



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

Chers amis, chers collègues,

C'est avec plaisir que nous vous convions à la 11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM), du 8 au 9 octobre 2024 à Saint-Etienne.

La 11<sup>ème</sup> Rencontre du CFPM sera pour nous l'occasion d'échanger sur nos avancées et de renforcer nos liens et collaborations scientifiques. Ainsi de nombreux travaux s'intéressant à des thématiques variées allant de l'hémostase à pathologie plaquettaire et megacaryocytaire, en passant par la transfusion et le système nerveux central, seront abordés par chercheurs, cliniciens et étudiants de nos différentes équipes.

Nous sommes également heureux et fiers de vous accueillir pour la première fois dans notre "Sainté", le diminutif affectueux que les stéphanois donnent à leur ville. Après avoir "fait ses armes" dans le secteur industriel et minier, Sainté s'est résolument tournée vers le Design, le Numérique et l'Optique, des pôles très fortement représentés au sein du Campus où nous nous retrouverons, ainsi que dans la Cité du Design qui le jouxte.

Nous vous ferons aussi partager des saveurs locales au cours du repas de gala qui se déroulera à la Fabuleuse Cantine, à deux pas du lieu du Congrès, où nous ferons de notre mieux pour témoigner de l'esprit collectif et de la convivialité qui caractérisent si bien les stéphanois et dont les membres du comité local d'organisation espèrent pouvoir être des dignes représentants.

Dans la joie vous accueillir, pour faire bouillir ensemble le "chaudron scientifique", nous vous disons à bientôt à **Sainté !**

Fabrice COGNASSE, pour l'équipe d'organisation stéphanoise

## **COMITÉ**

Membres du comité d'organisation local, Saint-Etienne (SAINBIOSE U1059 – UJM/EMSE/INSERM/EFS)

Fabrice COGNASSE  
Hind HAMZEH-COGNASSE  
Anne Claire DUCHEZ  
Marco HEESTERMANS  
Amélie PRIER  
Marie-Ange EYRAUD  
Charles-Antoine ARTHAUD  
Victorine MAILLOT

Membres du comité national

Pr Marie-Christine ALESSI  
Dr Fabrice COGNASSE  
Dr Marie-Pierre GRATACAP  
Dr Benoît HO-TIN-NOE  
Dr Alexandre KAUSKOT  
Dr Pierre MANGIN  
Dr Hana RASLOVA

## **LIEU DU CONGRÈS**

Télécom Saint-Etienne  
25 rue du Dr Remy Annino  
42000 Saint-Etienne

## **CONTACTS**

Fabrice COGNASSE  
Faculté de Médecine  
SAINBIOSE INSERM U1059  
Campus Santé Innovations  
10 rue de la Marandière  
42270 Saint-Priest-en-Jarez  
0683975883 / 0477421400  
fabrice.cognasse@univ-st-etienne.fr



11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
 Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024

## Sponsors de la 11ème Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM) - Université de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024





**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**



**télécom  
saint-étienne**  
école d'ingénieurs  
nouvelles technologies

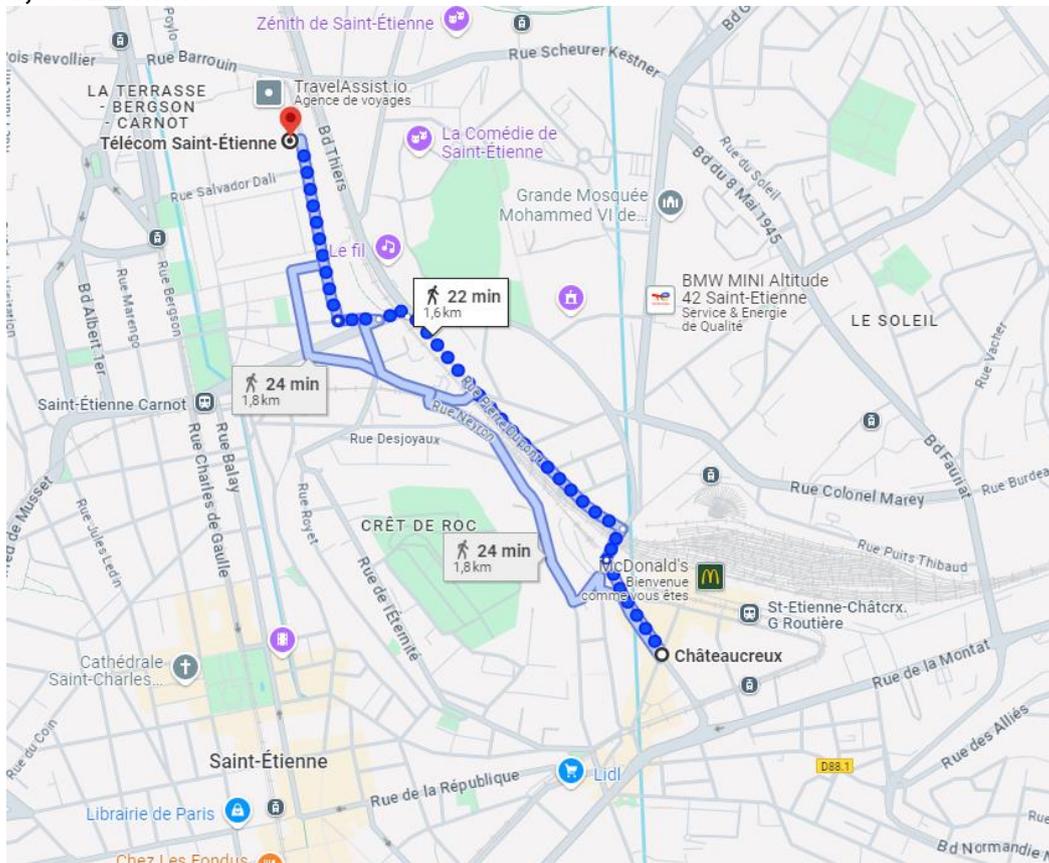
**Lieu du congrès : ÉCOLE D'INGENIEURS TELECOM ST-ETIENNE**

<https://www.telecom-st-etienne.fr>

Télécom Saint-Etienne  
25 rue du Dr Remy Annino  
42000 Saint-Etienne, FR



**Telecom, Accès depuis la gare de Saint-Etienne Châteaureux :  
A pied, en 22 minutes :**



Prendre la direction N-O sur Esplanade de France vers Avenue Denfert Rochereau  
Continuer sur rue du Sergent Rivière pendant 140 m  
Continuer sur rue Cugnot sur 76 m  
Passer sous le pont de la voie ferrée rue Ferdinand  
Prendre à gauche sur rue Pierre Dupont pendant 700 m  
Prendre à gauche sur Boulevard Jules Janin et traverser pour prendre la Rue  
Ampère sur 100 m  
Prendre à droite sur rue Dr Rémy Annino pendant 400 m pour arriver à Télécom  
Saint-Etienne sur la gauche



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**En tramway direct, en 21 minutes :**

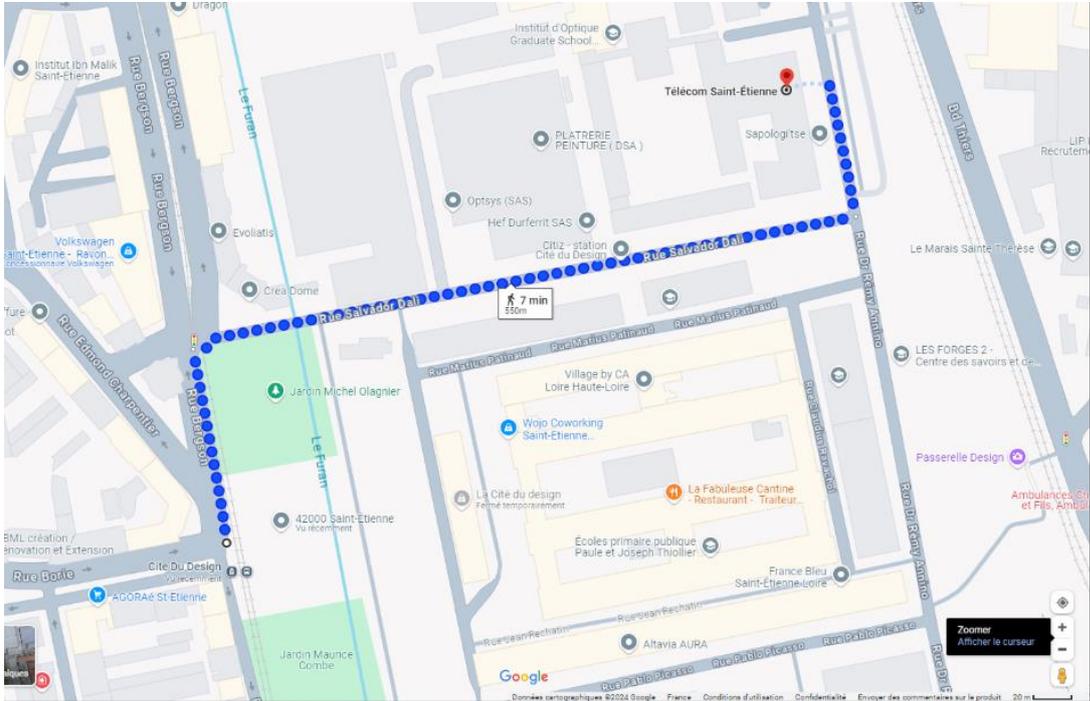
Prendre la ligne T2 direction « Cité du Design »  
Descendre à l'arrêt « Cité du Design » (14min, 8 arrêts)



Poursuivre à pied (7min au total) sur la rue Bergson sur 100m  
Prendre à 1<sup>ère</sup> à droite et suivre la rue Salvador Dali sur 350m  
Au bout de la rue, prendre à gauche la rue Dr Rémy Annino et suivre sur 70m pour  
arriver à Télécom Saint-Etienne sur la gauche



