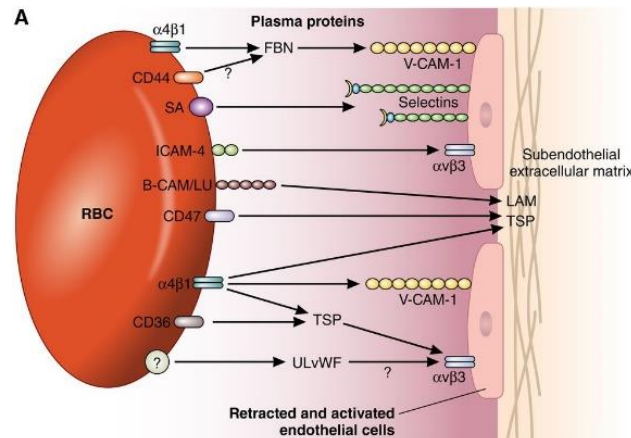


Figure 34. Adhérence des érythrocytes à l'endothélium vasculaire (Telen 2016). Les globules rouges SS interagissent avec les cellules endothéliales, la matrice sous endothéliale ainsi qu'avec des protéines plasmatiques. Les molécules d'adhérence des GRs comprennent ICAM-4, Lu/BCAM, VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), CD36, CD44, CD47, l'acide sialique (SA) ; les cellules endothéliales, VCAM-1, les selectines E, P, l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et la matrice sous-endothéliale, la laminine. Les protéines plasmatiques comme la thrombospondine (TSP), le facteur von Willebrand (vWF) et la fibronectine (FBN) favorisent les interactions indirectes entre les GRs et l'endothélium.

Les plaquettes contribuent également à l'augmentation de l'adhérence des GRs SS à l'endothélium (Antonucci *et al.* 1990; Brittain *et al.* 1993). En effet, les plaquettes activées sécrètent de grandes quantités de thrombospondine-1 (TSP-1) conduisant à une augmentation des interactions indirectes entre les GRs et les cellules endothéliales *via* le CD36 comme énoncé précédemment (Sugihara *et al.* 1992; Browne *et al.* 1996).

L'adhérence des GRs SS à l'endothélium vasculaire n'est pas sans conséquence puisqu'en plus d'induire une obstruction mécanique de la microcirculation, ces derniers sont connus pour générer un stress oxydant accru et l'activation du facteur de transcription NF- κ B des cellules endothéliales. L'activation de NF- κ B favorise la transcription de gènes codant pour des molécules d'adhésion comme la E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1 (Sultana *et al.* 1998).

(2) Adhérence des leucocytes

Les leucocytes et plus particulièrement les neutrophiles sont connus pour adhérer directement à l'endothélium vasculaire (Figure 35) et de manière accrue durant les crises vaso-occlusives chez les patients drépanocytaires (Fadlon *et al.* 1998).

Ces neutrophiles activés (Lard *et al.* 1999) expriment à leur surface un certain nombre de molécules d'adhésion comme PSGL-1, ESL-1 (E selectine ligand-1), les intégrines $\alpha_M\beta_2$ et $\alpha_L\beta_2$ qui interagissent au niveau des cellules endothéliales activées avec la P-sélectine, la E-sélectine et ICAM-1 respectivement (Hebbel *et al.* 1997; Okpala *et al.* 2002).

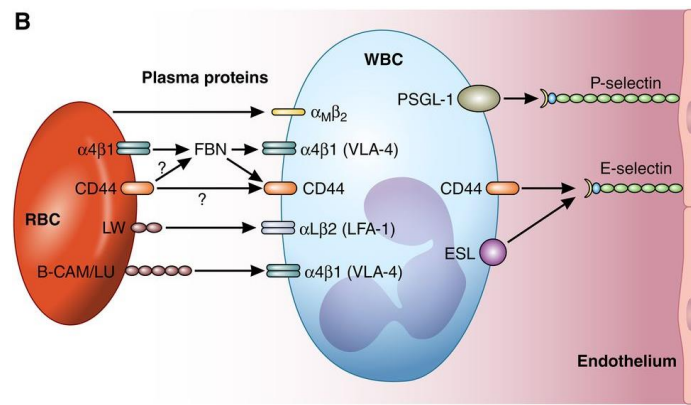


Figure 35. Adhérence des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Telen 2016). Les polynucléaires neutrophiles adhérents expriment des molécules d'adhésion comme PSGL-1 et ESL-1 qui interagissent au niveau des cellules endothéliales activées avec la P-sélectine et la E-sélectine respectivement.

Ces nouvelles découvertes concernant l'adhérence anormale des neutrophiles à l'endothélium ainsi qu'aux GRs a permis de faire évoluer le dogme selon lequel la vaso-occlusion dans la drépanocytose impliquait seulement les globules falciformes et les réticulocytes (Turhan *et al.* 2002; Frenette *et al.* 2007).

D'autres interactions cellulaires peuvent être également observées notamment entre les GRs et les monocytes (Schwartz *et al.* 1985) et entre les GRs et les neutrophiles (Hofstra *et al.* 1996). En effet, chez les patients drépanocytaires SS, la quantité d'agrégats GRs-Neutrophiles ($CD66b^+/CD235a^+$) est significativement augmentée sans toutefois qu'il y ait de différence significative entre les patients traités ou non à l'hydroxyurée (HU) (Dominical *et al.* 2014). Les

réticulocytes (CD235a⁺/CD71⁺) étaient principalement impliqués dans la formation de ces agrégats (Dominical *et al.* 2014).

C) Intervention des plaquettes

L'activation excessive des plaquettes est aujourd'hui bien établie dans la drépanocytose. Elle contribue à l'état prothrombotique, hypercoagulable et à la vaso-occlusion caractéristique de cette pathologie.

(1) Activation plaquettaire

L'activation plaquettaire est connue depuis un grand nombre d'années dans cette pathologie (Beurling-Harbury *et al.* 1989). Cette activation des PLTs chez les patients drépanocytaires est observée à l'état de base mais également durant les crises où l'activation de ces dernières est exacerbée (Wun *et al.* 1997; 1998; Inwald *et al.* 2000; Villagra *et al.* 2007; Proença-Ferreira *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2016). L'activation des PLTs est également observée chez les sujets drépanocytaires SC cependant, aucune différence n'est observée entre les patients SS et SC bien que l'expression clinique de la maladie soit moins sévère chez les patients SC (Wun *et al.* 1998). Chez les patients drépanocytaires, l'activation des PLTs est caractérisée à la fois par un taux augmenté de PLTs CD62P⁺, CD36⁺, PAC-1⁺(α IIb β 3 activée) (Wun *et al.* 1997; 1998; Proença-Ferreira *et al.* 2014) et par une surexpression à la surface des PLTs du CD62P, du CD40L (Inwald *et al.* 2000).

L'activation des plaquettes dans la drépanocytose est perçue comme résultant principalement de l'hémolyse intravasculaire. En effet, lors de l'hémolyse, les GRs libèrent des DAMPs comme l'Hb, l'Hème, HMGB1 et l'ADP qui sont de puissants activateurs plaquettaires. L'implication de l'ADP dans l'activation plaquettaire ayant déjà été évoquée dans la partie « plaquette », seuls les mécanismes d'activation médiés par l'hème et l'hémoglobine seront détaillés dans les paragraphes suivants.

Des études ont montré que l'Hb avait la capacité d'induire l'activation des plaquettes *via* son interaction avec la GP1b α (Singhal *et al.* 2015; Annarapu *et al.* 2016). *In vitro*, les chercheurs ont montré que cette activation était dépendante des concentrations en hémoglobine et que l'HbS avait une meilleure affinité pour la GPIb α que l'HbA (Annarapu *et al.* 2016). Cette interaction

provoque la phosphorylation de Lyn, PI3K, AKT et ERK dans les plaquettes aboutissant *in fine* à leur activation (Annarapu *et al.* 2016).

L'Hb libre provoque aussi une diminution de la biodisponibilité en NO (Monoxyde d'azote) (Reiter *et al.* 2002). Le NO est le principal vasodilatateur vasculaire produit par les cellules endothéliales. Cette diminution du NO contribue indirectement à l'activation des plaquettes (Villagra *et al.* 2007) car ce gaz dissous est connu pour inhiber l'activation et l'agrégation plaquettaire, ainsi que l'adhésion de ces dernières à l'endothélium (Loscalzo 2001).

L'étude de Cardenes *et al.* suggère également que l'Hb est responsable du dysfonctionnement du complexe V (ATP synthase) de la chaîne respiratoire des mitochondries chez les drépanocytaires SS avec pour conséquence une augmentation de la production de ROSm aboutissant à l'activation des plaquettes (Cardenes *et al.* 2014).

D'autres voies d'activation des plaquettes par l'Hb dans la drépanocytose sont suggérées notamment la voie des TLR4 sans preuve à l'appui. Cependant, une étude très récente a montré que l'HbS favorise l'activation des monocytes et la production de cytokines pro-inflammatoires *via* les TLR4 (Allali *et al.* 2022).

L'hème, lui, est capable de se lier à CLEC-2 et d'induire l'activation et l'agrégation des plaquettes par la phosphorylation de Syk, BTK et PLC γ chez l'humain et la souris (Bourne *et al.* 2020). Bien que l'hème soit également connu pour provoquer l'activation des cellules endothéliales et des macrophages par son interaction avec le TLR4 (Dutra *et al.* 2014; Belcher *et al.* 2014), aujourd'hui, il n'existe aucune preuve directe montrant que l'hème favorise l'activation plaquettaire *via* ce récepteur dans la drépanocytose. Toutefois, une première étude a montré chez des souris drépanocytaires transgéniques, que l'injection de faibles doses d'hémine conduit au développement de symptômes semblables au syndrome thoracique aigu (STA). L'injection d'hémopexine ou d'inhibiteur du TLR4 avant la perfusion d'hémine a protégé les souris drépanocytaires (Ghosh *et al.* 2013).

La stimulation des plaquettes par ces activateurs hémolytiques aboutit à la sécrétion d'ADP, d'ATP, de TSP-1, de vWF, de sCD40L, à la surexpression de la P-sélectine, à l'activation de la GPIIb/IIIa, à l'exposition de la phosphatidylsérine ce qui favorise l'agrégation des plaquettes, la

formation d'agrégats plaquettes-leucocytes, l'interaction des plaquettes avec l'endothélium vasculaire conduisant à une activation de l'endothélium et à une hypercoagulabilité.

(2) Interactions des plaquettes avec l'endothélium et les cellules circulantes

a) Plaquettes et cellules circulantes

Les plaquettes activées peuvent se lier aux monocytes, aux érythrocytes, aux neutrophiles et former des agrégats. Compte tenu de leur activation plaquettaire accrue, les patients drépanocytaires ont des taux d'agrégats circulants significativement augmentés. En effet, de nombreuses études évoquent une augmentation significative des agrégats plaquettes-érythrocytes (Wun *et al.* 1997; 1999; Inwald *et al.* 2000), plaquettes-neutrophiles (Polanowska-Grabowska *et al.* 2010; Frelinger *et al.* 2014), plaquettes-monocytes (Wun *et al.* 2002; Frelinger *et al.* 2014) comparativement aux sujets sains.

L'interaction des GRs avec les PLTs se fait par liaison de ICAM-4 à l'intégrine GPIIb/IIIa des PLTs (Hermand *et al.* 2003). Les agrégats plaquettes-neutrophiles sont principalement médiés par les interactions P-sélectine/PSGL-1 et GPIIb/IIIa/MAC-1 par l'intermédiaire du fibrinogène qui permet une adhésion ferme des neutrophiles aux plaquettes (Tableau 3), (Zarbock *et al.* 2007).

Enfin, en ce qui concerne les interactions plaquettes-monocytes, celles-ci résultent d'interaction entre P-sélectine/PSGL-1 et CD40L/MAC-1.

Endothelial cells	↔	Platelet	↔	Neutrophil
CD40	↔	CD40L	↔	CD40
Fibrinogen, fibronectin	↔	GIIb/IIIa	↔	Mac-1
P-selectin, vWF	↔	GPIb α	↔	Mac-1, ICAM-1
		ICAM-2	↔	LFA-1
Unknown, possibly GPIb α	↔	P-selectin	↔	PSGL-1, L-selectin

Multicellular adhesive interactions occur among platelets, neutrophils, and endothelial cells. vWF, von Willebrand factor; ICAM, intracellular adhesion molecule; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1; PSGL, P-selectin glycoprotein ligand; Mac-1, macrophage antigen-1.

Tableau 3. Molécules permettant l'adhérence des plaquettes aux cellules endothéliales et aux neutrophiles (Zarbock *et al.* 2007)

Récemment, il a été montré que les agrégats plaquettes-neutrophiles contribuaient à la vaso-occlusion pulmonaire dans un modèle murin drépanocytaire en obstruant les artérioles pulmonaires. Dans cette même étude, l'occlusion de ces artérioles a été atténuée après un

traitement bloquant la P-sélectine (Bennewitz *et al.* 2017). Toutes ces données suggèrent l'implication des plaquettes dans la vaso-occlusion d'une part et d'autre part dans le développement du syndrome thoracique aigu observé chez les patients drépanocytaires.

b) Plaquettes et endothélium

Les plaquettes étant dans un état activé dans la drépanocytose, celles-ci sont capables d'adhérer à l'endothélium vasculaire et d'induire l'activation des cellules endothéliales tout comme les GRs SS. En effet, l'incubation de cellules endothéliales avec des plaquettes de patients drépanocytaires induit une surexpression de molécules d'adhérence telles que ICAM-1 et E-sélectine, contribuant potentiellement au processus vaso-occlusif (Proença-Ferreira *et al.* 2014).

Les plaquettes peuvent se lier aux cellules endothéliales *via* l'interaction de la GPIb α et du CD40L plaquettaire à la P-sélectine et au récepteur CD40 des cellules endothéliales respectivement (Tableau 3).

Dans la drépanocytose, le contexte inflammatoire conduit également à l'activation et au dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire (Hebbel *et al.* 1997; Gladwin *et al.* 2014). En effet, dans la circulation sanguine, la quantité de cellules endothéliales circulantes est significativement élevée à l'état de base et d'autant plus durant les crises vaso-occlusives (Sowemimo-Coker *et al.* 1989; Solovey *et al.* 1997) évoquant l'activation et le détachement des cellules endothéliales. Ces lésions aboutissent à l'exposition de protéines telles que le vWF, le collagène, la fibronectine, et la laminine.

(3) Inflammation et thrombose

Les DAMPs libérés à la suite de l'hémolyse intravasculaire ainsi que les phénomènes d'ischémie-reperfusion dus à l'obstruction de la microcirculation participent à l'activation des cellules endothéliales et des cellules immunes comme les monocytes, les neutrophiles et les plaquettes et *in fine* à la sécrétion de cytokines inflammatoires responsables de l'inflammation chronique observée dans la drépanocytose. C'est à partir de ces premières étapes que va être initiée la thromboinflammation conduisant *in fine* à une amplification de la vaso-occlusion.

De nombreuses études ont mis en évidence un certain nombre d'anomalies hémostatiques expliquant l'état prothrombotique et d'hypercoagulabilité des patients drépanocytaires. En effet, celles-ci montrent une diminution des niveaux d'anticoagulants endogènes comme la protéine C

et la protéine S (Nsiri *et al.* 1996), une surexpression du TF au niveau des monocytes et des cellules endothéliales (Solovey *et al.* 1998; Setty *et al.* 2012), une augmentation du nombre de vésicules extracellulaires exprimant le TF et la PS (Shet *et al.* 2003; van Beers *et al.* 2009) et enfin une diminution des niveaux de certains facteurs de la voie intrinsèque de la coagulation (FXII, prékallikréine, kininogène) suggérant une consommation de ces derniers (Miller *et al.* 1983; Gordon *et al.* 1985).

Dans cette pathologie, les plaquettes activées, en plus des monocytes et des neutrophiles (Conran *et al.* 2018), sont connues pour sécréter des quantités accrues de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le CD40L soluble et l'IL-6 (Davila *et al.* 2015) et favoriser la production de NETs (Clark *et al.* 2007). Tous ces phénomènes concourent à un état thromboinflammatoire aboutissant à une vaso-occlusion de la microcirculation.

L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans la figure ci-dessous (Figure 36).

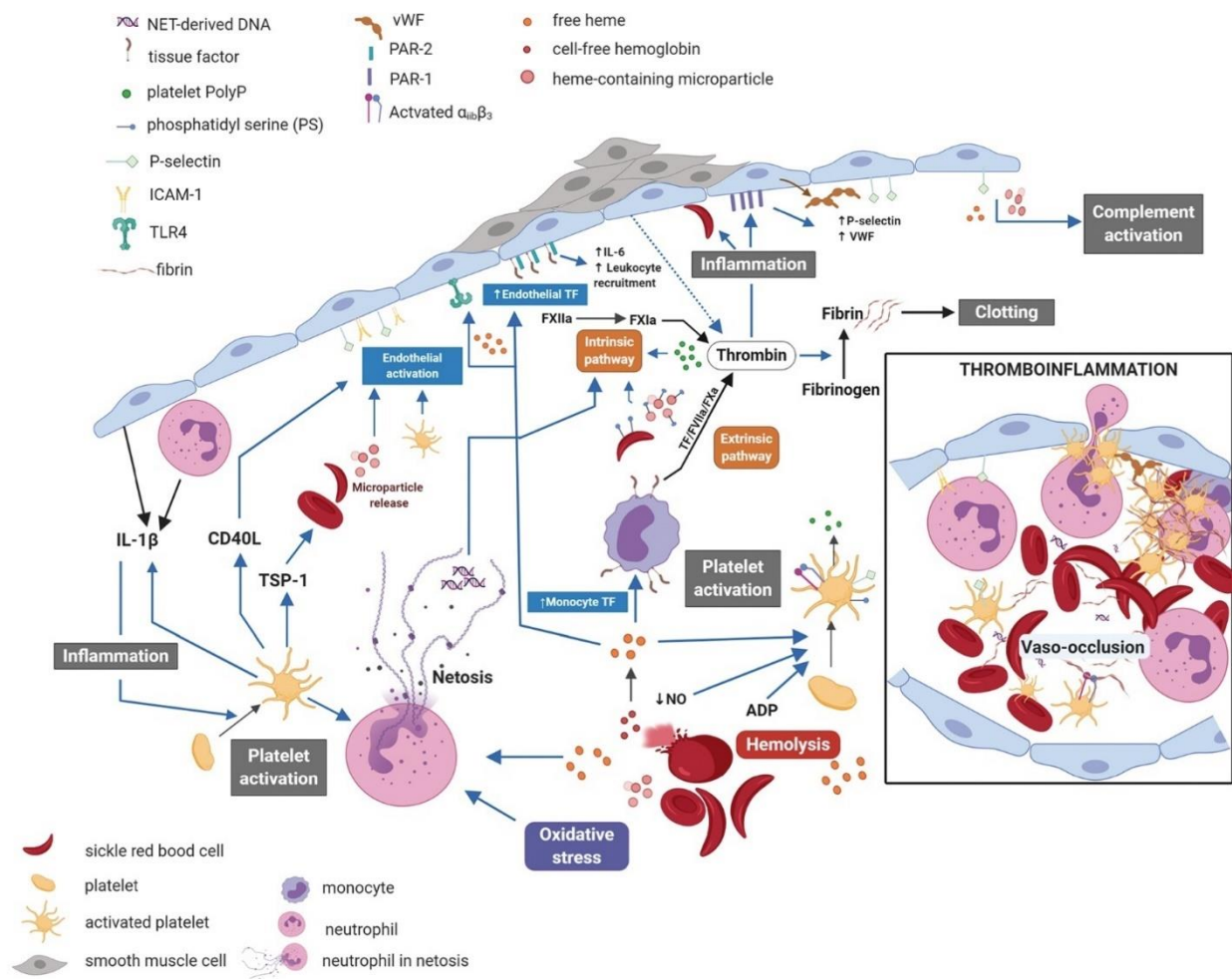


Figure 36. Voies thromboinflammatoires dans la drépanocytose (Conran *et al.* 2020). L'hémolyse intravasculaire ainsi que les événements d'ischémie-reperfusion contribuent à l'activation des plaquettes, des cellules endothéliales, des monocytes et favorisent la formation de NETs. Dans ce contexte, les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion (P-sélectine, ICAM-1), qui conduisent au recrutement des leucocytes, des globules rouges et des plaquettes au niveau de la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales, les leucocytes et les plaquettes activées produisent également de l'IL-1 β qui exacerbe l'inflammation. L'expression de FT par les monocytes initie la coagulation et conduit à la génération de thrombine puis de fibrine. Le recrutement des leucocytes, des plaquettes et des globules rouges au niveau de la paroi vasculaire, la formation d'agrégats hétérocellulaires, l'initiation de la coagulation et la formation de NETs conduisent à des événements thromboinflammatoires caractéristiques dans la drépanocytose.

(4) Les microparticules

Les microparticules (MPs) sont définies comme de petites vésicules phospholipidiques de 100 à 1000 nm de diamètre dérivées de la membrane cytoplasmique de cellules activées, soumises à un stress ou en apoptose. Elles sont constituées de protéines membranaires et de matériels cytosoliques dérivés des cellules dont elles proviennent (Burger *et al.* 2013) (Figure 37).

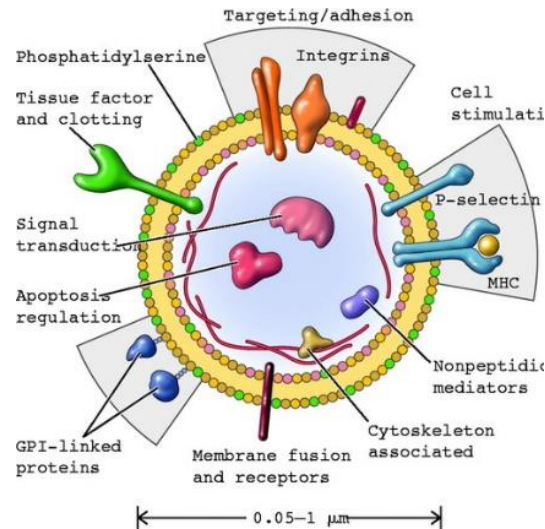


Figure 37. Structure d'une microparticule (Hugel *et al.* 2005)

Longtemps considérées comme des débris cellulaires inertes, les MPs sont aujourd'hui connues comme étant des médiateurs importants dans certains processus cellulaires physiologiques et pathologiques. Elles seraient impliquées dans la communication intercellulaire, l'inflammation, la coagulation, l'adhérence ainsi que dans un certain nombre de pathologies comme les maladies vasculaires, le cancer, les maladies infectieuses et le diabète (Wu *et al.* 2013).

Ces vésicules extracellulaires interviendraient également dans la physiopathologie de la drépanocytose. L'hyperactivation cellulaire due au contexte pro-inflammatoire, pro-oxydant ainsi que la diminution de la biodisponibilité en NO seraient à l'origine de la génération excessive de microparticules chez ces patients. Les études rapportent des concentrations en MPs plasmatiques 3 à 4 fois plus élevées chez ces patients à l'état de base comparativement aux sujets sains (Hebbel *et al.* 2016). Ces MPs proviennent principalement des plaquettes et des globules rouges (Shet *et al.* 2003; van Beers *et al.* 2009; Nebor *et al.* 2013; Kasar *et al.* 2014) et en infime quantité des

cellules endothéliales, des monocytes ou des granulocytes. Ces observations suggèrent une activation plus importante des plaquettes et des globules rouges dans cette pathologie. Une étude réalisée chez des enfants drépanocytaires SC à l'état de base a montré que ces patients eux aussi, présentaient majoritairement des MPs d'origine plaquettaire et érythrocytaire mais en quantité moindre que les enfants drépanocytaires SS (Garnier *et al.* 2017). Par ailleurs, une augmentation des concentrations en MPs totales durant les crises (Shet *et al.* 2003; Kasar *et al.* 2014; Hierso *et al.* 2017) avec, dans le cas des MPs-GR, une externalisation plus importante de phosphatidylsérine (Garnier *et al.* 2020) a été observée.

Enfin, des données suggèrent que ces vésicules seraient des bio-effecteurs des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la drépanocytose. En effet, une étude récente de notre laboratoire a montré que les MPs des patients drépanocytaires étaient capables de modifier le phénotype des cellules endothéliales en induisant une surexpression d'ICAM-1 favorisant ainsi l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium vasculaire (Garnier *et al.* 2020).

Ces microparticules, tout comme les globules rouges SS, les neutrophiles, les monocytes et les plaquettes interviennent dans le processus de vaso-occlusion caractéristique chez les patients drépanocytaires.

IV – Les manifestations cliniques

Les symptômes associés à la drépanocytose peuvent apparaître dès l'âge de 4 mois avec la diminution de la production de l'Hb Fœtale. Chez les drépanocytaires, les symptômes ont tendance à varier d'un patient à l'autre et à évoluer au fil des années. Les patients présentent des complications chroniques et/ou aiguës qui provoquent des dommages d'organes graves (Figure 38) pouvant conduire à la mort.

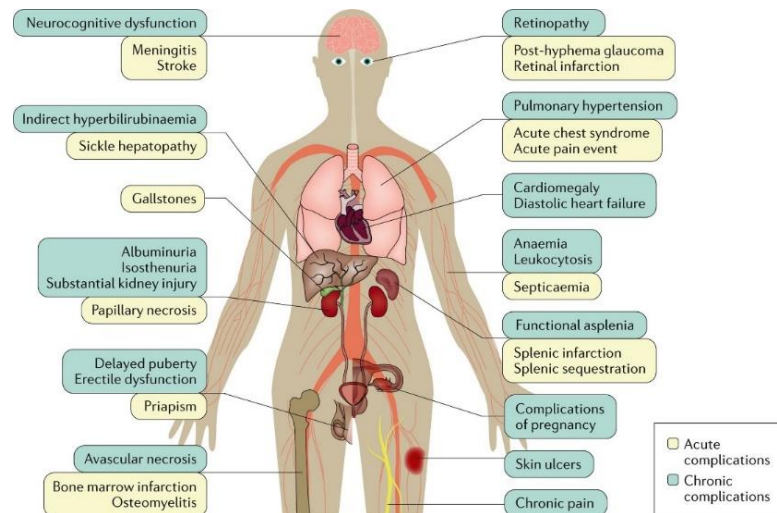


Figure 38. Complications cliniques chez les drépanocytaires (Kato *et al.* 2018)

A) Sous-phénotypes drépanocytaires

Depuis quelques années, les complications liées à la drépanocytose sont classées en deux sous-phénotypes chevauchants attribués soit à des événements vaso-occlusifs ou à des événements hémolytiques (Figure 39).

(1) Sous-phénotype hypervisqueux/vaso-occlusif

Le sous-phénotype hypervisqueux/vaso-occlusif regroupe les symptômes résultant de l'obstruction des vaisseaux sanguins en lien avec une viscosité sanguine augmentée : les crises douloureuses, les syndromes thoraciques aigus (STA), l'ostéonécrose. Ce sous-phénotype est caractérisé par de forts taux d'hémoglobine et une augmentation du nombre de leucocytes.

(2) Sous phénotype hyperhémolytique/vasculopathie

Le sous-phénotype hyperhémolytique/vasculopathie regroupe les accidents vasculaires cérébraux, l'hypertension pulmonaire, la glomérulopathie, le priapisme et les ulcères de jambes. Ce sous-phénotype est caractérisé par une diminution de la biodisponibilité en NO due à l'hémolyse intravasculaire (Reiter *et al.* 2002) conduisant à une dysfonction endothéliale. Ce profil de patients présente généralement une expression accrue des marqueurs de l'hémolyse comme les réticulocytes, la lactate déshydrogénase, l'ASAT et la bilirubine ainsi que de faibles taux d'hémoglobine.

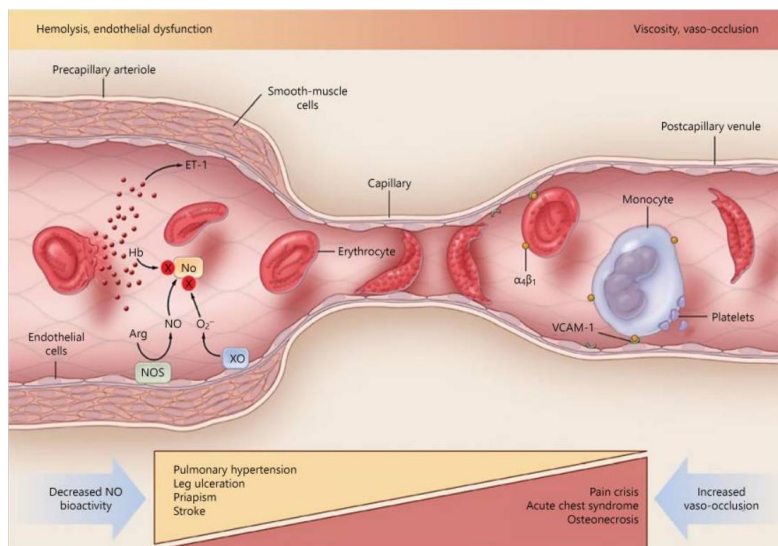


Figure 39. Sous phénotypes de la drépanocytose (Gladwin *et al.* 2008)

B) Complications cliniques

(1) Anémie hémolytique

L'anémie hémolytique fait partie des complications majeures de la drépanocytose. Elle résulte d'une grande fragilité des GRs du fait des cycles répétés de falciformations et de defalciformations. Chez les patients drépanocytaires SS, cette hémolyse intravasculaire se traduit par des niveaux d'Hb faibles. En effet, ces derniers présentent des taux en Hb de 7 à 9 g/dL vs 12 à 16g/dL chez les individus sains. Ce taux d'Hb est souvent plus élevé chez les patients SC et S β^{thal} (entre 9 et 12 g/dL) qui présentent une anémie très légère (Arlet *et al.* 2009).

Cette hémolyse provoque également une diminution de l'hématocrite à environ 24% en moyenne contre 40% pour des individus sains et à une augmentation du taux de réticulocytes qui est supérieur à 200 G/L.

(2) Crise vaso-occlusive

La crise vaso-occlusive est la complication la plus courante de la drépanocytose. Elle est également la première cause d'hospitalisation chez les patients. Elle est définie comme un épisode douloureux résultant de l'obstruction des vaisseaux sanguins principalement au niveau des veinules post-capillaires, des jonctions et des courbures des vaisseaux (Kaul *et al.* 1989) ; les veinules post-capillaires étant des sites où la vitesse du flux sanguin et la teneur en oxygène est

faible (Figure 41). Les épisodes douloureux sont de fréquence, de durée et d'intensité variables (Platt *et al.* 1991). Elles peuvent toucher toutes les parties du corps notamment les os longs, le bassin, le thorax.

(3) Syndrome thoracique aigu

Le syndrome thoracique aigu (STA) fait partie des causes les plus fréquentes de décès et d'hospitalisation chez les patients atteints de drépanocytose (Platt *et al.* 1994). Cette complication clinique est caractérisée par la présence d'un infiltrat sur la radiologie thoracique des patients accompagné de certains symptômes comme une douleur thoracique, une tachypnée, de la toux, de la fièvre (E. P. Vichinsky *et al.* 2000). Le STA résulte d'une obstruction des veinules post-capillaires au niveau de la microcirculation pulmonaire (Oppenheimer *et al.* 1971; Haupt *et al.* 1982).

(4) Ostéonécrose

L'ostéonécrose est présente chez près de la moitié des patients drépanocytaires adultes (Steinberg 1999). Elle est caractérisée par une dégénérescence et par la mort progressive du tissu osseux à la suite des cycles répétés d'obstruction des vaisseaux sanguins qui empêchent l'irrigation correcte du territoire. La tête du fémur et la tête de l'humérus font partie des zones les plus affectées par cette complication. Les patients présentant des concentrations élevées en hémoglobine (Hawker *et al.* 1982; Mukisi-Mukaza *et al.* 2011) présenteraient plus de risque de développer cette complication ce qui suggère que l'augmentation de la viscosité sanguine contribuerait à l'ostéonécrose.

(5) Accidents vasculaires cérébraux

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est dû à l'obstruction ou à la rupture d'un vaisseau sanguin au niveau du cerveau, on parle respectivement d'AVC ischémique et d'AVC hémorragique.

L'AVC est un risque majeur de mortalité à la fois chez les adultes et chez les enfants, plus particulièrement chez les drépanocytaires SS (Platt *et al.* 1994; Leikin *et al.* 1989). Les AVC d'origine hémorragique sont principalement retrouvés chez les patients adultes SS âgés de 20 à

29 ans (Powars *et al.* 1978; Ohene-Frempong *et al.* 1998). Les enfants eux, sont principalement touchés par des AVC ischémiques (Ohene-Frempong *et al.* 1998).

(6) Hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), est définie comme une augmentation de la pression sanguine au niveau des vaisseaux sanguins pulmonaires. Elle est définie comme une pression artérielle pulmonaire moyenne au repos ≥ 25 mm Hg déterminée par cathétérisme droit (Badesch *et al.* 2009). Selon plusieurs études, cette complication est retrouvée dans 6 à 10,4% des patients drépanocytaires (Gordeuk *et al.* 2016). Les patients souffrant de cette complication présentent un taux de mortalité exacerbé (Ataga *et al.* 2006; Mehari *et al.* 2012). De nombreuses études associent l'HTAP des patients drépanocytaires à l'hémolyse intravasculaire à l'origine de la diminution de la biodisponibilité en NO aboutissant à une vasoconstriction des vaisseaux sanguins et donc à une hypertension pulmonaire (Gladwin *et al.* 2004; Kato *et al.* 2006).

V – Stratégies thérapeutiques

Aujourd'hui, bien que la physiopathologie de la maladie ne soit pas totalement élucidée, les découvertes de ces dernières décennies ont permis d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients par une meilleure prise en charge avec l'utilisation de traitements préventifs ciblant les globules rouges mais aussi d'autres types cellulaires (Figure 45).

A) Traitements préventifs

(1) Hydroxycarbamide

L'hydroxycarbamide ou hydroxyurée (HU), est une molécule antimétabolique qui fut synthétisée pour la première fois en 1869 (Timson 1975). Initialement utilisé pour le traitement de la leucémie, ce médicament fut le premier à être accepté pour traiter la drépanocytose par la FDA en 1998 sous le nom de Droxia® et par l'EMA (European Medicines Agency) en 2007 sous le nom de Siklos®.

L'HU par sa faculté à générer du NO, est capable d'augmenter la synthèse de l'Hémoglobine F (HbF) dans les cellules progénitrices érythroïdes humaines *via* l'activation de la guanylate

cyclase (Cokic *et al.* 2003). Cette augmentation de l'HbF limite la polymérisation de l'HbS et par conséquent la falciformation des globules rouges (Charache *et al.* 1992).

Depuis un certain nombre d'années, l'HU est donc devenu un traitement clef dans la prise en charge de cette maladie puisque son utilisation permet de diminuer les risques de crises vaso-occlusives (CVO) (Charache *et al.* 1995; Jayabose *et al.* 1996; Voskaridou *et al.* 2010), de syndromes thoraciques aigus (STA) (Charache *et al.* 1995; Hankins *et al.* 2005) et d'AVC chez les enfants (Ware *et al.* 1999). Cette molécule est aussi bien connue pour sa faculté à réduire les besoins en transfusion (Charache *et al.* 1995; Voskaridou *et al.* 2010), l'anémie (Jayabose *et al.* 1996), la mortalité (Steinberg *et al.* 2003; Voskaridou *et al.* 2010) ainsi que la fréquence et la durée d'hospitalisation des patients (Voskaridou *et al.* 2010; Jayabose *et al.* 1996).

L'HU est connu pour avoir de multiples effets biologiques bénéfiques (Figure 40) comme la diminution significative des réticulocytes, des neutrophiles (Maier-Redelsperger *et al.* 1998), des plaquettes (Jayabose *et al.* 1996), la réduction de l'adhérence des érythrocytes falciformes (Bridges *et al.* 1996) et des neutrophiles aux cellules endothéliales, l'amélioration de la déformabilité des globules rouges (Nader *et al.* 2018) et la vasodilatation des vaisseaux sanguins par sa faculté à augmenter la biodisponibilité en NO.

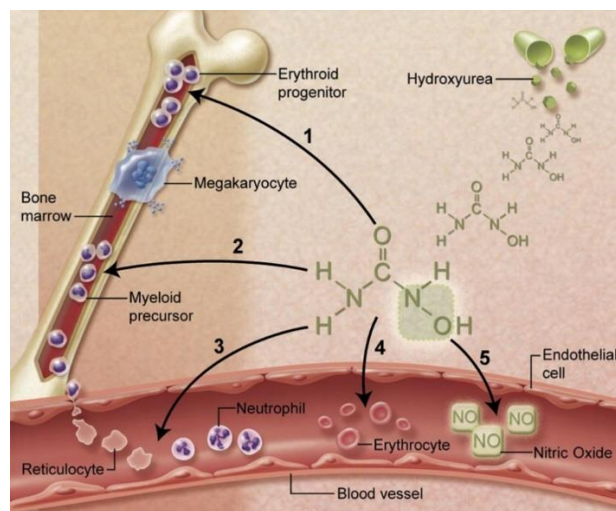


Figure 40. Les effets bénéfiques de l'hydroxyurée (McGann *et al.* 2011). (1) Induction de l'hémoglobine fœtale; (2) Diminution du nombre de neutrophiles et de réticulocytes dans la circulation; (3) Diminution de l'adhérence des neutrophiles, des réticulocytes à l'endothélium, diminution des dommages au niveau de l'endothélium; (4) Augmentation de l'hydratation, réduction de l'hémolyse et de la falciformation des érythrocytes; (5) Libération locale de monoxyde d'azote (NO), vasodilatation.

De nombreuses études, réalisées pour évaluer les risques liés à l'HU chez les drépanocytaires ont montré des effets secondaires limités (Jayabose *et al.* 1996; Hankins *et al.* 2005), avec un risque faible à long terme de développer des cancers (Ware 2010). Chez les enfants suivant ce traitement, une croissance normale (taille, poids, développement pubertaire) a été observée (Wang *et al.* 2002; Hankins *et al.* 2005). Toutefois, ce traitement causerait des problèmes de fertilité dus à une diminution de la quantité de spermatozoïdes dans le sperme chez les hommes (Berthaut *et al.* 2008) et à une diminution des réserves ovariennes chez la femme (Pecker *et al.* 2022).

(2) Crizanlizumab

Le 30 octobre 2020, l'Adakveo® (crizanlizumab) est le deuxième médicament après l'HU à être autorisé en Europe par l'EMA pour la prévention des crises vaso-occlusives chez les patients drépanocytaires de plus de 16 ans.

Le crizanlizumab est un anticorps monoclonal IgG2 Humanisé anti P-sélectine. L'utilisation de cet Ac permet de bloquer les interactions entre la P-sélectine et PSGL-1. Ce traitement permet d'empêcher les phénomènes d'adhérence des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Riley *et al.* 2019) mais peut également limiter l'interaction des plaquettes avec les cellules endothéliales et les leucocytes.

L'administration de l'Adakveo® se fait par voie veineuse à raison de 5mg/Kg avec un intervalle de deux semaines pour les deux premières injections puis toutes les quatre semaines pour les doses suivantes (Han *et al.* 2020).

La mise sur le marché de cette thérapeutique découle d'études montrant des effets relativement bénéfiques avec peu d'effets indésirables. C'est le cas de l'essai clinique de phase 2 réalisé par Ataga et ses collaborateurs sur 198 patients drépanocytaires où l'on observe une diminution significative de la fréquence des crises douloureuses après administration de 14 doses de crizanlizumab (5mg/Kg) durant 1 ans (Ataga *et al.* 2017).

(3) Prasugrel : traitement ciblant les plaquettes

Le prasugrel est un anti agrégant plaquettaire commercialisé sous le nom d'Effient® dont l'autorisation de mise sous le marché en Europe date de l'année 2009. Il est actuellement utilisé pour le traitement des syndromes coronariens aigus, des infarctus du myocarde.

In vivo, le prasugrel est converti en un métabolite actif capable de se lier de manière spécifique et irréversible au récepteur purinergique P2Y₁₂ (Jakubowski *et al.* 2007). L'interaction de cet antagoniste aux récepteurs à l'adénosine diphosphate (ADP) permet d'inhiber l'activation et l'agrégation des plaquettes médiées par l'ADP (Figure 41).

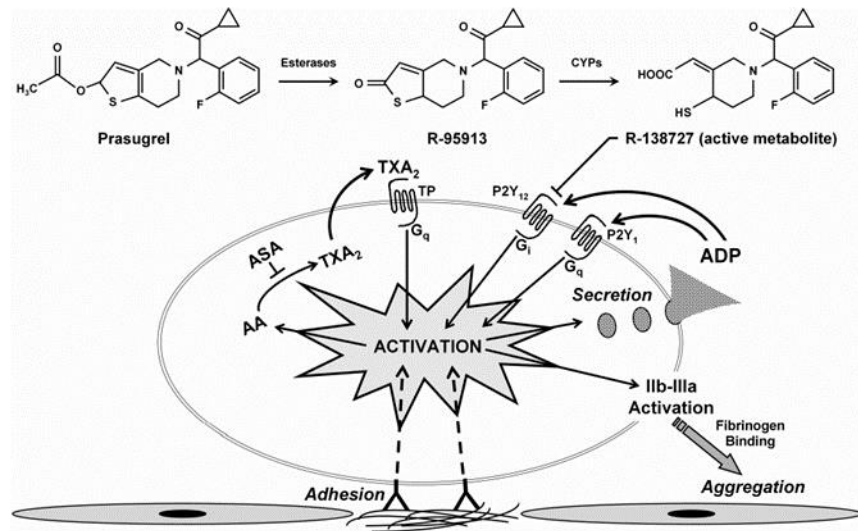


Figure 41. Mode d'action du prasugrel (Jakubowski *et al.* 2007). Inhibition de l'adhésion, de l'activation et de l'agrégation plaquettaire médiées par l'ADP par fixation du métabolite actif (R-138727) au récepteur P2Y₁₂. AA, acide arachidonique ; ADP, adénosine diphosphate ; ASA, aspirine ; CYP, cytochrome P-450 ; TXA₂, thromboxane A₂.

Chez les patients drépanocytaires, l'utilisation du prasugrel semble être une piste thérapeutique relativement intéressante puisque l'hémolyse chronique dans le cas de cette pathologie résulte entre autres d'une augmentation des concentrations plasmatiques en ADP et d'une diminution du NO favorisant l'activation des plaquettes.

Les essais cliniques réalisés chez les patients drépanocytaires font état de nombreux points bénéfiques au niveau cellulaire avec une diminution significative de l'activation des plaquettes, des agrégats monocytes-plaquettes, des agrégats neutrophiles-plaquettes induit *in vitro* par de l'ADP après 12 jours de traitement (Jakubowski *et al.* 2013; 2015).

Les différents essais cliniques relatent un traitement bien toléré, sans effets indésirable majeur, ni évènement hémorragique nécessitant une intervention médicale chez les patients drépanocytaires et les sujets sains (Jakubowski *et al.* 2013; Ted Wun *et al.* 2013; Heeney *et al.* 2016). Si beaucoup d'effets bénéfiques au niveau cellulaire et moléculaire sont apportés par ce

traitement, les essais cliniques n'ont pas montré d'effets cliniques significativement bénéfiques en termes d'intensité des douleurs (Wun *et al.* 2013), de nombre de crises vaso-occlusives, de syndrome thoracique aigu, et du nombre de jours d'hospitalisation par patients par année (Heeney *et al.* 2016).