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**



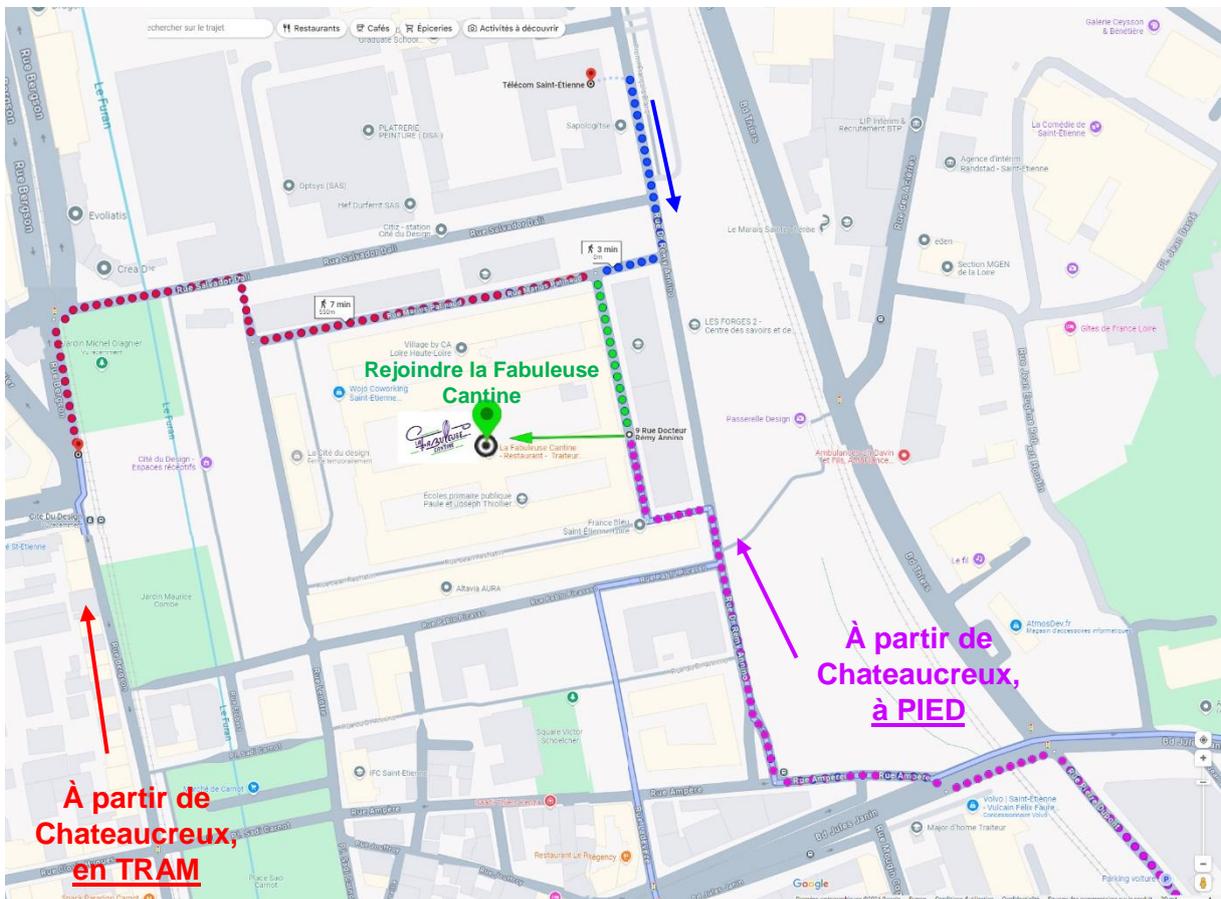


**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**REPAS/SOIREE SUR RESERVATION :  
LA FABULEUSE CANTINE A PARTIR DE  
18H30**



**Accès**



- **depuis la gare de Saint-Etienne Châteaureux**  
Suivre le même itinéraire que celui pour se rendre à Télécom Saint-Etienne à pied (trajet rose) ou en tram (trajet rouge) jusqu'à la rue Dr Rémy Annino puis, se référer au plan ci-dessus.
- **depuis Télécom Saint-Etienne**  
reprendre la rue Dr Rémy Annino en direction de la Cité du Design (trajet bleu), puis se référer au plan ci-dessus.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**11ème Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes  
(CFPM) - Université de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**MARDI 08 OCTOBRE**

**Accueil des participants – Café (hall de l'Ecole d'ingénieurs Télécom St-Etienne) -  
9h00–9h45**

**Introduction - 9h45-10h**

**Session I / Pathologies mégacaryocytaires plaquettaires - 10h00–12h15  
(Chairpersons : Fernando REAL & Alexandre KAUSKOT)**

- **Hana RASLOVA** (Paris) – 30 min – Dérégulation de l'axe p19/CDK4/CDK6 conduit au développement de néoplasmes myéloprolifératifs et de myélofibrose
- **Catherine LEON** (Strasbourg) – 30 min – Les forces mécaniques au cœur de la biogénèse des plaquettes
- **Christilla BACHELOT-LOZA** (Paris) – 30 min – Piezo1 : un nouvel acteur dans l'hémostase
- **Noemie JOLLIVE** (Strasbourg) – 15 min - Etude des contraintes mécaniques dans la thrombopoïèse et développement d'une barrière Sang-Moelle osseuse sur puce
- **Elsa BARRE** (Strasbourg) – 15 min - La délétion ciblée de Shp1 et Shp2 dans la lignée MK/plaquettaire altère la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse murine
- **Alexandra MAZHARIAN** (Strasbourg) – 15 min - La délétion de Shp2 par CRISPR/Cas9 impacte la mégacaryopoïèse humaine

**Session II / Sponsors - 12h20–12h45**

- STAGO
- St Etienne METROPOLE
- UJM
- INSERM
- MHEMO
- SFH
- SFTH
- Télécom de St Etienne
- Amis de Rémi
- EFS

**Déjeuner (hall de l'Ecole d'ingénieur Telecom de St Etienne) - 12h45-14h15**

**Session III / Transfusion plaquettaire- 14h15–16h00  
(Chairpersons : Blandine MAITRE & Anne Claire DUCHEZ)**

- **Jean-Marc BERGER & Isabelle CHAUD** (Savigneux) – 10 min - Association « Les amis de Rémi »
- **Cecile AUBRON** (Brest) – 30 min – Transfusion plaquettaire et rendement transfusionnel chez les patients de réanimation
- **Blandine MAITRE** (Strasbourg) – 30 min – Les allo-anticorps anti-HLA-I dans les états réfractaires : des mécanismes aux perspectives thérapeutiques
- **Anne Claire DUCHEZ** (St Etienne) – 15 min - Impact de l'âge des donneurs sur les concentrés plaquettaires et leur transfusion



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

- **Gabriel ROJAS JIMENEZ (Strasbourg)** – 15 min - Liver and spleen serve as graveyards for allogeneic platelets thanks to macrophages during HLA Class I transfusion refractoriness

**Pause - 16h00 –16h30**

**Session IV / Hémostase / Coagulation et Plaquette - 16h30 –18h00  
(Chairpersons : Julien DEMAGNY & Georges JOURDI)**

- **Marco HEESTERMANS (St Etienne)** – 30 min – Characterization of the Inflammatory Platelet Phenotype during Chronic VTE Sequels (the ROT-PLAT-VTE study)
- **Karin SADOUL (Grenoble)** – 30 min – Les sources d'énergie pour la réorganisation du cytosquelette dans les plaquettes activées
- **Alexandra YAKUSHEVA (Strasbourg)** – 15 min - Fibrin silences the hemostatic plug
- **Brigitte TARDY (St Etienne)** – 15 min - Rôle du TFPI dans les manifestations hémorragiques de l'hémophilie

**Repas/soirée sur réservation :**

**La Fabuleuse Cantine  
à partir de 18h30**





**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Mercredi 09 octobre**

**Accueil des participants – Café (hall de l'Ecole d'ingénieurs Télécom de St Etienne) - 8h00–8h45**

**Session V / Plaquette, cerveau et système nerveux central –8h45 –10h00  
(Chairpersons : Benoît HO-TIN-NOE & Fabrice COGNASSE)**

- **Georges JOURDI** (Paris) - 30 min – Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) : nouvel acteur en hémostase et thrombose ?
- **Jean Philippe DESILLES** (Paris) - 30 min – Nouveaux antiplaquettaires d'action immédiate à la phase aigüe des AVC ischémiques
- **Sophie MELICINE** (Paris) - 15 min - Inhibition du BDNF endogène par un anticorps monoclonal murin (mAb#9) : impact sur les fonctions plaquettaires, la coagulation et la fibrinolyse

**Pause - 10h00–10h15**

**Session VI / Platelets / Cancer / Thrombose - 10h15 –12h15  
(Chairpersons : Hana RASLOVA & Marie Cécile MICHALLET)**

- **Géraldine POENOU** (Saint-Etienne) – 30 min - Nouvelles pistes pour le rôle des plaquettes dans la maladie veineuse thromboembolique en lien avec le cancer
- **Laurence PANICOT DUBOIS** (Marseille) – 30 min - Rôle du neutrophile dans la thrombose artérielle et veineuse
- **Sonia SEVERIN** (Toulouse) – 30 min - Influence réciproque entre les plaquettes sanguines et le tissu hépatique en contexte de maladies métaboliques
- **Johanna AUGROS** (Tours) – 15 min - Comparaison des effets pro-thrombotiques des anticorps anti-PF4 développés au cours des TIH et VITT
- **Julien DEMAGNY** (Amiens) – 15 min - Diagnostic des thrombopénies induites à l'héparine par imagerie en flux

**Déjeuner (hall de l'Ecole d'ingénieur Télécom de St Etienne) - 12h15-13h30**

**Session VII / Biologie des plaquettes / cytosol et organite / Pathologie auto-immune - 13h30–15h15  
(Chairpersons : Karin SADOUL & Frédéric ADAM)**

- **Fernando REAL** (Lille) – 30 min - Megakaryocytes are new players in viral persistence
- **Marie Cécile MICHALLET** (Lyon) – 30 min - Gene signature of circulating platelet-bound neutrophils is associated with poor prognosis in cancer patients
- **Toscane VIELLARD** (Paris) – 15 min - Une nouvelle mutation de la tubuline  $\beta$ 1 associée à un profil prothrombotique dépendant de l'axe GPVI et de la sécrétion
- **Franciele de LIMA** (Lyon) – 15 min - Do mitochondria-derived reactive oxygen species modulate platelet activation and aggregation
- **Jean SOLARZ** (Paris) – 15 min - Contrôle mécanosensible de la dynamique de l'actine dans la fonctionnalité de la GPIIb $\alpha$  par MICAL1

**Remise du prix de la meilleure communication et conclusion - 15h15–15h30h**



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

## **Résumé des Communications orales**

### **Dérégulation de l'axe p19/CDK4/CDK6 conduit au développement de néoplasmes myéloprolifératifs et de myélofibrose**

*RASLOVA Hana, INSERM, UMR1287, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France, Equipe labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer*

La myélofibrose primaire (MFP), la thrombocytémie essentielle (TE) et la polyglobulie de Vaquez (PV) font partie des néoplasmes myéloprolifératifs (NMPs) BCR-ABL négatifs et sont caractérisées par l'hyperprolifération des lignages myéloïdes incluant les mégacaryocytes (MKs). Cette hyperprolifération, due dans environ 50% des cas à la mutation JAK2V617F peut conduire au développement d'une hématopoïèse extramédullaire (HEM) et à une MF, dont les acteurs majeurs sont les MKs. L'utilisation d'inhibiteurs de JAK2, tels que le ruxolitinib ou le fédératinib, diminue les symptômes de la MF, mais n'a d'effet ni sur la progression ni sur la résorption de la MF et le seul traitement efficace est la greffe de moelle osseuse. En effet, ces inhibiteurs ne sont pas sélectifs de la signalisation anormale liée à JAK2V617F. Il est donc d'intérêt d'identifier et d'inhiber les cibles en aval de JAK2V617F. Les voies de signalisation activées par JAK2V617F induisent la survie cellulaire et la transition du cycle cellulaire G1/S en activant les kinases dépendantes des cyclines CDK4/6. Récemment il a été montré que l'expression et l'activité de CDK6 étaient augmentées dans les progéniteurs hématopoïétiques Jak2V617F et que l'absence de CDK6 induisait la correction du phénotype NMP muté Jak2V617F chez la souris. De l'autre côté, p19INK4D, un inhibiteur de CDK4/6, est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire des MKs et l'arrêt des endomitoses. Sa délétion entraîne, l'amplification de MKs hyperlobés associée à une augmentation de la concentration de TGF- $\beta$ 1 et le développement de fibrose avec l'âge. L'ensemble de ces données suggèrerait que la voie p19/CDK4/CDK6 au niveau des MKs pourrait jouer un rôle dans le développement de la MF dans le contexte JAK2V617F. En effet, nous avons montré que la diminution de l'expression de p19INK4D dans les MKs de patients TE ou de souris, tous deux mutés JAK2V617F est corrélée à l'augmentation de la ploïdie alors que celle de CDK6 n'est pas affectée. Pour étudier, la contribution de l'axe de p19/CDK4/CDK6 sur la dysmégacaryopoïèse et le développement de la MF, l'effet de la délétion de p19 (KO p19) a été étudié dans les souris hétérozygotes knock-in (KI) Jak2V617F conditionnel. Contrairement aux souris KI Jak2V617F qui développent une MF sévère à partir de 6 mois post-induction de Jak2V617F, toutes les KOp19/KI Jak2V617F développent une MF de grade I dès 3 semaines post-induction de Jak2V617F qui progresse en MF sévère à partir de 8 semaines. Les souris KOp19/KI Jak2V617F sont caractérisées par l'accélération du phénotype observé chez les KI Jak2V617F avec l'établissement de l'HEM plus rapide, une hyperplasie mégacaryocytaire avec l'activation spontanée des MKs au niveau de la moelle osseuse entraînant l'augmentation de TGF- $\beta$ 1 total et actif. Le traitement des souris KI Jak2V617F, KOp19/KI Jak2V617F avec du palbociclib (PB), inhibiteur de CDK4/CDK6 diminue l'HEM, l'hyperplasie mégacaryocytaire et prévient le développement de fibrose. De plus le PB cible spécifiquement les progéniteurs Jak2V617F chez les souris et chez les patients PV et TE avec un effet inhibiteur sélectif sur les clones hétérozygotes JAK2V617F. En conclusion, la dérégulation de l'axe p19/CDK4/CDK6 joue un rôle important dans le développement de NMP, p19 étant dérégulé dans les MKs et CDK6 dans les progéniteurs précoces. Le ciblage de cet axe pourrait représenter un outil thérapeutique efficace dans le traitement de NMP et MF.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Les forces mécaniques au cœur de la biogénèse des plaquettes**

*Catherine Léon, Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, F-67000  
Strasbourg, France*

Les plaquettes sanguines sont produites par les mégacaryocytes (MK) logés dans la moelle osseuse. Une fois parvenu à maturité, le MK transperce le vaisseau sinusoïde pour étendre une protrusion dans la circulation. Celle-ci sera soit libérée directement en (pré)plaquette par bourgeonnement ou s'allongera en proplaquette qui sera alors fragmentée dans la microcirculation avale. Les mécanismes qui contrôlent l'ensemble du processus menant à la formation des plaquettes sont complexes. Ils résultent de l'action combinée du microenvironnement médullaire sur le MK, comprenant à la fois des cytokines, la matrice extracellulaire, les autres cellules ainsi que les facteurs mécanobiologiques. Ces derniers sont eux-mêmes multiples, englobant au sein de la moelle les contraintes mécaniques provenant de la rigidité du tissu, du confinement créé par les cellules adjacentes ou de la topographie de la matrice. Il semble maintenant clair que ces multiples contraintes mécaniques jouent un rôle à différents niveaux. Celles-ci impactent positivement la différenciation des MKs comparé à un milieu liquide. En revanche, ces contraintes contrôlent négativement la formation des plaquettes. La rigidité et le confinement augmentent l'activation des Rho GTPases, favorisant une forte tension intracellulaire, et empêchant ainsi la libération inappropriée de plaquettes. Une diminution de ces contraintes au sein de la moelle entraîne la formation ectopique de proplaquettes et plaquettes. Une fois la protrusion initiale dans le vaisseau sinusoïde, la transition entre milieu confiné et milieu liquide entraîne une diminution de la contractilité intracellulaire, favorisant le bourgeonnement et l'extension des proplaquettes. A ce stade, les forces hémodynamiques telles que la force de trainée contribuent à l'extension des proplaquettes. Enfin, le passage transendothélial lui-même résulte d'un dialogue entre MK et cellule endothéliale, probablement en partie d'origine mécanobiologique. Comment les cellules endothéliales réagissent aux forces protrusives des MKs pour la formation des pores endothéliaux, comment les contraintes mécaniques du tissu médullaire impactent les cellules endothéliales et quelles en sont les conséquences sur les mécanismes d'intravasation des proplaquettes sont également des questions en cours d'investigation. Ainsi, si l'impact des forces mécaniques sur le comportement des cellules en général et leur adaptation à l'environnement est maintenant bien reconnue, ces forces semblent jouer un rôle particulièrement important dans la régulation de la formation des plaquettes du fait des environnements mécaniques radicalement différents auxquels sont soumis les MKs durant l'ensemble du processus.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Piezo1 : un nouvel acteur dans l'hémostase**

*Aurore Marchelli<sup>1</sup>, Julien Demagny<sup>1,2</sup>, Emma Ziessel<sup>1</sup>, Pascale Gaussem<sup>1,3</sup>, Christilla Bachelot-Loza<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>UMRS1140 Faculté de Pharmacie, Université Paris Cité, Paris*

*<sup>2</sup>HEMATIM UE4666, Univ. Picardie Jules Verne, Amiens*

*<sup>3</sup>Service d'hématologie biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, APHP, Paris*

L'importance des mécanotransducteurs a été soulignée par l'attribution du prix Nobel de médecine et de physiologie 2021 à Ardem Patapoutian et David Julius pour leur découverte de transducteurs thermiques et mécaniques, dont Piezo1.

Piezo1 est un canal ionique activé mécaniquement qui présente une conductance préférentielle pour les ions calcium ( $Ca^{2+}$ ). Exprimé dans de nombreux tissus sensibles aux forces mécaniques, sa fonction au cours de divers processus biologiques a été décrite, aussi variés que l'hématopoïèse, l'homéostasie du fer ou la fonction endothéliale.

Les altérations géniques à l'origine d'anomalies quantitatives ou qualitatives de Piezo1 sont responsables de plusieurs maladies héréditaires, telles que le lymphœdème primaire et la xérocitose héréditaire (XH). La XH, également nommée stomatocytose héréditaire avec hématies déshydratées, résulte dans 90% des cas de mutations responsables d'un gain de fonction de Piezo1. Diverses manifestations clinico-biologiques telles qu'une anémie hémolytique, un œdème périnatal, une hyperferritinémie caractérisent cette pathologie. De plus, la splénectomie autrefois fréquemment pratiquée est actuellement contre-indiquée car elle s'accompagne systématiquement de complications thromboemboliques veineuses ou artérielles.

Nous présenterons les différents travaux de la littérature démontrant le rôle de Piezo1 dans l'hémostase, travaux basés soit sur des modèles pathologiques, soit qui utilisent un activateur chimique Yoda1. Plus récemment, deux modèles pré-cliniques ont permis d'approfondir l'implication de Piezo1 dans la mégacaryopoïèse et l'activation plaquettaire : un modèle d'inactivation de Piezo1 spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire, développé par Catherine Léon, et un modèle KI gain de fonction que nous avons développé.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Etude des contraintes mécaniques dans la thrombopoïèse et développement d'une barrière Sang-Moelle osseuse sur puce**

Noémie Brassard-Jollive<sup>1</sup>, Laurie Ruch<sup>1</sup>, Josiane Weber<sup>1</sup>, Paul Johnson<sup>1</sup>, Nathalie Brouard<sup>1</sup>, Dominique Collin<sup>2</sup>, Thiebault Lequeu<sup>1</sup>, Clara Ramón-Lozano<sup>3</sup>, Anita Eckly<sup>1</sup>, Catherine Strassel<sup>1</sup>, François Gastaud<sup>4</sup>, Abdul I Barakat<sup>3</sup> et Catherine Léon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR\_S1255, INSERM, Etablissement Français du Sang-Grand Est, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Institut Charles Sadron, UPR 22, Strasbourg, France

<sup>3</sup>LadHyX, CNRS, Ecole polytechnique, Institut polytechnique de Paris, Palaiseau, France

<sup>4</sup> Institut de Chirurgie Orthopédique et Sportive à Strasbourg (ICOSS), Strasbourg, France

La thrombopoïèse regroupe les étapes finales de maturation des mégacaryocytes (MKs) dont la formation de podosomes créant des pores transendothéliaux à travers lesquels le MK envoie une protrusion. Lors de ce processus, les cellules endothéliales de moelle osseuse (BMECs) et les MKs sont soumis à différents stress mécaniques qui sont liés au stroma (rigidité, topographie de la matrice), au flux sanguin (cisaillement, étirements du vaisseau) et aux interactions cellulaires (courbures de membrane, étirements de membranes). Ces contraintes physiques peuvent être modifiées dans des contextes physiopathologiques telles que le vieillissement ou la myélofibrose, et il est primordial de comprendre leur rôle dans le processus global de formation des plaquettes sanguines. Notre hypothèse étant que non seulement les MKs mais aussi les BMECs ressentent ces forces et dialoguent pour faciliter le passage des protrusions, nous avons décidé d'étudier la mécanosensibilité des MKs et des BMECs, d'une part isolément, puis de manière combinée en développant un modèle intégré reproduisant la barrière Sang-Moelle sur puce.