(4) Voxelotor

Le voxelotor ou également appelé GBT440 est une nouvelle molécule développée capable de se lier de manière réversible à l'HbS et d'inhiber la polymérisation de l'HbS en augmentant l'affinité de l'Hb pour l'oxygène. Les premiers résultats d'un essai clinique de phase 3 évoquent des effets indésirables limités, une diminution des marqueurs de l'hémolyse mais ne montrent pas de diminution significative du nombre de CVO (Vichinsky *et al.* 2019). Des expériences réalisées *in vitro* ont également montré une amélioration la déformabilité des GRs SS et de la viscosité sanguine dans des conditions pauvres en oxygène suite à l'incubation des GRs avec cette molécule (Dufu *et al.* 2018).

(5) Autres traitements

D'autres thérapeutiques symptomatiques sont utilisés de manière récurrente telles que :

- Les antibiotiques, principalement délivrés aux enfants dont le risque de décès est accru en cas d'infections bactériennes (Leikin *et al.* 1989).
- Les antalgiques, pour atténuer et soulager les douleurs. Les patients peuvent se voir administrer des antalgiques plus ou moins forts comme le paracétamol, la codéine et la morphine en fonction de l'intensité de la douleur.
- La transfusion sanguine, visant essentiellement à diminuer l'anémie en augmentant les taux d'Hb. La transfusion va également permettre d'améliorer l'oxygénation des tissus et diminuer la quantité de GRs falciformes circulants.
- Les échanges transfusionnels, utilisés dans le but de remplacer les GRs falciformes des patients par des GRs provenant de sujets sains afin d'atteindre un taux d'HbS < 30% sans dépasser les 11g/dL d'Hb pour éviter d'augmenter la viscosité sanguine (Schmalzer *et al.* 1987). Cet échange permet aussi de diminuer le taux de GRs falciformes circulants.

Si la transfusion et les échanges transfusionnels réduisent grandement le taux d'hospitalisation (Styles *et al.* 1994) en prévenant la survenue de CVO, d'AVC, de STA, celle-ci comporte toutefois des risques d'allo-immunisation et de surcharge en fer qui peuvent être délétères pour le patient.

B) Traitements curatifs

Aujourd'hui, les seuls traitements curatifs permettant de guérir de la drépanocytose sont la greffe de moelle osseuse et la thérapie génique. Ces traitements curatifs sont toutefois lourds, risqués, coûteux et sont donc réservés principalement aux enfants présentant une forme sévère de la maladie avec des antécédents d'AVC, de CVO et de STA.

La greffe de moelle osseuse consiste à détruire les cellules souches de la moelle osseuse du patient par chimiothérapie et à réinjecter à celui-ci des cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur sain HLA compatible, généralement un frère ou une sœur. En France, une étude réalisée sur 234 patients rapporte un taux de survie sans complication après 5 ans de 97,9% et un risque de mortalité lié à la greffe de moins de 2% (Bernaudin *et al.* 2020). Si de nombreux progrès ont été réalisés depuis les années 1988, il existe néanmoins des risques de rejet du greffon, d'infections et d'infertilité.

Avec la lourdeur de la greffe de moelle osseuse, le nombre réduit de donneurs compatibles, les chercheurs ont développé un autre traitement curatif : la thérapie génique. Cette dernière consiste à introduire dans les cellules souches hématopoïétiques du patient un gène β non muté permettant *in fine* la production d'HbA. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour remplacer le gène malade :

- L'introduction du gène non muté dans les cellules hématopoïétiques grâce à des vecteurs viraux (Cavazzana-Calvo *et al.* 2010; Ribeil *et al.* 2017)
- L'utilisation de la technique « gene editing » grâce au système CRISPR-Cas9 qui permet d'exciser et de remplacer le gène muté par une autre séquence (Hoban *et al.* 2016).

La COVID-19

I – Emergence du SARS-CoV-2 dans le monde

A) Historique de l'épidémie

C'est à partir du 8 décembre 2019 que plusieurs cas de pneumonies d'étiologie inconnue sont recensés en Chine dans la capitale de la province de Hubei, Wuhan. Les enquêtes épidémiologiques menées sur place ont rapidement établi un lien entre cette maladie et un marché de fruits de mer où sont vendus des animaux vivants tels que des volailles, des chauves-souris, des serpents, des grenouilles, des lapins, des marmottes et des hérissons, suggérant une infection zoonotique (Mahdy *et al.* 2020). Face à la propagation de cette pneumonie, dès le 31 décembre, la Chine alerte l'OMS (WHO 2019).

Le 7 janvier 2020, un nouveau coronavirus est identifié par le centre chinois de contrôle et de prévention des maladies, suite à son isolement à partir du liquide de lavage broncho-alvéolaire de patients (Lu *et al.* 2020; Zhu *et al.* 2020). Ce virus est alors nommé provisoirement 2019-nCoV puis SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2) par le « *Coronavirus Study Group (CSG) of the International Committee on Taxonomy of Viruses* » (Gorbalenya *et al.* 2020).

La séquence génétique du virus est par la suite transmise à l'OMS qui, dès le 13 janvier 2020, publie le premier protocole de test RT-PCR établi par un laboratoire partenaire pour le diagnostic du nouveau coronavirus (WHO 2019).

Le 24 janvier, la France informe l'OMS de trois premiers cas du nouveau coronavirus, chez des personnes s'étant rendues à Wuhan. Ce n'est que le 11 février 2020, que cette maladie est officiellement nommée COVID-19 (Coronavirus disease-19), (WHO 2019).

Dès le 11 mars 2020, le terme de pandémie est évoqué par le directeur général de l'OMS avec l'augmentation croissante et rapide du nombre de cas en dehors de la Chine (WHO 2019). Le 12 mars 2020, la Guadeloupe annonce son premier cas avéré de COVID-19 et un mois plus tard, le nombre de cas confirmés dans le monde atteignait déjà plus d'un million.

Des études sont alors menées de par le monde afin de déterminer le réservoir animal de ce virus d'une part, et d'autre part afin de mieux comprendre le processus de réplication du virus et la physiopathologie de la maladie.

Au 30 juin 2020, la COVID-19 présentait un taux de létalité de 4,9% dans le monde (Florindo *et al.* 2020). La recherche de vaccins et de thérapeutiques devient un enjeu majeur pour de nombreux groupes pharmacologiques.

B) Origine et transmission du SARS-CoV-2

Les premières hypothèses concernant l'origine du SARS-CoV-2 se tournent vers les chauves-souris qui sont des réservoirs connus des coronavirus.

Dès la fin du mois de Janvier, le séquençage complet du génome du virus appelé encore 2019-nCoV a permis de montrer une similarité globale de 96,2% avec le virus Bat-CoV-RaTG13 retrouvé chez la chauve-souris (Zhou *et al.* 2020). Ces données sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle, la chauve-souris serait le réservoir initial du 2019-nCoV (Figure 42).

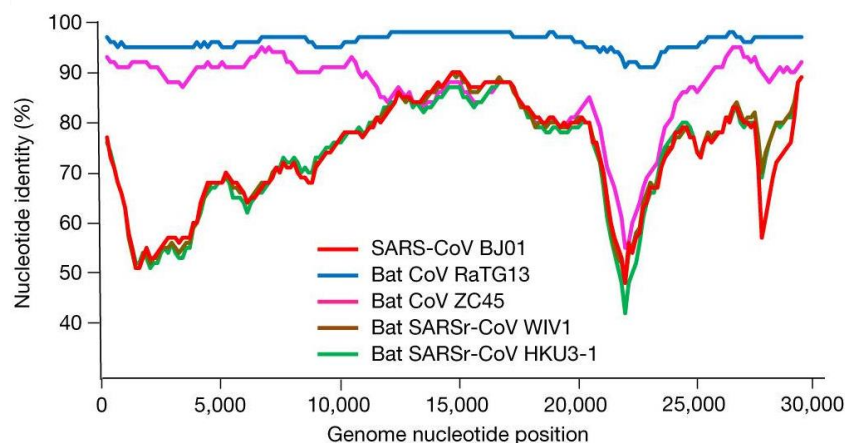


Figure 42. Similarité génomique du SARS-CoV-2 avec des coronavirus connus (Zhou *et al.* 2020)

Par la suite, l'étude de Liu *et al.* a montré que le SARS-CoV-2 présentait également une similitude de séquence nucléotidique avec le pangolin-CoV-2020 d'environ 90,32 %, contre 90,24% pour le Bat-CoV-RaTG13, suggérant que le pangolin serait l'hôte intermédiaire du SARS-CoV-2 (Liu *et al.* 2020). La transmission du SARS-CoV-2 à l'homme par cet hôte intermédiaire n'est actuellement pas totalement élucidée mais se serait produite par un contact direct.

Chez l'homme, la transmission interhumaine se fait principalement par voie aérienne avec l'émission par l'individu infecté de microgouttelettes contenant des particules virales.

II – Structure et réplication du SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 fait partie d'une grande catégorie de virus, appelés Coronavirus (CoVs) pour leur apparence en forme de couronne. Ces derniers sont responsables de maladies respiratoires et gastro-intestinales plus ou moins graves chez l'homme. Les coronavirus ont été décrits pour la première fois en 1966 par Tyrell et Bynoe (Velavan *et al.* 2020). Mais, c'est à partir de l'épidémie de SARS-CoV en Chine, fin 2002, puis du MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome CoronaVirus) en 2012, en Arabie Saoudite, qu'a émergé l'intérêt pour ces virus, jusque-là considérés comme non dangereux, ni mortels pour l'homme. En 2018, seuls six coronavirus sont connus chez l'homme : HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV et MERS-CoV (Yin *et al.* 2018).

A) Les coronavirus

Les CoVs appartiennent à l'ordre des *Nidovirales*, à la famille des *Coronaviridae* et à la sous-famille des *Orthocoronavirinae*. Selon la dernière classification du Comité international de taxonomie des virus (ICTV), les membres de cette sous-famille peuvent être classés en 4 genres, les *Alphacoronavirus* (α -CoVs), les *Bétacoronavirus* (β -CoVs), les *Deltacoronavirus* (δ -CoVs) et les *Gammacoronavirus* (γ -CoVs) (« International Committee on Taxonomy of Viruses » s. d.).

Les α -CoVs et les β -CoVs sont connus pour infecter principalement les mammifères. Les γ -CoVs et les δ -CoVs sont majoritairement retrouvés chez les oiseaux (Fan *et al.* 2019). Si les α -CoVs provoquent des infections légères et asymptomatiques, les β -CoVs eux, peuvent provoquer des maladies graves pouvant conduire au décès (Velavan *et al.* 2020).

B) Le SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité positive appartenant au genre des *Bétacoronavirus*. Ce virus est formé d'une enveloppe à bicouche phospholipidique dans laquelle sont enchâssées différentes protéines de structure : la protéine spike (S), la protéine membranaire (M), la protéine d'enveloppe (E), l'Hémagglutinine-Esterase (HE).

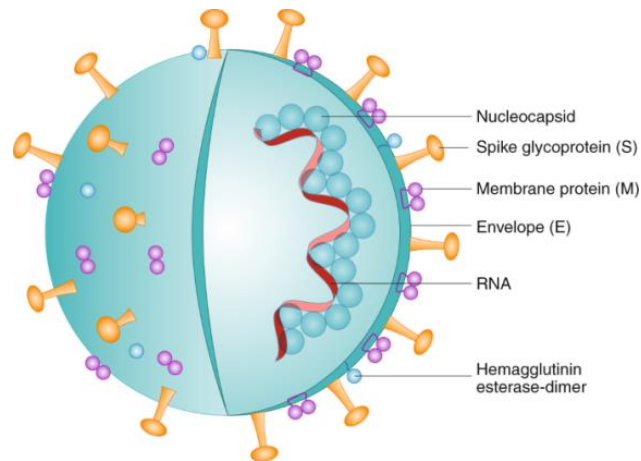


Figure 43. Représentation schématique de la structure du SARS-CoV-2 (Florindo *et al.* 2020)

A l'intérieur de cette particule virale, est retrouvé l'ARN génomique lié à la protéine de capsid (N) formant ensemble une nucléocapside hélicoïdale (Pan *et al.* 2021) (Figure 43).

Selon plusieurs études, le génome du SARS-CoV-2 aurait une taille d'environ 30 000 bases (Figure 44). Deux tiers du génome constituent le gène de la réplicase. Ce gène comprend deux cadres de lectures ouverts ORF1a et ORF1b codant pour deux polyprotéines pp1a et pp1b. Ces deux polyprotéines sont par la suite clivées en 16 protéines non-structurales (NSP 1–16) essentielles à la réplication virale. Le reste du génome code pour 9 protéines accessoires (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c et 10) et 4 protéines structurales (S, E, M et N) (Bonny *et al.* 2020; Gordon *et al.* 2020).

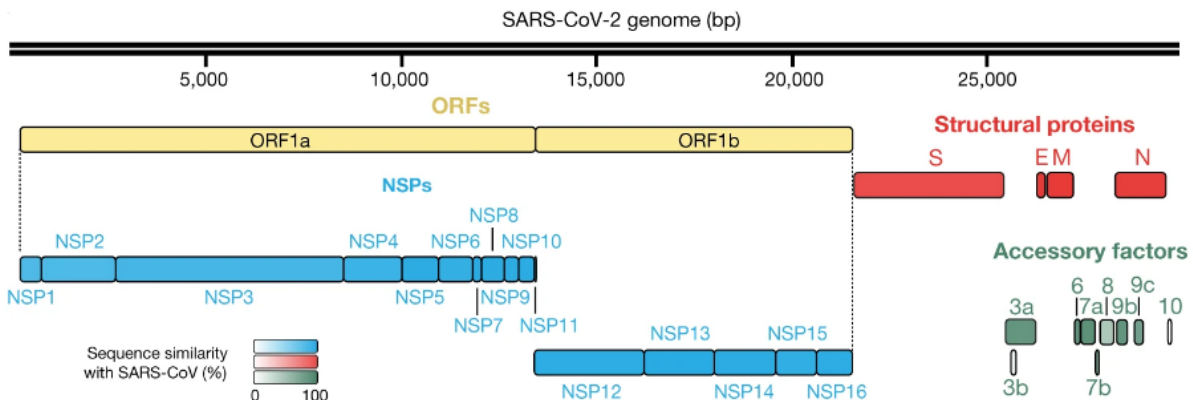


Figure 44. Génome du SARS-CoV-2 (Gordon *et al.* 2020)

C) Réplication virale

Le SARS-CoV-2 comme le SARS-CoV se lie au récepteur Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) des cellules hôtes pour infecter l'homme (Li *et al.* 2003; Lu *et al.* 2020; Zhou *et al.* 2020). L'ACE2 est une carboxypeptidase impliquée principalement dans la conversion de l'angiotensine II en angiotensine [1-7]. Chez l'homme, cette enzyme est exprimée au niveau des cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires (pneumocytes de type II), des entérocytes de l'intestin grêle et aussi au niveau des cellules endothéliales artérielles et veineuses (Hamming *et al.* 2004). L'ACE2 est l'une des protéines essentielles au cycle de réplication du SARS-CoV-2.

Concernant les plaquettes, l'expression du récepteur ACE2 est relativement controversée. Si l'étude de S. Zhang et ses collaborateurs montrent que les plaquettes humaines et de souris expriment le récepteur ACE2 et la sérine protéase TMPRSS2 (Zhang *et al.* 2020), d'autres études ne mettent en évidence ni la présence d'ARNm ni celle de la protéine ACE2 dans les plaquettes (Manne *et al.* 2020; Bury *et al.* 2021).

En revanche, l'ARNm du SARS-CoV-2 a été retrouvé dans les plaquettes de 2 patients dans une étude comptant 25 patients COVID-19 (Manne *et al.* 2020) suggérant la capacité des plaquettes à internaliser le virus sans pour autant participer au processus de réplication de ce dernier (Koupenova *et al.* 2021).

Le cycle de réplication du SARS-CoV-2 peut être décomposé en 5 grandes étapes qui seront détaillées dans les paragraphes suivants (Figure 45).

(1) Attachement et entrée du virus dans la cellule hôte

Le SARS-CoV-2 se fixe au récepteur ACE2 de la cellule hôte *via* sa protéine S. La protéine Spike comprend deux sous unités S1 et S2 impliquées respectivement dans la liaison au récepteur ACE2 et dans la fusion du virus avec la membrane cellulaire (He *et al.* 2004). La liaison de la protéine S par sa sous unité S1 provoque un changement de sa conformation et l'exposition de sa sous unité S2. Le clivage de la protéine S au niveau des sites S1/S2 par la protéase TMPRSS-2 (transmembrane serine protease 2) est indispensable à la fusion des membranes virales et cellulaires (Hoffmann *et al.* 2020).

(2) Traduction du gène réplicase de l'ARN viral et protéolyse

Suite à cette étape de fusion, le génome est libéré dans le cytosol de la cellule hôte où les ribosomes hôtes traduisent le gène de la réplicase virale en deux polyprotéines pp1a et pp1b. Ces dernières sont ensuite clivées par des protéases hôtes et virales en plusieurs NSPs fonctionnelles : hélicase, ARN polymérase ARN dépendant, exoribonuclease, primase, endonucléase etc. nécessaires à la réplication de l'ARN viral et à la formation de toutes les protéines indispensables à la formation des nouveaux virions (V'kovski *et al.* 2021).

(3) Réplication du génome viral

Ces protéines virales nouvellement synthétisées permettent la réplication intégrale de l'ARN génomique (+) en ARN génomique (-) et en ARN sous génomique (-) produits par transcription discontinue. L'ARN génomique (-) est par la suite transcrit en ARN génomique (+) et l'ARN sous génomique (-) en ARNm sous-génomique (+) (de Wit *et al.* 2016).

(4) Traduction des protéines structurales et accessoires

Une fois les ARNm sous génomiques (+) produits, ceux-ci sont traduits en protéines structurales (S, E, M et N) et en protéines accessoires dont le rôle n'est pas encore totalement élucidé. Elles auraient la capacité d'atténuer la réponse immunitaire innée de l'hôte par inhibition de la synthèse d'interférons de type I (Perlman *et al.* 2009).

(5) L'assemblage et la libération de virions

Les protéines sont par la suite adressées au réticulum endoplasmique, puis à l'appareil de Golgi, où a lieu l'assemblage des protéines virales. Les protéines N se lient à l'ARN génomique (+) pour former la nucléocapside, qui est ensuite assemblée avec les autres protéines structurales. Les virions nouvellement formés sont sécrétés ensuite par exocytose (de Wit *et al.* 2016).

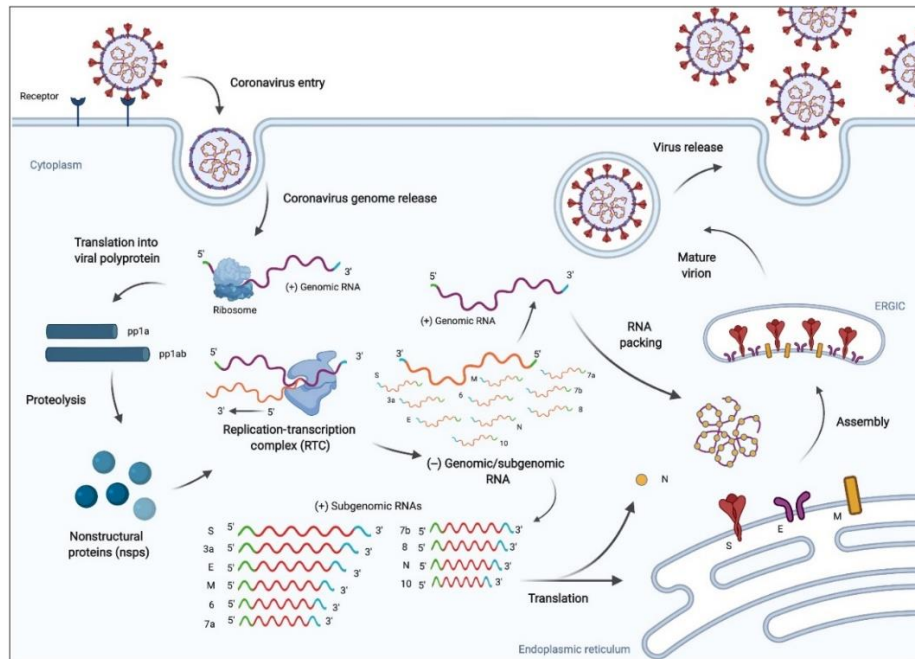


Figure 45. Cycle de réplication du SARS-CoV-2 dans les cellules (Zafferani *et al.* 2021). Le virus en se liant au récepteur ACE2 *via* sa protéine Spike entre dans la cellule par endocytose et libère son génome à ARN de sens positif. Le virus exploite la machinerie cellulaire de la cellule hôte pour former de nouveaux virions qui sont ensuite relargués par exocytose.

Enfin, chez l’homme, la période médiane d’incubation du virus est d’environ 4 jours. Elle est définie comme étant l’intervalle entre le premier contact avec un animal ou une personne infectée et la première date potentielle d’apparition des symptômes (Guan *et al.* 2020).

III – Symptômes cliniques et complications

La COVID-19 se caractérise par un trouble respiratoire de gravité variable allant d’une maladie légère des voies respiratoires supérieures, à un syndrome de détresse respiratoire aiguë, pouvant engager le pronostic vital des malades (Mahdy *et al.* 2020). Une grande majorité des patients sont asymptomatiques ou présentent des symptômes grippaux légers comme la fièvre, la toux, la dyspnée qui sont les symptômes les plus couramment observés (Huang *et al.* 2020; Yang *et al.* 2020) et plus rarement, des symptômes gastro-intestinaux comme la diarrhée, la nausée, des vomissements et des douleurs abdominales (Figure 46).

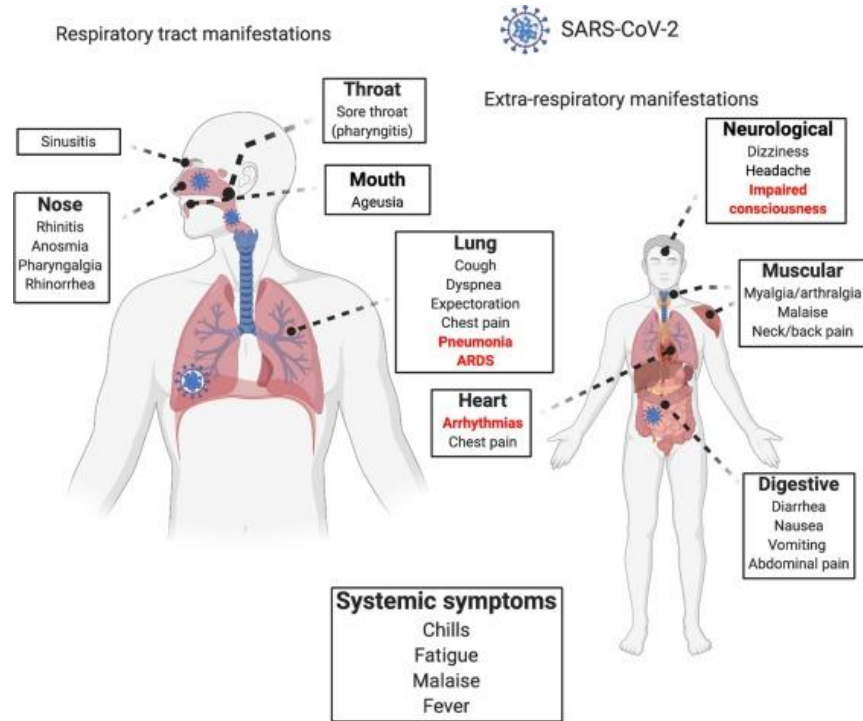


Figure 46. Symptômes cliniques associés à une infection au SARS-CoV-2 (Harrison *et al.* 2020)

Les patients hospitalisés présentent quasiment tous au niveau pulmonaire des lésions alvéolaires diffuses et des anomalies au niveau des scanners thoraciques avec des opacités en verre dépoli caractéristiques d'une infection au SARS-CoV-2 (Chung *et al.* 2020; Huang *et al.* 2020).

Certains patients, huit à dix jours après l'apparition des premiers symptômes peuvent développer un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et une défaillance multiple d'organes causée par une réaction inflammatoire excessive et inadaptée appelée « tempête cytokinique » (Huang *et al.* 2020; Bonny *et al.* 2020; Yang *et al.* 2020).

En effet, dans l'étude de Yang *et al.* menée parmi les cas graves, 67% des patients présentaient un SDRA, 29% des lésions rénales aiguës, 23% des lésions cardiaques et 29% des dysfonctionnements du foie.

Ces formes sévères de la maladie sont retrouvées principalement chez les personnes d'un âge avancé (Petrey *et al.* 2021), les hommes (Huang *et al.* 2020; Yang *et al.* 2020; Liao *et al.* 2020), les sujets présentant des comorbidités telles que l'hypertension, le diabète, l'obésité (Huang *et al.*

2020) ainsi que chez les individus prenant des immunosuppresseurs ou ayant subi récemment une intervention chirurgicale (Machhi *et al.* 2020).

Concernant les marqueurs biologiques, les patients hospitalisés présentent une augmentation du nombre de leucocytes, mais présentent une diminution du nombre de lymphocytes (Huang *et al.* 2020; Liao *et al.* 2020). Cette lymphopénie est d'autant plus marquée chez les patients sévères.

Différentes études décrivent une thrombopénie légère dans la COVID-19 principalement chez les patients critiques (< 150 G/L), ainsi qu'une altération des paramètres de coagulation à savoir un temps de prothrombine allongé, une augmentation des concentrations plasmatiques en fibrinogène, en D-dimères (Taus *et al.* 2020; Gu *et al.* 2021; Yang *et al.* 2020; Ozen *et al.* 2021; Valdivia-Mazeyra *et al.* 2021). Ces paramètres biologiques ne permettent pas d'évoquer la « Coagulation IntraVasculaire Disséminée » (CIVD) caractérisée par une formation excessive de petits caillots dans tout le corps avec une thrombopénie sévère, un niveau élevé de D-dimères, un temps de prothrombine plus long et un niveau diminué de fibrinogène. La coagulopathie des patients COVID est particulière, unique ; certains auteurs parlent de « CIVD non classique » (Gu *et al.* 2021).

Sur le plan inflammatoire, les données de la littérature évoquent une augmentation d'un certain nombre de cytokines (IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-18, IL-21, IFN- γ , TNF- α), de chimiokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL16) et de facteurs de croissance plasmatiques (PDGF, VEGF) (Huang *et al.* 2020; Taus *et al.* 2020; Zaid *et al.* 2020). Il existe toutefois des données contradictoires pouvant s'expliquer par une inclusion des patients plus ou moins tardive après le début des symptômes ainsi que par une classification différente des patients d'une étude à l'autre.

Des niveaux élevés d'IL-8, d'IL-6 et IL-1 β sont aussi observés lors de l'analyse des fluides de lavage broncho alvéolaire des patients sévères (Liao *et al.* 2020). Les patients présentaient également des niveaux élevés de CRP (Merad *et al.* 2020; Yang *et al.* 2020).

Les autopsies des patients atteints de COVID-19 ont révélé la présence de thrombis riches en plaquettes et en fibrine dans les petites artères et dans les capillaires des poumons, du cœur, des reins (Gu *et al.* 2021; Campbell *et al.* 2021; Valdivia-Mazeyra *et al.* 2021) ainsi qu'un nombre

significativement augmenté de mégacaryocytes au niveau du cœur et des poumons (Campbell *et al.* 2021; Valdivia-Mazeyra *et al.* 2021).

Les complications thrombotiques observées chez ces patients sont une cause majeure de mortalité et de morbidité dont les médiateurs potentiels seraient l'endothélium vasculaire, le système de coagulation et les plaquettes (Gu *et al.* 2021).

IV – Activation des plaquettes et activation d'autres types cellulaires

A) Les plaquettes

Aujourd'hui, les plaquettes sont connues pour interagir avec les virus et pour être une source importante de médiateurs inflammatoires. En effet, celles-ci peuvent être activées directement par de nombreux virus tels que la dengue (Hottz *et al.* 2013; Hottz *et al.* 2013; Hottz *et al.* 2014), *influenza* (Rondina *et al.* 2012; Boilard *et al.* 2014; Lê *et al.* 2015) etc.

Les nombreuses études menées durant la crise sanitaire ont permis d'admettre que ces cellules sont également activées lors de l'infection au SARS-CoV-2. En effet, les patients atteints de COVID-19 présentaient une augmentation significative de l'expression de la P-sélectine et du pourcentage de plaquettes p-selectine positives (Hottz *et al.* 2020; Manne *et al.* 2020; Zaid *et al.* 2020; Taus *et al.* 2020). Cette hyperactivité plaquettaire favorise les interactions plaquettes-leucocytes et l'émission de microparticules plaquettaires (MP-PLTs). En effet, les niveaux d'agrégats circulants plaquettes-lymphocytes (Manne *et al.* 2020), plaquettes-neutrophiles (Manne *et al.* 2020; Le Joncour *et al.* 2020; Taus *et al.* 2020), plaquettes-monocytes (Manne *et al.* 2020; Le Joncour *et al.* 2020; Taus *et al.* 2020) et des concentrations en MP-PLTs (Taus *et al.* 2020; Zahran *et al.* 2021; Garnier *et al.* 2022) sont significativement augmentés par rapport aux sujets sains.

Dans le cas des monocytes (Figure 47), les interactions avec les plaquettes conduisent à une expression de facteur tissulaire (TF) à la surface des monocytes (Ivanov *et al.* 2019; Hottz *et al.* 2020). La formation de ces agrégats, retrouvés principalement chez les patients de formes sévères de COVID-19, peuvent en partie expliquer l'hypercoagulabilité observée, puisque le FT est connu pour jouer un rôle central dans l'initiation de la cascade de coagulation.

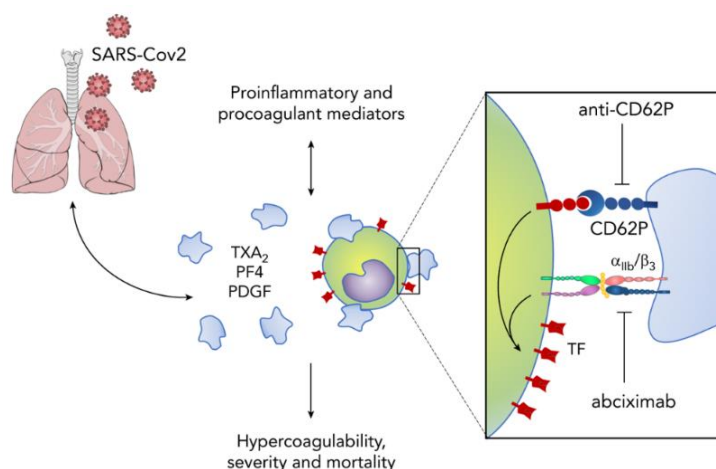


Figure 47. Formation d'agrégats plaquettes-monocytes et expression du facteur tissulaire chez les patients COVID-19 sévères (Hottz *et al.* 2020)

Sur le plan fonctionnel, l'agrégation des plaquettes des patients se fait significativement plus rapidement, à faibles concentrations en thrombine (Manne *et al.* 2020; Zaid *et al.* 2020) et celles-ci ont la capacité d'adhérer plus efficacement aux surfaces recouvertes de collagène dans des conditions de flux comparativement aux sujets sains (Zaid *et al.* 2020).

Au niveau inflammatoire, des études ont montré que ces dernières pourraient participer à la sécrétion de cytokines. En effet, les plaquettes de patients COVID-19 sévères et non sévères sont capables de relarguer plus d'IL-1 β que les sujets sains à des concentrations en thrombine de 0,05 U/mL (Zaid *et al.* 2020) et de 0,1 U/mL (Taus *et al.* 2020). La stimulation de ces plaquettes par la thrombine a également conduit à une augmentation significative des concentrations d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-1RA, l'IFN- γ , l'IL-18 (Taus *et al.* 2020) également retrouvées en quantité augmentée dans le plasma des patients (Taus *et al.* 2020; Huang *et al.* 2020). Ceci suggère une implication des plaquettes dans l'hyperinflammation observée dans cette maladie.

B) Les plaquettes et l'endothélium vasculaire

Dans la maladie COVID-19, de nombreuses études évoquent une activation des cellules endothéliales. En effet, les taux plasmatiques de molécules d'adhésion, telles que sICAM-1, sVCAM-1, sP-sélectine sont augmentés et plus particulièrement dans le cas de patients sévères (Goshua *et al.* 2020; Tong *et al.* 2020).

L'étude de Guervilly et ses collaborateurs ont décrits des quantités significativement augmentées de cellules endothéliales circulantes chez les patients admis en soins intensifs (Guervilly *et al.* 2020). De plus, l'étude de Garnier *et al.* a montré *In vitro* que les MPs des patients COVID-19 intubés, ont provoqué une augmentation de l'expression endothéliale de la P-sélectine, de VCAM-1 et la mort des cellules endothéliales (Garnier *et al.* 2022).

La production accrue de cytokines pro-inflammatoire et de MPs pourrait dans le cas de patients graves causer des dommages vasculaires avec un détachement des cellules endothéliales.

Ce contexte pro-inflammatoire et pro-adhérent des cellules endothéliales ainsi que l'exposition de la matrice sous endothéliale favoriserait donc l'adhésion des plaquettes, des monocytes et des neutrophiles (Figure 48).

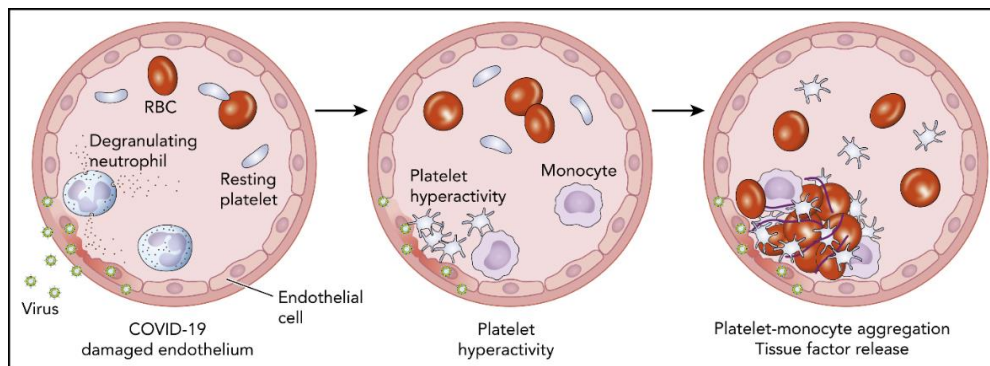


Figure 48. Endothélium endommagé et hyperactivité plaquettaire conduisant à la formation de thrombus au niveau de vaisseaux sanguins (Battinelli 2020)

En résumé, les plaquettes dans le contexte d'une infection au SARS-CoV-2 sont hyperactives. Elles sont capables de contribuer à l'inflammation, à l'hypercoagulabilité, à la formation d'agrégats et de thrombus expliquant les événements thromboinflammatoires observés chez les patients COVID-19.

B – Objectifs

La drépanocytose ainsi que la COVID19 se caractérisent par une activation plaquettaire dans un contexte inflammatoire. Les plaquettes sont de plus en plus décrites comme étant des acteurs importants dans plusieurs maladies inflammatoires. Les crises vaso-occlusives dans la drépanocytose sont liées à la vaso-occlusion des petits vaisseaux et on sait désormais que les plaquettes participent à ce processus en collaboration avec d'autres éléments cellulaires sanguins et endothéliaux. Dans la COVID19, on observe également une activation plaquettaire résultant probablement de coopérations cellulaires liées notamment à une souffrance endothéliale. Dans ces deux pathologies, on observe une inflammation qui à la fois est la résultante de l'activation cellulaire globale mais aussi qui entretient probablement cette activation cellulaire globale. Il est donc intéressant de considérer cette activation plaquettaire dans ce type de pathologies afin d'une part, de mieux comprendre leur physiopathologie et, d'autre part, de cibler ces acteurs cellulaires dans un but thérapeutique.

L'objectif initial de ma thèse était d'étudier l'activation plaquettaire chez les sujets drépanocytaires SC et SS, particulièrement représentés en Guadeloupe et suivis à l'Unité Transversale de la Drépanocytose. Cependant, la survenue de la pandémie COVID19 nous a conduit à interrompre nos travaux sur la drépanocytose. Ayant développé les outils nécessaires à l'étude de l'activation plaquettaire dans la drépanocytose, j'ai pu étudier l'activation plaquettaire des patients atteints de COVID19.

A ce titre, ma thèse comprend deux parties : une partie portant sur la drépanocytose et une autre sur la COVID19.

Partie n°1 : La drépanocytose

Dans la drépanocytose, les mécanismes physiopathologiques aboutissant à la vaso-occlusion sont complexes et impliquent à la fois des interactions anormales entre les globules rouges drépanocytaires et l'endothélium vasculaire mais aussi entre les leucocytes et les plaquettes. Les plaquettes sont aujourd'hui considérées comme des acteurs clefs du processus vaso-occlusif (Beurling-Harbury *et al.* 1989; Antonucci *et al.* 1990) mais à ce jour, les voies de signalisation mises en jeu lors de leur activation et l'implication des plaquettes dans l'inflammation chronique

caractéristique chez les patients drépanocytaires ont été peu documentées. Dans le contexte physiopathologique de la drépanocytose, plusieurs voies d'activation des plaquettes sont possibles :

- l'hémolyse intravasculaire *via* la libération d'hémoglobine plasmatique et d'hème (Singhal *et al.* 2015),
- l'activation de l'inflammasome NLRP3 plaquettaire connu aujourd'hui pour son implication dans l'activation des plaquettes (Murthy *et al.* 2017) et dans la sécrétion d'IL-1 β bioactives.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'activation des plaquettes et de la caspase-1 plaquettaire (reflétant de l'activation de l'inflammasome NLRP3), de caractériser la contribution de la BTK (régulateur connu de l'inflammasome) et de mieux caractériser les voies de signalisations impliquées dans l'activation plaquettaire et dans l'inflammation observée chez les patients atteints de drépanocytose. Ce projet pourrait *in fine*, identifier de nouvelles pistes thérapeutiques avec l'utilisation d'un inhibiteur de la BTK, l'Ibrutinib, actuellement utilisé dans le traitement de certaines hémopathies lymphoïdes B.

Nous avons posé comme hypothèse principale une activation de l'inflammasome NLRP3 en lien avec une activation des plaquettes chez les patients drépanocytaires à l'état de base, conduisant à une production accrue des médiateurs plaquettaires de l'inflammation tels que l'IL-1 β .

La contribution de l'hémolyse intravasculaire dans l'activation des plaquettes, de la caspase-1 et de la protéine BTK est également évaluée par l'analyse de corrélations entre ces paramètres et des marqueurs hémolytiques comme les réticulocytes, l'hémoglobine, la bilirubine totale, l'aspartate amino-transférase (ASAT) et la lactate déshydrogénase (LDH).

Partie n°2 : La COVID-19

L'émergence de la pandémie de Covid-19 nous a par la suite poussé à étudier l'activation des plaquettes et de l'inflammasome NLRP3 dans cette maladie compte-tenu des caractéristiques prothrombotique et inflammatoire de cette pathologie.

L'objectif est de mettre en évidence une relation entre l'activation de la caspase-1 plaquettaire (reflétant l'activation de l'inflammasome NLRP3) et le niveau de gravité de la maladie, d'évaluer la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 β , d'évaluer l'état d'activation de la protéine BTK et de tester les effets de l'ibrutinib sur l'activation des plaquettes.

Ce travail est réalisé dans deux groupes de patients COVID-19 : un groupe présentant des symptômes modérés et un groupe de patients présentant des symptômes sévères nécessitant une prise en charge en unité de soins intensifs. Une population contrôle, constituée de donneurs sains est également étudiée. Comme énoncé précédemment, l'activation des plaquettes et de la caspase-1 sont mis en évidence par cytométrie en flux et l'activation de la BTK par western-blot en quantifiant sa forme phosphorylée. Les concentrations plasmatiques en IL-2, IL-12 p70, IFN γ , TNF α , IL-6, IL-1 β sont évaluées par Luminex.

Des corrélations entre l'activation des plaquettes, de la caspase-1 et des marqueurs de la coagulation (D-dimères, temps de prothrombine) sont aussi effectuées afin d'établir un potentiel lien avec l'état procoagulant des patients COVID-19.

Enfin, des manipulations *in vitro* sont réalisées avec des plaquettes de sujets sains pré-incubées ou non avec de l'ibrutinib puis incubées avec du plasma de patients COVID-19 ou de sujets sains. L'activation des plaquettes, de l'inflammasome et de la BTK est ensuite évaluée par Cytométrie en flux et par western-blots.

A terme, cette étude apportera des éclairages sur l'activation des plaquettes et sur les voies de signalisation mises en jeu dans la maladie COVID-19.

C – Matériels et méthodes

I – Patients inclus

Les patients participant à ces études ont été inclus dans deux protocoles de recherche distincts qui sont le « Rôle de l'inflammasome dans l'activation plaquettaire du sujet drépanocytaire » et la « Caractérisation de l'inflammasome NLRP3 plaquettaire chez les patients COVID-19 : étude comparative entre les formes modérées et sévères » dont les acronymes respectifs sont « DrePlaquette » et « PlaQCOVID ».

A) Etude DréPlaquette

(1) Critères d'inclusions

DréPlaquette est une étude observationnelle transversale monocentrique réalisée au CHU de la Guadeloupe. Les patients inclus dans l'étude étaient des drépanocytaires (homozygotes SS traités ou non à l'HU et des hétérozygotes composite SC) diagnostiqués dans des laboratoires de référence pour les hémoglobinopathies et suivis à l'Unité Transversale de la Drépanocytose (UTD). Ces patients devaient au moment de l'inclusion être âgés d'au moins 18 ans et être cliniquement à l'état de base c'est-à-dire à plus d'un mois de toutes complications et de 3 mois de toutes transfusions. Après signature du consentement, les prélèvements des patients et des témoins (AA) étaient recueillis à l'UTD et ensuite traités dans les heures suivantes au sein de l'UMR S1134 Inserm.

(2) Critères de non inclusion

Les critères de non inclusion pour l'ensemble des participants étaient les suivants :

- sujets mineurs
- génotype autre que SS, SC et AA
- sujets en cours de grossesse ou d'allaitement
- sujets n'ayant pas donné leur consentement

patients ayant eu une saignée ou une transfusion moins de trois mois avant l'inclusion

B) Etude PlaQCOVID

(1) Critères d'inclusion

La deuxième étude PlaQCOVID comme la précédente est observationnelle transversale monocentrique et réalisée au CHU de la Guadeloupe. Les patients inclus présentaient une

infection au SARS-CoV-2 confirmée par RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Les prélèvements ont été recueillis après information et consentement des patients, des proches ou des représentants légaux dans le cas où les patients ne seraient pas en mesure d'y consentir et des sujets contrôles.