Il avait été précédemment montré que les MKs ressentent la rigidité en milieu 3D en utilisant un hydrogel inerte. Nous utilisons ici des hydrogels de collagène I présentant différentes rigidités/ topographies pour mimer la présence du réseau de matrice dans une moelle saine ou fibreuse. *A contrario* du milieu liquide ou de l'hydrogel inerte, la culture en gel induit la formation de podosomes, suggérant des interactions avec la matrice extracellulaire, mimant ainsi l'environnement *in vivo*. Nous observons une différenciation optimale au sein du gel le plus mou (2 mg/mL,  $E=48\pm 9$  Pa) alors que le milieu liquide ou l'augmentation de la rigidité (4 et 6 mg/mL,  $E=222\pm 30$  et  $384\pm 15$  Pa) altèrent leur différenciation.

La mécanosensibilité des BMECs a été étudiée en les cultivant sur des substrats de PDMS présentant différentes rigidités (1,5 et 90 kPa) ou sous un flux laminaire unidirectionnel associé à des forces de cisaillement de 5 (physiologiques) et 20 (pathologiques) dyn/cm<sup>2</sup>. Leur réponse a été comparée à celle des cellules endothéliales microvasculaires de poumons (LECs), continuellement soumises à des stress mécaniques lors de la respiration. Pour les deux types cellulaires, le substrat rigide augmente la formation de fibres de stress et l'étalement des cellules. En revanche, les BMECs répondent de manière plus intense à une élévation des forces de cisaillement par rapport aux LECs, se traduisant par un alignement plus important du cytosquelette d'actine et des noyaux dans le sens du flux dès 5 dyn/cm<sup>2</sup>. De manière intéressante, l'augmentation de la rigidité et/ou des forces de cisaillement induit une diminution de la VE-cadhérine, qui s'organise de manière discontinue au niveau des jonctions des BMECs, indiquant une modification de la perméabilité de la barrière endothéliale.

Ces travaux montrent que les contraintes physiques affectent fortement la différenciation des MKs et les jonctions adhérentes des BMECs. Pour étudier le dialogue MK-BMEC et le passage trans-endothélial, nous avons développé un modèle de barrière Sang-Moelle *in vitro*. Ce modèle consiste en un canal de 120 microns de diamètre perfusable, tapissé par des BMECs au sein d'une matrice de collagène I contenant des progéniteurs mégacaryocytaires. Nous utiliserons ce modèle pour moduler isolément ou en combinaison les différentes contraintes mécaniques et tester leur impact sur la transmigration des plaquettes.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**La délétion de Shp2 par CRISPR/Cas9 impacte la mégacaryopoïèse humaine**

*Eugénie Schaeffer<sup>1</sup>, Desline Hennequin<sup>1</sup>, Christian Di Buduo<sup>2</sup>, Alessandra Balduin<sup>2</sup>, Yotis A. Senis<sup>1</sup>,  
Alexandra Mazharian<sup>1</sup>*

*1 Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France*

*2 Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*

*3 Department of Biomedical Engineering, Tufts University, Medford, United States.*

Introduction : La protéine-tyrosine phosphatase 2 (Shp2), codée par le gène de la protéine-tyrosine phosphatase non réceptrice de type 11 (PTPN11) et contenant le domaine d'homologie Src 2, est largement exprimée et est reconnu comme régulateur positif de la signalisation des récepteurs des cytokines et des facteurs de croissance, y compris le récepteur de la thrombopoïétine (Tpo) de la leucémie myéloproliférative (Mpl) dans les mégacaryocytes (MK) et les plaquettes. Elle joue un rôle majeur dans de nombreuses réponses cellulaires telles que la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire. Des résultats antérieurs obtenus chez des souris knock-out conditionnelles (KO) Shp2 générées à l'aide de la souche délétère Pf4-Cre ont révélé que Shp2 est un régulateur positif des voies Ras-MAPK et PI3K-AKT en aval de Mpl dans les MK, garantissant une mégacaryopoïèse et une thrombopoïèse efficaces. Cependant, son rôle dans les MK humains n'a pas été examiné.

Objectifs : Éclaircir le rôle de Shp2 dans la régulation du développement des MK humains dérivés des cellules précurseurs hématopoïétique CD34+.

Méthodes : Pour étudier la fonction de Shp2 dans la mégacaryopoïèse humaine, nous avons utilisé l'inhibiteur allostérique de Shp2 SHP099 et la technique CRISPR/Cas9 pour abolir génétiquement PTPN11 dans les cellules précurseurs hématopoïétiques CD34+. Les effets sur la mégacaryopoïèse, la production de plaquettes et la signalisation ont été évalués par cytométrie de flux et par immunodosage capillaire.

Résultats : Le traitement de cellules hématopoïétiques CD34+ en présence de 10  $\mu$ M de SHP099 a eu un effet mineur sur la viabilité cellulaire. Cependant, il induit une forte inhibition de la prolifération, du développement et de la maturation des MK, avec une diminution du nombre de MK matures, une réduction de la ploïdie et une réduction significative des MK proplaquettaires. Le SHP099 inhibe également le nombre de plaquettes libérées par les MK humains dans le modèle de niche de moelle osseuse en fibre de soie 3D, démontrant que l'activité de Shp2 est nécessaire à la production des plaquettes. Une délétion efficace du gène Shp2 par CRISPR/Cas9 a été réalisée dans les cellules précurseurs CD34+, conduisant à la perte de l'expression protéique de Shp2 et à une réduction significative de l'expansion cellulaire. La suppression de Shp2 de cette manière a entravé la maturation des MK et de la libération des plaquettes. L'inhibition pharmacologique et la délétion génétique de Shp2 dans les MK humains ont également conduit à une perte de la phosphorylation d'ERK1/2 et AKT induite par la Tpo.

Conclusions : Shp2 est un régulateur positif essentiel de la mégacaryopoïèse humaine, de la thrombopoïèse et de la signalisation Mpl.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**La délétion ciblée de Shp1 et Shp2 dans la lignée MK/plaquettaire altère la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse murine**

*Elsa Barré<sup>1</sup>, Marc-Damien Lourenco-Rodrigues<sup>1</sup>, Desline Hennequin<sup>1</sup>, Lucie Zimmermann<sup>1</sup>, Amandine Girard<sup>1</sup>, Anita Eckly<sup>1</sup>, Yotis A. Senis<sup>1</sup>, Alexandra Mazharian<sup>1</sup>*

*1, Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France*

Contexte : Les protéines tyrosines phosphatases 1 et 2 (respectivement PTPN6 et PTPN11), également connues sous le nom de PTP 1 et 2 (Shp1 et Shp2) sont largement exprimées et jouent un rôle essentiel dans la régulation de la signalisation des récepteurs des cytokines et des facteurs de croissance, y compris le récepteur de la thrombopoïétine (Tpo) de la leucémie myéloproliférative (Mpl) dans les mégacaryocytes (MK) et les plaquettes. Nous avons précédemment montré que la délétion ciblée de Shp1 et/ou Shp2 dans la lignée MK/plaquettes à l'aide du transgène Pf4-Cre a un impact négatif sur la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse. Cependant, en raison de la fuite bien documentée du transgène Pf4-Cre, nous ne pouvons pas conclure définitivement les fonctions physiologiques de Shp1 et Shp2 dans la lignée MK/plaquettaire. Pour cela, il a été mis en place un nouvel modèle murin plus spécifique de la lignée MK/plaquettes à l'aide du transgène Gp1ba-Cre.

Objectifs : Étudier les fonctions distinctes et synergiques de Shp1 et Shp2 dans la régulation du développement et de la fonction des MK/plaquettes et de la signalisation Mpl chez la souris.

Méthodes : Des souris déficientes en Shp1 et/ou Shp2 ont été générées en croisant des souris floxées-Shp1 et -Shp2 avec la souris transgénique Gp1ba-Cre. L'agrégation plaquettaire, le développement, la maturation et la fonction des MK, ainsi que la signalisation Mpl ont été mesurés à l'aide de tests standard.

Résultats : La délétion ciblée de Shp1 et Shp2 dans la lignée MK/plaquettaire à l'aide du transgène Gp1ba-Cre se traduit par une ablation protéique efficace de Shp1 et Shp2 dans les MK et les plaquettes. Les souris doublement déficientes présentent une macrothrombocytopenie et une altération de l'agrégation plaquettaire induite par la GPVI, associée à une réduction significative de l'activation plaquettaire et de l'expression du GPVI. Le développement et la maturation des MK sont altérés chez ces souris, ce qui se traduit par une réduction significative de la ploïdie avec un blocage dans des stades immatures, notamment une inhibition significative du nombre de MK au stade III dans la moelle osseuse et de MK proplaquettaires. La phosphorylation d'ERK1/2 induite par la Tpo est également significativement réduite.

Conclusions : Shp1 et Shp2 sont essentielles pour la mégacaryopoïèse, la thrombopoïèse et la signalisation Mpl via la voie Ras-MAPK.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

***Transfusion plaquettaire et rendement transfusionnel chez les patients de réanimation***

*Florian Reizine<sup>1, 2</sup>, Sarah Le Marec<sup>3</sup>, Anthony Le Meur<sup>4</sup>, Maëlys Consigny<sup>5</sup>, Florian Berteau<sup>6</sup>, Laetitia Bodenes<sup>3</sup>, Marie Geslain<sup>7</sup>, Zoe McQuilten<sup>8</sup>, Catherine Le Niger<sup>9</sup>, Julien Huntzinger<sup>2</sup>, Philippe Seguin<sup>10</sup>, Jean-Baptiste Thibert<sup>11</sup>, Jean Reignier<sup>4</sup>, Pierre-Yves Egretteau<sup>6</sup>, Jean-Marc Tadié<sup>1</sup>, Olivier Huet<sup>7</sup>, Pierre Asfar<sup>12</sup>, Stephan Ehrmann<sup>13</sup>, Cécile Aubron<sup>3,8</sup>*

*1 Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, CHU de Rennes, France*

*2 Service de réanimation polyvalente, CH de Vannes, France*

*3 Service de Médecine Intensive Réanimation, Université de Bretagne Occidentale, Centre Hospitalo-Universitaire de Brest, France*

*4 Service de Médecine Intensive Réanimation, CHU de Nantes, France*

*5 Service de Biostatistiques, CHU de Brest, Brest, France*

*6 Service de réanimation polyvalente, CH de Morlaix, France*

*7 Département d'anesthésie-réanimation, Université de Bretagne occidentale, CHU de Brest, France*

*8 Australian and New Zealand Intensive Care Research Centre (ANZIC-RC), Monash University, Melbourne, Australia*

*9 Unité d'hémovigilance, CHU de Brest, France*

*10 Service de réanimation chirurgicale, CHU de Rennes, France*

*11 Etablissement Français du Sang Bretagne, Rennes, France.*

*12 Service de Médecine Intensive Réanimation, CHU d'Angers, France*

*13 Médecine Intensive Réanimation, CHRU de Tours INSERM CIC 1415, CRICS-TriggerSEP F-CRIN research network, INSERM U1100, Université de Tours FR*

Introduction : La transfusion plaquettaire en réanimation est relativement fréquente avec 20% des patients qui reçoivent au moins un concentré plaquettaire. Dans plus de la moitié des cas, les concentrés plaquettaires sont donnés pour prévenir les complications hémorragiques chez des patients sévèrement thrombopéniques. Dans un tiers des cas environ, la transfusion plaquettaire est administrée pour traiter des saignements majeurs et plus rarement en prévention de saignements associés à des procédures invasives ou de la chirurgie. Le taux de plaquettes à partir duquel une transfusion plaquettaire prophylactique est nécessaire pour prévenir un saignement chez les patients de réanimation reste inconnu et essentiellement basé sur des données issues de la littérature en onco-hématologie.

Méthodes : L'étude RECCIP est une étude prospective multicentrique, conduite dans 9 réanimations du Grand Ouest, qui a analysé le rendement transfusionnel chez des patients de réanimation thrombopéniques et recevant une transfusion plaquettaire prophylactique. Le rendement transfusionnel était étudié grâce à l'incrément corrigé du taux plaquettaire ou CCI (corrected count increment) qui ajuste pour la surface corporelle et le taux de plaquettes administré. Un CCI inférieur à 7 mesuré entre 18 et 24 heures après la transfusion définissait un mauvais rendement plaquettaire.

Résultats : Trois quart des 181 patients inclus dans cette étude avaient au moins une transfusion plaquettaire avec un mauvais rendement transfusionnel. Les facteurs indépendamment associés à un mauvais rendement transfusionnel étaient le sepsis à l'admission, une hémopathie maligne sous-jacente et la durée de conservation des plaquettes. Il n'y avait pas d'association entre mauvais rendement plaquettaire et survenue d'évènements hémorragiques.

Conclusion : La majorité des transfusions plaquettaires prophylactiques administrés à des patients de réanimation ont un mauvais rendement transfusionnel 24 heures après transfusion. Parmi les facteurs indépendamment associés à un mauvais rendement transfusionnel, seule la durée de conservation des concentrés plaquettaires étaient accessibles à une potentielle intervention.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Les allo-anticorps anti-HLA-I dans les états réfractaires : des mécanismes aux perspectives thérapeutiques**

*Blandine MAITRE, EFS, Grand Est, UMRS\_1255, INSERM, Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

Les patients pris en charge dans les services d'onco-hématologie nécessitent un support transfusionnel plaquettaire important et itératif. Une des conséquences graves de ces transfusions multiples est l'état réfractaire aux transfusions plaquettaires (ERTP), une complication sévère associée à des séjours hospitaliers plus longs, une utilisation excessive de produits sanguins labiles et un risque accru de décès. L'ERTP peut être d'origine immune ou non immune. Dans les ERTIP immuns, les allo-anticorps du receveur dirigés contre les antigènes HLA-I des plaquettes du donneur entraînent une élimination rapide des plaquettes transfusées de la circulation et conduisent ainsi à un échec thérapeutique de la transfusion. Dans ce cas, le seul moyen de prendre en charge le patient repose sur la sélection de plaquettes compatibles HLA-I, une approche limitée par le nombre restreint de donneurs HLA disponibles et la difficulté de répondre à la demande en cas d'urgence. Cependant, tous les patients porteurs d'anticorps anti-HLA-I ne deviennent pas réfractaires aux transfusions de plaquettes, ce qui soulève la question des caractéristiques intrinsèques des anticorps associés à un état réfractaire et de leur importance dans les mécanismes de clairance plaquettaire. L'objectif de cette présentation est de récapituler les connaissances et de détailler les récentes avancées sur les mécanismes conduisant à l'élimination des plaquettes transfusées. Enfin, un aperçu des futures stratégies thérapeutiques pour prendre en charge les patients en état réfractaire sera discuté.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Impact de l'âge des donneurs sur les concentrés plaquettaires et leur transfusion**

*Amélie Prier<sup>1,2\*</sup>, Maelys Portier<sup>1,2\*</sup>, Nancy Kouadio<sup>1,2</sup>, Charles-Antoine<sup>1,2</sup> Arthaud, Marie-Ange Eyraud<sup>1,2</sup>, Marco Heestermans<sup>1,2</sup>, Hind Hamzeh-Cognasse<sup>2</sup>, Fabrice Cognasse<sup>1,2</sup> et Anne-Claire Duchez<sup>1,2</sup>*

*\*Ces auteurs ont participé de manière équivalente*

- 1. Etablissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpes, Saint Etienne, France*
- 2. INSERM, U 1059 SAINBIOSE, Université Jean Monnet, Mines Saint Etienne, France*

Introduction. La transfusion de concentré plaquettaire (CP) est une procédure qui permet de sauver des vies mais dans de rares cas elle provoque des réactions indésirables, parfois graves. Les CP sont composés de plaquettes et de plasma contenant des biomolécules actives telles que les cytokines et les médiateurs lipidiques.

Objectifs. Nos objectifs sont 1/ de discriminer des molécules bioactives dont l'expression est modulée par l'âge physiologique des donneurs du PC; 2/ d'évaluer cette modulation en termes de réaction indésirable transfusionnelle.

Méthodes. Les CP sont transfusés et les reliquats non transfusés ont été analysés par spectrométrie de masse (pour les lysophospholipides, la sphingomyéline 1 phosphate) et par ELISA (HMGB1, PF4, MDC, CX3CL1, GDF15, HSAA, MCP-3, NGAL, ADAM-13, MCP-1, IL-13). Les CPs sont classés selon l'âge du donneur [18-30], [30-60] et [60-70] ainsi que le statut de réaction transfusionnel suite à la transfusion du CP.

Résultats. L'expression de plusieurs molécules telles que le PF4 augmente au cours de l'âge physiologique. Cependant, l'expression de plusieurs molécules dont le S1P diminue au cours de l'âge physiologique alors que l'expression de HMGB1 n'est pas modulée. Conclusions. Notre étude a révélé une modulation de certaines molécules bioactives pendant le vieillissement. Ces molécules ont un impact dans la transfusion de concentré plaquettaire, et seront surveillées à l'avenir avant la transfusion.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Liver and spleen serve as graveyards for allogeneic platelets thanks to macrophages during HLA Class I transfusion refractoriness**

*G Rojas Jiménez<sup>1,2,3</sup>, C Angénioux<sup>1,2,3</sup>, F Proamer<sup>1,2,3</sup>, Eckly A<sup>1,2,3</sup>, B Maître<sup>1,2,3</sup>*

*1 Établissement Français du Sang, Grand Est,*

*2 UMRS\_1255, INSERM*

*3 Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

Background: Transfusing platelets into patients already alloimmunized against HLA class I antigens can be challenging. Such alloantibodies can result in rapid elimination of the transfused platelets from the bloodstream, leading to transfusion failure known as platelet transfusion refractoriness (PTR). The question of where transfused platelets are eliminated during PTR remains unanswered.

Aim: To determine the fate of transfused platelets during PTR.

Methods: A previously described murine model of platelet alloimmunization was used to mimic PTR (Couvidou et al. 2023). 30 min after transfusion, liver and spleen were harvested and processed for electron microscopy or immunohistology stained for transfused platelets (eGFP+), macrophages (F4/80+), and endothelium (CD31+). Identification of the cells positive for allogeneic platelets was performed on liver/spleen cells by flow cytometry. The relative importance of spleen was studied in splenectomized/sham mice. The role of the liver was assessed by administering a low dose of clodronate liposomes (6.5 mg/kg i.v.) 24 h before transfusion. We performed a non-linear regression of the percentage of transfused platelets to analyze recirculation (n=3 for all experiments).

Results: Alloimmune mice were confirmed to be in a refractory state 30 min after transfusion, whereas naïve mice showed a different kinetic (p=0.0082) in which platelets were still circulating. Confocal and electron microscopy images showed allogeneic platelets present within both splenic and hepatic phagocytes only in refractory mice. Flow cytometry analysis identified the Kupffer cells as responsible for platelet uptake during PTR: 54.6% positive for allogeneic platelets versus 2.1% in naïve mice (p=0.05). In the spleen, red pulp macrophages were identified as the primary population taking up platelets during PTR (19.1% positive for allogeneic platelets compared to 1.4% in naïve mice (p=0.05)). Splenectomized mice, however, did not show a difference in the elimination of allogeneic platelets upon transfusion as compared to sham controls (p=0.7067). Clodronate-treated mice showed different elimination kinetics compared to PBS-liposome-treated individuals (p=0.0021). Splenectomy combined with clodronate liposomes did abrogate PTR compared to sham controls treated with clodronate (p<0.0001), indicating a role of both the spleen and the liver.