Un total de 51 patients infectés par le SARS-CoV-2 et de 8 sujets contrôles non infectés ont été recrutés. Parmi ces patients, 19 étaient hospitalisés en médecine (non-ICU COVID-19) et 32 en unité de soin intensif (ICU COVID-19).

(2) Critères de non inclusion

Dans cette étude, les critères de non inclusion pour l'ensemble des participants étaient les suivants :

- refus de participation par le patient, son proche ou son représentant légal
- patients faisant l'objet d'une mesure de sauvegarde de justice
- patients mineurs

II – Méthodes

A) Isolation, lavage et lyse des plaquettes

Les échantillons de sang ont été récupérés dans des tubes trisodium citrate (3,2%) et centrifugés (170g, 10 minutes, température ambiante) pour obtenir du plasma riche en plaquettes (PRP). Le PRP a été incubé (10 min à 37°C) en présence de Prostaglandine E1 (PGE1, 1µg/mL) et ou d'Apyrase (1UI/mL) et ensuite centrifugé (1000g, 5min, à température ambiante). Le surnageant a été retiré et les plaquettes re-suspendues et incubées (30 min à 37°C) dans du tampon « Tyrode albumin buffer » (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 12mM NaHCO₃, 0,42mM NaH₂PO₄-H₂O, 1mM MgCl₂-6H₂O, 2mM CaCl₂-2H₂O, 5mM HEPES, 0,05g glucose, 20% Bovine Serum Albumin (BSA), pH 7,3). Les plaquettes ont ensuite été centrifugées (1000g, 5 min, à température ambiante), re-suspendues dans du tampon « Tyrode » (137mM NaCl, 0,3mM Na₂HPO₄, 2mM KCl, 12mM NaHCO₃, 5mM HEPES, 5mM dextrose, 1mM MgCl₂, pH 7,3) et incubées (10 min à 37°C). Enfin, les plaquettes ont été lysées avec du tampon de lyse (10mM Tris Base, 0.5% Triton-X100, 25mM NaCl, 125mM sucrose, 25mM NaF, 5mM Na₄P₂O₇-10H₂O, pH 7.4) qui contenait 5mM de

vanadate, 1mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2mM de Fluorure de sodium (NaF), et 1/100 de cocktail de protéase (Sigma-Aldrich, USA). Les protéines ont été conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

B) Western-blots

Le niveau de phosphorylation de la BTK a été déterminé par western-blot. Les lysats protéiques ont été séparés par électrophorèse en utilisant un gel SDS-PAGE 4-12% durant 90 minutes. Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Thermo Fisher Scientific, USA). Après la saturation des membranes durant 1h en tampon Tris-buffered saline (TBS) contenant 0,1% de Tween 20, 5% de lait ou 1% de BSA plus 1% de lait, les membranes ont été incubées durant toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires de lapin anti-p-BTK, anti-BTK (Cell Signaling Technology, USA) et de souris anti-GAPDH (Merck Millipore, USA) dilués au 1/1000, 1/1000 and 1/500 respectivement. Après le lavage des membranes, celles-ci ont été incubées avec des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (1/5000, Dako A/S, Denmark) durant 1 heure à température ambiante. Les western-blots ont été analysés en utilisant un Imager Amersham 600 (GE Healthcare, USA). Pour la quantification, une analyse densitométrique a été réalisée avec le logiciel ImageJ software (NIH, USA). Les résultats sont montrés comme le ratio p-BTK sur BTK totale.

C) Phénotypage des plaquettes

Les caractéristiques des plaquettes ont été déterminées par cytométrie en flux (Cytotflex, Beckman Coulter, USA). Le PRP a été marqué avec des anticorps (anti-CD41-ECD de Beckman Coulter, USA et anti-CD62P-APC de Becton Dickinson, USA) ou avec une sonde FAM-FLICA (Immunochemistry Technologies, USA) durant 30 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées 5min à 300g avec du tampon Tyrode albumin buffer.

Un minimum de 15 000 évènements a été acquis. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza analysis software (Beckman Coulter). Les plaquettes ont été ciblées en regardant les paramètres taille (FSC), structure (SSC) ainsi que l'expression du CD41 (marqueur spécifique des plaquettes). Les sondes anti-CD62P et FAM-FLICA ont été utilisées pour évaluer l'expression de

surface de la P-sélectine et de la caspase-1 activée, reflétant l'activation des plaquettes et l'activation de l'inflammasome NLRP3 plaquettaire respectivement.

D) Caractérisation des agrégats plaquettes-neutrophiles

Les caractéristiques des agrégats plaquettes-neutrophiles ont été déterminées par cytométrie en flux (Cytoflex, Beckman Coulter, USA). Le sang total a été marqué avec des anticorps anti-CD41-APC (Beckman Coulter, USA), anti-CD16-AA788 (Biolegend, USA), anti-CD45-ECD (Beckman Coulter, USA) durant 20 min à température ambiante. Les cellules ont été lavées 5 min à 300g avec du tampon plaquette (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7,4). Les globules rouges ont ensuite été lysés durant 15 min avec du tampon de lyse GRs 1X (15,5 mM NaCl, 1 mM KHCO₃, 0,01 mM EDTA, pH 7.4) puis les cellules ont été lavées avec du tampon plaquette. Cette étape de lyse a été réalisée deux fois.

Un minimum de 15 000 événements a été acquis. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza analysis software (Beckman Coulter). Les agrégats plaquettes-neutrophiles sont caractérisés comme les événements positifs à la fois pour le CD45 (marqueur panleucocytaire), le CD16 (marqueur des neutrophiles) et le CD41.

E) Analyses plasmatiques des patients Covid-19

Les échantillons sanguins des patients atteints de Covid-19 et des sujets sains ont été recueillis sur tube EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic). Les tubes ont été centrifugés à 580g, durant 5 min à 25°C pour obtenir du plasma qui a par la suite été stocké à -80°C jusqu'à son utilisation. La quantification des cytokines (IL-2, IL-12 p70, IFN γ , TNF α , IL-6, IL-1 β) a été réalisée au Luminex en duplicate par nos collègues Parisiens et en accord avec les instructions du fournisseur. Les données ont été collectées grâce au système MAGPIX (ThermoFisher Scientific) et analysées avec le logiciel ProcartaPlex Analyst 1.0 (ThermoFisher Scientific).

F) Stimulation des plaquettes *in vitro* avec du plasma de patients Covid

Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) de chaque donneur a été obtenu à partir de prélèvements sanguins effectués sur tubes trisodium citrate (3,2%) par centrifugation à 1500g durant 16 min. Les échantillons de plasma ont été stockés à -80°C jusqu'au jour de leur utilisation.

Les plaquettes de sujets contrôles ont été incubées durant 1 heure avec du plasma de patients ou d'individus sains prétraité ou non durant 10 minutes avec un inhibiteur de BTK (ibrutinib, 5 μ M; Janssen). Ensuite, les plaquettes ont été marquées en utilisant des anticorps (anti-CD41 ECD, anti-CD62P APC), une sonde FAM-FLICA ou lavées et lysées pour évaluer l'état de phosphorylation de la BTK.

G) Analyses statistiques

Pour toutes les expériences des différentes études, la normalité de la distribution des variables a été évaluée par le test de Shapiro-Wilk. Les variables quantitatives ont été exprimées comme les médianes avec les écarts interquartiles (IQR) ou comme les moyennes avec les déviations standards ($\pm$ SD).

Les caractéristiques des patients ont été analysées en utilisant le test de Student-*t* ou le test non paramétrique de Mann-Whitney ou encore via une ANOVA (suivi du test *post hoc* de Tuckey pour les comparaisons multiples) ou avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (suivi du test *post hoc* de Dunn comparaisons multiples) pour les variables quantitatives. Le test de Khi-2 ou le test exact de Fisher ont été utilisés pour l'analyse des variables qualitatives.

Les analyses statistiques des données de cytométrie en flux, de western-blot et de concentration des cytokines ont été réalisées avec une ANOVA (suivi du test *post hoc* de Tuckey pour les comparaisons multiples) ou avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (suivi du test *post hoc* de Dunn comparaisons multiples) en accord avec la normalité de la distribution. Des corrélations de Pearson ont été réalisées pour tester les associations entre différents paramètres étudiés. Le test *t* de Student apparié ou le test de Wilcoxon ont été utilisés pour évaluer les effets du traitement à l'ibrutinib et du plasma des patients COVID-19 sur les plaquettes provenant de sujets sains.

L'ensemble de toutes ces analyses statistiques a été réalisé en utilisant le logiciel GraphPad Prism (version 8; San Diego, CA). Les *P* value < 0,05 été considérées comme étant statistiquement significatives.

D – Résultats

Article 1 :

Activation de la caspase-1 plaquettaire et surexpression de la P-sélectine chez les patients drépanocytaires : une implication de l'inflammasome NLRP3 ?

Livia Claude, Doris Célanie, Frédéric Martino, Malissa Boecasse, Luc Reininger, Maryse Etienne-Julan, Benoit Tressieres, Yves Colin, Caroline Le Van Kim, Marc Romana, Véronique Baccini

Article en préparation

L'anémie hémolytique chronique, les crises vaso-occlusives douloureuses et l'inflammation chronique sont caractéristiques chez les patients atteints de la drépanocytose. La CVO est la première cause d'hospitalisation des patients drépanocytaires.

Les mécanismes physiopathologiques aboutissant à la vaso-occlusion sont complexes et impliquent à la fois des interactions anormales entre les cellules circulantes et l'endothélium vasculaire mais aussi entre les cellules circulantes entre elles (globules rouges drépanocytaires, leucocytes, plaquettes).

Les plaquettes sont aujourd'hui considérées comme des acteurs clefs du processus vaso-occlusif par leurs capacités à induire l'activation des cellules de l'immunité et des cellules endothéliales par interaction directe ou indirectement par le relargage de cytokines.

Dans la drépanocytose, les plaquettes sont activées et sécrètent des quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β . La bioactivation de cette dernière nécessite l'activation de la caspase-1 qui est médiée par un inflammasome : l'inflammasome NLRP3.

Les différentes études menées sur les macrophages afin de mieux comprendre son implication dans les mécanismes inflammatoires ont montré que cet inflammasome NLRP3 peut être activé par des signaux de danger comme les PAMPs et les DAMPs.

Ce complexe a récemment été mis en évidence dans les plaquettes et les premières études menées ont permis de montrer une implication de l'inflammasome NLRP3 dans les mécanismes d'activation, d'agrégation des plaquettes et dans la formation de thrombus qui peuvent être atténués par inhibition de la BTK, protéine connue pour son rôle dans l'activation de l'inflammasome.

Nous avons donc émis l'hypothèse d'une activation de l'inflammasome NLRP3 en lien avec une activation des plaquettes chez les patients drépanocytaires à l'état de base.

Dans cette étude, nous avons évalué l'expression de la P-sélectine plaquettaire, l'activation de la caspase-1 (reflétant l'activation de l'inflammasome NLRP3), la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles par cytométrie en flux et la phosphorylation de BTK par Western blot dans une cohorte de 81 patients adultes drépanocytaires SC et SS à l'état de base.

Nos résultats confirment l'augmentation de l'activation des plaquettes chez les patients drépanocytaires et montrent un taux élevé d'agrégats plaquettes-neutrophiles chez les patients

SS. Nous avons également montré l'activation de la caspase-1 plaquettaire chez les patients drépanocytaires et obtenu des données suggérant pour la première fois l'activation de l'inflammasome NLRP3 chez les patients SC. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de conclure quant à l'activation de la BTK.

De plus, nous avons observé un lien entre l'activation de la caspase-1 et plusieurs marqueurs d'hémolyse chez les patients SS et également un lien entre l'activation de la caspase-1 et l'activation plaquettaire chez les patients SC et SS.

**Activation of platelet caspase-1 and P-selectin over-expression in sickle cell disease patients:
an involvement of NLRP3 inflammasome?**

Livia Claude^{1,2}, Doris Célanie^{1,2}, Frédéric Martino^{1,4}, Malissa Boecasse^{1,2}, Luc Reininger^{1,2},
Maryse Etienne-Julan³, Benoit Tressieres⁵, Yves Colin^{1,2}, Caroline Le Van Kim^{1,2}, Marc
Romana^{1,2}, Véronique Baccini^{1,2,6}

1. Université Paris Cité and Université des Antilles, INSERM, BIGR, F-75015 Paris, France
2. Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France
3. Unité Transversale de la Drépanocytose, Hôpital Ricou, CHU de la Guadeloupe, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe
4. Service de Réanimation, CHU de la Guadeloupe, Pointe à Pitre, Guadeloupe
5. Centre d'Investigation Clinique Antilles Guyane, Inserm CIC 1424, CHU de la Guadeloupe, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe
6. Laboratoire d'Hématologie, CHU de la Guadeloupe, Pointe à Pitre, Guadeloupe

Running title: Platelet caspase-1 activation in sickle cell disease

Corresponding author:

Véronique Baccini, Université des Antilles,
UMR S_1134, BIGR, Hôpital Ricou,
CHU de la Guadeloupe, Route de Chauvel,
97159 Pointe-à-Pitre, Cedex, Guadeloupe.
Email: veronique.baccini@chuguadeloupe.fr

Word count: 211 (abstract) and 3867 (main body of text)

Figures: 4; **Table:** 2

Reference count: 51

ABSTRACT

Sickle cell disease is characterized by hemolytic anemia, painful vaso-occlusive crises and chronic inflammation resulting partly from platelet activation. It has been recently shown that platelets express the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing protein 3 (NLRP3) and the apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) forming NLRP3 inflammasome, which controls activation of caspase-1 and cleavage of interleukin-1 β (IL-1 β). Bruton tyrosine kinase (BTK), known to activate NLRP3 inflammasome, is also expressed in platelet. In sickle cell disease, platelets are activated and can secrete increased quantities of IL-1 β suggesting a possible activation of NLRP3 inflammasome.

Here, we assessed platelet P-selectin expression, caspase-1 activation, platelet-neutrophil aggregate formations by flow cytometry and BTK phosphorylation by Western blot in a cohort of 81 adult sickle cell patients at steady state condition (34 SC patients and 47 SS patients including 31 who were treated with hydroxycarbamide). We showed an increase in platelet activation in sickle patients and a high level of platelet-neutrophil aggregate in SS patients compared to healthy subjects (17 AA). We also demonstrated platelet caspase-1 activation in sickle cell patients and obtained data suggesting for the first time NLRP3 inflammasome activation in SC patients. Further studies are needed to understand the mechanism of caspase-1 activation and to evaluate the potential therapeutic efficiency of Ibrutinib, a BTK inhibitor.

Key words:

Sickle cell disease, platelets, caspase-1, Bruton Tyrosine Kinase

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is a genetic disorder caused by the production of an abnormal hemoglobin (Hb), the so-called hemoglobin S (HbS). HbS results to a single base mutation (A>T) at β -globin gene causing the substitution of valine for glutamic acid at the sixth codon of the mature β -globin chain. In deoxygenated conditions, HbS polymerization induces the sickling of red blood cells (RBCs) and leads to a decrease in deformability and an increase in RBCs fragility. SCD is characterized by hemolytic anemia, painful vaso-occlusive crises and chronic inflammation.¹

SCD is a generic term encompassing several sickle cell syndromes such as homozygous for the β^S allele or compound heterozygous resulting from the co-inheritance of β^S allele and other abnormal Hb alleles.¹ Two major sickle cell syndromes are mainly observed in the West Indies: SS and SC sickle cell patients.² HbC is the outcome of a single amino acid substitution of valine for lysine at the sixth codon of the β -globin chain. HbSC patients are usually described as exhibiting a moderate clinical expression of the disease compared to HbSS patients. However, SC patients present an hypercoagulability state and sickle complications such as retinopathy and osteonecrosis among other.^{3,4}

Several studies have shown that platelets are activated in SCD patients in steady state and further during crisis.⁵⁻⁸ Platelets are known to play a critical role in hemostasis, thrombosis and they are increasingly recognized for their role in inflammation and in innate and adaptive immune responses.⁹⁻¹¹ Indeed, activated platelets release and synthesize cytokines and chemokines¹²⁻¹⁴, induce the activation of immune and endothelial cells¹⁵⁻¹⁹, promote the formation of aggregates with monocytes and neutrophils^{20,21} and therefore participate in vaso-occlusion and chronic inflammation in this disease.²²⁻²⁵

SCD platelets secrete increased quantities of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β).²⁶ IL-1 β is synthesized as precursor protein, and its activation by cleavage, requires the assemblage of a multimolecular complex called nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing protein 3 (NLRP3) inflammasome that allows caspase-1 activation.²⁷ Platelets are known to express NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), bruton tyrosine kinase (BTK) and caspase-1 which are critical to form an active inflammasome complex.^{28,29} NLRP3 inflammasome activation in platelets are known to promote platelet activation, aggregation, thrombus formation through BTK and reverted by BTK inhibitor.²⁹

In sickle cell disease, several triggers can induce platelet activation like hemolytic damage-associated to molecular pattern molecules (DAMPs).^{8,31,32} Among these DAMPs, some of them, such as hemoglobin (Hb) and heme could lead to inflammasome NLRP3 activation in platelets. Indeed, in macrophages, heme is known to activate NLRP3 inflammasome through Toll-like receptor 4 (TLR4)³⁰ which is also expressed by platelets.

In the present study, we hypothesize that platelet caspase-1 is activated in SC and SS patients through BTK, NLRP3 inflammasome activation and contributes to platelet activation. Therefore, we investigated P-selectin expression, caspase-1 and BTK activation in platelets and also platelet-neutrophil aggregates isolated from sickle cell patients.

METHODS

Human subjects and study design

A total of 81 SCD patients regularly followed by the sickle cell unit (UTD) of the University Hospital of Guadeloupe were included in the study: 34 SC patients and 47 SS patients including 31 who were treated with hydroxycarbamide for more than 6 months. In addition, seventeen healthy

donors with the same ethnic origin were also included. All participants must be 18 years old. SCD patients were at steady state condition at the time of inclusion, i.e. without acute complications (infection, vaso-occlusive crisis, acute chest syndrome, stroke and priapism) at least one month before enrolment and without blood transfusions or phlebotomies in the previous three months. Patients and healthy control subjects were recruited after informed written consent, in accordance with the local institutional review boards (nos. CNRIPH: 19-11-26-67312) and the Declaration of Helsinki.

Standard biological and biochemical variables

Cellular blood counts were obtained using XN-1000® analyzer (Sysmex, Kobe, Japan), and biochemical parameters from COBAS 4800® analyzer (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse). Fetal hemoglobin (HbF) was determined using HLPC.

Isolation, washing, and lysis of platelets

Blood samples were collected using a 21-gauge needle into a 3.2% trisodium citrate tube and centrifuged (170 *g*, 10 min, room temperature, brake-free) within 1 h after collection to obtain the platelet-rich plasma (PRP). An aliquot of PRP was used for flow cytometry, and the remaining PRP was used for protein lysates. The latter was incubated (10 min, 37°C) in the presence of prostaglandin E1 (1 µg/ml) and Apyrase (1UI/mL), and then was centrifuged. The supernatant was discarded, and platelets were incubated (30 min, 37°C) in Tyrode albumin buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.42 mM NaH₂PO₄-H₂O, 1 mM MgCl₂-6H₂O, 2 mM CaCl₂-2H₂O, 5 mM HEPES, 0.05 g glucose, 20% bovine serum albumin, pH 7.3). Platelets were then

washed and incubated in Tyrode buffer (137 mM NaCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 5 mM dextrose, 1 mM MgCl₂, pH 7.3).²⁸ Finally, platelets were lysed with lysis buffer (10 mM Tris Base, 0.5% Triton-X100, 25 mM NaCl, 125 mM sucrose, 25 mM NaF, 5 mM Na₄P₂O₇-10H₂O, pH 7.4), 5 mM vanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM NaF, and 1/100 of protease cocktail (Sigma-Aldrich). Proteins were stored at -20°C until used.

Western blot analysis

Phosphorylation level of BTK at Tyr223 was determined by western blot. Autophosphorylation at Tyr223 within the SH3 domain is necessary for full activation of BTK. Platelet lysates (50 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The membranes were then blocked and incubated with anti-human phosphorylated BTK (p-BTK) (5082S; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-human BTK (3533S; Cell Signaling Technology) and anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (MAB374; Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Immune complexes were revealed with secondary peroxidase-conjugated antibodies (Dako A/S). Western blots were analyzed using an Amersham Imager 600 (GE Healthcare). For quantification, densitometry was performed with ImageJ software (National Institutes of Health). The results are shown as the ratio of p-BTK to total BTK.

Platelet phenotyping

Platelet characteristics were determined by flow cytometry (Cytoflex, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Platelets from PRP were labeled with monoclonal antibodies (anti-CD41-ECD and anti-CD62P-APC from Beckman Coulter, Brea, CA, USA) or a green fluorescent probe called

fluorescent labeled inhibitor of caspase-1 (FLICA) that irreversibly binds to activated caspase-1, according to the manufacturer's instructions (Immunochemistry Technologies, Davis, CA, USA). Then, platelets were washed for 5 min at 200g with Tyrode buffer. A minimum of 15,000 events was acquired. The results were analyzed with Kaluza analysis software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Platelets were distinguished by specific binding of anti-CD41 and characteristic forward and side scattering. First, platelets were gated according to size/structure (forward and side scattering) and then selected on the CD41 labeling. Anti-CD62P antibody and FAM-FLICA probe were used to evaluate P-selectin surface expression and active caspase-1, reflecting platelet and caspase-1 activation, respectively.

Platelet-neutrophil aggregates

Characteristics of platelet-neutrophil aggregates were quantified by flow cytometry (Cytoflex, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Whole blood was incubated with anti-CD41-APC (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), anti-CD16-AF488 (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-CD45-ECD (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) antibodies for 20 min at room temperature. Cells were washed for 5 min at 300g with platelet buffer (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.4). Red blood cells were then lysed for 15 min with 1X red blood cell lysis buffer (15.5 mM NaCl, 1 mM KHCO₃, 0.01 mM EDTA, pH 7.4) then the cells were washed with platelet buffer. This lysis step was performed twice. A minimum of 15,000 events was acquired. The results were analyzed with Kaluza analysis software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Platelet-neutrophil aggregates were characterized as positive events for both CD45 (pan leukocyte marker), CD16 (neutrophil marker) and CD41.

Statistical analysis

For all experiments, normality of distributions was assessed, and quantitative variables were expressed as medians and interquartile ranges (IQRs) or means and standard deviations ($\pm$ SD) accordingly. Differences in patients' characteristics were assessed using the Student *t* test or Mann–Whitney nonparametric test, analysis of variance (ANOVA; followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons), or Kruskal–Wallis nonparametric test (followed by Dunn's post hoc test for multiple comparisons). Statistical analyses of flow cytometry data, western blot data were performed with ANOVA (followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons) or Kruskal–Wallis nonparametric test (followed by Dunn's post hoc test for multiple comparisons) according to the normality of the distributions. Pearson correlations were performed to test the associations between the parameters investigated. Statistical analyses were performed by using Prism version 8 (GraphPad Software). A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Sickle cell patient cohort

Eighty-one sickle cell patients were enrolled in our study: 34 SC patients and 47 SS patients including 31 who were treated with hydroxycarbamide. Biological characteristics of the study subjects at the time of blood collection are summarized in Table 1.

Table 1. Biological characteristics of studied subjects

	AA (n=17)	SC (n=34)	SS (n=47)
Age, median (IQR), years	52 (35 – 58)	40 (23 – 54)	47 (31 – 51)
HC treatment, %	NA	NA	31 (66)
Hb, mean ($\pm$ SD), g/dL	13.5 (0.8)	11.1**** (1.3)	8.7****/□□□□ (1.4)
HbF, median (IQR), %	1.0 (1.0 – 1.1)	1.5 (1.1 – 2.4)	11.6****/□□□□ (7.1 – 16.1)
MCV, median (IQR), fL	91.1 (88.8 – 92.9)	74.5**** (65.9 – 80.0)	92.3 □□□□ (85.5 – 100.0)
RET, median (IQR), $\times 10^9$/L	56 (44 – 73)	109** (94 – 151)	209****/□□□□ (141 – 312)
RET, median (IQR), %	1.3 (1.1 – 1.7)	2.5* (2.0 -3.5)	8.1 ****/□□□□ (5.4 – 11.7)
LDH, median (IQR), U/L	194.0 (180.0 – 227.0)	275.0 (232.0 – 308.5)	470.0****/□□□□ (383.0 – 551.0)
Total bilirubin, median (IQR), μM	6.0 (4.0 – 7.0)	18.5** (14.0 – 25.0)	39.0****/□□□□ (26.0 – 72.0)
ASAT, median (IQR), U/L	20.0 (17.0 – 22.0)	23.0 (15.0 – 30.3)	36.0****/□□□□ (27.0 – 50.0)
WBC, mean ($\pm$ SD), $\times 10^9$/L	5.9 (2.4)	7.5 (3.0)	7.7 (2.3)
PLT, median (IQR), $\times 10^9$/L	283 (254 – 323)	310 (175 – 432)	343 (249 – 419)
CRP, median (IQR), mg/L	0.9 (0.6 – 2.0)	2.8* (1.2 – 7.5)	4.2**** (1.8 – 6.9)

Note: Data are median (IQR), mean ($\pm$ SD) or *n* (%).

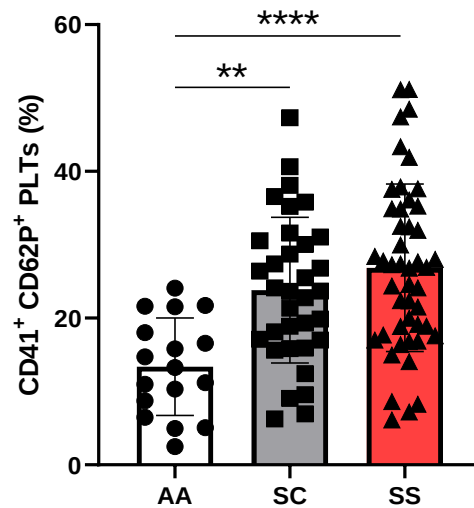
Abbreviations: HC, hydroxycarbamide; Hb, hemoglobin; HbF, fetal hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; RET, reticulocyte; LDH, lactate dehydrogenase; ASAT, aspartate aminotransferase, WBC, white blood cell; PLT, platelet; CRP, c-reactive protein; IQR, interquartile range; NA, not applicable; SD, standard deviation.

Different from AA group, **p* <0.05, ***p* <0.01, ****p* <0.001, *****p* <0.0001; Different from SC group, □□□*p* <0.001, □□□□*p* <0.0001.

Platelet activation is increased in sickle cell patients

We measured the membrane expression of platelet CD62P (P-selectin), a marker of platelet α granule secretion. We show that platelets are activated in SC and SS patients compared to healthy controls (Figure 1). Platelet expression of CD62P is higher in SS patients ($26.86 \pm 11.43\%$ vs. $13.38 \pm 6.64\%$; $p < 0.0001$) and SC patients ($23.80 \pm 9.93\%$ vs. $13.38 \pm 6.64\%$; $p = 0.0026$) compared to healthy controls. There was no significant difference between SC and SS patients ($23.80 \pm 9.93\%$ vs. $26.86 \pm 11.43\%$; $p = 0.3850$). Regarding SS group, there was no significant difference between HC treated and untreated patients ($27.31 \pm 11.54\%$ vs. $25.99 \pm 11.53\%$; $p = 0.7114$).

Figure 1. Platelet activation in sickle cell patients

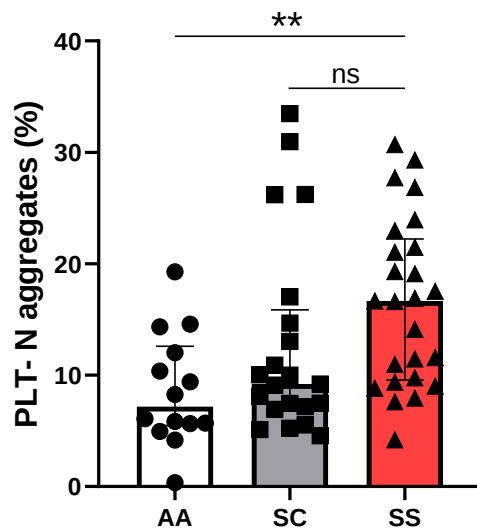


Platelet P-selectin expression (CD41⁺ CD62P⁺ PLTs) was measured by flow cytometry in 17 healthy donors, 34 SC patients and 47 SS patients. Multiple comparisons were realized between healthy subjects, SC patients and SS patients. Data are shown as mean with standard deviation. p values were calculated with one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$. PLT, platelet.

Platelet-neutrophil aggregates are increased in SS patients

Because platelet activation can promote the formation of platelet-neutrophil (PLT-N) aggregates, we also assessed PLT-N aggregates in SCD patients. We found that the rate of PLT-N aggregates was higher in SS patients compared to healthy subjects (16.65%; IQR, 9.58–22.23 vs. 7.18%; IQR, 5.48–12.59; $p = 0.0056$). We also observed a trend compared to SC patients (16.65%; IQR, 9.58–22.23 vs. 9.21%; IQR, 7.06–15.85; $p = 0.1144$). There was no significant difference between SC patients and healthy controls (9.21%; IQR, 7.06–15.85 vs. 7.18%; IQR, 5.48–12.59; $p = 0.6574$). Concerning SS group, there was no significant difference between HC treated and untreated patients ($14.91 \pm 7.31\%$ vs. $20.18 \pm 7.11\%$; $p = 0.1037$).

Figure 2. Platelet-neutrophil aggregates in sickle cell patients



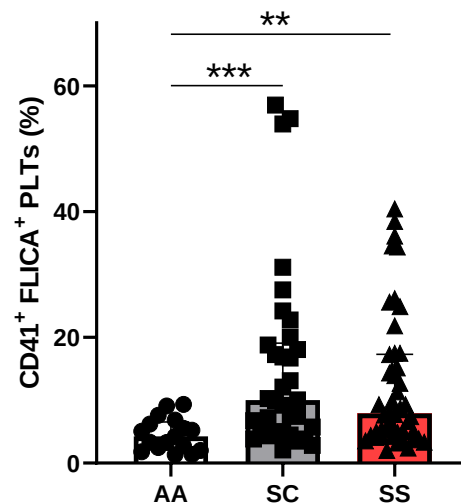
Platelet-neutrophil aggregates were measured by flow cytometry in 14 healthy donors, 21 SC patients and 25 SS patients. Multiple comparisons were realized between healthy subjects, SC patients and SS patients. Data are shown as median with interquartile ranges and minimum and maximum values. Inter-group differences were assessed using Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test. Not significant, $**p < 0.01$. PLT-N, platelet-neutrophil.

Activation of the platelet caspase-1 is increased in sickle cell patients and associated with hemolysis markers in SS patients

We tested the caspase-1 activation using FAM-FLICA probe. We have shown that, caspase-1 is significantly more activated in SC (10%; IQR, 4.91–19.10 vs. 4.24%; IQR, 2.23–6.53; $p = 0.0007$) and SS patients (7.91%; IQR, 4.36–17.32 vs. 4.24%; IQR, 2.23–6.53; $p = 0.0036$) compared to healthy controls (Figure 2). There was no significant difference between SC and SS patients (10%; IQR, 4.91–19.10 vs. 7.91%; IQR, 4.36–17.32; $p > 0.9999$).

We observed a correlation between the percentage of CD41⁺ FLICA⁺ PLTs and several hemolysis markers in SS patients but not in SC patients (Table 2). Because free hemoglobin and other markers of hemolysis as HMGB1 are known to activate NLRP3 inflammasome and therefore caspase-1, we analyzed the correlations between the percentage of CD41⁺ FLICA⁺ PLTs and reticulocyte rate, HbF, total bilirubin and ASAT levels. We detected that platelet caspase-1 activation was correlated with HbF ($r = -0.3872$, $p = 0.0216$), total bilirubin ($r = 0.3238$, $p = 0.0320$) and trend to correlate with RET ($r = 0.2825$, $p = 0.0632$) for SS patients but not for SC patients. We also observed a correlation between CD41⁺ FLICA⁺ PLTs and CD41⁺ CD62P⁺ PLTs percentage in SS ($r = 0.3702$, $p = 0.0113$) and SC patients ($r = 0.4755$, $p = 0.0045$).

Figure 3. Caspase-1 activation in platelets of sickle cell patients



Platelet caspase-1 activation was measured by flow cytometry using FAM-FLICA probe (CD41⁺ FLICA⁺ PLTs) in 17 healthy donors, 34 SC patients and 47 SS patients. Multiple comparisons were realized between healthy subjects, SC patients and SS patients. Data are shown as median with interquartile ranges and minimum and maximum values. *p* values were calculated with Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. FLICA, fluorescent labeled inhibitor of caspase-1; PLT, platelet.

Table 2. Correlation between rate of CD41⁺ FLICA⁺ platelets and hemolysis/anemia markers in sickle cell patients

	SS patients			SC patients		
	Pearson <i>r</i>	95% CI	<i>p</i> values	Pearson <i>r</i>	95% CI	<i>p</i> values
CD41⁺ FLICA⁺ PLTs (%)						
RET (%)	0.2825	-0.01575 to 0.5345	0.0632	-0.1192	-0.4443 to 0.2337	0.5087
HbF (%)	-0.3872	-0.6381 to -0.06198	0.0216	0.04723	-0.5413 to 0.6047	0.8841
Total bilirubin (μM)	0.3238	0.02978 to 0.5662	0.0320	-0.1643	-0.4852 to 0.1956	0.3688
ASAT (U/L)	0.2596	-0.04044 to 0.5166	0.0889	-0.04811	-0.3903 to 0.3057	0.7937

Correlations were estimated by Pearson's correlation coefficients (*r*) in sickle cell patients. CI, confidence interval; RET, reticulocyte, HbF, fetal hemoglobin; ASAT, aspartate aminotransferase; FLICA, fluorescent labeled inhibitor of caspase-1; PLT, platelet. Significant *p* values are in bold.

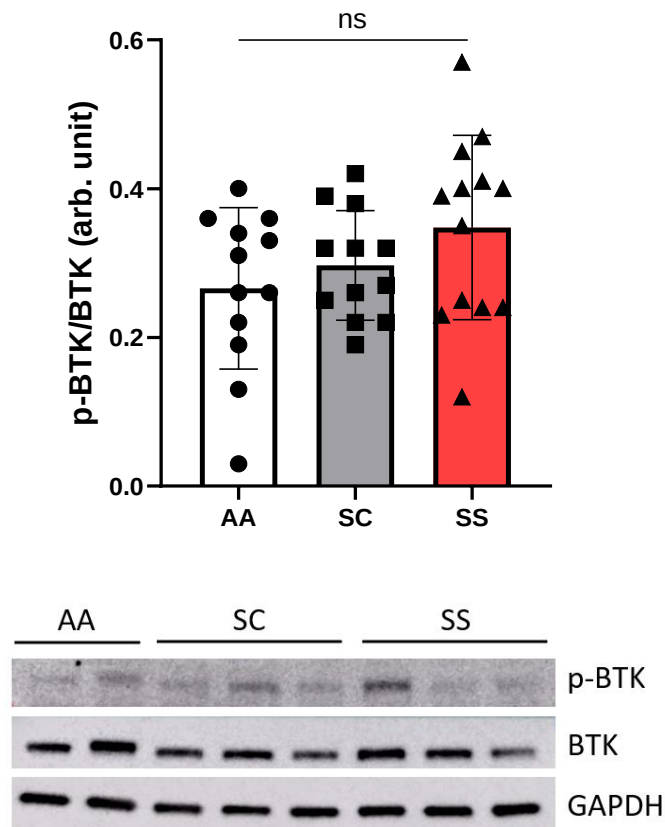
Phosphorylation of BTK in platelets of sickle cell patients

We then assessed BTK activation through p-BTK level in platelets of healthy subjects, SC and SS patients using western blot analysis (Figure 3). We observed higher rates for BTK phosphorylation level in SS patients compared to healthy controls, but these results were not significant ($0.35\pm0.12\%$ vs. $0.27\pm0.11\%$; $p = 0.1402$).

No significant difference neither between SC and SS patients ($0.30\pm0.07\%$ vs. $0.35\pm0.12\%$; $p = 0.4521$) nor between SC patients and healthy controls ($0.30\pm0.07\%$ vs. $0.27\pm0.11\%$; $p = 0.7531$) was observed for BTK phosphorylation level.

As BTK is known to activate platelet and NLRP3 inflammasome, we also assessed correlations between BTK phosphorylation, platelet and caspase-1 activation. No significant correlation between phosphorylation state of BTK and $CD41^+$ FLICA⁺ PLTs percentage ($r = 0.4262$, $p = 0.1465$) and between BTK phosphorylation and $CD41^+$ CD62P⁺ PLTs percentage ($r = 0.3880$, $p = 0.1902$) was found.

Figure 4. BTK phosphorylation in platelets of sickle cell patients



Phosphorylation state of BTK was measured in 12 healthy donors, 12 SC patients and 13 SS patients by the densitometric analysis of western blots and normalized to total BTK. Multiple comparisons were realized between healthy subjects, SC patients and SS patients. Data are shown as mean with standard deviation. *p* values were calculated with one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Not significant. BTK, Bruton tyrosine kinase; p-BTK, phosphorylated Bruton tyrosine kinase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

DISCUSSION

In the present study, we have documented an increase in platelet activation in sickle cell patients and a high level of platelet-neutrophil aggregates in SS patients. We also demonstrated platelet caspase-1 activation in SCD patients, suggesting NLRP3 inflammasome activation. Moreover, we observed a link between caspase-1 activation and several hemolysis markers in SS

patients and also a link between caspase-1 activation and platelet activation in both SC and SS patients.

In sickle cell disease, activated platelets are known to promote adhesion of RBCs, monocytes and neutrophils to the vascular endothelium.^{22,33,34} Moreover, the interaction of platelets with monocytes and neutrophils induces overexpression of TF by monocytes¹⁶, promotes netosis³⁵ and stimulates the secretion of cytokines by these cells. All these phenomena contribute to a thromboinflammatory state resulting in vaso-occlusion of the microcirculation.³⁴

Several studies described platelet activation⁵⁻⁸ and platelet-neutrophil aggregates formation^{20,21} in sickle cell patients. Our results confirmed platelet activation through the increase in P-selectin surface expression in SC and SS patients.

We have also shown that SS patients have elevated levels of circulating platelet-neutrophil aggregates. It is well known that P-selectin expression contributes to aggregates' formation through the interaction of platelet P-selectin and leukocytes PSGL-1.³⁶ Indeed, the use of neutralizing P-selectin antibody reduced the formation of platelet-neutrophil aggregates in mice.²⁰ In SCD mice, platelet-neutrophil aggregates cause pulmonary arteriole microembolism.³⁷ In our study, SS patients have higher platelet-neutrophil aggregates' level compared to healthy subjects that can explain their most severe clinical expression of the disease than SC patients. There was no significant difference between HC treated and untreated patients regarding platelet activation and platelet-neutrophil aggregates' formation.

Our latter results were in accordance with those of Villagra *et al.* which did not observe a significant difference for platelet activation between treated and untreated patients.⁸

The use of crizanlizumab, a humanized anti-P-selectin monoclonal antibody, could limit the formation of platelet-leucocyte aggregates. In phase 2 clinical trials, the administration of crizanlizumab was associated with a significant decreased in the frequency of vaso-occlusive

crisis.^{38,39} However, the impact of this drug on the formation of PLT-N aggregates has not been studied to our knowledge to date.

In sickle cell disease, several triggers may be responsible of platelets activation. Indeed, hemolytic DAMPs, known to be produced at high levels in SCD patients, could be involved in such activation. Indeed, different studies demonstrated that cell-free Hb^{40,31,41}, heme⁴², HMGB1⁴³ caused platelet activation. The latter is also known to induce the activation of NLRP3 inflammasome in other cell types.^{27,32,44,45}

In our study, we have documented an activation of caspase-1 in SC and SS patient platelets, suggesting NLRP3 inflammasome activation. To our knowledge, for the first time, we present evidences of platelet caspase-1 activation and data suggesting an activation of the NLRP3 inflammasome in SC patients.⁴⁶

We also shown that platelet caspase-1 activation is associated with some hemolysis markers in SS patients but not in SC patients. SS patients contrary to SC patients have a substantial chronic hemolytic anemia due to RBCs hemolysis, exhibiting higher hemolysis markers' levels (Hb, RET, LDH, Total bilirubin, ASAT) than the latter. Regarding caspase-1 activation, no significant difference is observed between SC and SS patients, suggesting comparable activation of caspase-1 in these two groups. Moreover, in these two groups, caspase-1 activation is corelated with platelet activation. These results suggest that, there could be different triggers for the two syndromes. Another explanation is that the hemoglobin level of SC patients is higher than SS patients and that SC patients have also less hemolysis and exhibited lower inter-individual variability of these variables. It could explain that we did not observe any association between hemolysis markers and platelet caspase-1 activation may be because our study is not statistically powerful enough to observe such a relationship.

Recent studies have shown that BTK is a critical activator of NLRP3 inflammasome in platelets²⁹, monocytes and macrophages.^{47,48} Therefore, we evaluated the state of phosphorylation of BTK. We did not detect significant increase in BTK phosphorylation or significant correlation with caspase-1 and platelet activation, probably due to a too limited number of patients analyzed. However, we observed a trend for higher BTK phosphorylation level in SS patients compared to healthy subjects. Interestingly, a negative correlation was found between HbF and BTK phosphorylation state ($r = -0.5549$, $p = 0.0960$) and between HbF and Caspase-1 activation ($r = -0.3872$, $p = 0.0216$) in SS patients. HbF is well known to limit the polymerization of HbS and therefore the sickling of red blood cells.⁴⁹ By this mechanism, HbF decreases RBC hemolysis and therefore the release of hemolytic DAMPs. Indeed, in SS patients, HbF level was, as expected, negatively correlated with reticulocyte count and total bilirubin level and positively with hemoglobin levels.

These results suggest an indirect and beneficial effect of HbF, which would limit the phosphorylation of BTK and the activation of caspase-1 by the decrease in hemolytic DAMP levels. Vogel *et al.* have recently shown that HMGB1 provokes NLRP3 inflammasome activation through TLR4 and BTK in platelets of SS patients.⁴⁶ In this study, they also demonstrated that the use of Ibrutinib, a BTK inhibitor, currently used in onco-hematology, significantly reverse platelet caspase-1 activation induces by HMGB1 in sickle cell patients and SCD mice.

Another study has demonstrated that BTK inhibitor inhibits the activation of NLRP3 inflammasome, platelet activation and aggregation and also thrombus formation.²⁹

In addition to TLR4 receptor, the stimulation of other platelet receptors by hemolytic DAMPs could induce the activation of BTK/NLRP3/Caspase-1/IL-1 β pathway in sickle cell patients. Indeed, Hb, HbS, and heme can induce platelet activation through GPIIb α and C-type-lectin-like receptor-2

(CLEC-2) respectively.^{31,41,42} Other studies have shown that BTK plays a critical role in platelet activation mediated by GPIb and CLEC-2 receptors.^{50,51}

Finally, a recent study has shown that the release of IL-1 β -rich vesicles after NLRP3 inflammasome activation promoted the formation of platelet-neutrophil aggregates, and provoked a lung vaso-occlusion in SCD mice. The use of caspase-1 inhibitor has allowed to lessen these effects.⁵²

In summary, our study showed platelet activation in sickle cell patients and a high level of platelet-neutrophil aggregates' formation in SS patients. We also demonstrated platelet caspase-1 activation in sickle cell patients, suggesting NLRP3 inflammasome activation. In SS patients, we presented evidence that caspase-1 activation could result from hemolytic DAMPs. Further studies are needed to understand the mechanism of caspase-1 activation in SC patients.