Conclusions: This work evidences allogeneic platelets end up in both the liver and the spleen during PTR, mainly in Kupffer cells and Red pulp macrophages.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Characterization of the Inflammatory Platelet Phenotype during Chronic VTE Sequels (the ROT-PLAT-VTE study)**

*Marco HEESTERMANS<sup>1,2</sup>, Geraldine POENOU<sup>1,3</sup>, Alexandre RODIERE<sup>3</sup>, Élodie DE MAGALHAES<sup>3</sup>, Anne-Claire DUCHEZ<sup>1,2</sup>, Marie-Ange EYRAUD<sup>1,2</sup>, Amélie PRIER<sup>1,2</sup>, Charles-Antoine ARTHAUD<sup>1,2</sup>, Hind HAMZEH-COGNASSE<sup>1</sup>, Fabrice COGNASSE<sup>1,2</sup>, Laurent BERTOLETTI<sup>1,3</sup>*

*1 INSERM, U1059 SAINBIOSE, Université Jean Monnet, Mines Saint-Étienne, Saint-Etienne, France.*

*2 Etablissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpes, Research Department, Saint-Etienne, France*

*3 Service de Médecine Vasculaire et Thérapeutique, CHU de St-Etienne, Saint-Etienne, France*

Introduction : 30% of all VTE patients develop chronic VTE sequels. Treatment of chronic VTE sequels is severely complicated since the pathophysiology is unknown and anticoagulants are ineffective. Recently, it has been demonstrated that platelets mediate (thrombo)inflammatory processes. Experimental studies have associated both platelets and inflammatory processes to chronic VTE sequels. We hypothesize that (inflammatory) platelets directly or indirectly mediate chronic VTE sequels. Our approach is to characterize platelets from patients with acute VTE, which develop chronic VTE sequels or fully recover.

Materials and Methods : Two blood samples are drawn from VTE patients; 72 hours (acute event) and 3-6 months (recovered or chronic VTE sequels) after admission to the CHU because of acute VTE. We use flow cytometry to measure the membrane expression of several activation (CD62P, CD63, Annexin V) and inflammatory (TLR2, TLR4, RAGE, CD40L, CD40, CXCR7, CD142, CLEC-2, DC-sign, CD36) markers on resting and TRAP-activated platelets (CD41+ cells). Seahorse (Agilent) will be used to measure platelet metabolism. Platelet-free plasma is collected for cyto/chemokine analysis.

Results : 44 patients have been included in the study: 27 patients have returned for their follow-up appointment, 9 patients are scheduled for their second appointment, and from 8 patients no second blood sample will be available. Thus far, we did not observe significant differences between patients with acute VTE vs. their follow-up appointment in platelet (inflammatory) markers, using flow cytometry. Platelet maximal respiration ( $p=0.03$ ) and spare respiratory capacity ( $p=0.03$ ) were slightly but significantly decreased in patients during their follow-up appointment.

Conclusion : Thus far, we did not see a clear trend for aberrant platelet characteristics in patients with acute VTE or 3 months later. Since the majority of patients did not attend to the follow-up appointment, no sub-analysis on the different forms of chronic VTE sequels has been performed yet. The current study will increase our knowledge on the role of (inflammatory) platelets in chronic VTE sequels, while also generating a biobank of VTE patients with and without chronic VTE sequels.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Les sources d'énergie pour la réorganisation du cytosquelette dans les plaquettes activées**

*Alexei Grichine<sup>1\*</sup>, Shancy Jacob<sup>4\*</sup>, Anita Eckly<sup>2</sup>, Joran Villaret<sup>1</sup>, Clotilde Joubert<sup>1</sup>, Florence Appaix<sup>1</sup>, Mylène Pezet<sup>1</sup>, Anne-Sophie Ribba<sup>1</sup>, Eric Denarier<sup>3</sup>, Jacques Mazzega<sup>1</sup>, Jean-Yves Rinckel<sup>2</sup>, Laurence Lafanechère<sup>1</sup>, Bénédicte Elena-Herrmann<sup>1</sup>, Jesse W. Rowley<sup>4</sup> and Karin Sadoul<sup>1</sup>,*

*1 University Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Institute for Advanced Biosciences, 38000 Grenoble, France*

*2 University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France*

*3 University Grenoble Alpes, INSERM U1216, CEA, Grenoble Institute of Neuroscience, GIN, 3800 Grenoble, France*

*4 Molecular Medicine Program, University of Utah, Salt Lake City, United States*

Les plaquettes sanguines subissent plusieurs réorganisations successives du cytosquelette lorsqu'elles sont recrutées sur une blessure d'un vaisseau. Ces réorganisations ont lieu pendant la phase d'activation des plaquettes, le processus d'étalement sur le vaisseau lésé et entre les fibres de fibrine du caillot en formation ainsi que pendant la rétraction du caillot. Toutes ces étapes nécessitent beaucoup d'énergie, en particulier la rétraction du caillot lorsque les plaquettes développent des forces importantes similaires à celles des cellules musculaires.

Les plaquettes peuvent produire de l'énergie par la glycolyse et la respiration mitochondriale. Cependant, bien que les plaquettes au repos ne possèdent que 5 à 8 mitochondries individuelles, elles produisent de l'ATP principalement par phosphorylation oxydative. Les plaquettes activées et étalées présentent une augmentation de taille par rapport aux plaquettes au repos et la question se pose de savoir où se trouvent les quelques mitochondries dans ces plaquettes plus grandes. En utilisant la microscopie d'expansion, nous montrons que le nombre de mitochondries par plaquette est augmenté dans les plaquettes étalées. L'imagerie en direct et la microscopie électronique à balayage par faisceau d'ions focalisés suggèrent qu'un événement de fission mitochondriale a lieu pendant l'activation des plaquettes. La fission est dépendante de Drp1 puisque les plaquettes déficientes en Drp1 ont des mitochondries fusionnées. Dans les cellules nucléées, la fission mitochondriale indique un passage à un phénotype glycolytique. En utilisant des tests de rétraction du caillot, nous montrons que les plaquettes ont une production d'énergie plus glycolytique pendant la rétraction du caillot et que les plaquettes déficientes en Drp1 présentent un défaut de rétraction du caillot.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Fibrin silences the hemostatic plug**

*Alexandra Yakusheva<sup>1</sup>, Muhammad Usman Ahmed<sup>1</sup>, Catherine Bourdon<sup>1</sup>, Kim Jouffroy<sup>1</sup>, Charlotte Fauth<sup>1</sup>, Clarisse Mouriaux<sup>1</sup>, Matthew J. Flick<sup>2</sup>, Mikhail A. Panteleev<sup>3-5</sup>, Pierre H. Mangin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France; <sup>2</sup>Division of Experimental Hematology and Cancer Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH; <sup>3</sup>Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow 119991, Russia; <sup>4</sup>Faculty of Physics, Moscow State University, Moscow 119991, Russian Federation; <sup>5</sup>Federal Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow 117198, Russian Federation.

**Introduction:** A hemostatic response composed of three steps with: i) growth of a plug, ii) embolization of its intraluminal part, and iii) stabilization of the remaining patch. While the molecular mechanism of thrombus growth is well characterized, how an active plug becomes inert remains completely unknown. The aim of this work was to evaluate the role of fibrin in silencing the remaining patch, beyond its stabilizing effect.

**Methods:** We used WT mice and FgaE<sup>K</sup> mice with no capacity for thrombin-mediated proteolysis of fibrinogen. Intravital microscopy was used to visualize thrombus dynamics in experimental models of FeCl<sub>3</sub>- and mechanical-injuries. A tail-clip bleeding assay allowed to evaluate the bleeding time and the frequency of rebleeds. An in vitro flow based-assay was used to monitor platelet adhesion and thrombus formation.

**Results:** Intravital microscopy indicated that platelet attachment to the thrombus surface stops about ten minutes after injury, indicating that the thrombus becomes inactive, a stage that we named silent phase. This event coincides with the time at which fibrin occupies the maximal area within the plug. Histological analysis of the thrombus during this silent phase showed that the fibrin shell covers the thrombus, suggesting a role of fibrin in preventing platelet accumulation. The dynamics of thrombus formation in FgaE<sup>K</sup> mice, which are unable to form fibrin, were prolonged as compared to control, with repeated growth phases both in experimental thrombosis models and in a tail bleeding assay i.e. no reach of the silent phase. We identified two mechanisms of action. Firstly, we showed a role of fibrin through an inhibition of intrathrombus thrombin, since in vivo experiments with injection of plasminogen activator (rtPA) to lyse fibrin and release of active thrombin resulted in moving from a silent to an active phase of thrombosis. Secondly, using a flow-based assay, we provided evidence that fibrin limits platelet recruitment through its poor adhesive function, as a fibrin-rich thrombus showed modest platelet recruitment compared to a fibrin-poor thrombus.

**Conclusion:** In addition to well-established role of fibrin in clot stabilization, these findings identify a novel role of fibrin in silencing the thrombus by limiting platelet adhesion to the plug after thrombus embolization.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Rôle du TFPI dans les manifestations hémorragiques de l'hémophilie**

*Brigitte TARDY*



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) : nouvel acteur en hémostasie et thrombose ?**

*Georges JOURDI, Hôpital Lariboisière & Université Paris Cité, Paris, France*

Malgré les avancées majeures de la recherche neurovasculaire, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques demeurent la deuxième mondiale cause de mortalité et d'invalidité. Comprendre les mécanismes physiopathologiques pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et approches diagnostiques pouvant ainsi aider à l'identification rapide et fiable des patients victimes d'AVC, réduisant ainsi le délai de prise en charge. Initialement découvert dans les neurones, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) est un facteur de croissance présent à forte concentration dans les plaquettes sanguines. Des études récentes montrent que le BDNF exogène active les plaquettes lavées de manière autocrine/paracrine et favorise la lyse du caillot de fibrine en système purifié. Nos résultats montrent également que le BDNF exogène augmente l'adhésion des plaquettes au collagène et au fibrinogène en conditions de flux artériel et veineux et induit la rétraction du caillot plaquettaire. Il augmente la génération de thrombine tout en favorisant la lyse du caillot dans le plasma et en diminuant sa fermeté en sang total. Par conséquent, les effets du BDNF sur l'hémostasie sont variables et complexes. La caractérisation de son rôle et des variations de sa concentration sur le caillot fibrino-plaquettaire ouvre un nouveau volet de recherche dans le domaine neurovasculaire.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Nouveaux antiplaquettaires d'action immédiate à la phase aigüe des AVC ischémiques**

*Jean-Philippe Désilles, Mikael Mazighi, Martine Jandrot-Perrus, Benoit Ho-Tin-Noé, Université de Paris Cité, U1144 INSERM, Optimisation thérapeutique en Neuropsychopharmacologie, Paris, France, Service de neuroradiologie interventionnelle, Hôpital Fondation A. de Rothschild, Paris, France*

Malgré les avancées majeures et récentes des traitements de la phase aigüe des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques, plus de 1 patient sur 2 gardent des séquelles neurologiques responsable d'un handicap.

La prise en charge actuelle de la phase aigüe comprend deux stratégies de recanalisation artérielle, la thrombolyse intraveineuse et la thrombectomie mécanique qu'il est possible d'associer dans les 4h30 suivant le début des symptômes avec la possibilité de réaliser une TM seule jusqu'à 24 heures.

L'ajout de médicaments antiplaquettaires d'action immédiate aux traitements de recanalisation artérielle est actuellement en cours d'exploration afin de permettre de réduire le handicap fonctionnel après un AVC ischémique. Ces traitements pourraient cibler 3 phénomènes physiopathologiques distincts : la thrombose microvasculaire, le ré-occlusion artérielle intracrânienne et la thrombose de stent artériel cervical lorsque sa pose est nécessaire.

La littérature pré-clinique suggère que la thrombose microvasculaire en aval d'une occlusion artérielle cérébrale serait un phénomène précoce et participant à l'extension des lésions ischémiques avant l'obtention de la reperfusion artérielle. Plusieurs médicaments antiplaquettaires sont en cours d'exploration dans cette indication et notamment le glenzocimab et le cangrelor.

Dans près de 10% des cas, la thrombectomie mécanique est associée à un échec de recanalisation artérielle proximale et ce du fait de la survenue d'une ré-occlusion précoce in situ dans une majorité de cas. Il a été retrouvé dans plusieurs études cliniques que l'administration d'abciximab ou de cangrelor permettait de ré-ouvrir l'artère avec un impact sur le pronostic clinique.

Enfin, lorsque la pose d'un stent artériel cervical en amont de l'AVC ischémique est nécessaire à la phase aigüe, le type et les modalités de l'anti-agrégation plaquettaire reste à définir afin de prévenir du risque de thrombose intra-stent sans augmentation du risque de transformation hémorragique.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Inhibition du BDNF endogène par un anticorps monoclonal murin (mAb#9) : impact sur les fonctions plaquettaires, la coagulation et la fibrinolyse**

*Sophie MELICINE<sup>1,2</sup>, Benoit HO-TIN-NOE<sup>3</sup>, Pascale GAUSSEM<sup>1,4</sup>, Virginie SIGURET<sup>1,2</sup>, Georges JOURDI<sup>1,2</sup>*

1 Université Paris Cité, INSERM, Innovations thérapeutiques en hémostase, F-75006 Paris, France

2 Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP. Nord, F-75010 Paris, France

3 Université Paris Cité, INSERM, Optimisation thérapeutique en neuropsychopharmacologie, F-75006 Paris, France

4 Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP. Centre, F-75015 Paris, France

**Introduction :** Le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) est présent à des concentrations plus élevées dans les plaquettes que dans le système nerveux central. Son rôle en hémostase et pathologies neurovasculaires reste peu exploré. Nos travaux préliminaires ont montré que le BDNF active les plaquettes tout en favorisant la fibrinolyse et diminuant la fermeté du caillot fibrino-plaquettaire. Notre objectif était d'étudier l'effet de l'inhibition du BDNF sur différents tests en hémostase.

**Matériels et méthodes :** Trente-deux volontaires sains (EFS) ont été prélevés pour cette étude. L'agrégation plaquettaire en plaquettes lavées est mesurée par transmission optique en présence de mAb#9 (IgG2b monoclonale anti-BDNF, lot 9/29/22, DSHB, USA) ou de son contrôle isotypique et déclenchée par du BDNF recombinant ou des agonistes classiques (ADP, TRAP-6 et collagène). Le mAb#9 est testé sous forme de surnageant de culture cellulaire (mAb#9 DSHB) ou purifié par chromatographie d'affinité protéine-G. Les constantes enzymatiques ainsi que la neutralisation de l'interaction du BDNF avec son récepteur canonique (TrkB) sont déterminées à l'aide du système Biacore<sup>TM</sup>. Le test de génération de thrombine est réalisé en plasma pauvre (PPP) ou riche en plaquettes. La fibrinof formation et la fibrinolyse sont étudiées en PPP par turbidimétrie. La thromboélastométrie rotative est réalisée sur ROTEM<sup>®</sup> en sang total.

**Résultats :** Le mAb#9 DSHB inhibe totalement les agrégations plaquettaires quel que soit l'agoniste. A l'opposé, le mAb#9 purifié n'a aucun effet inhibiteur des plaquettes alors qu'il présente une bonne affinité pour le BDNF (KD=8,7 nM) et qu'il inhibe son interaction avec le TrkB. L'effet inhibiteur du mAb#9 DSHB est dû au ProClin<sup>TM</sup>, un antimicrobien contenu dans le surnageant de culture. Le mAb#9 purifié n'a pas d'impact sur l'activité pro-coagulante des plaquettes, la génération de thrombine, la fibrinof formation, la fibrinolyse ou les propriétés viscoélastométriques du caillot.

**Conclusion :** Bien que le mAb#9 empêche l'interaction du BDNF avec son récepteur, il n'inhibe pas son effet activateur plaquettaire et est neutre vis-à-vis de la coagulation et la fibrinolyse. Nos résultats remettent en question l'implication du TrkB dans l'activation plaquettaire induite par le BDNF. Le(s) mécanisme(s) exact(s) des effets du BDNF en hémostase décrits dans la littérature reste(nt) à élucider.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Nouveaux antiplaquettaires d'action immédiate à la phase aigüe des AVC ischémiques**

*Jean-Philippe Désilles, Mikael Mazighi, Martine Jandrot-Perrus, Benoit Ho-Tin-Noé*

*Univ de Paris Cité, U1144 INSERM, Optimisation thérapeutique en Neuropsychopharmacologie, Paris, France*

*Service de neuroradiologie interventionnelle, Hôpital Fondation A. de Rothschild, Paris, France*

Malgré les avancées majeures et récentes des traitements de la phase aigüe des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques, plus de 1 patient sur 2 gardent des séquelles neurologiques responsable d'un handicap.

La prise en charge actuelle de la phase aigüe comprend deux stratégies de recanalisation artérielle, la thrombolyse intraveineuse et la thrombectomie mécanique qu'il est possible d'associer dans les 4h30 suivant le début des symptômes avec la possibilité de réaliser une TM seule jusqu'à 24 heures.

L'ajout de médicaments antiplaquettaires d'action immédiate aux traitements de recanalisation artérielle est actuellement en cours d'exploration afin de permettre de réduire le handicap fonctionnel après un AVC ischémique. Ces traitements pourraient cibler 3 phénomènes physiopathologiques distincts : la thrombose microvasculaire, le ré-occlusion artérielle intracrânienne et la thrombose de stent artériel cervical lorsque sa pose est nécessaire.

La littérature pré-clinique suggère que la thrombose microvasculaire en aval d'une occlusion artérielle cérébrale serait un phénomène précoce et participant à l'extension des lésions ischémiques avant l'obtention de la reperfusion artérielle. Plusieurs médicaments antiplaquettaires sont en cours d'exploration dans cette indication et notamment le glenzocimab et le cangrelor.

Dans près de 10% des cas, la thrombectomie mécanique est associée à un échec de recanalisation artérielle proximale et ce du fait de la survenue d'une ré-occlusion précoce in situ dans une majorité de cas. Il a été retrouvé dans plusieurs études cliniques que l'administration d'abciximab ou de cangrelor permettait de ré-ouvrir l'artère avec un impact sur le pronostic clinique.

Enfin, lorsque la pose d'un stent artériel cervical en amont de l'AVC ischémique est nécessaire à la phase aigüe, le type et les modalités de l'anti-agrégation plaquettaire reste à définir afin de prévenir du risque de thrombose intra-stent sans augmentation du risque de transformation hémorragique.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Nouvelles pistes pour le rôle des plaquettes dans la maladie veineuse thromboembolique en lien avec le cancer**

Géraldine POENOU<sup>1,2</sup>

*1 INSERM, U1059 SAINBIOSE, Université Jean Monnet, Mines Saint-Étienne, Saint-Etienne, France.*

*2 Service de Médecine Vasculaire et Thérapeutique, CHU de St-Etienne, Saint-Etienne, France*

Les interactions paracrines entre les plaquettes et les cellules cancéreuses sont rapportées comme jouant un rôle dans la potentialisation de la dissémination, la survie dans la circulation et l'extravasation des cellules tumorales vers des sites distants de métastases, notamment dans les cancers colorectaux. Il a également été suggéré que les signaux émis par les plaquettes induisent des altérations épigénétiques, en augmentant l'expression d'oncoprotéines dans les cellules tumorales circulantes, ce qui pourrait contribuer à la promotion de la mitogenèse, de l'angiogenèse et de la croissance métastatique. Le lien entre thrombose veineuse et cancer reste étroit, bien que tous les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore complètement élucidés. Avec l'émergence du concept d'immuno-thrombose, où les plaquettes se trouvent au carrefour entre le cancer et les événements thromboemboliques veineux, il semble pertinent d'étudier l'évolution thrombotique des patients atteints de cancer colorectal sous traitement antiagrégant plaquettaire. Grâce à la base de données de l'étude ONCOCIP, une étude de cohorte prospective multicentrique, des patients adultes consécutifs atteints de cancer colorectal et porteurs d'un cathéter implanté ont été suivis pendant 12 mois. L'objectif principal de cette étude était d'identifier les facteurs de risque de thrombose veineuse et d'évaluer l'impact du traitement antiagrégant plaquettaire chez ces patients. Au total, 472 patients ont été inclus, dont 66 sous traitement antiagrégant plaquettaire (âge médian : 65 ans ; femmes : 58 %). La majorité des patients (96,8 %) ont reçu une chimiothérapie. Après 12 mois de suivi, 56 patients (11,8 %) étaient décédés et 14 % avaient présenté un événement thromboembolique veineux (ETEV). Une corrélation protectrice a été observée entre l'utilisation d'un traitement antiagrégant plaquettaire et l'absence de thrombose sur cathéter implanté. Une tendance non significative vers une amélioration de la survie a également été mise en évidence. Cette hypothèse a été testée et confirmée dans deux autres groupes de patients présentant des profils hémostatiques différents (cancer pancréatique, n = 162 ; cancer de l'estomac, n = 103).