The increase in subjects' numbers, in particular for the evaluation of BTK phosphorylation; the study of patients in crisis, the use of inhibitors and the stimulation of healthy platelets by hemolytic DAMPs or plasma of sickle cell patients in crisis would allow us to better understand and characterize the signaling pathways involved in platelet activation and vaso-occlusion.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France. This work was supported by a grant of V.B. from the University hospital of Guadeloupe.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.B. designed the research; L.C., V.B., D.C., M.B., F.M., L.R., performed the experiments; M.E.-J. recruited patients; L.C., B.T., M.R., and V.B. analyzed the results; L.C. and V.B. made the

figures; L.C., Y.C., C.L.V.K., M.R. and V.B. wrote the manuscript; M.R. and V.B. obtained ethical approval.

REFERENCES

1. Rees, D. C., Williams, T. N. & Gladwin, M. T. Sickle-cell disease. *Lancet* **376**, 2018–2031 (2010).
2. Saint-Martin, C. *et al.* Universal newborn screening for haemoglobinopathies in Guadeloupe (French West Indies): a 27-year experience. *J Med Screen* **20**, 177–182 (2013).
3. Lionnet, F. *et al.* Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica* **97**, 1136–1141 (2012).
4. Colella, M. P. *et al.* Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. *Haematologica* **100**, 466–471 (2015).
5. Wun, T. *et al.* Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J. Lab. Clin. Med.* **129**, 507–516 (1997).
6. Wun, T. *et al.* Platelet activation in patients with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **100**, 741–749 (1998).
7. Inwald, D. P. *et al.* Platelet and leucocyte activation in childhood sickle cell disease: association with nocturnal hypoxaemia. *Br. J. Haematol.* **111**, 474–481 (2000).
8. Villagra, J. *et al.* Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* **110**, 2166–2172 (2007).
9. Semple, J. W., Italiano, J. E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* **11**, 264–274 (2011).

10. Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R. A., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol* **34**, 5–30 (2012).
11. Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M. & Modjeski, K. L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* **123**, 2759–2767 (2014).
12. Lindemann, S. *et al.* Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *J Cell Biol* **154**, 485–490 (2001).
13. Denis, M. M. *et al.* Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets. *Cell* **122**, 379–391 (2005).
14. Jenne, C. N., Urrutia, R. & Kubes, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *International Journal of Laboratory Hematology* **35**, 254–261 (2013).
15. Henn, V. *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591–594 (1998).
16. Lindmark, E., Tenno, T. & Siegbahn, A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2322–2328 (2000).
17. Ma, Y.-Q., Plow, E. F. & Geng, J.-G. P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of α M β 2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood* **104**, 2549–2556 (2004).
18. Martins, P. A. da C., van Gils, J. M., Mol, A., Hordijk, P. L. & Zwaginga, J. J. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of β 1 and β 2 integrins. *J Leukoc Biol* **79**, 499–507 (2006).
19. Hottz, E. D. *et al.* Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J. Immunol.* **193**, 1864–1872 (2014).

20. Polanowska-Grabowska, R. *et al.* P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2392–2399 (2010).
21. Frelinger, A. L. *et al.* Platelet activation and inhibition in sickle cell disease (pains) study. *Platelets* **25**, 27–35 (2014).
22. Brittain, H. A., Eckman, J. R., Swerlick, R. A., Howard, R. J. & Wick, T. M. Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. *Blood* **81**, 2137–2143 (1993).
23. Dominical, V. M. *et al.* Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. *Haematologica* **99**, e214–e217 (2014).
24. Proença-Ferreira, R. *et al.* Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PLoS ONE* **9**, e89012 (2014).
25. Zhang, D., Xu, C., Manwani, D. & Frenette, P. S. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood* **127**, 801–809 (2016).
26. Davila, J. *et al.* A novel inflammatory role for platelets in sickle cell disease. *Platelets* **26**, 726–729 (2015).
27. Swanson, K. V., Deng, M. & Ting, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* **19**, 477–489 (2019).
28. Hottz, E. D. *et al.* Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* **122**, 3405–3414 (2013).
29. Murthy, P. *et al.* The NLRP3 inflammasome and bruton's tyrosine kinase in platelets co-regulate platelet activation, aggregation, and in vitro thrombus formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 230–236 (2017).

30. Dutra, F. F. *et al.* Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E4110–4118 (2014).
31. Helms, C. C. *et al.* Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *J Thromb Haemost* **11**, 2148–2154 (2013).
32. Singhal, R. *et al.* Hemoglobin interaction with GP1b α induces platelet activation and apoptosis: a novel mechanism associated with intravascular hemolysis. *Haematologica* **100**, 1526–1533 (2015).
33. Antonucci, R., Walker, R., Herion, J. & Orringer, E. Enhancement of sickle erythrocyte adherence to endothelium by autologous platelets. *Am. J. Hematol.* **34**, 44–48 (1990).
34. Conran, N. & De Paula, E. V. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease - challenging the hemostatic balance. *Haematologica* **105**, 2380–2390 (2020).
35. Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**, 463–469 (2007).
36. Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R. K. & Ley, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* **21**, 99–111 (2007).
37. Bennewitz, M. F. *et al.* Lung vaso-occlusion in sickle cell disease mediated by arteriolar neutrophil-platelet microemboli. *JCI Insight* **2**, e89761 (2017).
38. Ataga, K. I. *et al.* Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* **376**, 429–439 (2017).
39. Kutlar, A. *et al.* Effect of crizanlizumab on pain crises in subgroups of patients with sickle cell disease: A SUSTAIN study analysis. *Am. J. Hematol.* **94**, 55–61 (2019).
40. Cardenes, N. *et al.* Platelet bioenergetic screen in sickle cell patients reveals mitochondrial complex V inhibition, which contributes to platelet activation. *Blood* **123**, 2864–2872 (2014).

41. Annarapu, G. K. *et al.* HbS Binding to GP1b α Activates Platelets in Sickle Cell Disease. *PLoS ONE* **11**, e0167899 (2016).
42. Bourne, J. H. *et al.* Heme induces human and mouse platelet activation through C-type-lectin-like receptor-2. *Haematologica* (2020) doi:10.3324/haematol.2020.246488.
43. Vogel, S. *et al.* Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J Clin Invest* **125**, 4638–4654 (2015).
44. Chi, W. *et al.* HMGB1 promotes the activation of NLRP3 and caspase-8 inflammasomes via NF- κ B pathway in acute glaucoma. *J Neuroinflammation* **12**, 137 (2015).
45. Nyakundi, B. B. *et al.* Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β production upon intravascular hemolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 464–475 (2019).
46. Vogel, S. *et al.* The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. *Blood Adv* **2**, 2672–2680 (2018).
47. Ito, M. *et al.* Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat Commun* **6**, 7360 (2015).
48. Liu, X. *et al.* Human NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activity is regulated by and potentially targetable through Bruton tyrosine kinase. *J. Allergy Clin. Immunol.* **140**, 1054-1067.e10 (2017).
49. Charache, S. *et al.* Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood* **79**, 2555–2565 (1992).
50. Liu, J., Fitzgerald, M. E., Berndt, M. C., Jackson, C. W. & Gartner, T. K. Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/VWF-induced signaling and GPIb-dependent thrombus formation in vivo. *Blood* **108**, 2596–2603 (2006).

51. Nicolson, P. L. R. *et al.* Low-dose Btk inhibitors selectively block platelet activation by CLEC-2. *Haematologica* **106**, 208–219 (2021).
52. Vats, R. *et al.* Platelet Extracellular Vesicles Drive Inflammasome-IL-1 β -Dependent Lung Injury in Sickle Cell Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **201**, 33–46 (2020).

Article 2 :

**L'activation de la caspase-1 plaquettaire et de la BTK
chez les patients atteints de COVID-19 est associée à la
gravité de la maladie et inhibée in vitro par l'ibrutinib**

Livia Claude, Frédéric Martino, Patricia Hermand, Bassel Chahim, Pierre-Marie
Roger, Marie de Bourayne, Yohann Garnier, Benoit Tressieres, Yves Colin, Caroline
Le Van Kim, Marc Romana, Véronique Baccini

Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. Volume 6, Issue 8 (2022) e12811

La gravité de la pathologie COVID-19 est souvent associée à des complications thrombotiques et à une tempête cytokinique conduisant à l'admission de certains patients en unité de soins intensifs. Les plaquettes sont connues pour être responsables des anomalies des paramètres de l'hémostase (thrombocytopénie, augmentation des D-dimères et allongement du temps de prothrombine) dans d'autres infections virales par l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par des voies de signalisation impliquant la Bruton tyrosine kinase (BTK) et conduisant *in fine* à l'activation de la caspase-1. Nous avons émis l'hypothèse que l'activation de la caspase-1 et la phosphorylation de la BTK pourraient être associées à la gravité de la maladie et que l'ibrutinib, un inhibiteur de la BTK, pourrait inhiber cette activation plaquettaire. Nous avons étudié l'activation de la caspase-1 par cytométrie en flux et la phosphorylation de BTK par Western blot dans une cohorte de 51 patients afro-caribéens atteints de la COVID-19 (19 non traités en réanimation et 32 traités en réanimation).

Nous montrons que l'activation de la caspase-1 et de la BTK est associée à la sévérité de la maladie et à l'état procoagulant des patients. De plus, nous avons montré *in vitro* que le plasma de patients COVID-19 sévères est capable d'augmenter l'expression de la P-selectine et d'induire l'activation de la caspase-1 des plaquettes provenant de sujets sains et que l'ibrutinib pouvait atténuer cet effet. Nos résultats montrent que l'activation de la caspase-1 et de la BTK sont liées à la sévérité de la maladie et suggèrent un espoir thérapeutique avec l'utilisation de l'ibrutinib dans le traitement de la COVID-19 par réduction de l'état procoagulant des patients.

ORIGINAL ARTICLE

Platelet caspase-1 and Bruton tyrosine kinase activation in patients with COVID-19 is associated with disease severity and reversed in vitro by ibrutinib

Livia Claude MSc^{1,2,3,4} | Frédéric Martino MD, MSc^{1,5} |
 Patricia Hermand PhD^{2,3,4} | Bassel Chahim MD⁶ | Pierre-Marie Roger MD, PhD⁷ |
 Marie de Bourayne PharmD, PhD⁸ | Yohann Garnier PhD^{1,2,3,4} |
 Benoit Tressieres MSc⁹ | Yves Colin PhD^{2,3,4} | Caroline Le Van Kim PhD^{2,3,4} |
 Marc Romana PhD^{1,2,3,4} | Véronique Baccini PharmD, PhD^{1,2,3,4,10}

¹Université des Antilles, UMR_S1134, BIGR, Pointe-à-Pitre, France

²Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France

³Université Paris Cité, UMR_S1134, BIGR, INSERM, Paris, France

⁴Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France

⁵Service de Réanimation, CHU de la Guadeloupe, Pointe à Pitre, Guadeloupe

⁶Service Post-Urgences, CHU de la Guadeloupe, Pointe à Pitre, Guadeloupe

⁷Service d'Infectiologie, CHU de la Guadeloupe, Pointe à Pitre, Guadeloupe

⁸Pharmafield for Janssen, Neuilly sur Seine, France

⁹Centre d'Investigation Clinique Antilles Guyane, Inserm CIC 1424, CHU de la Guadeloupe, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

¹⁰Laboratoire d'Hématologie, CHU de la Guadeloupe, Pointe à Pitre, Guadeloupe

Correspondence

Véronique Baccini, Université des Antilles, UMR_S_1134, BIGR, Hôpital Ricou, CHU de la Guadeloupe, Route de Chauvel, 97159 Pointe-à-Pitre, Cedex, Guadeloupe.
 Email: veronique.baccini@chu-guadeloupe.fr

Funding information

Janssen Research and Development; University Hospital Of Guadeloupe

Handling Editor: Prof. Yotis Senis

Abstract

Background: Severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19) is often associated with thrombotic complications and cytokine storm leading to intensive care unit (ICU) admission. Platelets are known to be responsible for abnormal hemostasis parameters (thrombocytopenia, raised D-dimers, and prolonged prothrombin time) in other viral infections through the activation of the nucleotide-binding domain leucine repeat rich containing protein 3 inflammasome induced by signaling pathways driven by Bruton tyrosine kinase (BTK) and leading to caspase-1 activation.

Objectives: We hypothesized that caspase-1 activation and the phosphorylation of BTK could be associated with the severity of the disease and that ibrutinib, a BTK inhibitor, could inhibit platelet activation.

Methods and Results: We studied caspase-1 activation by flow cytometry and the phosphorylation of BTK by Western blot in a cohort of 51 Afro-Caribbean patients with COVID-19 disease (19 not treated in ICU and 32 treated in ICU). Patients with a platelet count of $286.7 \times 10^9/L$ ($69-642 \times 10^9/L$) were treated by steroids and heparin preventive anticoagulation. Caspase-1 and BTK activation were associated with the severity of the disease and with the procoagulant state of the patients. Furthermore, we showed in vitro that the plasma of ICU patients with COVID-19 was able to increase CD62P expression and caspase-1 activity of healthy platelets and that ibrutinib could prevent it.

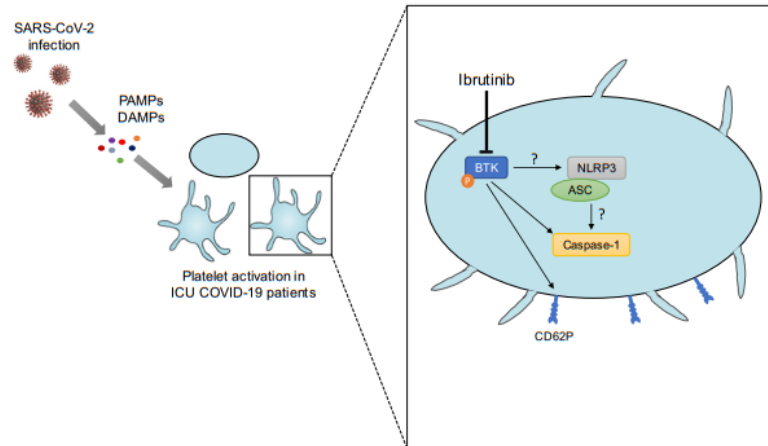
Conclusions: Our results show that caspase-1 and BTK activation are related to disease severity and suggest the therapeutic hope raised by ibrutinib in the treatment of COVID-19 by reducing the procoagulant state of the patients.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH).

KEYWORDS

Bruton tyrosine kinase, caspase-1, COVID-19, ibrutinib, platelets

**Essentials**

- Platelet hyperreactivity and thrombotic complications are observed in coronavirus disease 2019 (COVID-19).
- Platelet caspase-1 and BTK activation is related to disease severity in patients with COVID-19.
- BTK (an activator of caspase-1) and caspase-1 activation are reversed in vitro by ibrutinib.
- Ibrutinib is a therapeutic hope in the treatment of COVID-19.

1 | INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for coronavirus disease 2019 (COVID-19), characterized in its typical form by pneumonia with fever, cough, and dyspnea. Among the patients, about 14% develop the severe form of the disease and 5% its critical form (with respiratory and multiorgan failures or systemic shock) due to an excessive inflammatory reaction known as "cytokine storm."¹ It is characterized by a vast release of several proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α (TNF α), interferon- γ (IFN γ) and IL-1 β , leading to an inappropriate and excessive activation of the macrophages and the immune system as a whole.^{2,3} Thrombotic complications are frequent in the severe forms of the disease and are associated with abnormal hemostasis parameters (thrombocytopenia, raised D-dimers, and prolonged prothrombin time) mimicking disseminated intravascular coagulation.⁴ However, thrombocytopenia observed during COVID-19 infection remains moderate. Five percent to 42% of patients with COVID-19 exhibited mild thrombocytopenia ($100\text{--}150 \times 10^9/\text{L}$).^{5–8} Patients with severe COVID-19 have a lower platelet count ($23\text{--}31 \times 10^9/\text{L}$) than in mild or moderate forms of COVID-19.^{9,10} Several studies reported platelet activation in patients with COVID-19, suggesting that this blood cell type

may be due to the occurrence of these devastating conditions.^{11,12} Nevertheless, coagulopathy observed during COVID-19 still appears to be the result of the exacerbated inflammatory response and activation/alteration of endothelial tissue.¹³

Platelets play a well-known role in hemostasis and thrombosis, but they also mediate inflammatory and immune processes in several infectious illnesses such as dengue, HIV-1, and influenza.^{14–18} These processes, referred to as immunothrombosis, can drive adverse clinical outcomes such as vascular thrombosis, organ failure, and death, as observed in COVID-19.¹⁹

Several signaling pathways may lead to platelet activation, including those related to toll-like-receptors (TLRs). Platelets express several TLRs, which can be stimulated by pathogen-associated molecular patterns inducing signaling pathways driven by Bruton tyrosine kinase (BTK).²⁰ BTK is a nonreceptor signaling kinase downstream of several platelet receptors like glycoprotein (GP) VI,^{21,22} GPIb/IX/V,²³ and C-type lectin domain family 2.²⁴ BTK is able to activate the nucleotide-binding domain leucine repeat rich containing protein 3 (NLRP3) inflammasome in platelets,²⁵ which results in caspase-1 activation and the release of bioactive IL-1 β as well as other proinflammatory cytokines such as IL-18. It is worth noting that a major role of NLRP3 platelet inflammasome in the cytokine storm has been highlighted in the case of dengue virus infection.²⁶

In the present study, our main hypothesis is that blood platelets may participate in the inflammatory response observed during COVID-19 infection through the activation of caspase-1. Therefore, we investigated caspase-1 and BTK activation in platelets isolated from patients with COVID-19 in different clinical conditions. In addition, we evaluated *in vitro* the impact of plasma from patients with severe COVID-19 on platelets from healthy subjects and showed that ibrutinib, a BTK inhibitor, reverses the induced platelet activation.

2 | METHODS

2.1 | Human subjects and study design

In this cross-sectional study, 51 patients with SARS-CoV-2 infection were recruited from the University Hospital of Guadeloupe from September 8 to October 20, 2020: 19 hospitalized in medicine departments (non-ICU COVID-19) and 32 hospitalized in the ICU. Before the start of the study, a sample size calculation was performed. Few data were available in the literature. For this calculation, we used preliminary (unpublished) data on platelet caspase-1 activation in intubated ($8.7 \pm 6.9\%$; $n = 6$) and nonintubated patients with COVID-19 ($2.1 \pm 1.4\%$; $n = 4$). From these figures, we calculated that 17 individuals per group were necessary to highlight a difference in means among our 3 groups with an alpha risk of 5% and a power of 80% (calculations performed with the software nQuery Advisor 7.0). All patients were included after legal authorization and as soon as possible after hospital admission. Given the constraints of platelet handling, we could propose the study to a maximum of only two patients per day. Their recruitment also depended on hospital admissions. Despite these factors, all of the patients we proposed to the study agreed to be a part of it. The median time for blood sampling from the beginning of the symptom was 9 days. Patient eligibility criteria were SARS-CoV-2 positivity and acceptance to participate in the study.

SARS-CoV-2 infection was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in accordance with current standards. Eight healthy donors who were not infected by SARS-CoV-2 (negative RT-PCR) were also included in the same period. These donors were Guadeloupeans working at the University Hospital of Guadeloupe and gave their consent to participate in the study.

Patients with COVID-19 and healthy control subjects were recruited after informed written consent, in accordance with the local institutional review boards (Nos. IDRCB: 2020-401,908-31 and CNRIPH: 19-11-26-67,312, respectively) and the Declaration of Helsinki. All patients with COVID-19 were integrated in the following protocol: corticosteroid, preventive anticoagulation with heparin, ivermectin, and oxygen therapy.

No vaccine was available at this time, so none of the patients and healthy donors included in the study were vaccinated against SARS-CoV-2.

2.2 | Standard biological and biochemical variables

Cellular blood counts were delivered by the XN-1000 analyzer (Sysmex), coagulation parameters released by STAR-R Evolution Expert Series analyzer (Diagnostics Stago S.A.S.) and biochemical parameters from COBAS 4800 analyzer (Roche Diagnostics).

2.3 | Isolation, washing, and lysis of platelets

Blood samples were collected using a 21-gauge needle into a 3.2% trisodium citrate tube and centrifuged (170g, 10 min, room temperature, brake-free) within 1 h after collection to obtain the platelet-rich plasma (PRP). An aliquot of PRP was used for flow cytometry, and the remaining PRP was used for protein lysates. For this latter, PRP was incubated in the presence of prostaglandin E1 ($1 \mu\text{g/ml}$) and then was centrifuged. The supernatant was discarded, and platelets were incubated in Tyrode albumin buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 0.42 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mM HEPES, 0.05 g glucose, 20% bovine serum albumin, pH 7.3). Platelets were then washed and incubated in Tyrode buffer (137 mM NaCl, 0.3 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 5 mM HEPES, 5 mM dextrose, 1 mM MgCl_2 , pH 7.3).²⁶ Finally, platelets were lysed with lysis buffer (10 mM Tris Base, 0.5% Triton-X100, 25 mM NaCl, 125 mM sucrose, 25 mM NaF, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4), 5 mM vanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM NaF, and 1/100 of protease cocktail (Sigma-Aldrich). Proteins were stored at -20°C until used.

2.4 | Western blot analysis

Phosphorylation level of BTK at Tyr223 was determined by western blot. Autophosphorylation at Tyr223 within the SH3 domain is necessary for full activation of BTK. Platelet lysates ($50 \mu\text{g}$) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Thermo Fisher Scientific). The membranes were then blocked and incubated with anti-human phosphorylated BTK (p-BTK) (5082S; Cell Signaling Technology), anti-human BTK (3533S; Cell Signaling Technology) and anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (MAB374; Merck Millipore). Immune complexes were revealed with secondary peroxidase-conjugated antibodies (Dako A/S). Western blots were analyzed using an Amersham Imager 600 (GE Healthcare). For quantification, densitometry was performed with ImageJ software (National Institutes of Health). The results are shown as the ratio of p-BTK to total BTK.

2.5 | Platelet phenotyping

Platelet characteristics were determined by flow cytometry (Cytotflex, Beckman Coulter). PRP was labeled with antibodies (anti-CD41-ECD and anti-CD62P-APC from Beckman Coulter) or a

fluorescent probe green fluorescent labeled inhibitor of caspase-1 (FLICA) that irreversibly binds to activated caspase-1, according to the manufacturer's instructions (Immunochemistry Technologies). A minimum of 15,000 events was acquired. Platelets were distinguished by specific binding of anti-CD41 and characteristic forward and side scattering. First, platelets were gated according to size/structure (forward and side scattering) and then selected on the CD41 labeling. Anti-CD62P antibody and FAM-FLICA probe were used to evaluate P-selectin surface expression and active caspase-1, reflecting platelet and caspase-1 activation, respectively.

2.6 | Plasma analysis

Plasma samples were obtained from an EDTA tube of blood from patients and healthy donors by centrifugation, then stored at -80°C until inflammatory mediator quantification. IL-2, IL-12 p70, IFN γ , TNF α , IL-6, and IL-1 β quantification was performed using the Luminex technique in accordance with the manufacturer's instructions. Each plasma sample was tested in duplicate and data collected on a MAGPIX system (Thermo Fisher Scientific) and analyzed with ProcartaPlex Analyst 1.0 Software (ThermoFisher Scientific).

2.7 | Platelet stimulation with plasma from patients with COVID-19

The platelet-poor plasma of each donor was obtained from a 3.2% trisodium citrate tube of blood after double centrifugation: a centrifugation at 170g, 10min (obtaining PRP) then centrifugation at 1500g, 16min at room temperature, and was then stored at -80°C until used. Platelets from healthy controls were incubated for 1 h with plasma from ICU patients with COVID-19 or control subjects pretreated or not, during 10 min with a BTK inhibitor (ibrutinib, 5 μM ; purchased from Selleck Chemicals). Thereafter, platelets were labeled using antibodies (anti-CD41 ECD, anti-CD62P APC) and a FAM-FLICA probe or washed and lysed to assess BTK phosphorylation state as described above. For these indirect assays, the percentage of CD41 $^{+}$ CD62P $^{+}$ and FLICA $^{+}$ platelets were evaluated, respectively, by stimulation of platelets from 7 and 4 healthy subjects, respectively.

2.8 | Statistical analysis

For all experiments, normality of distributions was assessed, and quantitative variables were expressed as medians and interquartile ranges (IQRs) or means and standard deviations ($\pm\text{SD}$). Patient characteristics were analyzed using the Student *t* test or Mann-Whitney nonparametric test, analysis of variance (ANOVA; followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons), or Kruskal-Wallis nonparametric test (followed by Dunn's post hoc test for multiple comparisons) for quantitative variables and Khi-2 test or Fisher's exact test for categorical variables. Statistical analyses of flow cytometry data,

western blot data, and cytokine concentrations were performed with ANOVA (followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons) or Kruskal-Wallis nonparametric test (followed by Dunn's post hoc test for multiple comparisons) according to the normality of the distributions. Pearson correlations were performed to test the associations between the parameters investigated. Paired *t* test or Wilcoxon test was used to evaluate the effects of ibrutinib treatment and plasma of ICU patients with COVID-19 on healthy platelets. Statistical analyses were performed by using Prism version 8 (GraphPad Software). *p* value <0.05 was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | COVID-19 patient cohort

Fifty-one patients with COVID-19 were enrolled in our study: 19 non-ICU COVID-19 and 32 ICU COVID-19 (Table 1). In our cohort, the mean age was not different between non-ICU patients with COVID-19 and ICU patients with COVID-19, although the latter tended to be older (57 years vs. 64 years, respectively; $p = 0.1460$). Patients were mostly men in the two groups (79.0% and 71.9%, respectively). As expected, hospital duration was significantly longer in the ICU group (18 days vs. 4 days; $p = 0.0004$), while survival was significantly reduced in this group (50.0% vs. 94.7%; $p = 0.0016$). Compared to the non-ICU group, ICU patients with COVID-19 had significantly higher levels of leukocytes ($13.00 \times 10^9/\text{L}$ vs. $7.00 \times 10^9/\text{L}$; $p = 0.0005$), neutrophils ($10.76 \times 10^9/\text{L}$ vs. $5.47 \times 10^9/\text{L}$; $p < 0.0001$), C-reactive protein (181.0 mg/L vs. 73.8 mg/L; $p = 0.0177$), D-dimer (1.94 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vs. 0.76 $\mu\text{g}/\text{ml}$; $p = 0.0022$), fibrinogen (8.1 g/L vs. 6.4 g/L; $p = 0.0413$), creatinine (118 $\mu\text{mol}/\text{L}$ vs. 85 $\mu\text{mol}/\text{L}$; $p = 0.0114$) and higher prothrombin time (15.6 s vs. 14.0 s; $p < 0.0001$). We also observed a trend for higher values of total bilirubin in ICU group (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ vs. 7 $\mu\text{mol}/\text{L}$; $p = 0.0765$). Platelet, lymphocyte, and monocyte counts were not statistically different between these two groups, and few patients were thrombocytopenic (one ICU patient with COVID-19 with a platelet count less than $100 \times 10^9/\text{L}$, seven less than $150 \times 10^9/\text{L}$; two non-ICU patients with COVID-19 less than $150 \times 10^9/\text{L}$; and none had a platelet count less than $50 \times 10^9/\text{L}$). Surprisingly, we did not observe differences in the classical comorbidities associated with the severity of COVID-19 in the two groups (Table 1).

3.2 | Platelet activation is increased in COVID-19 patients and is dependent on the severity of the disease

We measured the membrane expression of platelet CD62P (P-selectin), a marker of platelet α granule secretion. As shown in Figure 1A, platelets are more activated in ICU patients with COVID-19 compared to non-ICU patients with COVID-19 and healthy controls. Therefore, the level of platelet activation is associated with the COVID-19 severity. Platelet expression of CD62P is

TABLE 1 Clinical characteristics of patients with COVID-19 and healthy donors

	Healthy donors (n = 8)	Patients with COVID-19 (n = 51)	
		Non-ICU COVID-19 (n = 19)	ICU COVID-19 (n = 32)
Age, mean, years ($\pm$ SD)	44 (16)	57 (12)	64 (11)
Male, n (%)	2 (25.0)	15 (79.0)	23 (71.9)
Race/ethnicity			
Afro-Caribbeans, n (%)	8 (100)	19 (100)	32 (100)
Days of hospitalization, median (IQR)	NA	4 (3–14)	18 (9–22)*
Survivors, n (%)	NA	18 (94.7)	16 (50.0)**
SAPS II score, median (IQR)	NA	NA	37 (29–45)
SOFA score, median (IQR)	NA	NA	5 (3.5–8)
SOFA score <5, n (%)	NA	NA	13 (41)
Respiratory assistance			
Mechanical ventilation, n (%)	NA	0 (0)	23 (72)
High-flow oxygen therapy, n (%)	NA	0 (0)	9 (28)
Extracorporeal membrane oxygenation, n (%)	NA	0 (0)	0 (0)
Laboratory results			
Hemoglobin, g/dl, mean ($\pm$ SD)	13.1 (1.1)	13.0 (1.4)	9.6 (2.7)*
Leukocytes, $\times 10^9$ /L, median (IQR)	5.60 (4.10–8.00)	7.00 (5.30–9.90)	13.00 (8.93–16.13)*
Lymphocytes, $\times 10^9$ /L, median (IQR)	1.87 (1.38–2.30)	1.13 (0.92–2.02)	1.05 (0.58–1.58)
Monocytes, $\times 10^9$ /L, median (IQR)	0.54 (0.41–0.63)	0.56 (0.35–0.73)	0.59 (0.31–0.97)
Neutrophils, $\times 10^9$ /L, median (IQR)	3.03 (2.06–4.97)	5.47 (3.08–7.14)	10.76 (7.87–13.89)*
Platelets, $\times 10^9$ /L, median (IQR)	291 (283–323)	260 (202–334)	236 (167–415)
Total bilirubin, μ mol/L, median (IQR)	7 (4–20)	7 (6–10)	10 (7–16)
C-reactive protein, mg/L, median (IQR)	0.9 (0.7–1.4)	73.8 (41.9–106.8)	181.0 (94.5–295.3)**
D-dimer, μ g/ml, median (IQR)	–	0.76 (0.53–1.40)	1.94 (1.01–5.52)**
Prothrombin time, s, mean ($\pm$ SD)	–	14.0 (0.61)	15.6 (1.29)*
Fibrinogen, g/L, mean ($\pm$ SD)	–	6.4 (2.3)	8.1 (1.7)**
Lactate, mmol/L, median (IQR)	–	1.10 (0.80–1.50)	1.40 (1.10–1.90)
Creatinine, μ mol/L, median (IQR)	–	85 (59–99)	118 (93–530)**
Troponin, ng/ml, median (IQR)	–	0.011 (0.008–0.015)	0.026 (0.010–0.042)
Comorbidity			
Hypertension, n (%)	–	7 (36.8)	12 (37.5)
Diabetes, n (%)	–	3 (15.8)	10 (31.3)
Obesity, n (%)	–	6 (31.6)	10 (31.3)
Body mass index, kg/m ² , median (IQR)	–	–	28.4 (26.8–30.2)
No comorbidity	–	10 (52.6)	14 (43.8)
Medications on day of blood collection			
Steroids, n (%)	NA	12 (75)	23 (71.9)
Heparin preventive anticoagulation, n (%)	NA	12 (75)	32 (100)**
Antiplatelet therapy, n (%)	NA	1 (6.2)	6 (18)

Note: Data are median (IQR), mean ($\pm$ SD) or n (%).

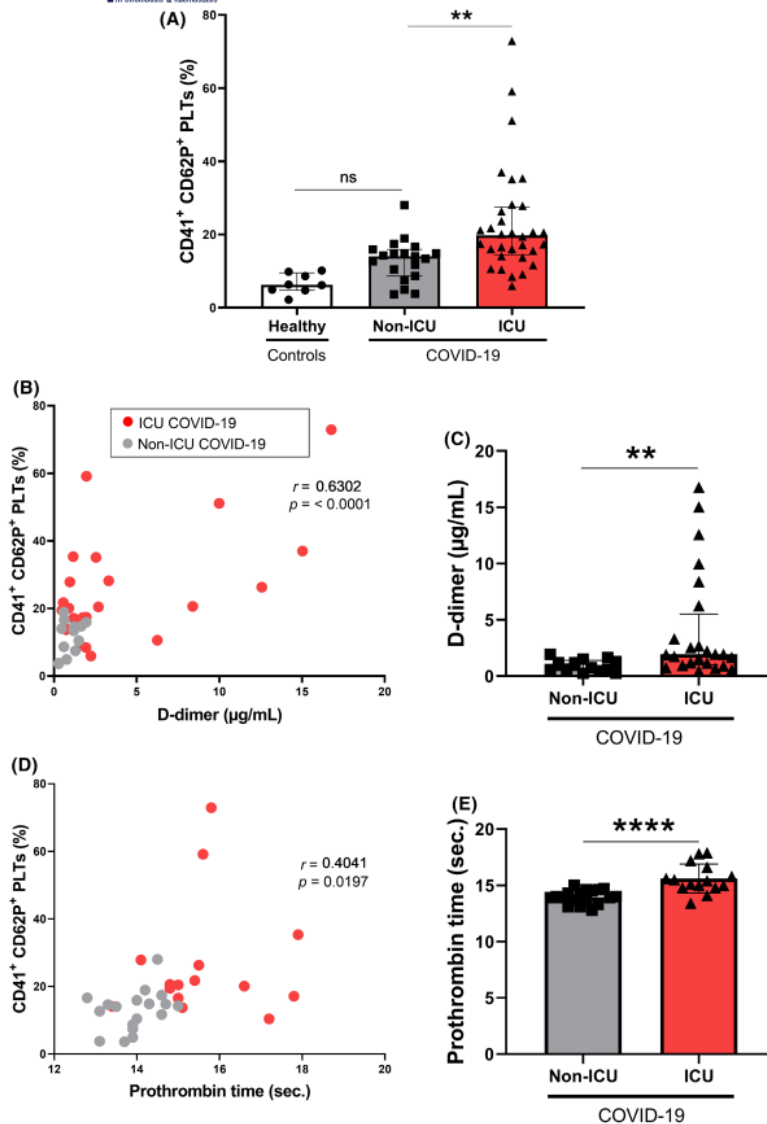
Abbreviations: ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; NA, not applicable; SD, standard deviation.

* $p < 0.001$ for the comparison of non-ICU versus ICU patients with COVID-19.

** $p \leq 0.05$ and $p \geq 0.001$ for the comparison of non-ICU versus ICU patients with COVID-19.

higher in ICU patients with COVID-19 (Figure 1A) compared to non-ICU patients with COVID-19 (median, 19.76%; IQR, 14.46–27.46 vs. median 14.02%; IQR, 8.680–15.91; $p = 0.0088$) and healthy controls

(median, 6.23%; IQR, 4.78–9.49; $p < 0.0001$). There was no significant difference between healthy controls and non-ICU patients with COVID-19 ($p = 0.109$).



Because D-dimer levels were associated with disease severity,²⁷ we analyzed the correlations between D-dimer rate and CD62P expression. We showed that platelet activation was positively correlated with the D-dimer rate of patients with COVID-19 ($r = 0.63$, $p < 0.0001$) (Figure 1B) and that platelet activation was positively correlated with prothrombin time ($r = 0.40$, $p = 0.0197$) (Figure 1D).

3.3 | Activation of the platelet caspase-1 is increased in patients with COVID-19 and associated with the severity of the disease

We tested the caspase-1 activation using FAM-FLICA probe. As shown in Figure 2, caspase-1 is significantly more activated in ICU patients with COVID-19, compared to healthy subjects (median, 8.02%; IQR, 4.57–13.97 vs. median, 3.11%; IQR, 1.66–4.93;

$p = 0.0048$). There was no significant difference between healthy controls and non-ICU patients with COVID-19 (median, 3.11%; IQR, 1.66–4.93 vs. median, 5.80%; IQR, 3.26–9.95, $p = 0.182$).

3.4 | BTK is activated in platelets of patients with COVID-19

We assessed the underlying mechanism of platelet caspase-1 activation in patients with COVID-19 by evaluating BTK activation through p-BTK level in platelets of patients with COVID-19 using western blot analysis (Figure 3). BTK phosphorylation level was significantly increased in platelets from ICU patients with COVID-19 (median, 0.68; IQR, 0.55–1.21) compared to healthy subjects (median, 0.19; IQR, 0.05–0.30; $p = 0.0004$) and to non-ICU patients with COVID-19 (median, 0.48; IQR, 0.41–0.55; $p = 0.0190$) (Figure 3).

FIGURE 1 Platelet activation in patients with COVID-19 and correlations with coagulation markers. (A) Platelet P-selectin expression (CD41⁺ CD62P⁺ PLTs) was measured by flow cytometry in 8 healthy donors, 19 non-ICU patients with COVID-19 and 32 ICU patients with COVID-19. Platelets were gated using CD41 expression and the percentage of CD62P⁺ platelets was evaluated among CD41⁺ platelets. (B) Strong positive correlation was observed between CD41⁺ CD62P⁺ PLTs percentage and D-dimer concentration ($r = 0.6302$) and (D) weak positive correlation was observed between CD41⁺ CD62P⁺ PLTs percentage and prothrombin time ($r = 0.4041$). (C) D-dimer concentration and (E) prothrombin time were evaluated in non-ICU and ICU COVID-19 groups. (A) Multiple comparisons were realized between healthy subjects, non-ICU patients, and ICU patients with COVID-19 and (C,E) were carried out between non-ICU patients with COVID-19 and ICU patients with COVID-19. (A,C,E) Data are shown (A,C) as median with interquartile ranges or (E) mean with standard deviation. p values were calculated with (A) Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test, (C) Mann-Whitney U test and (E) Student- t test. (B,D) Pearson's correlation coefficients (r) were calculated and are shown in the panels. Not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. COVID-19, coronavirus disease 2019; ICU, intensive care unit; PLT, platelet

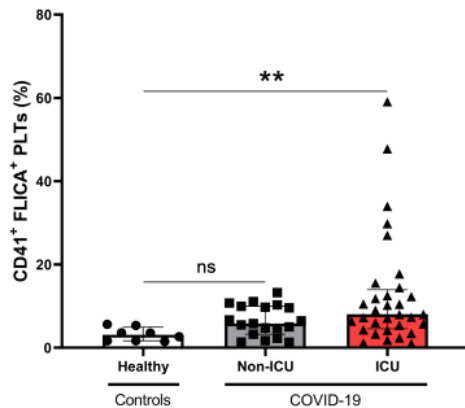


FIGURE 2 Caspase-1 activation in platelets of patients with COVID-19. Platelet caspase-1 activation was measured by flow cytometry using FAM-FLICA probe (CD41⁺ FLICA⁺ PLTs) in 8 healthy donors, 19 non-ICU patients with COVID-19 and 32 ICU patients with COVID-19. Multiple comparisons were realized between healthy subjects, non-ICU patients with COVID-19, and ICU patients with COVID-19. Data are shown as median with interquartile ranges and minimum and maximum values. *p* values were calculated with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test. Not significant, ***p* < 0.01. FLICA, fluorescent labeled inhibitor of caspase-1; PLT, platelet

There was no significant difference between healthy controls and non-ICU patients with COVID-19 (median, 0.19; IQR, 0.05–0.30 vs. median, 0.48; IQR, 0.41–0.55; *p* = 0.1681).

3.5 | Plasma from patients with COVID-19 induces platelet activation in healthy individuals

Next, we examined if plasma from patients with COVID-19 could affect the CD62P expression, caspase-1 activation, and BTK phosphorylation in platelets isolated from healthy subjects. Our results showed that plasma from ICU patients with COVID-19 significantly increased platelet CD62P expression (Figure 4A–C) (median, 8.74%; IQR, 5.61–21.97 vs. median, 14.11; IQR, 9.64–27.14; *p* = 0.0017) and caspase-1 activity (mean, 5.79%; $\pm$ SD, 3.90 vs. mean, 11.49%; $\pm$ SD, 6.28; *p* = 0.0097) (Figure 4D–F) compared to plasma from healthy subjects. These data indicate that circulating factors are at least responsible for increased platelet activation and caspase-1 activation in severe patients with COVID-19.

3.6 | BTK inhibitor ibrutinib rescue the platelet activation induced by plasma of patients with COVID-19

We then tested the ability of ibrutinib (Selleck Chemicals), one of the available BTK inhibitors, to reverse the platelet activation induced by plasma of ICU patients with COVID-19.

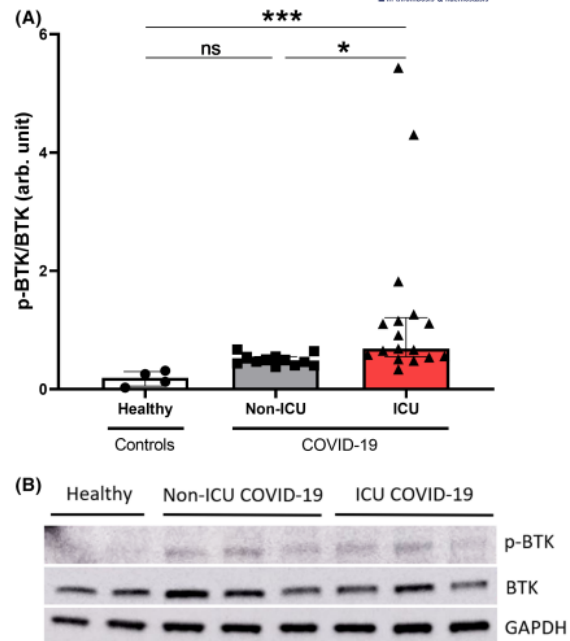


FIGURE 3 BTK phosphorylation in platelets of patients with COVID-19. Phosphorylation state of BTK was measured in 4 healthy donors, 12 non-ICU patients with COVID-19, and 17 ICU patients with COVID-19 by the densitometric analysis of western blots and normalized to total BTK. Multiple comparisons between healthy subjects, non-ICU and ICU patients with COVID-19 were realized. Data are shown as median with interquartile ranges and minimum and maximum values. *p* values were calculated with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test. Not significant, **p* < 0.05, ****p* < 0.001. BTK, Bruton tyrosine kinase; COVID-19, coronavirus disease 2019; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ICU, intensive care unit; p-BTK, phosphorylated Bruton tyrosine kinase

Incubation of platelets with ibrutinib significantly suppressed platelet CD62P enhanced expression (Figure 5A–C) (median, 14.28%; IQR, 9.64–27.14 vs. median, 10.13%; IQR, 6.37–13.97; *p* = 0.0017) and caspase-1 activity (Figure 5D–F) (mean, 11.49%; $\pm$ SD, 6.28 vs. mean, 5.67%; $\pm$ SD, 2.18; *p* = 0.0123) induced by plasma of ICU patients with COVID-19, indicating that platelet CD62P expression and caspase-1 activation depend, at least in part, on BTK activation. To confirm the ibrutinib action, protein lysates of stimulated healthy platelets were analyzed by western blot. Ibrutinib completely abolished BTK phosphorylation in healthy patient platelets stimulated or not by the plasma of ICU patients with COVID-19 (Figure 5G).

3.7 | Cytokine concentration

We measured the levels of different cytokines: IL-2, IL-12 p70, IFN γ , TNF α , IL-6, and IL-1 β . Non-ICU patients had increased levels of all cytokines compared with healthy controls. Surprisingly, non-ICU

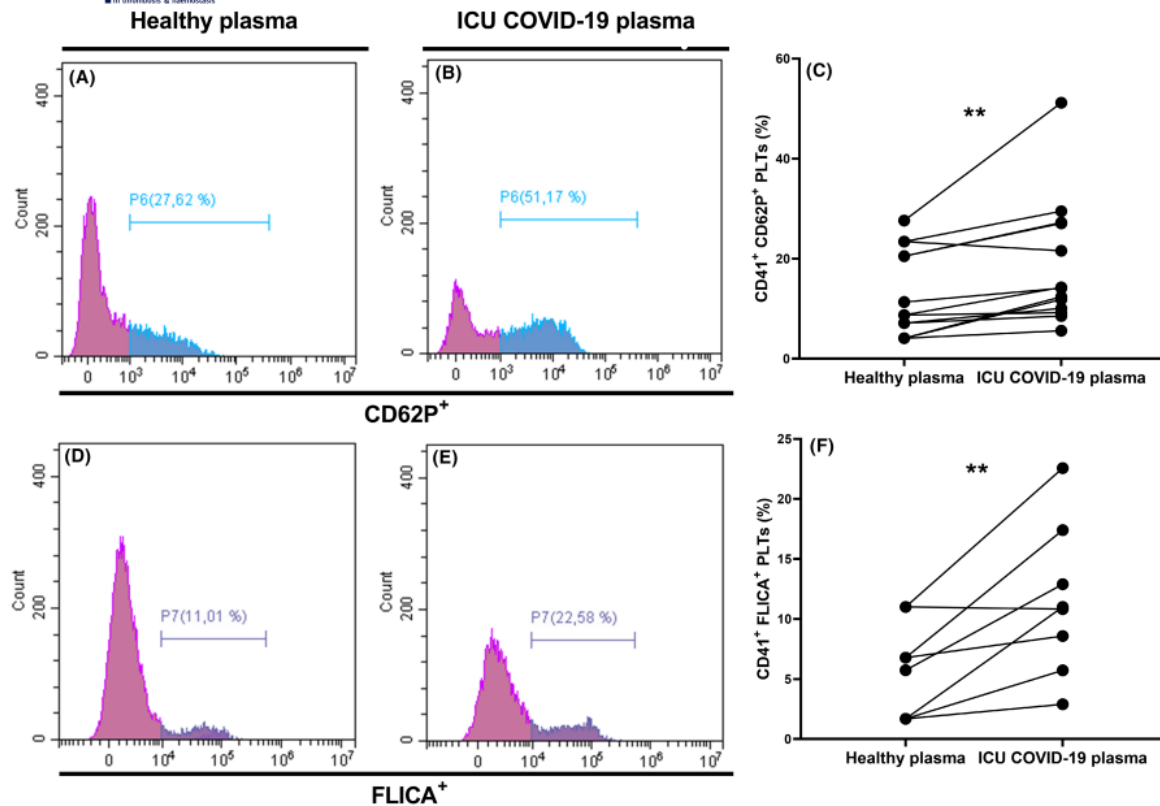


FIGURE 4 Plasma of ICU patients with COVID-19 induce platelet and caspase-1 activation. (A–F) Platelets of healthy subjects were incubated with plasma from healthy (A,D) or ICU patients with COVID-19 (B,E) during 1 h. (A–C) P-selectin expression and (D–F) caspase-1 activations of platelets were measured by flow cytometry. Platelets were distinguished by specific binding of anti-CD41 and characteristic forward and side scattering. Expressions of P-selectin (A,B) and caspase-1 (D,E) on CD41⁺ platelets were then analyzed on specific histograms. Differences in the expression of P-selectin (CD62P) and caspase-1 (FLICA) on platelets of healthy subjects incubated with healthy subject plasma or ICU COVID-19 plasma are illustrated in graphs C and F respectively. *p* value was calculated with (F) paired *t* test or (C) Wilcoxon test. ***p* < 0.01. COVID-19, coronavirus disease 2019; FLICA, fluorescent labeled inhibitor of caspase-1; ICU, intensive care unit; PLT, platelet

patients exhibited also increased levels of the investigated cytokines when compared to ICU patients (Figure S1). No difference was observed between ICU patients and healthy controls.

4 | DISCUSSION

In the present report, we showed an increase in platelet activation in patients with COVID-19 that is more pronounced in those exhibiting the worst clinical conditions. We also documented for the first-time activation of caspase-1 and BTK. Moreover, we demonstrated in vitro that plasma of ICU patients with COVID-19 is able to activate platelets from healthy subjects and increase caspase-1 activation and BTK phosphorylation. These effects were reversed by the use of ibrutinib. Interestingly, we observed that ICU patients with COVID-19 exhibit low levels of cytokines induced by helper T lymphocytes (Th1) compared to non-ICU patients.

Thrombotic complications are common among severely ill patients with COVID-19.^{28–31} In our cohort, we observed that ICU patients with COVID-19 have significantly higher levels of D-dimer, and prothrombin time is significantly longer compared to non-ICU patients as previously described.²⁴ In other viral infections, platelets are also known to be responsible for these hemostasis abnormalities.²⁶ Patients admitted to ICU for septic shock typically exhibit thrombocytopenia associated with higher morbidity and mortality.³² But this thrombocytopenia seems to be moderate in SARS-CoV-2 infection.²

Several studies described a direct relationship between thrombocytopenia and the severity of the disease in patients with COVID-19.⁹ In contrast, few patients of our series were thrombocytopenic. In addition, we did not detect difference in platelet count between ICU and non-ICU groups in contrast with previous studies.⁹ This discrepancy could be related to the ethnic origin of the patients included in our study, most of them being Afro-Caribbean

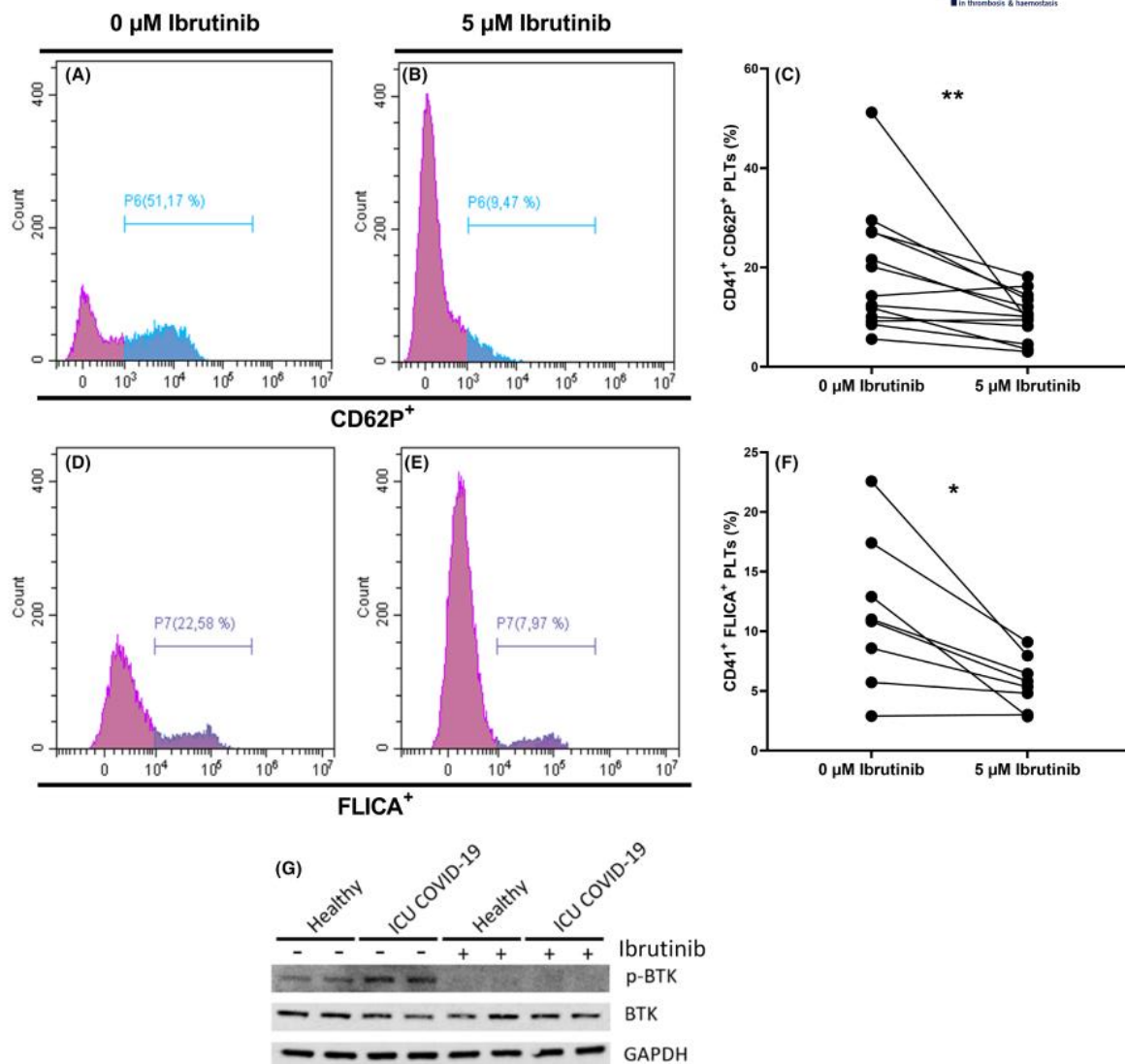


FIGURE 5 Ibrutinib inhibits platelet and caspase-1 activation induced by plasma of ICU patients with COVID-19. (A–F) Healthy platelets were preincubated or not with 5 μ M of ibrutinib during 10 min, then incubated with plasma of ICU patients with COVID-19 during 1 h. (G) Healthy platelets were preincubated or not with 5 μ M of ibrutinib during 10 min and thereafter with plasma of healthy subjects or ICU patients with COVID-19 during 1 h. (A–C) P-selectin expression and (D–F) caspase-1 activations were measured by flow cytometry. Platelets were distinguished by specific binding of anti-CD41 and characteristic forward and side scattering. Expressions of P-selectin (A,B) and caspase-1 (D,E) on CD41⁺ platelets without or with ibrutinib 5 μ M were then analyzed on specific histograms. Differences in the expression of P-selectin (CD62P) and caspase-1 (FLICA) on healthy platelets incubated with ICU COVID-19 plasma without or with ibrutinib 5 μ M are illustrated in graphs C and F respectively. (G) Representative western blot of p-BTK, BTK, and GAPDH proteins. *p* value was calculated with (F) paired *t* test or (C) Wilcoxon test. **p* < 0.05. ***p* < 0.01. Bruton tyrosine kinase; COVID-19, coronavirus disease 2019; FLICA, fluorescent labeled inhibitor of caspase-1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ICU, intensive care unit; p-BTK, phosphorylated Bruton tyrosine kinase; PLT, platelet

and knowing that ethnic variation of thrombotic risk has been previously reported.³³

Several studies described the platelet activation in COVID-19, showing their degranulation, the release of platelet extracellular vesicles, the production of proinflammatory cytokines and the

platelet-leukocyte aggregates formation.^{11,12,34,35} Our study confirmed the platelet activation in COVID-19 through the increase of P-selectin surface expression.¹¹ We further extend these results by showing that P-selectin expression varies according to the disease severity since the highest expression was observed in ICU patients.

It is well known that platelets can be activated during blood collection. To avoid this pitfall, we collected the blood of all the patients and healthy controls according to the same protocol, namely, with a 21-gauge needle, and we treated the platelets within an hour after sample collection. We also evidenced positive correlations between the P-selectin expression and expression of two coagulation markers, namely, D-dimers and prothrombin time. Several mechanisms and intracellular pathways are able to induce P-selectin expression and the implication of platelets in the inflammation state of many infectious diseases is now well documented.^{34,36–40} It has been suggested that this activation could be the result of the stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the binding of SARS-CoV-2 spike protein to angiotensin-converting enzyme 2,⁴¹ while an *in vitro* study suggested that immune complexes containing recombinant SARS-CoV-2 spike protein and anti-spike IgG enhanced platelet-mediated thrombosis on von Willebrand factor.⁴² In our study, we show that platelet activation is associated with caspase-1 activation and BTK phosphorylation. Caspase-1 activation is known to be induced by the NLRP3 inflammasome in platelets in several infectious diseases.^{26,43} Our results suggest a role of platelet activation in the severity degree of the disease and the procoagulant state of the patients probably mediated by NLRP3 inflammasome. However, in the present report, we did not show a direct link between the activation of caspase-1 and that of NLRP3. Therefore, additional studies are required to determine if the NLRP3 inflammasome is directly responsible for caspase-1 activation in platelets from patients with COVID-19. In addition, it would be interesting to explore the platelet-signaling pathways potentially involved upstream of BTK and caspase-1, using specific inhibitors. Among the pathways potentially involved, we can mention the way of GPVI, GPIb or TLRs, since platelets express some TLRs.⁴⁴

Furthermore, several studies have also suggested a potential role of the NLRP3 inflammasome during the COVID-19 cytokine storm.^{45–48} A heterogeneous NLRP3 inflammasome signature in circulating monocytes and granulocytes, depending on the COVID-19 severity, has been recently described.⁴⁹ Surprisingly, we did not detect an association between cytokine levels and disease severity. While the severity of the disease and admission to the ICU are associated with an exacerbated immune stimulation leading to a cytokine storm,² this association is not always observed. In agreement with previous reports, we observed that most severe patients from our cohort exhibited lower Th1 cytokine levels like IL-12, IFN γ , and TNF α . An explanation for these discrepancies remained unsolved but could be related to the time course of the disease at which the samples were obtained.^{50,51} Blood collections were performed as soon as possible after hospital admission (generally within 24 h), but median duration between symptoms onset and hospital admission was more than 1 week, so we cannot exclude a decrease of cytokine levels, explaining differences with other works. This result also suggests that observed platelet activation and platelet caspase-1 activation are not or little involved in this cytokine storm. But additional experiments would be needed to test this hypothesis on a more homogeneous patient population (on the timing of symptom development). Furthermore, we

showed that platelets could be activated *in vitro* by plasma obtained from patients with severe COVID-19, in agreement with the study of Hottz et al.¹¹ We extend this finding by showing that this activation process also involved caspase-1 and BTK. While the plasmatic triggering factors have not been studied in the present study and remained elusive, it is worth noting that Althaus et al.⁵² showed that COVID-19 serum induces platelet apoptosis and that this effect is triggered by IgG through the Fc γ RIIA pathway. Further studies are warranted to identify these factors and the involved signaling pathways.

Nevertheless, we also showed that ibrutinib was able to strongly reduce the *in vitro* activation of platelets induced by the plasma of patients with COVID-19. It is tempting to speculate that this reduction of platelet activation is related by its impact on BTK phosphorylation, but it has been shown that this compound may counteract platelet activation through Fc γ RIIA stimulation.⁵³ It is worth noting that patients with B-cell malignancies treated by BTK inhibitors who developed COVID-19 seem to be protected from severe illness.^{54,55} Altogether, these results strongly suggested that BTK could be a promising therapeutic target.

Several limitations of this report could be noticed such as the limited number of patients included as well as the cross-sectional design of the study. Patient inclusion was conducted from the second wave of the COVID-19 pandemic, implying that all patients from our cohort were infected by the same initial variant.

Another limitation is that ibrutinib was used at 5 μ M, which is a high dose known to also inhibit Src kinases in platelets,^{56–59} and Src kinases are essential for platelet activation and act upstream of BTK in the GPVI-signaling pathway.⁶⁰ Further experiments are needed to learn the precise involvement of Src kinase inhibition in the observed ibrutinib effect.

Despite these limitations, we have been able to evidence platelet activation, at least partly mediated by plasmatic factors, associated with COVID-19 severity and to document the inhibitory effect of ibrutinib on platelet activation *in vitro*.

In summary, our study shows caspase-1 activation in the platelets of patients with COVID-19 that is related to disease severity. Moreover, we confirmed the potential therapeutic interest of ibrutinib to reduce platelet activation in COVID-19. Our study shows another target pathway for BTK inhibitors and reinforces the possibility of using this therapeutic molecule in the treatment of COVID-19.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.B. designed the research; L.C., V.B., and F.M. performed the experiments; F.M., B.C., and P.M.R. recruited patients; P.H. performed and supervised the Luminex experiments; L.C., B.T., M.B., Y.G., M.R., and V.B. analyzed the results; L.C. and V.B. made the figures; L.C., Y.C., C.L.V.K., M.R., and V.B. wrote the manuscript; M.R. and V.B. obtained ethical approval.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Karubiotec for the use of their P2 laboratory. This work was supported by a grant of V.B. from the University Hospital of Guadeloupe and another grant from Janssen-Cilag. The authors thank also Ms Annick Bourguignon for the rereading of the manuscript.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the University Hospital of Guadeloupe (Grant/Award Nos. IDRCB: 2020-401,908-31 and CNRIPH: 19-11-26-67,312) and Janssen-Cilag.

RELATIONSHIP DISCLOSURE

L.C., F.M., P.H., B.C., P.M.R., Y.G., B.T., Y.C., C.L.V.K., and M.R. declare no conflicts of interest. M.d.B. is scientific manager at Pharmafield, on mission for Janssen. She presented the research project to Janssen V.B. received grant support from Janssen-Cilag during the conduct of this study.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Livia Claude  <https://orcid.org/0000-0002-6415-3941>
 Frédéric Martino  <https://orcid.org/0000-0002-1389-2306>
 Patricia Hermand  <https://orcid.org/0000-0003-0628-9733>
 Bassel Chahim  <https://orcid.org/0000-0003-0892-0779>
 Pierre-Marie Roger  <https://orcid.org/0000-0001-5261-3093>
 Marie de Bourayne  <https://orcid.org/0000-0002-8644-378X>
 Yohann Garnier  <https://orcid.org/0000-0002-2720-5829>
 Benoît Tressières  <https://orcid.org/0000-0002-9585-4281>
 Yves Colin  <https://orcid.org/0000-0001-5196-4254>
 Caroline Le Van Kim  <https://orcid.org/0000-0002-3251-1310>
 Marc Romana  <https://orcid.org/0000-0002-8715-9836>
 Véronique Baccini  <https://orcid.org/0000-0003-3913-7664>

TWITTER

Frédéric Martino  @fonitram

REFERENCES

- Wu C, Chen X, Cai Y, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020;180(7):934-943.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506.
- Zhang C, Wu Z, Li JW, Zhao H, Wang GQ. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;55(5):105954.
- Thachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020;18(5):1023-1026.
- Liu Y, Sun W, Guo Y, et al. Association between platelet parameters and mortality in coronavirus disease 2019: retrospective cohort study. *Platelets.* 2020;31(4):490-496.
- Zhang Y, Zeng X, Jiao Y, et al. Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020;193:110-115.
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. China medical treatment expert group for COVID-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708-1720.
- Yang X, Yang Q, Wang Y, et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020;18(6):1469-1472.
- Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: a meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2020;506:145-148.
- Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(7):1021-1028.
- Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood.* 2020;136(11):1330-1341.
- Manne BK, Denorme F, Middleton EA, et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood.* 2020;136(11):1317-1329.
- Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood.* 2020;135(23):2033-2040.
- Boilard E, Paré G, Rousseau M, et al. Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood.* 2014;123(18):2854-2863.
- Campbell RA, Schwertz H, Hottz ED, et al. Human megakaryocytes possess intrinsic antiviral immunity through regulated induction of IFITM3. *Blood.* 2019;133(19):2013-2026.
- Chao CH, Wu WC, Lai YC, et al. Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007625.
- Koupenova M, Corkrey HA, Vitseva O, et al. The role of platelets in mediating a response to human influenza infection. *Nat Commun.* 2019;10(1):1780.
- Sung PS, Huang TF, Hsieh SL. Extracellular vesicles from CLEC2-activated platelets enhance dengue virus-induced lethality via CLEC5A/TLR2. *Nat Commun.* 2019;10(1):2402.
- Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):34-45.
- Garraud O, Cognasse F. Platelet toll-like receptor expression: the link between « danger » ligands and inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2010;9(5):322-333.
- Quek LS, Bolen J, Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol.* 1998;8(20):1137-1140.
- Oda A, Ikeda Y, Ochs HD, et al. Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Bruton's tyrosine/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD32 cross-linking. *Blood.* 2000;95(5):1663-1670.
- Liu J, Fitzgerald ME, Berndt MC, Jackson CW, Gartner TK. Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/VWF-induced signaling and GPIb-dependent thrombus formation in vivo. *Blood.* 2006;108(8):2596-2603.
- Nicolson PLR, Nock SH, Hinds J, et al. Low-dose Btk inhibitors selectively block platelet activation by CLEC-2. *Haematologica.* 2021;106(1):208-219.
- Murthy P, Durco F, Miller-Ocun JL, et al. The NLRP3 inflammasome and Bruton's tyrosine kinase in platelets co-regulate platelet activation, aggregation, and in vitro thrombus formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(1):230-236.
- Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood.* 2013;122(20):3405-3414.
- Ozen M, Yilmaz A, Cakmak V, et al. D-Dimer as a potential biomarker for disease severity in COVID-19. *Am J Emerg Med.* 2021;40:55-59.
- Llitiós JF, Leclerc M, Chochois C, et al. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *J Thromb Haemost.* 2020;18(7):1743-1746.

29. Beyrouiti R, Adams ME, Benjamin L, et al. Characteristics of ischaemic stroke associated with COVID-19. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(8):889-891.
30. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020;191:145-147.
31. Lodigiani C, Iapichino G, Carenzo L, et al. Venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19 patients admitted to an academic hospital in Milan, Italy. *Thromb Res*. 2020;191:9-14.
32. Akca S, Haji-Michael P, de Mendonça A, Suter P, Levi M, Vincent JL. Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2002;30(4):753-756.
33. Fogarty H, Townsend L, Ni Cheallaigh C, et al. More on COVID-19 coagulopathy in Caucasian patients. *Br J Haematol*. 2020;189(6):1060-1061.
34. Lanza GA, Barone L, Scalone G, et al. Inflammation-related effects of adjuvant influenza A vaccination on platelet activation and cardiac autonomic function. *J Intern Med*. 2011;269(1):118-125.
35. Wool GD, Miller JL. The impact of COVID-19 disease on platelets and coagulation. *Pathobiology*. 2021;88(1):15-27.
36. Hottz ED, Quirino-Teixeira AC, Valls-de-Souza R, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelet function in HIV plus dengue coinfection associates with reduced inflammation and milder dengue illness. *Sci Rep*. 2019;9(1):7096.
37. Damien P, Cognasse F, Lucht F, et al. Highly active antiretroviral therapy alters inflammation linked to platelet cytokines in HIV-1-infected patients. *J Infect Dis*. 2013;208(5):868-870.
38. Kelesidis T, Papakonstantinou V, Detopoulou P, et al. The role of platelet-activating factor in chronic inflammation, immune activation, and comorbidities associated with HIV infection. *AIDS Rev*. 2015;17(4):191-201.
39. Jin L, Ying ZH, Yu CH, Zhang HH, Yu WY, Wu XN. Isofraxidin ameliorated influenza viral inflammation in rodents via inhibiting platelet aggregation. *Int Immunopharmacol*. 2020;84:106521.
40. Lê VB, Schneider JG, Boergeling Y, et al. Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(7):804-819.
41. Zhang S, Liu Y, Wang X, et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):120.
42. Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. 2020;130(5):2620-2629.
43. Cornelius DC, Baik CH, Travis OK, et al. NLRP3 inflammasome activation in platelets in response to sepsis. *Physiol Rep*. 2019;7(9):e14073.
44. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol*. 2005;83(2):196-198.
45. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):355-362.
46. Merad M, Martin JC. Author Correction: Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(7):448.
47. Parisi V, Leosco D. Precision medicine in COVID-19: IL-1 β a potential target. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(5):543-544.
48. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med*. 2021;218(3):e20201707.
49. Courjon J, Dufies O, Robert A, et al. Heterogeneous NLRP3 inflammasome signature in circulating myeloid cells as a biomarker of COVID-19 severity. *Blood Adv*. 2021;5(5):1523-1534.
50. Dayarathna S, Jeewandara C, Gomes L, et al. Similarities and differences between the « cytokine storms » in acute dengue and COVID-19. *Sci Rep*. 2020;10(1):19839.
51. Gadotti AC, de Castro Deus M, Telles JP, et al. IFN- γ is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection. *Virus Res*. 2020;289:198171.
52. Althaus K, Marini I, Zlamal J, et al. Antibody-induced procoagulant platelets in severe COVID-19 infection. *Blood*. 2021;137(8):1061-1071.
53. Bye AP, Hoepel W, Mitchell JL, et al. Aberrant glycosylation of anti-SARS-CoV-2 IgG is a pro-thrombotic stimulus for platelets. *Blood*. 2021;138(16):1481-1489.
54. Treon SP, Castillo J, Skarbnik AP, et al. The BTK-inhibitor ibrutinib may protect against pulmonary injury in COVID-19 infected patients. *Blood*. 2020;135(21):1912-1915.
55. Roschewski M, Lionakis MS, Sharman JP, et al. Inhibition of Bruton tyrosine kinase in patients with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020;5(48):eabd0110.
56. Levade M, David E, Garcia C, et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*. 2014;124(26):3991-3995.
57. Kamel S, Horton L, Ysebaert L, et al. Ibrutinib inhibits collagen-mediated but not ADP-mediated platelet aggregation. *Leukemia*. 2015;29(4):783-787.
58. Bye AP, Unsworth AJ, Vaiyapuri S, Stainer AR, Fry MJ, Gibbins JM. Ibrutinib inhibits platelet integrin α IIb β 3 outside-in signaling and thrombus stability but not adhesion to collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(11):2326-2335.
59. Rigg RA, Aslan JE, Healy LD, et al. Oral administration of Bruton's tyrosine kinase inhibitors impairs GPVI-mediated platelet function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;310(5):C373-C380.
60. Gratacap MP, Martin V, Valéra MC, et al. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo. *Blood*. 2009;114(9):1884-1892.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Claude L, Martino F, Hermand P, et al. Platelet caspase-1 and Bruton tyrosine kinase activation in patients with COVID-19 is associated with disease severity and reversed in vitro by ibrutinib. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022;6:e12811. doi: [10.1002/rth2.12811](https://doi.org/10.1002/rth2.12811)

E – Discussion générale et perspectives

Depuis des années, les plaquettes sont connues pour leur rôle indispensable dans l'hémostase. Aujourd'hui, un certain nombre d'études ont permis de mettre en lumière leur implication physiologique et pathologique dans l'inflammation, dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Semple *et al.* 2011; Vieira-de-Abreu *et al.* 2012; Morrell *et al.* 2014). En effet, celles-ci jouent un rôle dans des pathologies comme l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde et dans un grand nombre de maladies infectieuses telles que la dengue, la grippe etc. (Huo et Ley 2004; Boilard *et al.* 2010; Hottz *et al.* 2013; Boilard *et al.* 2014).

Ces différentes fonctions sont assurées par la présence de récepteurs de reconnaissance de DAMPs et de PAMPs comme la protéine NLRP3 qui intervient dans la formation d'un inflammasome ; l'inflammasome NLRP3 dont l'activation permet la bioactivation de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 β et interleukine-18). L'activation de l'inflammasome NLRP3 plaquettaire est évoquée pour la première fois chez des patients atteints de la dengue (Hottz, Lopes, *et al.* 2013). L'étude de l'inflammasome NLRP3 plaquettaire a par la suite permis de montrer que l'activation de ce complexe favorise l'activation et l'agrégation des plaquettes ainsi que la formation de thrombus *in vitro* via la BTK (Murthy *et al.* 2017). L'implication possible de l'inflammasome NLRP3 et de la BTK dans plusieurs voies de signalisation plaquettaires leurs permettraient donc de jouer un rôle essentiel dans des mécanismes inflammatoires et thrombotiques observés dans des maladies comme la drépanocytose.

C'est dans ce contexte que l'idée d'étudier l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans la drépanocytose est née, soutenue également par des études montrant une activation plaquettaire (Wun *et al.* 1997; 1998; Inwald *et al.* 2000; Villagra *et al.* 2007) et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β par ces dernières chez ces patients (Davila *et al.* 2015). Les plaquettes activées interagissent avec les leucocytes et les cellules endothéliales vasculaires et sont capables d'activer ces cellules directement par contact et indirectement *via* la sécrétion de cytokines et de chimiokines permettant ainsi le recrutement des leucocytes au niveau du site de l'inflammation. Les plaquettes pourraient donc jouer un rôle clef dans les mécanismes de vaso-occlusion observés dans cette pathologie.

Nous avons, dans un premier temps évalué l'activation des plaquettes et la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles chez les patients drépanocytaires SC et SS à l'état de base ; deux génotypes prédominants en Guadeloupe avec des présentations cliniques distinctes. Nos résultats confirment l'activation des plaquettes déjà observée chez les patients drépanocytaires SC et SS (Wun *et al.* 1997; 1998; Inwald *et al.* 2000; Villagra *et al.* 2007) et mettent en évidence des niveaux élevés d'agrégats plaquettes-neutrophiles chez les patients SS.

Les DAMPs d'origines hémolytiques comme l'Hb (Cardenes *et al.* 2014; Singhal *et al.* 2015; Annarapu *et al.* 2016), l'hème (Bourne *et al.* 2020), le HMGB1 (Vogel *et al.* 2015) sont connus pour activer les plaquettes. Il a également été montré que ces derniers peuvent provoquer l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les monocytes et les macrophages (Swanson *et al.* 2019; Dutra *et al.* 2014; Chi *et al.* 2015; Nyakundi *et al.* 2019). Dans notre étude, nous montrons une activation de la caspase-1 plaquettaire chez les patients SC et SS et que l'activation de la caspase-1 est corrélée à l'activation plaquettaire dans ces deux groupes.

Nous sommes les premiers à mentionner l'activation de la caspase-1 plaquettaire et à suggérer une activation de l'inflammasome NLRP3 chez les patients SC.

Nous avons observé un lien entre l'activation de la caspase-1 et certains marqueurs d'hémolyse chez les patients SS, qui, contrairement aux patients SC présentent une anémie hémolytique chronique et des marqueurs hémolytiques significativement plus élevés (Hb, réticulocytes, LDH, Bilirubine totale, ASAT). Nous montrons également une corrélation entre le taux d'HbF et l'activation de la caspase-1 chez les patients SS. Ces résultats suggèrent un effet indirect et bénéfique de l'HbF, qui empêcherait l'activation de la caspase-1, bien que nous n'ayons pas montré de différence significative entre les patients SS traités et non traités à l'HU. Ces résultats observés seraient probablement dus à un effectif trop faible de patients SS non traités à l'HU.

En effet, l'HbF en limitant la polymérisation de l'HbS et donc la falciformation des globules rouges (Charache *et al.* 1992) permettrait de limiter le relargage de DAMPs issus de l'hémolyse des globules rouges.

Des études récentes ont montré que la BTK est un activateur essentiel de l'inflammasome NLRP3 dans les plaquettes (Murthy *et al.* 2017), les monocytes et les macrophages (Ito *et al.* 2015; Liu *et al.* 2017).

Nous avons donc par la suite évalué l'état de phosphorylation de la BTK. Nous avons observé uniquement une tendance pour les patients SS par rapport aux sujets sains probablement due à un effectif trop petit avec toutefois des résultats qui pourraient suggérer un lien entre l'HbF et l'état de phosphorylation de la BTK.

Nous n'observons pas de corrélation chez les patients SC. Une explication pourrait être que ces patients ont un taux d'hémoglobine plus élevé avec une hémolyse moindre et surtout une variabilité inter-individuelle beaucoup plus réduite. Ainsi, notre étude ne serait pas assez puissante pour mettre en évidence un lien entre l'hémolyse et l'activation plaquettaire de la caspase-1. Une autre explication serait que l'activation plaquettaire dans ces deux populations seraient liée à des triggers différents.

Vogel et ses collaborateurs ont récemment montré que HMGB1 provoque l'activation de l'inflammasome NLRP3 *via* TLR4 et BTK dans les plaquettes de patients SS (Vogel *et al.* 2018). HMGB1 étant un DAMP produit lors de l'hémolyse, il pourrait être un trigger de l'activation plaquettaire chez les patients SS. Dans cette même étude, ils ont également démontré que l'utilisation d'Ibrutinib, un inhibiteur de BTK, actuellement utilisé en oncohématologie, inhibe significativement l'activation de la caspase-1 plaquettaire induite par HMGB1 chez les patients drépanocytaires et les souris SCD. Cet inhibiteur a également permis de réduire l'activation des plaquettes, leur agrégation et la formation de thrombus (Murthy *et al.* 2017).

La stimulation de récepteurs comme la GPIb α et CLEC-2 par des DAMPS hémolytiques pourrait aussi induire l'activation de la voie BTK/NLRP3/Caspase-1/IL-1 β chez les patients drépanocytaires. En effet, l'Hb et l'hème peuvent activer les plaquettes *via* GPIb α et le récepteur de type lectine-2 de type C (CLEC-2) respectivement (Singhal *et al.* 2015; Annarapu *et al.* 2016; Bourne *et al.* 2020). La BTK joue un rôle essentiel dans l'activation plaquettaire médiée par les récepteurs GPIb α et CLEC-2 (J. Liu *et al.* 2006; Nicolson *et al.* 2021). L'inhibition de la BTK pourrait donc réduire l'activation des plaquettes induite par de potentielles interactions entre les DAMPs hémolytiques et les récepteurs GPIb α et CLEC-2.

Enfin, une étude récente a montré que l'inhibition de la caspase-1 a permis d'atténuer la formation d'agrégats plaquettes-neutrophiles et le risque de vaso-occlusion pulmonaire chez des souris SCD, médiés par la libération de vésicules riches en IL-1 β suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Vats *et al.* 2020). L'ibrutinib pourrait également être un bon candidat pour limiter la formation d'agrégats et prévenir les risques de vaso-occlusion pulmonaire.

L'activation plaquettaire des patients drépanocytaires sur un versant inflammatoire est désormais clairement établie. Ce qu'il ne faut jamais négliger lorsqu'on travaille sur les plaquettes, est qu'elles proviennent de leur cellule parentale, le mégacaryocyte. En effet, elles peuvent être activées en périphérie mais elles reflètent aussi la différenciation subie par la cellule dont elles proviennent. Récemment, le dogme de la mégacaryocytopoïèse linéaire a été remis en question avec des études de transcriptomique (Sun *et al.* 2021; C. Liu *et al.* 2021) qui ont montré qu'il existerait plusieurs types fonctionnels de mégacaryocytes et que leurs proportions respectives varieraient en fonction du contexte physio-pathologique du patient. Ainsi, il existerait des mégacaryocytes immuns (proches des monocytes ou des cellules dendritiques et qui ne seraient pas capables de produire des plaquettes), des mégacaryocytes polyploïdes spécialisés dans le remodelage de l'environnement médullaire et la régulation des CSH et des mégacaryocytes polyploïdes classiques produisant les plaquettes.

Ce nouveau paradigme de la mégacaryocytopoïèse nous a conduit à nous interroger sur la différenciation mégacaryocytaire des patients drépanocytaires qui pourrait être différente en fonction du syndrome drépanocytaire et expliquer le phénotype des plaquettes.

En conclusion, d'autres études sont nécessaires afin de comprendre le mécanisme d'activation de la caspase-1 chez les patients SC, notamment pour mettre en évidence les triggers de cette activation qui pourraient aussi provenir d'une différenciation mégacaryocytaire différente.

L'augmentation de l'effectif particulièrement pour l'évaluation de la phosphorylation de BTK est un point qui permettrait d'améliorer la tendance observée pour les patients SS.

L'utilisation d'inhibiteurs de certains récepteurs plaquettaires (TLR4, GPIIb α , CLEC-2), mais également de NLRP3, de la BTK et de la caspase-1 ainsi que la stimulation de plaquettes saines avec des DAMPs hémolytiques ou du plasma de patients drépanocytaires à l'état de base et en

crise permettrait de mieux comprendre et de caractériser les voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire et la vaso-occlusion en plus de celle déjà explorée par Vogel et ses collaborateurs. Enfin, l'étude de la mégacaryocytopoïèse de cellules CD34+ issues de patients SS et SC pourraient aider à la compréhension de l'activation plaquettaire à l'état de base de ces patients et mettre en lumière des différences en fonction du génotype.

Durant ma thèse, l'émergence de l'épidémie de COVID-19 dans le monde nous a conduit à explorer l'activation des plaquettes et de l'inflammasome NLRP3 dans cette pathologie. A ce stade, les toutes premières études réalisées montraient que certains patients développaient un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) dû à une tempête cytokinique, pouvant conduire *in fine* à une défaillance multiviscérale dans les cas les plus graves. Sur le plan inflammatoire, les données de la littérature évoquaient une augmentation d'un certain nombre de cytokines plasmatiques, et notamment de l'IL-1 β et de l'IL-18 (Huang *et al.* 2020; Taus *et al.* 2020; Zaid *et al.* 2020; Lucas *et al.* 2020) chez les patients présentant une forme sévère. Sachant d'une part que les plaquettes peuvent reconnaître et interagir avec une grande variété de virus, *via* leurs récepteurs et, d'autre part, que l'inflammasome NLRP3 peut être activé par des virus et divers PAMPs, nous avons émis l'hypothèse d'une potentielle activation des plaquettes et de l'inflammasome NLRP3 plaquettaire chez les patients atteints de la COVID-19.

Dans cette étude, nous avons étudié deux profils de patients atteints de COVID-19 : ceux hospitalisés en médecine présentant des symptômes modérés et ceux hospitalisés en unité de soins intensifs. Nous avons montré une augmentation significative de l'activation des plaquettes caractérisée par l'expression de la P-selectine chez les patients en soins intensifs comparativement aux patients hospitalisés en médecine. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes montrant une activation des plaquettes dans cette pathologie (Hottz *et al.* 2020; Manne *et al.* 2020). Il a été suggéré dans certaines études que l'activation plaquettaire pourrait être dû à l'activation de la voie de la MAPK (Zhang *et al.* 2020; Manne *et al.* 2020).

Nous avons observé comme dans certaines études antérieures, que les patients en soins intensifs, atteints d'une forme plus sévère, avaient des niveaux significativement plus élevés de

D-dimères et un temps de prothrombine significativement plus long que les patients hospitalisés en médecine (Huang *et al.* 2020; Tang *et al.* 2020). Nous avons également mis en évidence des corrélations positives entre l'activation des plaquettes et ces deux marqueurs de la coagulation : les D-dimères et le temps de prothrombine. L'étude de Hottz *et al.* a récemment montré que l'activation des plaquettes était associée à des marqueurs d'exacerbation de la coagulation tels que le fibrinogène et les D-dimères (Hottz *et al.* 2020). Dans cette étude, les chercheurs ont aussi montré que l'interaction des monocytes avec les plaquettes activées *via* les liaisons P-selectine/PSGL-1 et GPIIbIIIa/Fibrinogène/MAC1 induisait l'expression de facteur tissulaire (TF) à la surface des monocytes (Hottz *et al.* 2020). Les complications thrombotiques sont fréquentes chez les patients atteints de COVID-19 (Llitjos *et al.* 2020; Beyrouti *et al.* 2020; Klok *et al.* 2020; Lodigiani *et al.* 2020). L'activation des plaquettes et l'expression de TF à la surface des monocytes pourraient en partie expliquer les complications thrombotiques observées chez les patients atteints de formes sévères de la maladie, puisque le TF joue un rôle central dans l'initiation de la cascade de coagulation.

Pour la première fois, nous avons mis en évidence l'activation de la caspase-1 plaquettaire chez les patients atteints de COVID-19 et supposons donc une activation de l'inflammasome NLRP3, déjà connue pour être activée dans d'autres maladies infectieuses (Hottz *et al.* 2013; Cornelius *et al.* 2019). Plusieurs études ont suggéré une implication de l'inflammasome NLRP3 durant la tempête cytokinique au cours du COVID-19 dans d'autres types cellulaires (Merad et Martin 2020; Parisi et Leosco 2020; Rodrigues *et al.* 2021).

Dans notre étude, bien que nous ayons observé une exacerbation de l'activation de la caspase-1 chez les patients admis en soins intensifs, nous ne montrons aucune augmentation des concentrations en IL-1 β plasmatique dans le cas de formes graves de la maladie. L'une des explications possibles serait le délai entre l'apparition des premiers symptômes et l'inclusion des patients dans notre étude. Les patients atteints d'une forme sévère de la maladie présentaient également une augmentation de la phosphorylation de la BTK.

Des expériences ont par la suite été réalisées afin de mieux comprendre le mécanisme d'activation des plaquettes, de la caspase-1 et de la BTK. Nous avons démontré *in vitro* que le plasma de patients en soins intensifs atteints de COVID-19 est capable d'activer les plaquettes de

sujets sains. Cette activation des plaquettes par le plasma de patients présentant une forme sévère de la maladie a déjà été évoquée précédemment sans que les effecteurs plasmatiques n'aient été mis en cause (Hottz *et al.* 2020). Cependant, deux études récentes suggèrent une implication des IgG anti-Spike dans l'activation des plaquettes, par interaction de ces IgG avec les récepteurs FcγRIIA (Althaus *et al.* 2021; Bye *et al.* 2021).

Nous observons aussi une augmentation de l'activation de la caspase-1 et la phosphorylation de la BTK suite à la stimulation par le plasma des patients COVID-19 sévères. L'utilisation de l'ibrutinib a permis de réduire l'activation des plaquettes et de la caspase-1 induite par le plasma de ces patients. Ces résultats laissent supposer une implication de la BTK dans l'activation des plaquettes et de la caspase-1. L'étude de Bye *et al.* a montré que l'ibrutinib inhibait l'activation des plaquettes et la formation de thrombus *in vitro* induit par les IgG anti-spike *via* leurs interactions avec les récepteurs FcγRIIA (Bye *et al.* 2021). D'autres effets potentiellement bénéfiques d'inhibiteurs de la BTK ont été relatés, notamment chez les patients atteints de tumeurs malignes à cellules B traitées par inhibiteurs de la BTK qui semblent développer des formes moins graves de COVID-19 (Treon *et al.* 2020; Roschewski *et al.* 2020).

Nos résultats doivent toutefois être interprétés avec prudence puisque nous avons utilisé l'ibrutinib à une concentration de 5 μM (Levade *et al.* 2014; Kamel *et al.* 2015; Bye *et al.* 2015; Rigg *et al.* 2016). A cette concentration, les kinases Src essentielles à l'activation des plaquettes et agissant en amont de BTK dans la voie de signalisation GPVI pourrait être inhibées.

En conclusion, nous montrons dans cette étude une activation des plaquettes, de la caspase-1 plaquettaire chez les patients atteints de COVID-19 qui est exacerbée dans les cas les plus sévères. Si nos résultats évoquent potentiellement une activation de l'inflammasome NLRP3, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer l'activation de la caspase-1 par l'inflammasome NLRP3 dans les plaquettes des patients atteints de COVID-19.

Nous suggérons un potentiel intérêt thérapeutique de l'utilisation de l'ibrutinib dans les cas de formes sévères de COVID-19 qui permettrait de réduire l'activation plaquettaire et potentiellement en partie la thromboinflammation observée durant cette pathologie. D'autres études sont nécessaires afin d'identifier les voies de signalisation impliquées en amont de la BTK et de la caspase-1. L'exploration des voies GPVI, GPIb et TLR4 semble être une piste intéressante.

En résumé, les plaquettes semblent jouer un rôle important dans les maladies inflammatoires et thrombotiques probablement par leur capacité à libérer des cytokines et à interagir avec d'autres cellules. Les plaquettes activées peuvent induire l'activation des leucocytes, des cellules endothéliales et par conséquent, peuvent amplifier la réponse inflammatoire. Elles permettent également le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium endommagé et enflammé conduisant dans certains cas à l'occlusion des vaisseaux sanguins. Des thérapeutiques ciblant les plaquettes pourraient potentiellement être utilisées dans la drépanocytose et la COVID-19 afin de limiter l'inflammation et les risques de thrombose.

F – Références

- AFDPHE. 2016. « Bilan d'activité ».
- Allali, Slimane, Rachel Rignault-Bricard, Mariane de Montalembert, Melissa Taylor, Tahar Bouceba, Olivier Hermine, et Thiago Trovati Maciel. 2022. « HbS promotes TLR4-mediated monocyte activation and proinflammatory cytokine production in sickle cell disease ». *Blood* 140 (18): 1972-82. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014894>.
- Allison, A. C. 1954. « Protection Afforded by Sickle-Cell Trait against Subtertian Malarial Infection ». *British Medical Journal* 1 (4857): 290-94. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4857.290>.
- Althaus, Karina, Irene Marini, Jan Zlamal, Lisann Pelzl, Anurag Singh, Helene Häberle, Martin Mehrländer, et al. 2021. « Antibody-Induced Procoagulant Platelets in Severe COVID-19 Infection ». *Blood* 137 (8): 1061-71. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008762>.
- Andonegui, Graciela, Steven M. Kerfoot, Kelly McNagny, Kirsten V. J. Ebbert, Kamala D. Patel, et Paul Kubes. 2005. « Platelets Express Functional Toll-like Receptor-4 ». *Blood* 106 (7): 2417-23. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-0916>.
- Andrews, R. K., E. E. Gardiner, Y. Shen, J. C. Whisstock, et M. C. Berndt. 2003. « Glycoprotein Ib-IX-V ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (8): 1170-74. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00280-7).
- Annarapu, Gowtham K., Rashi Singhal, Avinash Gupta, Sheetal Chawla, Harish Batra, Tulika Seth, et Prasenjit Guchhait. 2016. « HbS Binding to GP1b α Activates Platelets in Sickle Cell Disease ». *PloS One* 11 (12): e0167899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167899>.
- Antonucci, R., R. Walker, J. Herion, et E. Orringer. 1990. « Enhancement of Sickle Erythrocyte Adherence to Endothelium by Autologous Platelets ». *American Journal of Hematology* 34 (1): 44-48. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830340110>.
- Arlet, J.-B., P. Bartolucci, A. Habibi, J.-A. Ribeil, K. Stankovic, F. Lionnet, et GREDA. 2009. « [Anemia in adult sickle cell disease] ». *La Revue De Medecine Interne* 30 Suppl 4 (décembre): S319-322. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.09.008>.
- Arman, M., et K. Krauel. 2015. « Human Platelet IgG Fc Receptor Fc γ RIIA in Immunity and Thrombosis ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13 (6): 893-908. <https://doi.org/10.1111/jth.12905>.
- Aschoff, Ludwig. 1893. « Ueber capilläre Embolie von riesenkernhaltigen Zellen ». *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 134 (1): 11-25.
- Ataga, Kenneth I., Charity G. Moore, Susan Jones, Oludamilola Olajide, Dell Strayhorn, Alan Hinderliter, et Eugene P. Orringer. 2006. « Pulmonary Hypertension in Patients with Sickle Cell Disease: A Longitudinal Study ». *British Journal of Haematology* 134 (1): 109-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06110.x>.
- Ataga, K.I., A. Kutlar, J. Kanter, D. Liles, R. Cancado, J. Friedrisch, T.H. Guthrie, et al. 2017. « Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease ». *The New England journal of medicine* 376 (5): 429-39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611770>.
- Badesch, David B., Hunter C. Champion, Miguel Angel Gomez Sanchez, Marius M. Hoeper, James E. Loyd, Alessandra Manes, Michael McGoon, et al. 2009. « Diagnosis and Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Journal of the American College of Cardiology* 54 (1 Suppl): S55-66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.011>.
- Barodka, Viachaslau M., Enika Nagababu, Joy G. Mohanty, Daniel Nyhan, Dan E. Berkowitz, Joseph M. Rifkind, et John J. Strouse. 2014. « New Insights Provided by a Comparison of Impaired Deformability with Erythrocyte Oxidative Stress for Sickle Cell Disease ».

- Blood Cells, Molecules & Diseases* 52 (4): 230-35.
<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.10.004>.
- Bartley, T. D., J. Bogenberger, P. Hunt, Y. S. Li, H. S. Lu, F. Martin, M. S. Chang, B. Samal, J. L. Nichol, et S. Swift. 1994. « Identification and Cloning of a Megakaryocyte Growth and Development Factor That Is a Ligand for the Cytokine Receptor Mpl ». *Cell* 77 (7): 1117-24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90450-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90450-2).
- Battinelli, Elisabeth M. 2020. « COVID-19 concerns aggregate around platelets ». *Blood* 136 (11): 1221-23. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007805>.
- Bauernfeind, Franz, Eva Bartok, Anna Rieger, Luigi Franchi, Gabriel Núñez, et Veit Hornung. 2011. « Reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation of the NLRP3 inflammasome ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (2): 613-17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100613>.
- Bauernfeind, Franz, Gabor Horvath, Andrea Stutz, Emad S. Alnemri, Kelly MacDonald, David Speert, Teresa Fernandes-Alnemri, et al. 2009. « NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (2): 787-91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>.
- Beers, Eduard J. van, Marianne C. L. Schaap, René J. Berckmans, Rienk Nieuwland, Auguste Sturk, Frederiek F. van Doormaal, Joost C. M. Meijers, Bart J. Biemond, et CURAMA study group. 2009. « Circulating Erythrocyte-Derived Microparticles Are Associated with Coagulation Activation in Sick Cell Disease ». *Haematologica* 94 (11): 1513-19. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.008938>.
- Belcher, John D., Chunsheng Chen, Julia Nguyen, Liming Milbauer, Fuad Abdulla, Abdu I. Alayash, Ann Smith, Karl A. Nath, Robert P. Hebbel, et Gregory M. Vercellotti. 2014. « Heme Triggers TLR4 Signaling Leading to Endothelial Cell Activation and Vaso-Occlusion in Murine Sick Cell Disease ». *Blood* 123 (3): 377-90. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-495887>.
- Bennewitz, Margaret F., Maritza A. Jimenez, Ravi Vats, Egemen Tutuncuoglu, Jude Jonassaint, Gregory J. Kato, Mark T. Gladwin, et Prithu Sundd. 2017. « Lung Vaso-Occlusion in Sick Cell Disease Mediated by Arteriolar Neutrophil-Platelet Microemboli ». *JCI Insight* 2 (1): e89761. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89761>.
- Bernaudin, Françoise, Jean-Hugues Dalle, Dominique Bories, Régis Peffault de Latour, Marie Robin, Yves Bertrand, Corinne Pondarre, et al. 2020. « Long-Term Event-Free Survival, Chimerism and Fertility Outcomes in 234 Patients with Sick-Cell Anemia Younger than 30 Years after Myeloablative Conditioning and Matched-Sibling Transplantation in France ». *Haematologica* 105 (1): 91-101. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.213207>.
- Berthaut, Isabelle, Geoffroy Guignédoux, Frédérique Kirsch-Noir, Vanina de Larouzière, Celia Ravel, Dora Bachir, Frédéric Galactéros, et al. 2008. « Influence of Sick Cell Disease and Treatment with Hydroxyurea on Sperm Parameters and Fertility of Human Males ». *Haematologica* 93 (7): 988-93. <https://doi.org/10.3324/haematol.11515>.
- Bertozzi, Cara C., Alec A. Schmaier, Patricia Mericko, Paul R. Hess, Zhiying Zou, Mei Chen, Chiu-Yu Chen, et al. 2010. « Platelets Regulate Lymphatic Vascular Development through CLEC-2-SLP-76 Signaling ». *Blood* 116 (4): 661-70. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270876>.
- Best, Denise, Yotis A. Senis, Gavin E. Jarvis, Helen J. Eagleton, David J. Roberts, Takashi Saito, Stephanie M. Jung, et al. 2003. « GPVI Levels in Platelets: Relationship to Platelet

- Function at High Shear ». *Blood* 102 (8): 2811-18. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0231>.
- Beurling-Harbury, C., et S. G. Schade. 1989. « Platelet Activation during Pain Crisis in Sickle Cell Anemia Patients ». *American Journal of Hematology* 31 (4): 237-41. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830310404>.
- Bevilacqua, M P, J S Pober, M E Wheeler, R S Cotran, et M A Gimbrone. 1985. « Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. » *Journal of Clinical Investigation* 76 (5): 2003-11.
- Beyrouiti, Rahma, Matthew E. Adams, Laura Benjamin, Hannah Cohen, Simon F. Farmer, Yee Yen Goh, Fiona Humphries, et al. 2020. « Characteristics of Ischaemic Stroke Associated with COVID-19 ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 91 (8): 889-91. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323586>.
- Boilard, Eric, Peter A. Nigrovic, Katherine Larabee, Gerald F. M. Watts, Jonathan S. Coblyn, Michael E. Weinblatt, Elena M. Massarotti, et al. 2010. « Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5965): 580-83. <https://doi.org/10.1126/science.1181928>.
- Boilard, Eric, Guillaume Paré, Matthieu Rousseau, Nathalie Cloutier, Isabelle Dubuc, Tania Lévesque, Pierre Borgeat, et Louis Flamand. 2014. « Influenza Virus H1N1 Activates Platelets through FcγRIIA Signaling and Thrombin Generation ». *Blood* 123 (18): 2854-63. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515536>.
- Bonny, V., A. Maillard, C. Mousseaux, L. Plaçais, et Q. Richier. 2020. « COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages ». *La Revue De Medecine Interne* 41 (6): 375-89. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.05.003>.
- Bourne, Joshua H., Martina Colicchia, Ying Di, Eleya Martin, Alexander Slater, Lubka T. Roumenina, Jordan D. Dimitrov, Steve P. Watson, et Julie Rayes. 2020. « Heme Induces Human and Mouse Platelet Activation through C-Type-Lectin-like Receptor-2 ». *Haematologica*, avril. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.246488>.
- Brandão, M. M., A. Fontes, M. L. Barjas-Castro, L. C. Barbosa, F. F. Costa, C. L. Cesar, et S. T. O. Saad. 2003. « Optical Tweezers for Measuring Red Blood Cell Elasticity: Application to the Study of Drug Response in Sickle Cell Disease ». *European Journal of Haematology* 70 (4): 207-11. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2003.00027.x>.
- Breiteneder-Geleff, S., K. Matsui, A. Soleiman, P. Meraner, H. Poczewski, R. Kalt, G. Schaffner, et D. Kerjaschki. 1997. « Podoplanin, Novel 43-Kd Membrane Protein of Glomerular Epithelial Cells, Is down-Regulated in Puromycin Nephrosis ». *The American Journal of Pathology* 151 (4): 1141-52.
- Breiteneder-Geleff, S., A. Soleiman, H. Kowalski, R. Horvat, G. Amann, E. Kriehuber, K. Diem, et al. 1999. « Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries: Podoplanin as a Specific Marker for Lymphatic Endothelium ». *The American Journal of Pathology* 154 (2): 385-94. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65285-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65285-6).
- Briddell, R. A., et R. Hoffman. 1990. « Cytokine Regulation of the Human Burst-Forming Unit-Megakaryocyte ». *Blood* 76 (3): 516-22.
- Bridges, K. R., G. D. Barabino, C. Brugnara, M. R. Cho, G. W. Christoph, G. Dover, B. M. Ewenstein, et al. 1996. « A Multiparameter Analysis of Sickle Erythrocytes in Patients Undergoing Hydroxyurea Therapy ». *Blood* 88 (12): 4701-10.

- Brittain, H. A., J. R. Eckman, R. A. Swerlick, R. J. Howard, et T. M. Wick. 1993. « Thrombospondin from Activated Platelets Promotes Sickle Erythrocyte Adherence to Human Microvascular Endothelium under Physiologic Flow: A Potential Role for Platelet Activation in Sickle Cell Vaso-Occlusion ». *Blood* 81 (8): 2137-43.
- Browne, P. V., D. F. Mosher, M. H. Steinberg, et R. P. Hebbel. 1996. « Disturbance of Plasma and Platelet Thrombospondin Levels in Sickle Cell Disease ». *American Journal of Hematology* 51 (4): 296-301. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8652\(199604\)51:4<296::AID-AJH8>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8652(199604)51:4<296::AID-AJH8>3.0.CO;2-R).
- Bruton, O. C. 1952. « Agammaglobulinemia ». *Pediatrics* 9 (6): 722-28.
- Bunn, H. Franklin. 2013. « The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria ». *Blood* 121 (1): 20-25. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449397>.
- Burger, Dylan, Sarah Schock, Charlie S. Thompson, Augusto C. Montezano, Antoine M. Hakim, et Rhian M. Touyz. 2013. « Microparticles: Biomarkers and Beyond ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 124 (7): 423-41. <https://doi.org/10.1042/CS20120309>.
- Bury, Loredana, Barbara Camilloni, Roberto Castronari, Elisa Piselli, Marco Malvestiti, Mariachiara Borghi, Haripriya KuchiBotla, et al. 2021. « Search for SARS-CoV-2 RNA in Platelets from COVID-19 Patients ». *Platelets* 32 (2): 284-87. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1859104>.
- Bye, Alexander P., Willianne Hoepel, Joanne L. Mitchell, Sophie Jégouic, Silvia Loureiro, Tanya Sage, Gestur Vidarsson, et al. 2021. « Aberrant Glycosylation of Anti-SARS-CoV-2 Spike IgG Is a Prothrombotic Stimulus for Platelets ». *Blood* 138 (16): 1481-89. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011871>.
- Bye, Alexander P., Amanda J. Unsworth, Sakthivel Vaiyapuri, Alexander R. Stainer, Michael J. Fry, et Jonathan M. Gibbins. 2015. « Ibrutinib Inhibits Platelet Integrin $\alpha IIb\beta 3$ Outside-In Signaling and Thrombus Stability But Not Adhesion to Collagen ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35 (11): 2326-35. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306130>.
- Byrd, John C., Peter Hillmen, Paolo Ghia, Arnon P. Kater, Asher Chanan-Khan, Richard R. Furman, Susan O'Brien, et al. 2021. « Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 39 (31): 3441-52. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01210>.
- Campbell, Robert A., Eric Boilard, et Matthew T. Rondina. 2021. « Is There a Role for the ACE2 Receptor in SARS-CoV-2 Interactions with Platelets? ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 19 (1): 46-50. <https://doi.org/10.1111/jth.15156>.
- Cardenes, Nayra, Catherine Corey, Lisa Geary, Shilpa Jain, Sergey Zharikov, Suchitra Barge, Enrico M. Novelli, et Sruti Shiva. 2014. « Platelet Bioenergetic Screen in Sickle Cell Patients Reveals Mitochondrial Complex V Inhibition, Which Contributes to Platelet Activation ». *Blood* 123 (18): 2864-72. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-529420>.
- Carrington, P. A., R. J. Hill, P. E. Stenberg, J. Levin, L. Corash, J. Schreurs, G. Baker, et F. C. Levin. 1991. « Multiple in Vivo Effects of Interleukin-3 and Interleukin-6 on Murine Megakaryocytopoiesis ». *Blood* 77 (1): 34-41.
- Cavazzana-Calvo, Marina, Emmanuel Payen, Olivier Negre, Gary Wang, Kathleen Hehir, Floriane Fusil, Julian Down, et al. 2010. « Transfusion Independence and HMG2 Activation after Gene Therapy of Human β -Thalassaemia ». *Nature* 467 (7313): 318-22. <https://doi.org/10.1038/nature09328>.

- Chang, Y., D. Bluteau, N. Debili, et W. Vainchenker. 2007. « From Hematopoietic Stem Cells to Platelets ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 5 Suppl 1 (juillet): 318-27. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02472.x>.
- Charache, S., G. J. Dover, R. D. Moore, S. Eckert, S. K. Ballas, M. Koshy, P. F. Milner, E. P. Orringer, G. Phillips, et O. S. Platt. 1992. « Hydroxyurea: Effects on Hemoglobin F Production in Patients with Sickle Cell Anemia ». *Blood* 79 (10): 2555-65.
- Charache, S., M. L. Terrin, R. D. Moore, G. J. Dover, F. B. Barton, S. V. Eckert, R. P. McMahon, et D. R. Bonds. 1995. « Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia ». *The New England Journal of Medicine* 332 (20): 1317-22. <https://doi.org/10.1056/NEJM199505183322001>.
- Chi, Wei, Hongrui Chen, Fei Li, Yingting Zhu, Wei Yin, et Yehong Zhuo. 2015. « HMGB1 promotes the activation of NLRP3 and caspase-8 inflammasomes via NF- κ B pathway in acute glaucoma ». *Journal of Neuroinflammation* 12 (juillet): 137. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0360-2>.
- Chiu, D., B. Lubin, B. Roelofsen, et L. L. van Deenen. 1981. « Sickled Erythrocytes Accelerate Clotting In Vitro: An Effect of Abnormal Membrane Lipid Asymmetry ». *Blood* 58 (2): 398-401.
- Clark, Stephen R., Adrienne C. Ma, Samantha A. Tavener, Braedon McDonald, Zahra Goodarzi, Margaret M. Kelly, Kamala D. Patel, et al. 2007. « Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps to Ensnare Bacteria in Septic Blood ». *Nature Medicine* 13 (4): 463-69. <https://doi.org/10.1038/nm1565>.
- Cognasse, Fabrice, Kim Anh Nguyen, Pauline Damien, Archibald McNicol, Bruno Pozzetto, Hind Hamzeh-Cognasse, et Olivier Garraud. 2015. « The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors ». *Frontiers in Immunology* 6: 83. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00083>.
- Cokic, Vladan P., Reginald D. Smith, Bojana B. Beleslin-Cokic, Joyce M. Njoroge, Jeffery L. Miller, Mark T. Gladwin, et Alan N. Schechter. 2003. « Hydroxyurea Induces Fetal Hemoglobin by the Nitric Oxide-Dependent Activation of Soluble Guanylyl Cyclase ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (2): 231-39. <https://doi.org/10.1172/JCI16672>.
- Conran, Nicola, et John D. Belcher. 2018. « Inflammation in Sickle Cell Disease ». *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 68 (2-3): 263-99. <https://doi.org/10.3233/CH-189012>.
- Conran, Nicola, et Erich V. De Paula. 2020. « Thromboinflammatory Mechanisms in Sickle Cell Disease - Challenging the Hemostatic Balance ». *Haematologica* 105 (10): 2380-90. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.239343>.
- Cook, Jerome E., et Jerome Meyer. 1915. « SEVERE ANEMIA WITH REMARKABLE ELONGATED AND SICKLE-SHAPED RED BLOOD CELLS AND CHRONIC LEG ULCER ». *Archives of Internal Medicine* XVI (4): 644-51. <https://doi.org/10.1001/archinte.1915.00080040140009>.
- Cornelius, Denise C., Cedar H. Baik, Olivia K. Travis, Dakota L. White, Cassandra M. Young, W. Austin Pierce, Corbin A. Shields, Bibek Poudel, et Jan M. Williams. 2019. « NLRP3 Inflammasome Activation in Platelets in Response to Sepsis ». *Physiological Reports* 7 (9): e14073. <https://doi.org/10.14814/phy2.14073>.
- Coughlin, S. R. 2000. « Thrombin Signalling and Protease-Activated Receptors ». *Nature* 407 (6801): 258-64. <https://doi.org/10.1038/35025229>.

- Cramer-Bordé, E. 2008. « Production plaquettaire : régulation cellulaire et moléculaire ». [//www.em-premium.com/data/traites/sa/13-42129/](http://www.em-premium.com/data/traites/sa/13-42129/), février. <https://www-em-premium-com.bu-services.univ-antilles.fr/article/78417/resultatrecherche/1>.
- Damm, Anna, Katja Lautz, et Thomas A. Kufer. 2013. « Roles of NLRP10 in Innate and Adaptive Immunity ». *Microbes and Infection* 15 (6-7): 516-23. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.03.008>.
- Davila, Jennifer, Deepa Manwani, Ljiljana Vasovic, Mauro Avanzi, Joan Uehlinger, Karen Ireland, et W. Beau Mitchell. 2015. « A Novel Inflammatory Role for Platelets in Sick Cell Disease ». *Platelets* 26 (8): 726-29. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.983891>.
- Debili, N., J. M. Massé, A. Katz, J. Guichard, J. Breton-Gorius, et W. Vainchenker. 1993. « Effects of the Recombinant Hematopoietic Growth Factors Interleukin-3, Interleukin-6, Stem Cell Factor, and Leukemia Inhibitory Factor on the Megakaryocytic Differentiation of CD34+ Cells ». *Blood* 82 (1): 84-95.
- DeJong, Kitty, Annabeth M. Miller, Renee K. Emerson, et Frans A. Kuypers. 2006. « High Calcium Requirement for Phosphatidylserine Exposure in Sick Cell Disease. » *Blood* 108 (11): 3788. <https://doi.org/10.1182/blood.V108.11.3788.3788>.
- Delaney, M. Keegan, Junling Liu, Yi Zheng, Michael C. Berndt, et Xiaoping Du. 2012. « A Role for Rac1 in Glycoprotein Ib-IX-mediated Signal Transduction and Integrin Activation ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32 (11): 2761-68. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.254920>.
- Denis, Melvin M., Neal D. Tolley, Michaeline Bunting, Hansjörg Schwertz, Huimiao Jiang, Stephan Lindemann, Christian C. Yost, et al. 2005. « Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets ». *Cell* 122 (3): 379-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.015>.
- Deuel, T. F., R. M. Senior, D. Chang, G. L. Griffin, R. L. Heinrikson, et E. T. Kaiser. 1981. « Platelet Factor 4 Is Chemotactic for Neutrophils and Monocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (7): 4584-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4584>.
- Deutsch, Varda R., et Aaron Tomer. 2006. « Megakaryocyte Development and Platelet Production ». *British Journal of Haematology* 134 (5): 453-66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06215.x>.
- Dinareello, C. A. 1996. « Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease ». *Blood* 87 (6): 2095-2147.
- Dominical, Venina M., Leigh Samsel, James S. Nichols, Fernando F. Costa, J. Phillip McCoy, Nicola Conran, et Gregory J. Kato. 2014. « Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia ». *Haematologica* 99 (11): e214-17. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.108555>.
- Dostert, Catherine, Virginie Pétrilli, Robin Van Bruggen, Chad Steele, Brooke T Mossman, et Jürg Tschopp. 2008. « Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica ». *Science (New York, N.Y.)* 320 (5876): 674-77. <https://doi.org/10.1126/science.1156995>.
- Doyle, Sarah L., Caroline A. Jefferies, Con Feighery, et Luke A. J. O'Neill. 2007. « Signaling by Toll-like Receptors 8 and 9 Requires Bruton's Tyrosine Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (51): 36953-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707682200>.
- Duewell, Peter, Hajime Kono, Katey J. Rayner, Cherilyn M. Sirois, Gregory Vladimer, Franz G. Bauernfeind, George S. Abela, et al. 2010. « NLRP3 Inflammasomes Are Required for Atherogenesis and Activated by Cholesterol Crystals ». *Nature* 464 (7293): 1357-61. <https://doi.org/10.1038/nature08938>.

- Dufu, Kobina, Mira Patel, Donna Oksenberg, et Pedro Cabrales. 2018. « GBT440 Improves Red Blood Cell Deformability and Reduces Viscosity of Sick Cell Blood under Deoxygenated Conditions ». *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 70 (1): 95-105. <https://doi.org/10.3233/CH-170340>.
- Dutra, Fabiano F., Letícia S. Alves, Danielle Rodrigues, Patricia L. Fernandez, Rosane B. de Oliveira, Douglas T. Golenbock, Dario S. Zamboni, et Marcelo T. Bozza. 2014. « Hemolysis-Induced Lethality Involves Inflammasome Activation by Heme ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (39): E4110-4118. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405023111>.
- Eisenbarth, Stephanie C., Oscar R. Colegio, William O'Connor, Fayyaz S. Sutterwala, et Richard A. Flavell. 2008. « Crucial Role for the Nalp3 Inflammasome in the Immunostimulatory Properties of Aluminium Adjuvants ». *Nature* 453 (7198): 1122-26. <https://doi.org/10.1038/nature06939>.
- Erickson-Miller, C. L., H. Ji, et M. J. Murphy. 1993. « Megakaryocytopoiesis and Platelet Production: Does Stem Cell Factor Play a Role? » *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 11 Suppl 2 (juillet): 163-69. <https://doi.org/10.1002/stem.5530110826>.
- Estevez, Brian, et Xiaoping Du. 2017. « New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 32 (2): 162-77. <https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2016>.
- Estevez, Brian, Aleksandra Stojanovic-Terpo, M. Keegan Delaney, Kelly A. O'Brien, Michael C. Berndt, Changgeng Ruan, et Xiaoping Du. 2013. « LIM kinase-1 selectively promotes glycoprotein Ib-IX-mediated TXA2 synthesis, platelet activation, and thrombosis ». *Blood* 121 (22): 4586-94. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-470765>.
- Fadlon, E., S. Vordermeier, T. C. Pearson, A. R. Mire-Sluis, D. C. Dumonde, J. Phillips, K. Fishlock, et K. A. Brown. 1998. « Blood Polymorphonuclear Leukocytes from the Majority of Sick Cell Patients in the Crisis Phase of the Disease Show Enhanced Adhesion to Vascular Endothelium and Increased Expression of CD64 ». *Blood* 91 (1): 266-74.
- Fadok, V. A., null de Cathelineau A, D. L. Daleke, P. M. Henson, et D. L. Bratton. 2001. « Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2): 1071-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003649200>.
- Fan, Yi, Kai Zhao, Zheng-Li Shi, et Peng Zhou. 2019. « Bat Coronaviruses in China ». *Viruses* 11 (3): 210. <https://doi.org/10.3390/v11030210>.
- Farashi, Samaneh, et Cornelis L. Harteveld. 2018. « Molecular Basis of α -Thalassemia ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, SI: Globins, 70 (mai): 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.09.004>.
- Ferrari, Davide, Cinzia Pizzirani, Elena Adinolfi, Roberto M. Lemoli, Antonio Curti, Marco Idzko, Elisabeth Panther, et Francesco Di Virgilio. 2006. « The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (7): 3877-83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.3877>.
- Flaumenhaft, Robert, James R. Dilks, Nataliya Rozenvayn, Rita A. Monahan-Earley, Dian Feng, et Ann M. Dvorak. 2005. « The Actin Cytoskeleton Differentially Regulates Platelet Alpha-Granule and Dense-Granule Secretion ». *Blood* 105 (10): 3879-87. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1392>.
- Florindo, Helena F., Ron Kleiner, Daniella Vaskovich-Koubi, Rita C. Acúrcio, Barbara Carreira, Eilam Yeini, Galia Tiram, Yulia Liubomirski, et Ronit Satchi-Fainaro. 2020. « Immune-

- Mediated Approaches against COVID-19 ». *Nature Nanotechnology* 15 (8): 630-45. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0732-3>.
- Frelinger, Andrew L., Joseph A. Jakubowski, Julie K. Brooks, Sabrina L. Carmichael, Michelle A. Berny-Lang, Marc R. Barnard, Matthew M. Heeney, et Alan D. Michelson. 2014. « Platelet Activation and Inhibition in Sick Cell Disease (Pains) Study ». *Platelets* 25 (1): 27-35. <https://doi.org/10.3109/09537104.2013.770136>.
- French, Shauna L., et Justin R. Hamilton. 2016. « Protease-Activated Receptor 4: From Structure to Function and Back Again ». *British Journal of Pharmacology* 173 (20): 2952-65. <https://doi.org/10.1111/bph.13455>.
- Frenette, P. S., C. V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J. H. Hartwig, D. Vestweber, et D. D. Wagner. 2000. « P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 191 (8): 1413-22. <https://doi.org/10.1084/jem.191.8.1413>.
- Frenette, Paul S., et George F. Atweh. 2007. « Sick Cell Disease: Old Discoveries, New Concepts, and Future Promise ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (4): 850-58. <https://doi.org/10.1172/JCI30920>.
- Friedman, M. J. 1978. « Erythrocytic Mechanism of Sick Cell Resistance to Malaria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (4): 1994-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.4.1994>.
- . 1979. « Oxidant Damage Mediates Variant Red Cell Resistance to Malaria ». *Nature* 280 (5719): 245-47. <https://doi.org/10.1038/280245a0>.
- Gachet, C., M. Cattaneo, P. Ohlmann, B. Hechler, A. Lecchi, J. Chevalier, D. Cassel, P. M. Mannucci, et J. P. Cazenave. 1995. « Purinoceptors on Blood Platelets: Further Pharmacological and Clinical Evidence to Suggest the Presence of Two ADP Receptors ». *British Journal of Haematology* 91 (2): 434-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05319.x>.
- Gachet, Christian. 2013. « [Molecular mechanisms of platelet activation] ». *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine* 197 (2): 361-73.
- Garnier, Yohann, Livia Claude, Patricia Hermand, Evely Sachou, Aurélie Claes, Kassandra Desplan, Bassel Chahim, et al. 2022. « Plasma Microparticles of Intubated COVID-19 Patients Cause Endothelial Cell Death, Neutrophil Adhesion and Netosis, in a Phosphatidylserine-Dependent Manner ». *British Journal of Haematology* 196 (5): 1159-69. <https://doi.org/10.1111/bjh.18019>.
- Garnier, Yohann, Séverine Ferdinand, Maryse Etienne-Julan, Gisèle Elana, Marie Petras, Lydia Doumido, Benoit Tressières, et al. 2017. « Differences of Microparticle Patterns between Sick Cell Anemia and Hemoglobin SC Patients ». *PloS One* 12 (5): e0177397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177397>.
- Garnier, Yohann, Séverine Ferdinand, Marie Garnier, Kizzy-Clara Cita, Régine Hierso, Aurélie Claes, Philippe Connes, et al. 2020. « Plasma Microparticles of Sick Patients during Crisis or Taking Hydroxyurea Modify Endothelium Inflammatory Properties ». *Blood*, avril. <https://doi.org/10.1182/blood.2020004853>.
- Gay, Laurie J., et Brunhilde Felding-Habermann. 2011. « Contribution of Platelets to Tumor Metastasis ». *Nature reviews. Cancer* 11 (2): 123-34. <https://doi.org/10.1038/nrc3004>.
- Geddis, Amy E., Norma E. Fox, Eugene Tkachenko, et Kenneth Kaushansky. 2007. « Endomitotic Megakaryocytes That Form a Bipolar Spindle Exhibit Cleavage Furrow

- Ingression Followed by Furrow Regression ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (4): 455-60. <https://doi.org/10.4161/cc.6.4.3836>.
- Gee, B. E., et O. S. Platt. 1995. « Sickie Reticulocytes Adhere to VCAM-1 ». *Blood* 85 (1): 268-74.
- George, James N. 2000. « Platelets ». *The Lancet* 355 (9214): 1531-39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02175-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02175-9).
- Ghosh, Samit, Olufolake Adetoro Adisa, Prasanthi Chappa, Fang Tan, Kesmic Ann Jackson, David Robert Archer, et Solomon Fiifi Ofori-Acquah. 2013. « Extracellular Hemin Crisis Triggers Acute Chest Syndrome in Sickie Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (11): 4809-20. <https://doi.org/10.1172/JCI64578>.
- Gicquel, Thomas, Tatiana Victoni, Alain Fautrel, Sacha Robert, Florence Gleonnec, Marie Guezingar, Isabelle Couillin, Véronique Catros, Elisabeth Boichot, et Vincent Lagente. 2014. « Involvement of Purinergic Receptors and NOD-like Receptor-Family Protein 3-Inflammasome Pathway in the Adenosine Triphosphate-Induced Cytokine Release from Macrophages ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 41 (4): 279-86. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12214>.
- Gitz, Eelo, Alice Y. Pollitt, Jerney J. Gitz-Francois, Osama Alshehri, Jun Mori, Samantha Montague, Gerard B. Nash, et al. 2014. « CLEC-2 Expression Is Maintained on Activated Platelets and on Platelet Microparticles ». *Blood* 124 (14): 2262-70. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-572818>.
- Gladwin, Mark T., et Solomon F. Ofori-Acquah. 2014. « Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD ». *Blood* 123 (24): 3689-90. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-563874>.
- Gladwin, Mark T., Vandana Sachdev, Maria L. Jison, Yukitaka Shizukuda, Jonathan F. Plehn, Karin Minter, Bernice Brown, et al. 2004. « Pulmonary Hypertension as a Risk Factor for Death in Patients with Sickie Cell Disease ». *The New England Journal of Medicine* 350 (9): 886-95. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035477>.
- Gladwin, Mark T., et Elliott Vichinsky. 2008. « Pulmonary Complications of Sickie Cell Disease ». *The New England Journal of Medicine* 359 (21): 2254-65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804411>.
- Gorbalenya, Alexander E., Susan C. Baker, Ralph S. Baric, Raoul J. de Groot, Christian Drosten, Anastasia A. Gulyaeva, Bart L. Haagmans, et al. 2020. « The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-NCoV and Naming It SARS-CoV-2 ». *Nature Microbiology* 5 (4): 536-44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Gordeuk, Victor R., Oswaldo L. Castro, et Roberto F. Machado. 2016. « Pathophysiology and Treatment of Pulmonary Hypertension in Sickie Cell Disease ». *Blood* 127 (7): 820-28. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-618561>.
- Gordon, David E., Gwendolyn M. Jang, Mehdi Bouhaddou, Jiewei Xu, Kirsten Obernier, Kris M. White, Matthew J. O'Meara, et al. 2020. « A SARS-CoV-2 Protein Interaction Map Reveals Targets for Drug Repurposing ». *Nature* 583 (7816): 459-68. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>.
- Gordon, E. M., B. L. Klein, B. W. Berman, S. E. Strandjord, J. E. Simon, et P. F. Coccia. 1985. « Reduction of Contact Factors in Sickie Cell Disease ». *The Journal of Pediatrics* 106 (3): 427-30. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(85\)80669-7](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(85)80669-7).
- Goshua, George, Alexander B. Pine, Matthew L. Meizlish, C.-Hong Chang, Hanming Zhang, Parveen Bahel, Audrey Baluha, et al. 2020. « Endotheliopathy in COVID-19-Associated

- Coagulopathy: Evidence from a Single-Centre, Cross-Sectional Study ». *The Lancet. Haematology* 7 (8): e575-82. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30216-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30216-7).
- Groslambert, Marine, et Bénédicte F. Py. 2018. « Spotlight on the NLRP3 Inflammasome Pathway ». *Journal of Inflammation Research* 11: 359-74. <https://doi.org/10.2147/JIR.S141220>.
- Gu, Sean X., Tarun Tyagi, Kanika Jain, Vivian W. Gu, Seung Hee Lee, Jonathan M. Hwa, Jennifer M. Kwan, *et al.* 2021. « Thrombocytopathy and Endotheliopathy: Crucial Contributors to COVID-19 Thromboinflammation ». *Nature Reviews. Cardiology* 18 (3): 194-209. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-00469-1>.
- Guan, Wei-jie, Zheng-yi Ni, Yu Hu, Wen-hua Liang, Chun-quan Ou, Jian-xing He, Lei Liu, *et al.* 2020. « Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China ». *New England Journal of Medicine* 382 (18): 1708-20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>.
- Guervilly, Christophe, Stephane Burtey, Florence Sabatier, Raphaël Cauchois, Guillaume Lano, Evelyne Abdili, Florence Daviet, *et al.* 2020. « Circulating Endothelial Cells as a Marker of Endothelial Injury in Severe COVID -19 ». *The Journal of Infectious Diseases* 222 (11): 1789-93. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa528>.
- Hahn, E. Vernon, et Elizabeth Bierman Gillespie. 1927. « Sick cell anemia: report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sick cell formation ». *Archives of Internal Medicine* 39 (2): 233-54. <https://doi.org/10.1001/archinte.1927.00130020072006>.
- Halle, Annett, Veit Hornung, Gabor C. Petzold, Cameron R. Stewart, Brian G. Monks, Thomas Reinheckel, Katherine A. Fitzgerald, Eicke Latz, Kathryn J. Moore, et Douglas T. Golenbock. 2008. « The NALP3 Inflammasome Is Involved in the Innate Immune Response to Amyloid-Beta ». *Nature Immunology* 9 (8): 857-65. <https://doi.org/10.1038/ni.1636>.
- Hally, Kathryn, Sebastien Fauteux-Daniel, Hind Hamzeh-Cognasse, Peter Larsen, et Fabrice Cognasse. 2020. « Revisiting Platelets and Toll-Like Receptors (TLRs): At the Interface of Vascular Immunity and Thrombosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (17): E6150. <https://doi.org/10.3390/ijms21176150>.
- Hamming, I., W. Timens, M. L. C. Bulthuis, A. T. Lely, G. J. Navis, et H. van Goor. 2004. « Tissue Distribution of ACE2 Protein, the Functional Receptor for SARS Coronavirus. A First Step in Understanding SARS Pathogenesis ». *The Journal of Pathology* 203 (2): 631-37. <https://doi.org/10.1002/path.1570>.
- Han, Jin, Santosh L. Saraf, et Victor R. Gordeuk. 2020. « Systematic Review of Crizanlizumab: A New Parenteral Option to Reduce Vaso-Occlusive Pain Crises in Patients with Sickle Cell Disease ». *Pharmacotherapy* 40 (6): 535-43. <https://doi.org/10.1002/phar.2409>.
- Hankins, Jane S., Russell E. Ware, Zora R. Rogers, Lynn W. Wynn, Peter A. Lane, J. Paul Scott, et Winfred C. Wang. 2005. « Long-Term Hydroxyurea Therapy for Infants with Sickle Cell Anemia: The HUSOFT Extension Study ». *Blood* 106 (7): 2269-75. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4973>.
- Hannemann, A., D. C. Rees, S. Tewari, et J. S. Gibson. 2015. « Cation Homeostasis in Red Cells From Patients With Sickle Cell Disease Heterologous for HbS and HbC (HbSC Genotype) ». *EBioMedicine* 2 (11): 1669-76. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.026>.
- Harrison, Andrew G., Tao Lin, et Penghua Wang. 2020. « Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis ». *Trends in Immunology* 41 (12): 1100-1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.

- Harrison, Paul. 2005. « Platelet Function Analysis ». *Blood Reviews* 19 (2): 111-23.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.05.002>.
- Haupt, H. M., G. W. Moore, T. W. Bauer, et G. M. Hutchins. 1982. « The Lung in Sickle Cell Disease ». *Chest* 81 (3): 332-37. <https://doi.org/10.1378/chest.81.3.332>.
- Hawker, H., H. Neilson, R. J. Hayes, et G. R. Serjeant. 1982. « Haematological Factors Associated with Avascular Necrosis of the Femoral Head in Homozygous Sickle Cell Disease ». *British Journal of Haematology* 50 (1): 29-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1982.tb01887.x>.
- He, Yuan, Hideki Hara, et Gabriel Núñez. 2016. « Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation ». *Trends in Biochemical Sciences* 41 (12): 1012-21.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>.
- He, Yuxian, Yusen Zhou, Shuwen Liu, Zhihua Kou, Wenhui Li, Michael Farzan, et Shibo Jiang. 2004. « Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 (2): 773-81.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.106>.
- Hebbel, R. P., et W. J. Miller. 1984. « Phagocytosis of Sick Erythrocytes: Immunologic and Oxidative Determinants of Hemolytic Anemia ». *Blood* 64 (3): 733-41.
- Hebbel, R. P., et G. M. Vercellotti. 1997. « The Endothelial Biology of Sick Cell Disease ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 129 (3): 288-93.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2143\(97\)90176-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2143(97)90176-1).
- Hebbel, R. P., M. R. Visser, J. L. Goodman, H. S. Jacob, et G. M. Vercellotti. 1987. « Potentiated Adherence of Sick Erythrocytes to Endothelium Infected by Virus ». *The Journal of Clinical Investigation* 80 (5): 1503-6. <https://doi.org/10.1172/JCI113233>.
- Hebbel, R. P., O. Yamada, C. F. Moldow, H. S. Jacob, J. G. White, et J. W. Eaton. 1980. « Abnormal Adherence of Sick Erythrocytes to Cultured Vascular Endothelium: Possible Mechanism for Microvascular Occlusion in Sick Cell Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 65 (1): 154-60. <https://doi.org/10.1172/JCI109646>.
- Hebbel, Robert P., et Nigel S. Key. 2016. « Microparticles in Sick Cell Anaemia: Promise and Pitfalls ». *British Journal of Haematology* 174 (1): 16-29.
<https://doi.org/10.1111/bjh.14112>.
- Heeney, Matthew M., Carolyn C. Hoppe, Miguel R. Abboud, Baba Inusa, Julie Kanter, Bernhards Ogutu, Patricia B. Brown, et al. 2016. « A Multinational Trial of Prasugrel for Sick Cell Vaso-Occlusive Events ». *The New England Journal of Medicine* 374 (7): 625-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512021>.
- Heid, Michelle E., Peter A. Keyel, Christelle Kamga, Sruti Shiva, Simon C. Watkins, et Russell D. Salter. 2013. « Mitochondrial ROS induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (10): 10.4049/jimmunol.1301490. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301490>.
- Heijnen, H., et P. van der Sluijs. 2015. « Platelet Secretory Behaviour: As Diverse as the Granules ... or Not? » *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 13 (12): 2141-51.
<https://doi.org/10.1111/jth.13147>.
- Hendriks, Rudi W., Saravanan Yuvaraj, et Laurens P. Kil. 2014. « Targeting Bruton's Tyrosine Kinase in B Cell Malignancies ». *Nature Reviews. Cancer* 14 (4): 219-32.
<https://doi.org/10.1038/nrc3702>.

- Henn, V., J. R. Slupsky, M. Gräfe, I. Anagnostopoulos, R. Förster, G. Müller-Berghaus, et R. A. Kroczeck. 1998. « CD40 Ligand on Activated Platelets Triggers an Inflammatory Reaction of Endothelial Cells ». *Nature* 391 (6667): 591-94. <https://doi.org/10.1038/35393>.
- Hernand, Patricia, Pierre Gane, Martine Huet, Vincent Jallu, Cécile Kaplan, H. H. Sonneborn, Jean-Pierre Cartron, et Pascal Bailly. 2003. « Red Cell ICAM-4 Is a Novel Ligand for Platelet-Activated Alpha IIb beta 3 Integrin ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 4892-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211282200>.
- Herrick, James B. 1910. « Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia ». *Archives of Internal Medicine* VI (5): 517-21. <https://doi.org/10.1001/archinte.1910.00050330050003>.
- Hierso, Régine, Nathalie Lemonne, Rinaldo Villaescusa, Marie-Laure Lalanne-Mistrih, Keyne Charlot, Maryse Etienne-Julan, Benoit Tressières, et al. 2017. « Exacerbation of Oxidative Stress during Sick Vaso-Occlusive Crisis Is Associated with Decreased Anti-Band 3 Autoantibodies Rate and Increased Red Blood Cell-Derived Microparticle Level: A Prospective Study ». *British Journal of Haematology* 176 (5): 805-13. <https://doi.org/10.1111/bjh.14476>.
- Hoban, Megan D, Dianne Lumaquin, Caroline Y Kuo, Zulema Romero, Joseph Long, Michelle Ho, Courtney S Young, et al. 2016. « CRISPR/Cas9-Mediated Correction of the Sick Mutation in Human CD34+ cells ». *Molecular Therapy* 24 (9): 1561-69. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.148>.
- Hoffmann, Markus, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S. Schiergens, et al. 2020. « SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor ». *Cell* 181 (2): 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
- Hofstra, T. C., V. K. Kalra, H. J. Meiselman, et T. D. Coates. 1996. « Sick Erythrocytes Adhere to Polymorphonuclear Neutrophils and Activate the Neutrophil Respiratory Burst ». *Blood* 87 (10): 4440-47.
- Hoover, R., R. Rubin, G. Wise, et R. Warren. 1979. « Adhesion of Normal and Sick Erythrocytes to Endothelial Monolayer Cultures ». *Blood* 54 (4): 872-76.
- Hornung, Veit, Franz Bauernfeind, Annett Halle, Eivind O. Samstad, Hajime Kono, Kenneth L. Rock, Katherine A. Fitzgerald, et Eicke Latz. 2008. « Silica Crystals and Aluminum Salts Activate the NALP3 Inflammasome through Phagosomal Destabilization ». *Nature Immunology* 9 (8): 847-56. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>.
- Horwood, Nicole J., Theresa H. Page, John P. McDaid, Christine D. Palmer, Jamie Campbell, Tara Mahon, Fionula M. Brennan, David Webster, et Brian M. J. Foxwell. 2006. « Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for TLR2 and TLR4-Induced TNF, but Not IL-6, Production ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (6): 3635-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3635>.
- Hottz, Eugenio D., Isaclaudia G. Azevedo-Quintanilha, Lohanna Palhinha, Livia Teixeira, Ester A. Barreto, Camila R. R. Pão, Cassia Righy, et al. 2020. « Platelet Activation and Platelet-Monocyte Aggregate Formation Trigger Tissue Factor Expression in Patients with Severe COVID-19 ». *Blood* 136 (11): 1330-41. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007252>.
- Hottz, Eugenio D., Juliana F. Lopes, Carla Freitas, Rogério Valls-de-Souza, Marcus F. Oliveira, Marcelo T. Bozza, Andrea T. Da Poian, et al. 2013. « Platelets Mediate Increased Endothelium Permeability in Dengue through NLRP3-Inflammasome Activation ». *Blood* 122 (20): 3405-14. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-504449>.

- Hottz, Eugenio D., Isabel M. Medeiros-de-Moraes, Adriana Vieira-de-Abreu, Edson F. de Assis, Rogério Vals-de-Souza, Hugo C. Castro-Faria-Neto, Andrew S. Weyrich, Guy A. Zimmerman, Fernando A. Bozza, et Patrícia T. Bozza. 2014. « Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (4): 1864-72. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400091>.
- Hottz, Eugenio D., Marcus F. Oliveira, Priscila C. G. Nunes, Rita Maria R. Nogueira, Rogério Valls-de-Souza, Andréa T. Da Poian, Andrew S. Weyrich, Guy A. Zimmerman, Patricia T. Bozza, et Fernando A. Bozza. 2013. « Dengue Induces Platelet Activation, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death through Mechanisms that Involve DC-SIGN and Caspases ». *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 11 (5): 951-62. <https://doi.org/10.1111/jth.12178>.
- Huang, Chaolin, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu, Li Zhang, et al. 2020. « Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China ». *Lancet (London, England)* 395 (10223): 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
- Hugel, Bénédicte, M. Carmen Martínez, Corinne Kunzelmann, et Jean-Marie Freyssinet. 2005. « Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 20 (février): 22-27. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2004>.
- Hughes, Craig E., Alice Y. Pollitt, Jun Mori, Johannes A. Eble, Michael G. Tomlinson, John H. Hartwig, Christopher A. O'Callaghan, Klaus Fütterer, et Steve P. Watson. 2010. « CLEC-2 activates Syk through dimerization ». *Blood* 115 (14): 2947-55. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237834>.
- Hundelshausen, Philipp von, Rory R. Koenen, Markus Sack, Sebastian F. Mause, Wencke Adriaens, Amanda E. I. Proudfoot, Tilman M. Hackeng, et Christian Weber. 2005. « Heterophilic Interactions of Platelet Factor 4 and RANTES Promote Monocyte Arrest on Endothelium ». *Blood* 105 (3): 924-30. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2475>.
- Huo, Yuqing, et Klaus F Ley. 2004. « Role of Platelets in the Development of Atherosclerosis ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 14 (1): 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2003.09.007>.
- Idzko, Marco, Simon Pitchford, et Clive Page. 2015. « Role of Platelets in Allergic Airway Inflammation ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (6): 1416-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.028>.
- Imai, T., et T. Nakahata. 1994. « Stem Cell Factor Promotes Proliferation of Human Primitive Megakaryocytic Progenitors, but Not Megakaryocytic Maturation ». *International Journal of Hematology* 59 (2): 91-98.
- Induruwa, Isuru, Stephanie M. Jung, et Elizabeth A. Warburton. 2016. « Beyond Antiplatelets: The Role of Glycoprotein VI in Ischemic Stroke ». *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society* 11 (6): 618-25. <https://doi.org/10.1177/1747493016654532>.
- Ingram, V. M. 1957. « Gene Mutations in Human Haemoglobin: The Chemical Difference between Normal and Sickle Cell Haemoglobin ». *Nature* 180 (4581): 326-28. <https://doi.org/10.1038/180326a0>.
- « International Committee on Taxonomy of Viruses ». s. d. Consulté le 6 novembre 2022. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101847.
- Inwald, D. P., F. J. Kirkham, M. J. Peters, R. Lane, A. Wade, J. P. Evans, et N. J. Klein. 2000. « Platelet and Leucocyte Activation in Childhood Sick Cell Disease: Association with

- Nocturnal Hypoxaemia ». *British Journal of Haematology* 111 (2): 474-81.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02353.x>.
- Ishibashi, T., H. Kimura, T. Uchida, S. Kariyone, P. Friese, et S. A. Burstein. 1989. « Human Interleukin 6 Is a Direct Promoter of Maturation of Megakaryocytes in Vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (15): 5953-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5953>.
- Italiano, Joseph E., et John H. Hartwig. 2013. « Chapter 2 - Megakaryocyte Development and Platelet Formation ». In *Platelets (Third Edition)*, édité par Alan D. Michelson, 27-49. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387837-3.00002-X>.
- Italiano, Joseph E., Patrick Lecine, Ramesh A. Shivdasani, et John H. Hartwig. 1999. « Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes ». *The Journal of Cell Biology* 147 (6): 1299-1312.
- Ito, Minako, Takashi Shichita, Masahiro Okada, Ritsuko Komine, Yoshiko Noguchi, Akihiko Yoshimura, et Rimpei Morita. 2015. « Bruton's Tyrosine Kinase Is Essential for NLRP3 Inflammasome Activation and Contributes to Ischaemic Brain Injury ». *Nature Communications* 6 (juin): 7360. <https://doi.org/10.1038/ncomms8360>.
- Ivanov, Ivelin I., Bonita H. R. Apta, Arkadiusz M. Bonna, et Matthew T. Harper. 2019. « Platelet P-Selectin Triggers Rapid Surface Exposure of Tissue Factor in Monocytes ». *Scientific Reports* 9 (1): 13397. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49635-7>.
- Iwasaki, Akiko, et Ruslan Medzhitov. 2004. « Toll-like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses ». *Nature Immunology* 5 (10): 987-95. <https://doi.org/10.1038/ni1112>.
- Jackson, Shaun P. 2011. « Arterial Thrombosis--Insidious, Unpredictable and Deadly ». *Nature Medicine* 17 (11): 1423-36. <https://doi.org/10.1038/nm.2515>.
- Jakubowski, Joseph A., Kenneth J. Winters, Hideo Naganuma, et Lars Wallentin. 2007. « Prasugrel: A Novel Thienopyridine Antiplatelet Agent. A Review of Preclinical and Clinical Studies and the Mechanistic Basis for Its Distinct Antiplatelet Profile ». *Cardiovascular Drug Reviews* 25 (4): 357-74. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2007.00027.x>.
- Jakubowski, Joseph A., Chunmei Zhou, David S. Small, Kenneth J. Winters, D. Richard Lachno, Andrew L. Frelinger, Jo Howard, Timothy G. Mant, Stipo Jurcevic, et Christopher D. Payne. 2013. « A Phase 1 Study of Prasugrel in Patients with Sickle Cell Disease: Pharmacokinetics and Effects on Ex Vivo Platelet Reactivity ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 75 (6): 1433-44. <https://doi.org/10.1111/bcp.12042>.
- Jakubowski, Joseph A., Chunmei Zhou, Kenneth J. Winters, D. Richard Lachno, Jo Howard, Christopher D. Payne, Timothy Mant, Stipo Jurcevic, et Andrew L. Frelinger. 2015. « The Effect of Prasugrel on ADP-Stimulated Markers of Platelet Activation in Patients with Sickle Cell Disease ». *Platelets* 26 (5): 474-79. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.940887>.
- Jandrot-Perrus, M., S. Busfield, A. H. Lagrue, X. Xiong, N. Debili, T. Chickering, J. P. Le Couedic, et al. 2000. « Cloning, Characterization, and Functional Studies of Human and Mouse Glycoprotein VI: A Platelet-Specific Collagen Receptor from the Immunoglobulin Superfamily ». *Blood* 96 (5): 1798-1807.
- Jantzen, H. M., L. Gousset, V. Bhaskar, D. Vincent, A. Tai, E. E. Reynolds, et P. B. Conley. 1999. « Evidence for Two Distinct G-Protein-Coupled ADP Receptors Mediating Platelet Activation ». *Thrombosis and Haemostasis* 81 (1): 111-17.
- Jayabose, Somasundaram, Oya Tugal, Claudio Sandoval, Padma Patel, Douglas Puder, Teresa Lin, et Paul Visintainer. 1996. « Clinical and Hematologic Effects of Hydroxyurea in

- Children with Sick Cell Anemia ». *The Journal of Pediatrics* 129 (4): 559-65.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(96\)70121-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(96)70121-X).
- Jefferies, Caroline A., Sarah Doyle, Cornelia Brunner, Aisling Dunne, Elizabeth Brint, Claudia Wietek, Eva Walch, Thomas Wirth, et Luke A. J. O'Neill. 2003. « Bruton's Tyrosine Kinase Is a Toll/Interleukin-1 Receptor Domain-Binding Protein That Participates in Nuclear Factor KappaB Activation by Toll-like Receptor 4 ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (28): 26258-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301484200>.
- Jenne, C. N., R. Urrutia, et P. Kubes. 2013. « Platelets: Bridging Hemostasis, Inflammation, and Immunity ». *International Journal of Laboratory Hematology* 35 (3): 254-61.
<https://doi.org/10.1111/ijlh.12084>.
- Joneckis, C. C., R. L. Ackley, E. P. Orringer, E. A. Wayner, et L. V. Parise. 1993. « Integrin Alpha 4 Beta 1 and Glycoprotein IV (CD36) Are Expressed on Circulating Reticulocytes in Sick Cell Anemia ». *Blood* 82 (12): 3548-55.
- Jung, Stephanie M., Masaaki Moroi, Kenji Soejima, Tomohiro Nakagaki, Yoshiki Miura, Michael C. Berndt, Elizabeth E. Gardiner, et al. 2012. « Constitutive Dimerization of Glycoprotein VI (GPVI) in Resting Platelets Is Essential for Binding to Collagen and Activation in Flowing Blood ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (35): 30000-13.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359125>.
- Junt, Tobias, Harald Schulze, Zhao Chen, Steffen Massberg, Tobias Goerge, Andreas Krueger, Denisa D. Wagner, et al. 2007. « Dynamic Visualization of Thrombopoiesis within Bone Marrow ». *Science (New York, N.Y.)* 317 (5845): 1767-70.
<https://doi.org/10.1126/science.1146304>.
- Kahn, M. L., M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara, et S. R. Coughlin. 1999. « Protease-Activated Receptors 1 and 4 Mediate Activation of Human Platelets by Thrombin ». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (6): 879-87.
<https://doi.org/10.1172/JCI6042>.
- Kallinikos-Maniatis, A. 1969. « Megakaryocytes and Platelets in Central Venous and Arterial Blood ». *Acta Haematologica* 42 (6): 330-35. <https://doi.org/10.1159/000208817>.
- Kamel, S., L. Horton, L. Ysebaert, M. Levade, K. Burbury, S. Tan, M. Cole-Sinclair, et al. 2015. « Ibrutinib Inhibits Collagen-Mediated but Not ADP-Mediated Platelet Aggregation ». *Leukemia* 29 (4): 783-87. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.247>.
- Kankkunen, Päivi, Laura Teirilä, Johanna Rintahaka, Harri Alenius, Henrik Wolff, et Sampsa Matikainen. 2010. « (1,3)-Beta-Glucans Activate Both Dectin-1 and NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (11): 6335-42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903019>.
- Karas, S. P., W. F. Rosse, et R. J. Kurlander. 1982. « Characterization of the IgG-Fc Receptor on Human Platelets ». *Blood* 60 (6): 1277-82.
- Kasar, Mutlu, Can Boğa, Mahmut Yeral, Suheyl Asma, Ilknur Kozanoglu, et Hakan Ozdogu. 2014. « Clinical Significance of Circulating Blood and Endothelial Cell Microparticles in Sick-Cell Disease ». *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 38 (2): 167-75.
<https://doi.org/10.1007/s11239-013-1028-3>.
- Kasper, Brigitte, Ernst Brandt, Sven Brandau, et Frank Petersen. 2007. « Platelet Factor 4 (CXC Chemokine Ligand 4) Differentially Regulates Respiratory Burst, Survival, and Cytokine Expression of Human Monocytes by Using Distinct Signaling Pathways ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (4): 2584-91.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2584>.

- Kato, Gregory J., Matthew Hsieh, Roberto Machado, James Taylor, Jane Little, John A. Butman, Tanya Lehy, John Tisdale, et Mark T. Gladwin. 2006. « Cerebrovascular Disease Associated with Sickle Cell Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Hematology* 81 (7): 503-10. <https://doi.org/10.1002/ajh.20642>.
- Kato, Gregory J., Frédéric B. Piel, Clarice D. Reid, Marilyn H. Gaston, Kwaku Ohene-Frempong, Lakshmanan Krishnamurti, Wally R. Smith, *et al.* 2018. « Sickle Cell Disease ». *Nature Reviews. Disease Primers* 4: 18010. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>.
- Kaul, D. K., M. E. Fabry, et R. L. Nagel. 1989. « Microvascular Sites and Characteristics of Sickle Cell Adhesion to Vascular Endothelium in Shear Flow Conditions: Pathophysiological Implications ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (9): 3356-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.9.3356>.
- Kaushansky, Kenneth. 2005. « Thrombopoietin and the Hematopoietic Stem Cell ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1044 (juin): 139-41. <https://doi.org/10.1196/annals.1349.018>.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2010. « The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-like Receptors ». *Nature Immunology* 11 (5): 373-84. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- Kawasaki, Takumi, et Taro Kawai. 2014. « Toll-Like Receptor Signaling Pathways ». *Frontiers in Immunology* 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00461>.
- Kersse, Kristof, Mathieu J. M. Bertrand, Mohamed Lamkanfi, et Peter Vandenabeele. 2011. « NOD-like Receptors and the Innate Immune System: Coping with Danger, Damage and Death ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22 (5-6): 257-76. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.09.003>.
- Kimura, H., T. Ishibashi, T. Uchida, Y. Maruyama, P. Friese, et S. A. Burstein. 1990. « Interleukin 6 Is a Differentiation Factor for Human Megakaryocytes in Vitro ». *European Journal of Immunology* 20 (9): 1927-31. <https://doi.org/10.1002/eji.1830200909>.
- Kisucka, Janka, Catherine E. Butterfield, Dan G. Duda, Sarah C. Eichenberger, Simin Saffaripour, Jerry Ware, Zaverio M. Ruggeri, Rakesh K. Jain, Judah Folkman, et Denisa D. Wagner. 2006. « Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (4): 855-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510412103>.
- Klok, F. A., M. J. H. A. Kruip, N. J. M. van der Meer, M. S. Arbous, D. a. M. P. J. Gommers, K. M. Kant, F. H. J. Kaptein, *et al.* 2020. « Incidence of Thrombotic Complications in Critically Ill ICU Patients with COVID-19 ». *Thrombosis Research* 191 (juillet): 145-47. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.013>.
- Koupenova, Milka, Heather A. Corkrey, Olga Vitseva, Kahraman Tanriverdi, Mohan Somasundaran, Ping Liu, Shaukat Soofi, *et al.* 2021. « SARS-CoV-2 Initiates Programmed Cell Death in Platelets ». *Circulation Research* 129 (6): 631-46. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319117>.
- Kroll, M H, T S Harris, J L Moake, R I Handin, et A I Schafer. 1991. « von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. » *Journal of Clinical Investigation* 88 (5): 1568-73.
- Labie, D., et J. Elion. 2005. « Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine ». *EMC - Hématologie* 2 (4): 220-39. <https://doi.org/10.1016/j.emch.2005.10.001>.

- Lard, L. R., F. P. Mul, M. de Haas, D. Roos, et A. J. Duits. 1999. « Neutrophil Activation in Sick Cell Disease ». *Journal of Leukocyte Biology* 66 (3): 411-15. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.3.411>.
- Lawrence, M. B., G. S. Kansas, E. J. Kunkel, et K. Ley. 1997. « Threshold Levels of Fluid Shear Promote Leukocyte Adhesion through Selectins (CD62L,P,E) ». *The Journal of Cell Biology* 136 (3): 717-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.3.717>.
- Le Joncour, Alexandre, Lucie Biard, Mathieu Vautier, Helene Bugaut, Arsene Mekinian, Georgina Maalouf, Matheus Vieira, *et al.* 2020. « Neutrophil-Platelet and Monocyte-Platelet Aggregates in COVID-19 Patients ». *Thrombosis and Haemostasis* 120 (12): 1733-35. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718732>.
- Lê, Vuong Ba, Jochen G. Schneider, Yvonne Boergeling, Fatma Berri, Mariette Ducatez, Jean-Luc Guerin, Iris Adrian, *et al.* 2015. « Platelet Activation and Aggregation Promote Lung Inflammation and Influenza Virus Pathogenesis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191 (7): 804-19. <https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1031OC>.
- Lederberg, J. 1999. « J. B. S. Haldane (1949) on Infectious Disease and Evolution ». *Genetics* 153 (1): 1-3.
- Lee, Geun-Shik, Naeha Subramanian, Andrew I. Kim, Ivona Aksentijevich, Raphaela Goldbach-Mansky, David B. Sacks, Ronald N. Germain, Daniel L. Kastner, et Jae Jin Chae. 2012. « The Calcium-Sensing Receptor Regulates the NLRP3 Inflammasome through Ca²⁺ and CAMP ». *Nature* 492 (7427): 123-27. <https://doi.org/10.1038/nature11588>.
- Lefrançais, Emma, Guadalupe Ortiz-Muñoz, Axelle Caudrillier, Beñat Mallavia, Fengchun Liu, David M. Sayah, Emily E. Thornton, *et al.* 2017. « The Lung Is a Site of Platelet Biogenesis and a Reservoir for Haematopoietic Progenitors ». *Nature* 544 (7648): 105-9. <https://doi.org/10.1038/nature21706>.
- Leikin, S. L., D. Gallagher, T. R. Kinney, D. Sloane, P. Klug, et W. Rida. 1989. « Mortality in Children and Adolescents with Sick Cell Disease. Cooperative Study of Sick Cell Disease ». *Pediatrics* 84 (3): 500-508.
- Lentz, Barry R. 2003. « Exposure of Platelet Membrane Phosphatidylserine Regulates Blood Coagulation ». *Progress in Lipid Research* 42 (5): 423-38. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(03)00025-0).
- Levade, Marie, Elodie David, Cédric Garcia, Pierre-Alexandre Laurent, Sarah Cadot, Anne-Sophie Michallet, Jean-Claude Bordet, *et al.* 2014. « Ibrutinib Treatment Affects Collagen and von Willebrand Factor-Dependent Platelet Functions ». *Blood* 124 (26): 3991-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-583294>.
- Li, Wenhui, Michael J. Moore, Natalya Vasilieva, Jianhua Sui, Swee Kee Wong, Michael A. Berne, Mohan Somasundaran, *et al.* 2003. « Angiotensin-Converting Enzyme 2 Is a Functional Receptor for the SARS Coronavirus ». *Nature* 426 (6965): 450-54. <https://doi.org/10.1038/nature02145>.
- Li, Zhenyu, M. Keegan Delaney, Kelly A. O'Brien, et Xiaoping Du. 2010. « Signaling during Platelet Adhesion and Activation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (12): 2341-49. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207522>.
- Li, Zhenyu, Xiaodong Xi, et Xiaoping Du. 2001. « A Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Signaling Pathway in the Activation of Platelet Integrin $\alpha IIb\beta 3^*$ ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42226-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106129200>.
- Li, Zhenyu, Guoying Zhang, Robert Feil, Jiahuai Han, et Xiaoping Du. 2006. « Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to

- activation of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ». *Blood* 107 (3): 965-72.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1308>.
- Liao, Danying, Fen Zhou, Lili Luo, Min Xu, Hongbo Wang, Jiahong Xia, Yong Gao, *et al.* 2020. « Haematological Characteristics and Risk Factors in the Classification and Prognosis Evaluation of COVID-19: A Retrospective Cohort Study ». *The Lancet. Haematology* 7 (9): e671-78. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30217-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30217-9).
- Lin, Tongtong, Liang Hu, Fan Hu, Kun Li, Chao-Yu Wang, Li-Juan Zong, Ya-Qian Zhao, *et al.* 2022. « NET-Triggered NLRP3 Activation and IL18 Release Drive Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy ». *Cancer Immunology Research* 10 (12): 1542-58.
<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-22-0197>.
- Lindemann, S., N. D. Tolley, D. A. Dixon, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman, et A. S. Weyrich. 2001. « Activated Platelets Mediate Inflammatory Signaling by Regulated Interleukin 1beta Synthesis ». *The Journal of Cell Biology* 154 (3): 485-90.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200105058>.
- Lindmark, E., T. Tenno, et A. Siegbahn. 2000. « Role of Platelet P-Selectin and CD40 Ligand in the Induction of Monocytic Tissue Factor Expression ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (10): 2322-28. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.10.2322>.
- Liu, Cuicui, Dan Wu, Meijuan Xia, Minmin Li, Zhiqiang Sun, Biao Shen, Yiyang Liu, *et al.* 2021. « Characterization of Cellular Heterogeneity and an Immune Subpopulation of Human Megakaryocytes ». *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)* 8 (15): e2100921. <https://doi.org/10.1002/advs.202100921>.
- Liu, Junling, Malinda E. Fitzgerald, Michael C. Berndt, Carl W. Jackson, et T. Kent Gartner. 2006. « Bruton Tyrosine Kinase Is Essential for Botrocetin/VWF-Induced Signaling and GPIIb-Dependent Thrombus Formation in Vivo ». *Blood* 108 (8): 2596-2603.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-011817>.
- Liu, Ping, Jing-Zhe Jiang, Xiu-Feng Wan, Yan Hua, Linmiao Li, Jiabin Zhou, Xiaohu Wang, *et al.* 2020. « Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? » *PLoS Pathogens* 16 (5): e1008421.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008421>.
- Liu, Xiao, Tica Pichulik, Olaf-Oliver Wolz, Truong-Minh Dang, Andrea Stutz, Carly Dillen, Magno Delmiro Garcia, *et al.* 2017. « Human NACHT, LRR, and PYD Domain-Containing Protein 3 (NLRP3) Inflammasome Activity Is Regulated by and Potentially Targetable through Bruton Tyrosine Kinase ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (4): 1054-1067.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.017>.
- Llitjos, Jean-François, Maxime Leclerc, Camille Chochois, Jean-Michel Monsallier, Michel Ramakers, Malika Auvray, et Karim Merouani. 2020. « High Incidence of Venous Thromboembolic Events in Anticoagulated Severe COVID-19 Patients ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 18 (7): 1743-46. <https://doi.org/10.1111/jth.14869>.
- Lodigiani, Corrado, Giacomo Iapichino, Luca Carenzo, Maurizio Cecconi, Paola Ferrazzi, Tim Sebastian, Nils Kucher, *et al.* 2020. « Venous and Arterial Thromboembolic Complications in COVID-19 Patients Admitted to an Academic Hospital in Milan, Italy ». *Thrombosis Research* 191 (juillet): 9-14.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.024>.
- Lopes Pires, Maria E., Simon R. Clarke, Sisi Marcondes, et Jonathan M. Gibbins. 2017. « Lipopolysaccharide potentiates platelet responses via toll-like receptor 4-stimulated Akt-Erk-PLA2 signalling ». *PLoS ONE* 12 (11): e0186981.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186981>.

- López-Herrera, Gabriela, Alexander Vargas-Hernández, Maria Edith González-Serrano, Laura Berrón-Ruiz, Juan Carlos Rodríguez-Alba, Francisco Espinosa-Rosales, et Leopoldo Santos-Argumedo. 2014. « Bruton's Tyrosine Kinase—an Integral Protein of B Cell Development That Also Has an Essential Role in the Innate Immune System ». *Journal of Leukocyte Biology* 95 (2): 243-50. <https://doi.org/10.1189/jlb.0513307>.
- Lordier, Larissa, Abdelali Jalil, Frédéric Aurade, Frédéric Larbret, Jérôme Larghero, Najet Debili, William Vainchenker, et Yunhua Chang. 2008. « Megakaryocyte Endomitosis Is a Failure of Late Cytokinesis Related to Defects in the Contractile Ring and Rho/Rock Signaling ». *Blood* 112 (8): 3164-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144956>.
- Los, Ferdinand C. O., Tara M. Randis, Raffi V. Aroian, et Adam J. Ratner. 2013. « Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 77 (2): 173-207. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-12>.
- Loscalzo, J. 2001. « Nitric Oxide Insufficiency, Platelet Activation, and Arterial Thrombosis ». *Circulation Research* 88 (8): 756-62. <https://doi.org/10.1161/hh0801.089861>.
- Lu, Lu, Xuejin Li, Peter G. Vekilov, et George Em Karniadakis. 2016. « Probing the Twisted Structure of Sickle Hemoglobin Fibers via Particle Simulations ». *Biophysical Journal* 110 (9): 2085-93. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.04.002>.
- Lu, Roujian, Xiang Zhao, Juan Li, Peihua Niu, Bo Yang, Honglong Wu, Wenling Wang, et al. 2020. « Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding ». *Lancet (London, England)* 395 (10224): 565-74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
- Lubin, B., D. Chiu, J. Bastacky, B. Roelofsen, et L. L. Van Deenen. 1981. « Abnormalities in Membrane Phospholipid Organization in Sickled Erythrocytes ». *The Journal of Clinical Investigation* 67 (6): 1643-49. <https://doi.org/10.1172/jci110200>.
- Lucas, Carolina, Patrick Wong, Jon Klein, Tiago B.R. Castro, Julio Silva, Maria Sundaram, Mallory K. Ellingson, et al. 2020. « Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19 ». *Nature* 584 (7821): 463-69. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>.
- Luo, Shi-Zhong, Xi Mo, Vahid Afshar-Kharghan, Sankaranarayanan Srinivasan, José A. López, et Renhao Li. 2007. « Glycoprotein Ibalpha Forms Disulfide Bonds with 2 Glycoprotein Ibbeta Subunits in the Resting Platelet ». *Blood* 109 (2): 603-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024091>.
- Ma, Yan-Qing, Edward F. Plow, et Jian-Guo Geng. 2004. « P-Selectin Binding to P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Induces an Intermediate State of AlphaMbeta2 Activation and Acts Cooperatively with Extracellular Stimuli to Support Maximal Adhesion of Human Neutrophils ». *Blood* 104 (8): 2549-56. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1108>.
- Machhi, Jatin, Jonathan Herskovitz, Ahmed M. Senan, Debashis Dutta, Barnali Nath, Maxim D. Oleynikov, Wilson R. Blomberg, et al. 2020. « The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections ». *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, juillet, 1-28. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5>.
- Mahdy, Mohamed A. A., Waleed Younis, et Zamzam Ewaida. 2020. « An Overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection ». *Frontiers in Veterinary Science* 7 (décembre): 596391. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.596391>.
- Maier-Redelsperger, M., M. de Montalembert, A. Flahault, M. G. Neonato, R. Ducrocq, M. P. Masson, R. Girot, et J. Elion. 1998. « Fetal Hemoglobin and F-Cell Responses to Long-Term Hydroxyurea Treatment in Young Sick Cell Patients. The French Study Group on Sick Cell Disease ». *Blood* 91 (12): 4472-79.

- Manne, Bhanu Kanth, Frederik Denorme, Elizabeth A. Middleton, Irina Portier, Jesse W. Rowley, Chris Stubben, Aaron C. Petrey, *et al.* 2020. « Platelet Gene Expression and Function in Patients with COVID-19 ». *Blood* 136 (11): 1317-29. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007214>.
- Mariathasan, Sanjeev, David S. Weiss, Kim Newton, Jacqueline McBride, Karen O'Rourke, Meron Roose-Girma, Wyne P. Lee, Yvette Weinrauch, Denise M. Monack, et Vishva M. Dixit. 2006. « Cryopyrin Activates the Inflammasome in Response to Toxins and ATP ». *Nature* 440 (7081): 228-32. <https://doi.org/10.1038/nature04515>.
- Martinon, Fabio, Kimberly Burns, et Jürg Tschopp. 2002. « The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of ProIL-Beta ». *Molecular Cell* 10 (2): 417-26. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00599-3).
- Martinon, Fabio, Virginie Pétrilli, Annick Mayor, Aubry Tardivel, et Jürg Tschopp. 2006. « Gout-Associated Uric Acid Crystals Activate the NALP3 Inflammasome ». *Nature* 440 (7081): 237-41. <https://doi.org/10.1038/nature04516>.
- Martins, Paula A. da Costa, Janine M. van Gils, Anita Mol, Peter L. Hordijk, et Jaap J. Zwaginga. 2006. « Platelet Binding to Monocytes Increases the Adhesive Properties of Monocytes by Up-Regulating the Expression and Functionality of B1 and B2 Integrins ». *Journal of Leukocyte Biology* 79 (3): 499-507. <https://doi.org/10.1189/jlb.0605318>.
- Masters, Seth L., Aisling Dunne, Shoba L. Subramanian, Rebecca L. Hull, Gillian M. Tannahill, Fiona A. Sharp, Christine Becker, *et al.* 2010. « Activation of the NLRP3 Inflammasome by Islet Amyloid Polypeptide Provides a Mechanism for Enhanced IL-1 β in Type 2 Diabetes ». *Nature Immunology* 11 (10): 897-904. <https://doi.org/10.1038/ni.1935>.
- Maugeri, N., L. Campana, M. Gavina, C. Covino, M. De Metrio, C. Panciroli, L. Maiuri, *et al.* 2014. « Activated Platelets Present High Mobility Group Box 1 to Neutrophils, Inducing Autophagy and Promoting the Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 12 (12): 2074-88. <https://doi.org/10.1111/jth.12710>.
- Maxwell, K. F., M. S. Powell, M. D. Hulett, P. A. Barton, I. F. McKenzie, T. P. Garrett, et P. M. Hogarth. 1999. « Crystal Structure of the Human Leukocyte Fc Receptor, Fc GammaRIIa ». *Nature Structural Biology* 6 (5): 437-42. <https://doi.org/10.1038/8241>.
- McEver, R. P., et M. N. Martin. 1984. « A Monoclonal Antibody to a Membrane Glycoprotein Binds Only to Activated Platelets ». *The Journal of Biological Chemistry* 259 (15): 9799-9804.
- McGann, Patrick T., et Russell E. Ware. 2011. « Hydroxyurea for sickle cell anemia: What have we learned and what questions still remain? » *Current opinion in hematology* 18 (3): 158-65. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834521dd>.
- Medzhitov, Ruslan. 2010. « Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame ». *Cell* 140 (6): 771-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.
- Mehari, Alem, Mark T. Gladwin, Xin Tian, Roberto F. Machado, et Gregory J. Kato. 2012. « Mortality in Adults with Sickle Cell Disease and Pulmonary Hypertension ». *JAMA* 307 (12): 1254-56. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.358>.
- Merad, Miriam, et Jerome C. Martin. 2020. « Pathological Inflammation in Patients with COVID-19: A Key Role for Monocytes and Macrophages ». *Nature Reviews. Immunology* 20 (6): 355-62. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>.
- Miller, R. L., P. S. Verma, et R. G. Adams. 1983. « Studies of the Kallikrein-Kinin System in Patients with Sickle Cell Anemia ». *Journal of the National Medical Association* 75 (6): 551-56.

- Mine, S., T. Fujisaki, M. Suematsu, et Y. Tanaka. 2001. « Activated Platelets and Endothelial Cell Interaction with Neutrophils under Flow Conditions ». *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 40 (11): 1085-92. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.40.1085>.
- Mohamed, A. J., B. F. Nore, B. Christensson, et C. I. Smith. 1999. « Signalling of Bruton's Tyrosine Kinase, Btk ». *Scandinavian Journal of Immunology* 49 (2): 113-18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00504.x>.
- Morrell, Craig N., Angela A. Aggrey, Lesley M. Chapman, et Kristina L. Modjeski. 2014. « Emerging Roles for Platelets as Immune and Inflammatory Cells ». *Blood* 123 (18): 2759-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-462432>.
- Muggen, Alice F., Simar P. Singh, Rudi W. Hendriks, et Anton W. Langerak. 2016. « Targeting Signaling Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Current Cancer Drug Targets* 16 (8): 669-88. <https://doi.org/10.2174/1568009616666160408145623>.
- Mukisi-Mukaza, M., C. Saint Martin, M. Etienne-Julan, M. Donkerwolcke, M. E. Burny, et F. Burny. 2011. « Risk Factors and Impact of Orthopaedic Monitoring on the Outcome of Avascular Necrosis of the Femoral Head in Adults with Sickle Cell Disease: 215 Patients Case Study with Control Group ». *Orthopaedics & Traumatology, Surgery & Research: OTSR* 97 (8): 814-20. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2011.09.011>.
- Muñoz-Planillo, Raúl, Peter Kuffa, Giovanny Martínez-Colón, Brenna L. Smith, Thekkelnaycke M. Rajendiran, et Gabriel Núñez. 2013. « K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter ». *Immunity* 38 (6): 1142-53. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>.
- Murakami, Tomohiko, Johan Ockinger, Jiujiu Yu, Vanessa Byles, Aisleen McColl, Aldebaran M. Hofer, et Tiffany Horng. 2012. « Critical Role for Calcium Mobilization in Activation of the NLRP3 Inflammasome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (28): 11282-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117765109>.
- Murthy, Pranav, Filip Durco, Jennifer L. Miller-Ocuin, Teiko Takedai, Shruthi Shankar, Xiaoyan Liang, Xiao Liu, et al. 2017. « The NLRP3 Inflammasome and Bruton's Tyrosine Kinase in Platelets Co-Regulate Platelet Activation, Aggregation, and in Vitro Thrombus Formation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483 (1): 230-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.161>.
- Nader, Elie, Marijke Grau, Romain Fort, Bianca Collins, Giovanna Cannas, Alexandra Gauthier, Katja Walpurgis, et al. 2018. « Hydroxyurea Therapy Modulates Sickle Cell Anemia Red Blood Cell Physiology: Impact on RBC Deformability, Oxidative Stress, Nitrite Levels and Nitric Oxide Synthase Signalling Pathway ». *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 81: 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.10.003>.
- Nebor, Danitza, Marc Romana, Raoul Santiago, Nathalie Vachieri, Julien Picot, Cédric Broquere, Vicky Chaar, et al. 2013. « Fetal Hemoglobin and Hydroxycarbamide Modulate Both Plasma Concentration and Cellular Origin of Circulating Microparticles in Sickle Cell Anemia Children ». *Haematologica* 98 (6): 862-67. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.073619>.
- Neel, J. V. 1949. « The Inheritance of Sickle Cell Anemia ». *Science (New York, N.Y.)* 110 (2846): 64-66. <https://doi.org/10.1126/science.110.2846.64>.
- Nicholas, R. A. 2001. « Identification of the P2Y₁₂ Receptor: A Novel Member of the P2Y Family of Receptors Activated by Extracellular Nucleotides ». *Molecular Pharmacology* 60 (3): 416-20.
- Nicolson, Phillip L. R., Sophie H. Nock, Joshua Hinds, Lourdes Garcia-Quintanilla, Christopher W. Smith, Joana Campos, Alexander Brill, et al. 2021. « Low-Dose Btk Inhibitors

- Selectively Block Platelet Activation by CLEC-2 ». *Haematologica* 106 (1): 208-19. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.218545>.
- Nsiri, B., N. Gritli, F. Bayoudh, T. Messaoud, S. Fattoum, et S. Machghoul. 1996. « Abnormalities of Coagulation and Fibrinolysis in Homozygous Sickle Cell Disease ». *Hematology and Cell Therapy* 38 (3): 279-84. <https://doi.org/10.1007/s00282-996-0279-2>.
- Nyakundi, Benard Bogonko, Andrea Tóth, Enikő Balogh, Béla Nagy, Judit Erdei, Bernhard Ryffel, György Paragh, Mario D. Cordero, et Viktória Jeney. 2019. « Oxidized Hemoglobin Forms Contribute to NLRP3 Inflammasome-Driven IL-1 β Production upon Intravascular Hemolysis ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1865 (2): 464-75. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.030>.
- Obergfell, Achim, Koji Eto, Attila Mocsai, Charito Buensuceso, Sheri L. Moores, Joan S. Brugge, Clifford A. Lowell, et Sanford J. Shattil. 2002. « Coordinate Interactions of Csk, Src, and Syk Kinases with [Alpha]IIb[Beta]3 Initiate Integrin Signaling to the Cytoskeleton ». *The Journal of Cell Biology* 157 (2): 265-75. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112113>.
- Ochs, H. D., et C. I. Smith. 1996. « X-Linked Agammaglobulinemia. A Clinical and Molecular Analysis ». *Medicine* 75 (6): 287-99. <https://doi.org/10.1097/00005792-199611000-00001>.
- Ohene-Frempong, K., S. J. Weiner, L. A. Sleeper, S. T. Miller, S. Embury, J. W. Moohr, D. L. Wethers, C. H. Pegelow, et F. M. Gill. 1998. « Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors ». *Blood* 91 (1): 288-94.
- Okpala, Iheanyi, Yvonne Daniel, Roberta Haynes, Damian Odoemene, et John Goldman. 2002. « Relationship between the Clinical Manifestations of Sickle Cell Disease and the Expression of Adhesion Molecules on White Blood Cells ». *European Journal of Haematology* 69 (3): 135-44. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2002.02775.x>.
- Oppenheimer, Ella H., et John R. Esterly. 1971. « Pulmonary Changes in Sickle Cell Disease ». *American Review of Respiratory Disease* 103 (6): 858-59. <https://doi.org/10.1164/arrd.1971.103.6.858>.
- Osada, Makoto, Osamu Inoue, Guo Ding, Toshiaki Shirai, Hirotake Ichise, Kazuyoshi Hirayama, Katsuhiko Takano, et al. 2012. « Platelet Activation Receptor CLEC-2 Regulates Blood/Lymphatic Vessel Separation by Inhibiting Proliferation, Migration, and Tube Formation of Lymphatic Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (26): 22241-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.329987>.
- Ossovskaia, Valeria S., et Nigel W. Bunnett. 2004. « Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease ». *Physiological Reviews* 84 (2): 579-621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2003>.
- Ozen, Mert, Atakan Yilmaz, Vefa Cakmak, Resad Beyoglu, Alten Oskay, Murat Seyit, et Hande Senol. 2021. « D-Dimer as a Potential Biomarker for Disease Severity in COVID-19 ». *The American Journal of Emergency Medicine* 40 (février): 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.12.023>.
- Pal Singh, Simar, Floris Dammeijer, et Rudi W. Hendriks. 2018. « Role of Bruton's Tyrosine Kinase in B Cells and Malignancies ». *Molecular Cancer* 17 (1): 57. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0779-z>.
- Pan, Pan, Miaomiao Shen, Zhenyang Yu, Weiwei Ge, Keli Chen, Mingfu Tian, Feng Xiao, et al. 2021. « SARS-CoV-2 N Protein Promotes NLRP3 Inflammasome Activation to Induce

- Hyperinflammation ». *Nature Communications* 12 (1): 4664.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25015-6>.
- Parisi, Valentina, et Dario Leosco. 2020. « Precision Medicine in COVID-19: IL-1 β a Potential Target ». *JACC. Basic to Translational Science* 5 (5): 543-44.
<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.04.006>.
- Pasvol, G., D. J. Weatherall, et R. J. Wilson. 1978. « Cellular Mechanism for the Protective Effect of Haemoglobin S against *P. Falciparum* Malaria ». *Nature* 274 (5672): 701-3.
<https://doi.org/10.1038/274701a0>.
- Patel, Sunita R., John H. Hartwig, et Joseph E. Italiano. 2005. « The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (12): 3348-54.
<https://doi.org/10.1172/JCI26891>.
- Patel, Sunita R., Jennifer L. Richardson, Harald Schulze, Eden Kahle, Niels Galjart, Ksenija Drabek, Ramesh A. Shivdasani, John H. Hartwig, et Joseph E. Italiano. 2005. « Differential Roles of Microtubule Assembly and Sliding in Proplatelet Formation by Megakaryocytes ». *Blood* 106 (13): 4076-85. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2204>.
- Pauling, L., et H. A. Itano. 1949. « Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 109 (2835): 443.
- Pecker, Lydia H., Sarah Hussain, Jaanvi Mahesh, Ravi Varadhan, Mindy S. Christianson, et Sophie Lanzkron. 2022. « Diminished Ovarian Reserve in Young Women with Sickle Cell Anemia ». *Blood* 139 (7): 1111-15. <https://doi.org/10.1182/blood.2021012756>.
- Pelegrin, Pablo, et Annmarie Surprenant. 2006. « Pannexin-1 Mediates Large Pore Formation and Interleukin-1 β Release by the ATP-Gated P2X7 Receptor ». *The EMBO Journal* 25 (21): 5071-82. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>.
- Perlman, Stanley, et Jason Netland. 2009. « Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis ». *Nature Reviews. Microbiology* 7 (6): 439-50.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2147>.
- Perregaux, D., et C. A. Gabel. 1994. « Interleukin-1 Beta Maturation and Release in Response to ATP and Nigericin. Evidence That Potassium Depletion Mediated by These Agents Is a Necessary and Common Feature of Their Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (21): 15195-203.
- Petrey, Aaron C., Fares Qeadan, Elizabeth A. Middleton, Irina V. Pinchuk, Robert A. Campbell, et Ellen J. Beswick. 2021. « Cytokine release syndrome in COVID-19: Innate immune, vascular, and platelet pathogenic factors differ in severity of disease and sex ». *Journal of leukocyte biology* 109 (1): 55-66. <https://doi.org/10.1002/JLB.3COVA0820-410RRR>.
- Pétrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, et J. Tschopp. 2007. « Activation of the NALP3 Inflammasome Is Triggered by Low Intracellular Potassium Concentration ». *Cell Death and Differentiation* 14 (9): 1583-89. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402195>.
- Piel, Frédéric B., Anand P. Patil, Rosalind E. Howes, Oscar A. Nyangiri, Peter W. Gething, Mewahyu Dewi, William H. Temperley, Thomas N. Williams, David J. Weatherall, et Simon I. Hay. 2013. « Global Epidemiology of Sickle Haemoglobin in Neonates: A Contemporary Geostatistical Model-Based Map and Population Estimates ». *Lancet (London, England)* 381 (9861): 142-51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61229-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61229-X).
- Platt, O. S., D. J. Brambilla, W. F. Rosse, P. F. Milner, O. Castro, M. H. Steinberg, et P. P. Klug. 1994. « Mortality in Sickle Cell Disease. Life Expectancy and Risk Factors for Early Death ». *The New England Journal of Medicine* 330 (23): 1639-44.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199406093302303>.

- Platt, O. S., B. D. Thorington, D. J. Brambilla, P. F. Milner, W. F. Rosse, E. Vichinsky, et T. R. Kinney. 1991. « Pain in Sickle Cell Disease. Rates and Risk Factors ». *The New England Journal of Medicine* 325 (1): 11-16. <https://doi.org/10.1056/NEJM199107043250103>.
- Polanowska-Grabowska, Renata, Kori Wallace, Joshua J. Field, Lanlin Chen, Melissa A. Marshall, Robert Figler, Adrian R. L. Gear, et Joel Linden. 2010. « P-Selectin-Mediated Platelet-Neutrophil Aggregate Formation Activates Neutrophils in Mouse and Human Sickle Cell Disease ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (12): 2392-99. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.211615>.
- Pollitt, Alice Y., Natalie S. Poulter, Eelo Gitz, Leyre Navarro-Nuñez, Ying-Jie Wang, Craig E. Hughes, Steven G. Thomas, et al. 2014. « Syk and Src Family Kinases Regulate C-Type Lectin Receptor 2 (CLEC-2)-Mediated Clustering of Podoplanin and Platelet Adhesion to Lymphatic Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (52): 35695-710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.584284>.
- Powars, D., B. Wilson, C. Imbus, C. Pegelow, et J. Allen. 1978. « The Natural History of Stroke in Sickle Cell Disease ». *The American Journal of Medicine* 65 (3): 461-71. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(78\)90772-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90772-6).
- Proença-Ferreira, Renata, Ana Flávia Brugnerotto, Vanessa Tonin Garrido, Venina Marcela Dominical, Daiana Morelli Vital, Marilene de Fátima Reis Ribeiro, Melissa Ercolin dos Santos, et al. 2014. « Endothelial Activation by Platelets from Sickle Cell Anemia Patients ». *PloS One* 9 (2): e89012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089012>.
- Qiao, Jianlin, Mohammad Al-Tamimi, Ross I. Baker, Robert K. Andrews, et Elizabeth E. Gardiner. 2015. « The Platelet Fc Receptor, FcγRIIa ». *Immunological Reviews* 268 (1): 241-52. <https://doi.org/10.1111/imr.12370>.
- Qiao, Jianlin, Xiaoqing Wu, Qi Luo, Guangyu Wei, Mengdi Xu, Yulu Wu, Yun Liu, et al. 2018. « NLRP3 Regulates Platelet Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ Outside-in Signaling, Hemostasis and Arterial Thrombosis ». *Haematologica* 103 (9): 1568-76. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.191700>.
- Quek, L. S., J. M. Pasquet, I. Hers, R. Cornall, G. Knight, M. Barnes, M. L. Hibbs, A. R. Dunn, C. A. Lowell, et S. P. Watson. 2000. « Fyn and Lyn Phosphorylate the Fc Receptor Gamma Chain Downstream of Glycoprotein VI in Murine Platelets, and Lyn Regulates a Novel Feedback Pathway ». *Blood* 96 (13): 4246-53.
- Radley, J. M., et C. J. Haller. 1982. « The Demarcation Membrane System of the Megakaryocyte: A Misnomer? ». *Blood* 60 (1): 213-19.
- Ramsland, Paul A., William Farrugia, Tessa M. Bradford, Caroline Tan Sardjono, Sandra Esparon, Halina M. Trist, Maree S. Powell, et al. 2011. « Structural Basis for Fc GammaRIIa Recognition of Human IgG and Formation of Inflammatory Signaling Complexes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (6): 3208-17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101467>.
- Rawlings, D. J., A. M. Scharenberg, H. Park, M. I. Wahl, S. Lin, R. M. Kato, A. C. Fluckiger, O. N. Witte, et J. P. Kinet. 1996. « Activation of BTK by a Phosphorylation Mechanism Initiated by SRC Family Kinases ». *Science (New York, N.Y.)* 271 (5250): 822-25. <https://doi.org/10.1126/science.271.5250.822>.
- Rayes, Julie, Steve P. Watson, et Bernhard Nieswandt. 2019. « Functional Significance of the Platelet Immune Receptors GPVI and CLEC-2 ». *The Journal of Clinical Investigation* 129 (1): 12-23. <https://doi.org/10.1172/JCI122955>.

- Rees, David C., Thomas N. Williams, et Mark T. Gladwin. 2010. « Sickle-Cell Disease ». *Lancet (London, England)* 376 (9757): 2018-31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X).
- Reiter, Christopher D., Xunde Wang, Jose E. Tanus-Santos, Neil Hogg, Richard O. Cannon, Alan N. Schechter, et Mark T. Gladwin. 2002. « Cell-Free Hemoglobin Limits Nitric Oxide Bioavailability in Sickle-Cell Disease ». *Nature Medicine* 8 (12): 1383-89. <https://doi.org/10.1038/nm1202-799>.
- Ribeil, Jean-Antoine, Salima Hacein-Bey-Abina, Emmanuel Payen, Alessandra Magnani, Michaela Semeraro, Elisa Magrin, Laure Caccavelli, et al. 2017. « Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease ». *New England Journal of Medicine* 376 (9): 848-55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609677>.
- Rigg, Rachel A., Joseph E. Aslan, Laura D. Healy, Michael Wallisch, Marisa L. D. Thierheimer, Cassandra P. Loren, Jiaqing Pang, Monica T. Hinds, András Gruber, et Owen J. T. McCarty. 2016. « Oral Administration of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Impairs GPVI-Mediated Platelet Function ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 310 (5): C373-380. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00325.2015>.
- Riley, Tanya R, et Treavor T Riley. 2019. « Profile of crizanlizumab and its potential in the prevention of pain crises in sickle cell disease: evidence to date ». *Journal of Blood Medicine* 10 (août): 307-11. <https://doi.org/10.2147/JBM.S191423>.
- Rivera, José, María Luisa Lozano, Leyre Navarro-Núñez, et Vicente Vicente. 2009. « Platelet Receptors and Signaling in the Dynamics of Thrombus Formation ». *Haematologica* 94 (5): 700-711. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.003178>.
- Rodrigues, Tamara S., Keyla S. G. de Sá, Adriene Y. Ishimoto, Amanda Becerra, Samuel Oliveira, Leticia Almeida, Augusto V. Gonçalves, et al. 2021. « Inflammasomes Are Activated in Response to SARS-CoV-2 Infection and Are Associated with COVID-19 Severity in Patients ». *The Journal of Experimental Medicine* 218 (3): e20201707. <https://doi.org/10.1084/jem.20201707>.
- Rondina, Matthew T., BreAnna Brewster, Colin K. Grissom, Guy A. Zimmerman, Diana H. Kastendieck, Estelle S. Harris, et Andrew S. Weyrich. 2012. « In Vivo Platelet Activation in Critically Ill Patients with Primary 2009 Influenza A(H1N1) ». *Chest* 141 (6): 1490-95. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2860>.
- Roschewski, Mark, Michail S. Lionakis, Jeff P. Sharman, Joseph Roswarski, Andre Goy, M. Andrew Monticelli, Michael Roshon, et al. 2020. « Inhibition of Bruton tyrosine kinase in patients with severe COVID-19 ». *Science Immunology* 5 (48): eabd0110. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd0110>.
- Saint-Martin, Christian, Marc Romana, Alix Bibrac, Karine Brudey, Vanessa Tarer, Lydia Divialle-Doumbo, Marie Petras, et al. 2013. « Universal Newborn Screening for Haemoglobinopathies in Guadeloupe (French West Indies): A 27-Year Experience ». *Journal of Medical Screening* 20 (4): 177-82. <https://doi.org/10.1177/0969141313507919>.
- Saito, K., A. M. Scharenberg, et J. P. Kinet. 2001. « Interaction between the Btk PH Domain and Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate Directly Regulates Btk ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (19): 16201-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100873200>.
- Sako, D., X. J. Chang, K. M. Barone, G. Vachino, H. M. White, G. Shaw, G. M. Veldman, K. M. Bean, T. J. Ahern, et B. Furie. 1993. « Expression Cloning of a Functional Glycoprotein Ligand for P-Selectin ». *Cell* 75 (6): 1179-86. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90327-m](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90327-m).

- Sang, Yaqiu, Mark Roest, Bas de Laat, Philip G. de Groot, et Dana Huskens. 2021. « Interplay between platelets and coagulation ». *Blood Reviews* 46 (mars): 100733. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100733>.
- Scheuerer, B., M. Ernst, I. Dürrbaum-Landmann, J. Fleischer, E. Grage-Griebenow, E. Brandt, H. D. Flad, et F. Petersen. 2000. « The CXC-Chemokine Platelet Factor 4 Promotes Monocyte Survival and Induces Monocyte Differentiation into Macrophages ». *Blood* 95 (4): 1158-66.
- Schmalzer, E. A., J. O. Lee, A. K. Brown, S. Usami, et S. Chien. 1987. « Viscosity of Mixtures of Sickle and Normal Red Cells at Varying Hematocrit Levels. Implications for Transfusion ». *Transfusion* 27 (3): 228-33. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1987.27387235626.x>.
- Schwartz, R. S., Y. Tanaka, I. J. Fidler, D. T. Chiu, B. Lubin, et A. J. Schroit. 1985. « Increased Adherence of Sickled and Phosphatidylserine-Enriched Human Erythrocytes to Cultured Human Peripheral Blood Monocytes ». *The Journal of Clinical Investigation* 75 (6): 1965-72. <https://doi.org/10.1172/JCI111913>.
- Selvadurai, Maria V., et Justin R. Hamilton. 2018. « Structure and Function of the Open Canalicular System - the Platelet's Specialized Internal Membrane Network ». *Platelets* 29 (4): 319-25. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1431388>.
- Semple, John W., Joseph E. Italiano, et John Freedman. 2011. « Platelets and the Immune Continuum ». *Nature Reviews. Immunology* 11 (4): 264-74. <https://doi.org/10.1038/nri2956>.
- Seok, Jin Kyung, Han Chang Kang, Yong-Yeon Cho, Hye Suk Lee, et Joo Young Lee. 2021. « Therapeutic Regulation of the NLRP3 Inflammasome in Chronic Inflammatory Diseases ». *Archives of Pharmacal Research* 44 (1): 16-35. <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01307-9>.
- Series, Jennifer, Cédric Garcia, Marie Levade, Julien Viaud, Pierre Sié, Loïc Ysebaert, et Bernard Payrastre. 2019. « Differences and Similarities in the Effects of Ibrutinib and Acalabrutinib on Platelet Functions ». *Haematologica* 104 (11): 2292-99. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.207183>.
- Serjeant, Graham R. 2010. « One Hundred Years of Sick Cell Disease ». *British Journal of Haematology* 151 (5): 425-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08419.x>.
- Setty, B. N. Yamaja, et Suhita Gayen Betal. 2008. « Microvascular Endothelial Cells Express a Phosphatidylserine Receptor: A Functionally Active Receptor for Phosphatidylserine-Positive Erythrocytes ». *Blood* 111 (2): 905-14. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099465>.
- Setty, B. N. Yamaja, Nigel S. Key, A. Koneti Rao, Suhita Gayen-Betal, Suba Krishnan, Carlton D. Dampier, et Marie J. Stuart. 2012. « Tissue Factor-Positive Monocytes in Children with Sick Cell Disease: Correlation with Biomarkers of Haemolysis ». *British Journal of Haematology* 157 (3): 370-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09065.x>.
- Setty, B. N. Yamaja, Surekha Kulkarni, et Marie J. Stuart. 2002. « Role of Erythrocyte Phosphatidylserine in Sick Red Cell-Endothelial Adhesion ». *Blood* 99 (5): 1564-71. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.5.1564>.
- Séverin, S., C. Ghevaert, et A. Mazharian. 2010. « The Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways: Role in Megakaryocyte Differentiation ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8 (1): 17-26. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03658.x>.
- Sha, Wenwen, Hiroki Mitoma, Shino Hanabuchi, Musheng Bao, Leiyun Weng, Naoshi Sugimoto, Ying Liu, et al. 2014. « Human NLRP3 Inflammasome Senses Multiple Types

- of Bacterial RNAs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (45): 16059-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412487111>.
- Shashkin, Pavel N., G. Thomas Brown, Arundhati Ghosh, Gopal K. Marathe, et Thomas M. McIntyre. 2008. « Lipopolysaccharide Is a Direct Agonist for Platelet RNA Splicing ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (5): 3495-3502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3495>.
- Sheikh, Sajila, Mahbub Rahman, Zoe Gale, N. Thin Luu, Philip C. W. Stone, Nick M. Matharu, G. Edward Luu Rainger, et Gerard B. Nash. 2005. « Differing Mechanisms of Leukocyte Recruitment and Sensitivity to Conditioning by Shear Stress for Endothelial Cells Treated with Tumour Necrosis Factor-Alpha or Interleukin-1beta ». *British Journal of Pharmacology* 145 (8): 1052-61. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706281>.
- Shen, Bo, Xiaojuan Zhao, Kelly A. O'Brien, Aleksandra Stojanovic-Terpo, M. Keegan Delaney, Kyungho Kim, Jaehyung Cho, Stephen C.-T. Lam, et Xiaoping Du. 2013. « A Directional Switch of Integrin Signalling and a New Anti-Thrombotic Strategy ». *Nature* 503 (7474): 131-35. <https://doi.org/10.1038/nature12613>.
- Shet, Arun S., Omer Aras, Kalpna Gupta, Mathew J. Hass, Douglas J. Rausch, Nabil Saba, Louann Koopmeiners, Nigel S. Key, et Robert P. Hebbel. 2003. « Sickie Blood Contains Tissue Factor-Positive Microparticles Derived from Endothelial Cells and Monocytes ». *Blood* 102 (7): 2678-83. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0693>.
- Shimada, Kenichi, Timothy R. Crother, Justin Karlin, Jargalsaikhan Dagvadorj, Norika Chiba, Shuang Chen, V. Krishnan Ramanujan, et al. 2012. « Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis ». *Immunity* 36 (3): 401-14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>.
- Singhal, Rashi, Gowtham K. Annarapu, Ankita Pandey, Sheetal Chawla, Amrita Ojha, Avinash Gupta, Miguel A. Cruz, Tulika Seth, et Prasenjit Guchhait. 2015. « Hemoglobin Interaction with GP1ba Induces Platelet Activation and Apoptosis: A Novel Mechanism Associated with Intravascular Hemolysis ». *Haematologica* 100 (12): 1526-33. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.132183>.
- Smith, C. I., C. M. Bäckesjö, A. Berglöf, L. J. Brandén, T. Islam, P. T. Mattsson, A. J. Mohamed, S. Müller, B. Nore, et M. Vihinen. 1998. « X-Linked Agammaglobulinemia: Lack of Mature B Lineage Cells Caused by Mutations in the Btk Kinase ». *Springer Seminars in Immunopathology* 19 (4): 369-81. <https://doi.org/10.1007/BF00792597>.
- Solovey, A., L. Gui, N. S. Key, et R. P. Hebbel. 1998. « Tissue Factor Expression by Endothelial Cells in Sickie Cell Anemia ». *The Journal of Clinical Investigation* 101 (9): 1899-1904. <https://doi.org/10.1172/JCI1932>.
- Solovey, A., Y. Lin, P. Browne, S. Choong, E. Wayner, et R. P. Hebbel. 1997. « Circulating Activated Endothelial Cells in Sickie Cell Anemia ». *The New England Journal of Medicine* 337 (22): 1584-90. <https://doi.org/10.1056/NEJM199711273372203>.
- Sowemimo-Coker, S. O., H. J. Meiselman, et R. B. Francis. 1989. « Increased Circulating Endothelial Cells in Sickie Cell Crisis ». *American Journal of Hematology* 31 (4): 263-65. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830310409>.
- Sreeramkumar, Vinatha, José M. Adrover, Ivan Ballesteros, Maria Isabel Cuartero, Jan Rossaint, Izaskun Bilbao, Maria Nacher, et al. 2014. « Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation ». *Science (New York, N.Y.)* 346 (6214): 1234-38. <https://doi.org/10.1126/science.1256478>.
- Steinberg, M. H. 1999. « Management of Sickie Cell Disease ». *The New England Journal of Medicine* 340 (13): 1021-30. <https://doi.org/10.1056/NEJM199904013401307>.

- Steinberg, Martin H., Franca Barton, Oswaldo Castro, Charles H. Pegelow, Samir K. Ballas, Abdullah Kutlar, Eugene Orringer, *et al.* 2003. « Effect of Hydroxyurea on Mortality and Morbidity in Adult Sickle Cell Anemia: Risks and Benefits up to 9 Years of Treatment ». *JAMA* 289 (13): 1645-51. <https://doi.org/10.1001/jama.289.13.1645>.
- Stenberg, P. E., R. P. McEver, M. A. Shuman, Y. V. Jacques, et D. F. Bainton. 1985. « A Platelet Alpha-Granule Membrane Protein (GMP-140) Is Expressed on the Plasma Membrane after Activation ». *The Journal of Cell Biology* 101 (3): 880-86. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.880>.
- Stojanovic, Aleksandra, Jasna A. Marjanovic, Viktor M. Brovkovich, Xiaoding Peng, Nissim Hay, Randal A. Skidgel, et Xiaoping Du. 2006. « A Phosphoinositide 3-Kinase-AKT-Nitric Oxide-CGMP Signaling Pathway in Stimulating Platelet Secretion and Aggregation* ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (24): 16333-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512378200>.
- Stricker, R. B., D. Wong, S. R. Saks, L. Corash, et M. A. Shuman. 1985. « Acquired Bernard-Soulier Syndrome. Evidence for the Role of a 210,000-Molecular Weight Protein in the Interaction of Platelets with von Willebrand Factor ». *The Journal of Clinical Investigation* 76 (3): 1274-78. <https://doi.org/10.1172/JCI112084>.
- Styles, L. A., et E. Vichinsky. 1994. « Effects of a Long-Term Transfusion Regimen on Sickle Cell-Related Illnesses ». *The Journal of Pediatrics* 125 (6 Pt 1): 909-11. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(05\)82006-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(05)82006-2).
- Sugihara, K., T. Sugihara, N. Mohandas, et R. P. Hebbel. 1992. « Thrombospondin Mediates Adherence of CD36+ Sickle Reticulocytes to Endothelial Cells ». *Blood* 80 (10): 2634-42. <https://doi.org/10.1182/blood.V80.10.2634.2634>.
- Sultana, Chand, Yamin Shen, Vinod Rattan, Cage Johnson, et Vijay K. Kalra. 1998. « Interaction of Sickle Erythrocytes With Endothelial Cells in the Presence of Endothelial Cell Conditioned Medium Induces Oxidant Stress Leading to Transendothelial Migration of Monocytes ». *Blood* 92 (10): 3924-35. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.10.3924>.
- Sun, Shu, Chen Jin, Jia Si, Ying Lei, Kunying Chen, Yueli Cui, Zhenbo Liu, *et al.* 2021. « Single-cell analysis of ploidy and the transcriptome reveals functional and spatial divergency in murine megakaryopoiesis ». *Blood* 138 (14): 1211-24. <https://doi.org/10.1182/blood.2021010697>.
- Sungaran, R., B. Markovic, et B. H. Chong. 1997. « Localization and Regulation of Thrombopoietin MRNa Expression in Human Kidney, Liver, Bone Marrow, and Spleen Using in Situ Hybridization ». *Blood* 89 (1): 101-7.
- Suzuki-Inoue, Katsue, David Tulasne, Yang Shen, Teresa Bori-Sanz, Osamu Inoue, Stephanie M. Jung, Masaaki Moroi, Robert K. Andrews, Michael C. Berndt, et Steve P. Watson. 2002. « Association of Fyn and Lyn with the Proline-Rich Domain of Glycoprotein VI Regulates Intracellular Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (24): 21561-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201012200>.
- Swanson, Karen V., Meng Deng, et Jenny P.-Y. Ting. 2019. « The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics ». *Nature Reviews. Immunology* 19 (8): 477-89. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.
- Tajika, K., K. Ikebuchi, K. Inokuchi, S. Hasegawa, K. Dan, S. Sekiguchi, T. Nakahata, et S. Asano. 1998. « IL-6 and SCF Exert Different Effects on Megakaryocyte Maturation ». *British Journal of Haematology* 100 (1): 105-11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00541.x>.

- Tang, Ning, Huan Bai, Xing Chen, Jiale Gong, Dengju Li, et Ziyong Sun. 2020. « Anticoagulant Treatment Is Associated with Decreased Mortality in Severe Coronavirus Disease 2019 Patients with Coagulopathy ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 18 (5): 1094-99. <https://doi.org/10.1111/jth.14817>.
- Taus, Francesco, Gianluca Salvagno, Stefania Canè, Cristiano Fava, Fulvia Mazzaferri, Elena Carrara, Varvara Petrova, et al. 2020. « Platelets Promote Thromboinflammation in SARS-CoV-2 Pneumonia ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40 (12): 2975-89. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315175>.
- Tedder, T. F., D. A. Steeber, A. Chen, et P. Engel. 1995. « The Selectins: Vascular Adhesion Molecules ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (10): 866-73.
- Telen, Marilyn J. 2016. « Beyond Hydroxyurea: New and Old Drugs in the Pipeline for Sickle Cell Disease ». *Blood* 127 (7): 810-19. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-618553>.
- Thiery, J. P., et M. Bessis. 1956. « [Mechanism of platelet genesis; in vitro study by cinemicrophotography] ». *Revue D'hématologie* 11 (2): 162-74.
- Thon, Jonathan N., Alejandro Montalvo, Sunita Patel-Hett, Matthew T. Devine, Jennifer L. Richardson, Allen Ehrlicher, Mark K. Larson, Karin Hoffmeister, John H. Hartwig, et Joseph E. Italiano. 2010. « Cytoskeletal Mechanics of Proplatelet Maturation and Platelet Release ». *The Journal of Cell Biology* 191 (4): 861-74. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006102>.
- Timson, J. 1975. « Hydroxyurea ». *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 32 (2): 115-31. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(75\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0165-1110(75)90002-0).
- Ting, Jenny P.-Y., Ruth C. Lovering, Emad S. Alnemri, John Bertin, Jeremy M. Boss, Beckley K. Davis, Richard A. Flavell, et al. 2008. « The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature ». *Immunity* 28 (3): 285-87. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.005>.
- Tong, Ming, Yu Jiang, Da Xia, Ying Xiong, Qing Zheng, Fang Chen, Lianhong Zou, Wen Xiao, et Yimin Zhu. 2020. « Elevated Expression of Serum Endothelial Cell Adhesion Molecules in COVID-19 Patients ». *The Journal of Infectious Diseases* 222 (6): 894-98. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa349>.
- Topol, E. J., T. V. Byzova, et E. F. Plow. 1999. « Platelet GPIIb-IIIa Blockers ». *Lancet (London, England)* 353 (9148): 227-31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11086-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11086-3).
- Totani, Licia, et Virgilio Evangelista. 2010. « PLATELET-LEUKOCYTE INTERACTIONS IN CARDIOVASCULAR DISEASE AND BEYOND ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (12): 2357-61. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207480>.
- Treon, Steven P., Jorge J. Castillo, Alan P. Skarbnik, Jacob D. Soumerai, Irene M. Ghobrial, Maria Luisa Guerrero, Kirsten Meid, et Guang Yang. 2020. « The BTK Inhibitor Ibrutinib May Protect against Pulmonary Injury in COVID-19-Infected Patients ». *Blood* 135 (21): 1912-15. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006288>.
- Tripette, Julien, Tamas Alexy, Marie-Dominique Hardy-Dessources, Daniele Mougenel, Eric Beltan, Tawfik Chalabi, Roger Chout, et al. 2009. « Red Blood Cell Aggregation, Aggregate Strength and Oxygen Transport Potential of Blood Are Abnormal in Both Homozygous Sickle Cell Anemia and Sickle-Hemoglobin C Disease ». *Haematologica* 94 (8): 1060-65. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.005371>.
- Turhan, Aslihan, Linnea A. Weiss, Narla Mohandas, Barry S. Collier, et Paul S. Frenette. 2002. « Primary Role for Adherent Leukocytes in Sickle Cell Vascular Occlusion: A New Paradigm ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (5): 3047-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.052522799>.

- Valdivia-Mazeyra, Mariel F., Clara Salas, Jesús M. Nieves-Alonso, Luz Martín-Fragueiro, Carmen Bárcena, Patricia Muñoz-Hernández, Karen Villar-Zarra, *et al.* 2021. « Increased Number of Pulmonary Megakaryocytes in COVID-19 Patients with Diffuse Alveolar Damage: An Autopsy Study with Clinical Correlation and Review of the Literature ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 478 (3): 487-96. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02926-1>.
- Vance, Russell E. 2015. « The NAIP/NLRC4 Inflammasomes ». *Current Opinion in Immunology* 32 (février): 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.010>.
- Varga-Szabo, David, Irina Pleines, et Bernhard Nieswandt. 2008. « Cell Adhesion Mechanisms in Platelets ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, mars. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.150474>.
- Vats, Ravi, Tomasz Brzoska, Margaret F. Bennewitz, Maritza A. Jimenez, Tirthadipa Pradhan-Sundd, Egemen Tutuncuoglu, Jude Jonassaint, *et al.* 2020. « Platelet Extracellular Vesicles Drive Inflammasome-IL-1 β -Dependent Lung Injury in Sickle Cell Disease ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 201 (1): 33-46. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1370OC>.
- Velavan, Thirumalaisamy P., et Christian G. Meyer. 2020. « The COVID-19 Epidemic ». *Tropical Medicine & International Health* 25 (3): 278-80. <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>.
- Versteeg, Henri H., Johan W. M. Heemskerk, Marcel Levi, et Pieter H. Reitsma. 2013. « New Fundamentals in Hemostasis ». *Physiological Reviews* 93 (1): 327-58. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>.
- Vetrie, D., I. Vorechovský, P. Sideras, J. Holland, A. Davies, F. Flinter, L. Hammarström, C. Kinnon, R. Levinsky, et M. Bobrow. 1993. « The Gene Involved in X-Linked Agammaglobulinaemia Is a Member of the Src Family of Protein-Tyrosine Kinases ». *Nature* 361 (6409): 226-33. <https://doi.org/10.1038/361226a0>.
- Vichinsky, E. P., L. D. Neumayr, A. N. Earles, R. Williams, E. T. Lennette, D. Dean, B. Nickerson, *et al.* 2000. « Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. National Acute Chest Syndrome Study Group ». *The New England Journal of Medicine* 342 (25): 1855-65. <https://doi.org/10.1056/NEJM200006223422502>.
- Vichinsky, Elliott, Carolyn C. Hoppe, Kenneth I. Ataga, Russell E. Ware, Videlis Nduba, Amal El-Beshlawy, Hoda Hassab, *et al.* 2019. « A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease ». *The New England Journal of Medicine* 381 (6): 509-19. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903212>.
- Vieira-de-Abreu, Adriana, Robert A. Campbell, Andrew S. Weyrich, et Guy A. Zimmerman. 2012. « Platelets: Versatile Effector Cells in Hemostasis, Inflammation, and the Immune Continuum ». *Seminars in Immunopathology* 34 (1): 5-30. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0286-4>.
- Villagra, José, Sruti Shiva, Lori A. Hunter, Roberto F. Machado, Mark T. Gladwin, et Gregory J. Kato. 2007. « Platelet Activation in Patients with Sickle Disease, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension, and Nitric Oxide Scavenging by Cell-Free Hemoglobin ». *Blood* 110 (6): 2166-72. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-061697>.
- V'kovski, Philip, Annika Kratzel, Silvio Steiner, Hanspeter Stalder, et Volker Thiel. 2021. « Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2 ». *Nature Reviews. Microbiology* 19 (3): 155-70. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
- Vogel, Sebastian, Taruna Arora, Xunde Wang, Laurel Mendelsohn, James Nichols, Darlene Allen, Arun S. Shet, Christian A. Combs, Zenaide M. N. Quezado, et Swee Lay Thein.

2018. « The Platelet NLRP3 Inflammasome Is Upregulated in Sickle Cell Disease via HMGB1/TLR4 and Bruton Tyrosine Kinase ». *Blood Advances* 2 (20): 2672-80. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018021709>.
- Vogel, Sebastian, Rebecca Bodenstein, Qiwei Chen, Susanne Feil, Robert Feil, Johannes Rheinlaender, Tilman E. Schäffer, *et al.* 2015. « Platelet-Derived HMGB1 Is a Critical Mediator of Thrombosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (12): 4638-54. <https://doi.org/10.1172/JCI81660>.
- Voskaridou, Ersi, Dimitrios Christoulas, Antonios Bilalis, Eleni Plata, Konstantinos Varvagiannis, George Stamatopoulos, Klio Sinopoulou, Aggeliki Balassopoulou, Dimitris Loukopoulos, et Evangelos Terpos. 2010. « The Effect of Prolonged Administration of Hydroxyurea on Morbidity and Mortality in Adult Patients with Sickle Cell Syndromes: Results of a 17-Year, Single-Center Trial (LaSHS) ». *Blood* 115 (12): 2354-63. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-221333>.
- Voskou, S., M. Aslan, P. Fanis, M. Phylactides, et M. Kleanthous. 2015. « Oxidative Stress in β -Thalassaemia and Sickle Cell Disease ». *Redox Biology* 6 (décembre): 226-39. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018>.
- Wahl, M. I., A. C. Fluckiger, R. M. Kato, H. Park, O. N. Witte, et D. J. Rawlings. 1997. « Phosphorylation of Two Regulatory Tyrosine Residues in the Activation of Bruton's Tyrosine Kinase via Alternative Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21): 11526-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11526>.
- Wang, Winfred C., Ronald W. Helms, Henry S. Lynn, Rupa Redding-Lallinger, Beatrice E. Gee, Kwaku Ohene-Frempong, Kim Smith-Whitley, *et al.* 2002. « Effect of Hydroxyurea on Growth in Children with Sickle Cell Anemia: Results of the HUG-KIDS Study ». *The Journal of Pediatrics* 140 (2): 225-29. <https://doi.org/10.1067/mpd.2002.121383>.
- Ware, Russell E. 2010. « How I Use Hydroxyurea to Treat Young Patients with Sickle Cell Anemia ». *Blood* 115 (26): 5300-5311. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-146852>.
- Ware, Russell E., Sherri A. Zimmerman, et William H. Schultz. 1999. « Hydroxyurea as an Alternative to Blood Transfusions for the Prevention of Recurrent Stroke in Children With Sickle Cell Disease ». *Blood* 94 (9): 3022-26. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.9.3022>.
- Watanabe, D., S. Hashimoto, M. Ishiai, M. Matsushita, Y. Baba, T. Kishimoto, T. Kurosaki, et S. Tsukada. 2001. « Four Tyrosine Residues in Phospholipase C-Gamma 2, Identified as Btk-Dependent Phosphorylation Sites, Are Required for B Cell Antigen Receptor-Coupled Calcium Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (42): 38595-601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103675200>.
- Watson, S. P., J. M. Auger, O. J. T. McCARTY, et A. C. Pearce. 2005. « GPVI and Integrin AIIb β 3 Signaling in Platelets ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (8): 1752-62. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01429.x>.
- Whang, Jennifer A., et Betty Y. Chang. 2014. « Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Rheumatoid Arthritis ». *Drug Discovery Today* 19 (8): 1200-1204. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.028>.
- White, J. G. 1969. « The Submembrane Filaments of Blood Platelets ». *The American Journal of Pathology* 56 (2): 267-77.
- White, James G. 2013. « Chapter 7 - Platelet Structure ». In *Platelets (Third Edition)*, édité par Alan D. Michelson, 117-44. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387837-3.00007-9>.

- WHO. 2019. *Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic*, 2019.
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- Williams, M. C., Y. Cao, A. Hinds, A. K. Rishi, et A. Wetterwald. 1996. « T1 Alpha Protein Is Developmentally Regulated and Expressed by Alveolar Type I Cells, Choroid Plexus, and Ciliary Epithelia of Adult Rats ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 14 (6): 577-85. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.14.6.8652186>.
- Williams, Thomas N., et David J. Weatherall. 2012. « World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (9): a011692. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011692>.
- Wit, Emmie de, Neeltje van Doremalen, Darryl Falzarano, et Vincent J. Munster. 2016. « SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses ». *Nature Reviews. Microbiology* 14 (8): 523-34. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.
- Woller, Geske, Ernst Brandt, Jessica Mittelstädt, Christian Rybakowski, et Frank Petersen. 2008. « Platelet Factor 4/CXCL4-Stimulated Human Monocytes Induce Apoptosis in Endothelial Cells by the Release of Oxygen Radicals ». *Journal of Leukocyte Biology* 83 (4): 936-45. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907592>.
- Wonerow, Peter, Andrew C. Pearce, David J. Vaux, et Steve P. Watson. 2003. « A Critical Role for Phospholipase Cgamma2 in AlphaIIb beta3-Mediated Platelet Spreading ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (39): 37520-29.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M305077200>.
- Wright, James Homer. 1906. « The Origin and Nature of the Blood Plates ». *The Boston Medical and Surgical Journal* 154 (23): 643-45. <https://doi.org/10.1056/NEJM190606071542301>.
- Wu, Ming-Fang, Szu-Ting Chen, An-Hang Yang, Wan-Wan Lin, Yi-Ling Lin, Nien-Jung Chen, I.-Shuen Tsai, Lei Li, et Shie-Liang Hsieh. 2013. « CLEC5A Is Critical for Dengue Virus-Induced Inflammasome Activation in Human Macrophages ». *Blood* 121 (1): 95-106.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-430090>.
- Wu, Yi, Naoki Asazuma, Kaneo Satoh, Yutaka Yatomi, Toshiro Takafuta, Michael C. Berndt, et Yukio Ozaki. 2003. « Interaction between von Willebrand Factor and Glycoprotein Ib Activates Src Kinase in Human Platelets: Role of Phosphoinositide 3-Kinase ». *Blood* 101 (9): 3469-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0806>.
- Wu, Yibing, Lisa M. Span, Patrik Nygren, Hua Zhu, David T. Moore, Hong Cheng, Heinrich Roder, William F. DeGrado, et Joel S. Bennett. 2015. « The Tyrosine Kinase C-Src Specifically Binds to the Active Integrin AIIbβ3 to Initiate Outside-in Signaling in Platelets ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (25): 15825-34.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648428>.
- Wu, Z.-H., C.-L. Ji, H. Li, G.-X. Qiu, C.-J. Gao, et X.-S. Weng. 2013. « Membrane Microparticles and Diseases ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17 (18): 2420-27.
- Wun, T., T. Paglieroni, C. L. Field, J. Welborn, A. Cheung, N. J. Walker, et F. Tablin. 1999. « Platelet-Erythrocyte Adhesion in Sick Cell Disease ». *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 47 (3): 121-27.
- Wun, T., T. Paglieroni, A. Rangaswami, P. H. Franklin, J. Welborn, A. Cheung, et F. Tablin. 1998. « Platelet Activation in Patients with Sick Cell Disease ». *British Journal of Haematology* 100 (4): 741-49. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00627.x>.
- Wun, T., T. Paglieroni, F. Tablin, J. Welborn, K. Nelson, et A. Cheung. 1997. « Platelet Activation and Platelet-Erythrocyte Aggregates in Patients with Sick Cell Anemia ».

- The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 129 (5): 507-16.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2143\(97\)90005-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2143(97)90005-6).
- Wun, Ted, Miguel Cordoba, Arun Rangaswami, Anthony W. Cheung, et Teresa Paglieroni. 2002. « Activated Monocytes and Platelet-Monocyte Aggregates in Patients with Sickle Cell Disease ». *Clinical and Laboratory Haematology* 24 (2): 81-88.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2002.00433.x>.
- Wun, Ted, Denis Soulieres, Andrew L. Frelinger, Lakshmanan Krishnamurti, Enrico M. Novelli, Abdullah Kutlar, Kenneth I. Ataga, *et al.* 2013. « A Double-Blind, Randomized, Multicenter Phase 2 Study of Prasugrel versus Placebo in Adult Patients with Sickle Cell Disease ». *Journal of Hematology & Oncology* 6 (février): 17.
<https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-17>.
- Xiao, Min, Yongkui Wang, Chen Tao, Zhenyu Wang, Jun Yang, Zhenguo Chen, Zhipeng Zou, *et al.* 2017. « Osteoblasts Support Megakaryopoiesis through Production of Interleukin-9 ». *Blood* 129 (24): 3196-3209. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-749838>.
- Yanaga, F., A. Poole, J. Asselin, R. Blake, G. L. Schieven, E. A. Clark, C. L. Law, et S. P. Watson. 1995. « Syk Interacts with Tyrosine-Phosphorylated Proteins in Human Platelets Activated by Collagen and Cross-Linking of the Fc Gamma-IIA Receptor ». *The Biochemical Journal* 311 (Pt 2) (Pt 2): 471-78. <https://doi.org/10.1042/bj3110471>.
- Yang, Xiaobo, Yuan Yu, Jiqian Xu, Huaqing Shu, Jia'an Xia, Hong Liu, Yongran Wu, *et al.* 2020. « Clinical Course and Outcomes of Critically Ill Patients with SARS-CoV-2 Pneumonia in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective, Observational Study ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 8 (5): 475-81. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5).
- Zafferani, Martina, Christina Haddad, Le Luo, Jesse Davila-Calderon, Liang-Yuan Chiu, Christian Shema Mugisha, Adeline G. Monaghan, *et al.* 2021. « Amilorides Inhibit SARS-CoV-2 Replication in Vitro by Targeting RNA Structures ». *Science Advances* 7 (48): eabl6096. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl6096>.
- Zahran, Asmaa M., Omnia El-Badawy, Wageeh A. Ali, Zainab Gaber Mahran, Essam Eldeen M. O. Mahran, et Amal Rayan. 2021. « Circulating microparticles and activated platelets as novel prognostic biomarkers in COVID-19; relation to cancer ». *PLoS ONE* 16 (2): e0246806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246806>.
- Zaid, Younes, Florian Puhm, Isabelle Allaeys, Abdallah Naya, Mounia Oudghiri, Loubna Khalki, Youness Limami, *et al.* 2020. « Platelets Can Associate With SARS-CoV-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19 ». *Circulation Research* 127 (11): 1404-18.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317703>.
- Zarbock, Alexander, Renata K. Polanowska-Grabowska, et Klaus Ley. 2007. « Platelet-Neutrophil-Interactions: Linking Hemostasis and Inflammation ». *Blood Reviews* 21 (2): 99-111. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2006.06.001>.
- Zhang, Dachuan, Chunliang Xu, Deepa Manwani, et Paul S. Frenette. 2016. « Neutrophils, Platelets, and Inflammatory Pathways at the Nexus of Sickle Cell Disease Pathophysiology ». *Blood* 127 (7): 801-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-618538>.
- Zhang, Datong, He Gong, et Fancui Meng. 2021. « Recent Advances in BTK Inhibitors for the Treatment of Inflammatory and Autoimmune Diseases ». *Molecules* 26 (16): 4907.
<https://doi.org/10.3390/molecules26164907>.
- Zhang, Guoying, Jingyan Han, Emily J. Welch, Richard D. Ye, Tatyana A. Voyno-Yasenetskaya, Asrar B. Malik, Xiaoping Du, et Zhenyu Li. 2009. « Lipopolysaccharide Stimulates Platelet Secretion and Potentiates Platelet Aggregation via TLR4/MyD88 and the CGMP-

- Dependent Protein Kinase Pathway ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (12): 7997-8004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802884>.
- Zhang, Guoying, Binggang Xiang, Shaojing Ye, Magdalena Chrzanowska-Wodnicka, Andrew J. Morris, T. Kent Gartner, Sidney W. Whiteheart, Gilbert C. White, Susan S. Smyth, et Zhenyu Li. 2011. « Distinct Roles for Rap1b Protein in Platelet Secretion and Integrin AIIb β 3 Outside-in Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (45): 39466-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.239608>.
- Zhang, Si, Yangyang Liu, Xiaofang Wang, Li Yang, Haishan Li, Yuyan Wang, Mengduan Liu, et al. 2020. « SARS-CoV-2 Binds Platelet ACE2 to Enhance Thrombosis in COVID-19 ». *Journal of Hematology & Oncology* 13 (1): 120. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00954-7>.
- Zhong, Yifei, Anna Kinio, et Maya Saleh. 2013. « Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases ». *Frontiers in Immunology* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00333>.
- Zhou, Peng, Xing-Lou Yang, Xian-Guang Wang, Ben Hu, Lei Zhang, Wei Zhang, Hao-Rui Si, et al. 2020. « A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin ». *Nature* 579 (7798): 270-73. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- Zhou, Rongbin, Amir S. Yazdi, Philippe Menu, et Jürg Tschopp. 2011. « A Role for Mitochondria in NLRP3 Inflammasome Activation ». *Nature* 469 (7329): 221-25. <https://doi.org/10.1038/nature09663>.
- Zhu, Na, Dingyu Zhang, Wenling Wang, Xingwang Li, Bo Yang, Jingdong Song, Xiang Zhao, et al. 2020. « A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 ». *The New England Journal of Medicine* 382 (8): 727-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.