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Les Neutrophiles dans l'immuno-thrombose**

Laurence Panicot-Dubois<sup>1</sup> et Christophe Dubois<sup>2</sup>.

*Centre de CardioloVasculaire et de Nutrition (C2VN), Aix Marseille Université, INSERM 1062, INRAE 1260, 27 bd Jean Moulin, 13385 Marseille.*

La thrombose est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Elle est impliquée dans de nombreuses maladies cardiovasculaires, telles que les thromboses artérielles et veineuses profondes, les embolies pulmonaires, ainsi que les accidents vasculaires cérébraux. En 2012, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont démontré que le neutrophile, une cellule du système immunitaire inné, participe à la formation du thrombus. Cette cellule est même indispensable à la formation du thrombus plaquettaire, puisqu'elle est la première à arriver sur le site lésé. Le neutrophile se lie à l'endothélium activé via le couple de ligands LFA-1/ICAM-1. Il constitue la principale source de facteur tissulaire (TF), qui active la cascade de coagulation, permettant ainsi la formation de thrombine, l'activation des plaquettes et la formation de fibrine.

L'intervention du neutrophile a conduit à l'émergence du concept d'immuno-thrombose. Le neutrophile, première ligne de défense en cas de désordre immunitaire, peut notamment intervenir en s'engageant dans le processus de NETose, qui libère des fibres composées d'ADN et de protéines telles que la CitH3 et la neutrophil elastase (NE). Certaines équipes ont montré que ces fibres, appelées NETs (Neutrophil Extracellular Traps), pourraient être impliquées dans l'initiation de l'immuno-thrombose.

Notre équipe a étudié, grâce à des technologies de pointe telles que la microscopie intra-vitale, la microscopie électronique et le serial block face (SBF), l'état des neutrophiles au sein des thrombus plaquettaires artériels et veineux murins. Nous avons montré que, dans le cas d'une blessure au laser sur une artériole, les neutrophiles ne forment pas de NETs. L'ajout de DNase-1, une molécule utilisée pour démontrer la présence de NETs, conduit cependant à une diminution de la formation du thrombus plaquettaire. Cette diminution n'est pas due à la dégradation des NETs par la DNase-1, mais à la consommation des agonistes plaquettaires et neutrophilaires (ADP et ATP) par la DNase-1. Nous avons également démontré, dans un modèle de thrombose veineuse profonde murine, que les NETs sont présents uniquement 48 heures après la ligature de la veine.

Les NETs ne semblent donc pas impliqués dans l'initiation de l'immuno-thrombose artérielle et veineuse.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Influence réciproque entre les plaquettes sanguines et le tissu hépatique en contexte de maladies métaboliques**

M. Borret<sup>1</sup>, M. Bellio<sup>1</sup>, A. Vauclard<sup>1</sup>, M. Miquel<sup>1</sup>, E. Lefrançais<sup>2</sup>, L. Payrastré<sup>3</sup>, P. Valet<sup>4</sup>, A. Abo<sup>5</sup>, C. Knau<sup>5</sup>, F. Briand<sup>6</sup>, T. Sulpice<sup>6</sup>, H. Guillou<sup>3</sup>, J.P. Pradere<sup>4</sup>, B. Payrastré<sup>1</sup>, S. Severin<sup>1</sup>

*1 Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Inserm Umr 1297, Université Paul Sabatier - Toulouse (France)*

*2 Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS Umr 5089, Université Paul Sabatier - Toulouse (France)*

*3 Toxalim, Inrae, Envnt, Inp-Purpan, Université Paul Sabatier - Toulouse (France)*

*4 Institut Restore, Inserm Umr 1301, CNRS Umr 5070, Université Paul Sabatier - Toulouse (France)*

*5Enterosys Sa - Labège (France),*

*6 Physiogenex - Escalquens (France)*

**Introduction :** Les maladies hépatiques métaboliques (MASLD) sont des désordres métaboliques du foie qui constituent un problème majeur de santé publique mondiale. Les MASLD s'accompagnent d'une morbidité et d'une mortalité cardiovasculaires considérables. Du fait de leur origine multifactorielle, l'étiologie et les conséquences cardiovasculaires de ces hépatopathies métaboliques demeurent encore mal caractérisées, compliquant ainsi leur prévention et prise en charge. Diverses études dans des modèles murins et chez l'Homme ont montré qu'une thérapie anti-plaquettaire atténue les conséquences hépatiques délétères des stades tardifs et irréversibles de MASLD. Cependant, la contribution des plaquettes, que ce soit au niveau hépatique ou dans le risque cardiovasculaire, reste encore mal caractérisée, en particulier dans les phases précoces et réversibles de MASLD, la stéatose hépatique et la stéatohépatite.

**Matériels et Méthodes :** Des modèles murins nutritionnels de stéatose et de stéatohépatite ont permis d'analyser l'impact de ces maladies sur l'activation plaquettaire et la thrombose in vitro par des techniques classiques et in vivo par microscopie biphotonique. Dans ces modèles murins, la modulation pharmacologique de l'activation ou du compte plaquettaire a permis d'analyser l'impact des plaquettes sur le métabolisme hépatique par des approches intégrées in vivo et des expériences in vitro sur des cellules hépatiques primaires fraîchement isolées, en utilisant des techniques histologiques, lipidomiques, métabolomiques, transcriptomiques, d'imagerie et de cytométrie de flux spectrale.

**Résultats :** Les phases précoces et réversibles de MASLD, la stéatose hépatique ou la stéatohépatite, sont responsables d'un recrutement plaquettaire et de la formation de microthrombi dans la microvasculature hépatique sans modifications majeures à l'échelle systémique du phénotype d'activation plaquettaire en réponse à divers agonistes et en condition de flux. Ces plaquettes recrutées au niveau local régulent le métabolisme gluco-lipidique hépatique en améliorant la tolérance au glucose par une diminution de sa production hépatique, en protégeant de l'accumulation de lipides et de l'inflammation hépatique, et en augmentant la perméabilité vasculaire hépatique. Les plaquettes influencent le métabolisme hépatique via leur sécrétome en agissant directement sur le phénotype des cellules endothéliales des microvaisseaux hépatiques et sur l'activité métabolique des hépaocytes.

**Conclusion :** Ces résultats mettent en lumière que dans des stades précoces de maladies métaboliques hépatiques, les plaquettes ne sont pas impliquées dans le risque cardiovasculaire associé à ces maladies mais protègent le foie des perturbations métaboliques et de l'installation des maladies métaboliques hépatiques. Ces résultats prometteurs fournissent de nouvelles perspectives thérapeutiques ciblant les acteurs plaquettaires dans le développement de MASLD.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Comparaison des effets pro-thrombotiques des anticorps anti-FP4 développés au cours des TIH et VITT**

*Johanna Augros<sup>1</sup>, Jérôme Rollin<sup>1,2</sup>, Sandra Billy<sup>1</sup>, Yves Gruel<sup>1</sup>, Claire Pouplard<sup>1,2</sup>, Caroline Vayne<sup>1,2</sup>*

*1 Université de Tours, INSERM U 1327 ISCHEMIA, Tours, France*

*2 CHRU de Tours, Service d'Hématologie-Hémostase, Tours, France*

Introduction et objectif : Les anticorps anti-facteur plaquettaire 4 (FP4) sont responsables de plusieurs syndromes caractérisés par la survenue d'une thrombopénie et de thromboses. Le premier décrit est celui des thrombopénies induites par l'héparine (TIH), associé au développement d'anticorps ciblant le complexe FP4/héparine. Ces anticorps sont souvent à l'origine de thromboses veineuses profondes ou embolies pulmonaires. En 2021, la campagne vaccinale contre le SARS-CoV-2 a fait émerger un nouveau syndrome appelé thrombopénies et thromboses immunes induites par la vaccination (VITT). Les VITT sont dues à la présence d'anticorps de forte affinité dirigés contre le FP4 natif, et caractérisées par la survenue de thromboses plus fréquentes, plus sévères et de localisation atypique (veines à bas débit au niveau cérébral et digestif) en comparaison aux TIH. Nous avons cherché à comprendre si les propriétés des anticorps anti-FP4 pouvaient expliquer cette différence de phénotype clinique.

Matériel et méthode : Plusieurs anticorps monoclonaux IgG anti-FP4 ont été développés par notre équipe : 5B9, ciblant le complexe FP4/héparine et mimant les anticorps de TIH, et 1E12, qui cible le FP4 natif, et mime les anticorps de VITT. Leurs propriétés pro-thrombotiques ont été évaluées in vitro, à l'aide d'un modèle de thrombose en conditions de flux, ainsi qu'au cours du test de génération de thrombine (TGT) sur plasma riche en plaquettes (PRP).

Résultats : Dans notre modèle de thrombose, 1E12 induit plus d'agrégats leuco-plaquettaire que 5B9 à concentration équivalente, et à un très faible shear stress (50 s<sup>-1</sup>). De plus, nous avons observé une forte accumulation de fibrine en présence de 1E12 uniquement. En PRP, seul 1E12 potentialise la génération de thrombine, et cet effet est dépendant de la présence de plaquettes, de Facteur V et Facteur XI de la coagulation.

Discussion : Nos résultats montrent que notre anticorps modèle de VITT possède une capacité singulière à activer la coagulation, et les plaquettes semblent jouer un rôle clé dans ce processus. Les mécanismes sous-tendant cet effet restent à élucider, notamment le rôle des phospholipides membranaires et des polyphosphates libérés par les plaquettes activées.

Conclusion : Ces résultats suggèrent un effet pro-thrombotique et pro-coagulant plus puissant des anticorps de VITT en comparaison à ceux de TIH, pouvant expliquer la plus grande sévérité des thromboses associées aux VITT.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Diagnostic des thrombopénies induites à l'héparine par imagerie en flux**

*Julie Carré<sup>1</sup>, Yohann Demont<sup>1</sup>, Christine Mouton<sup>3</sup>, Caroline Vayne<sup>4,5</sup>, Eve-Anne Guery<sup>4</sup>, Annelise Voyer<sup>1</sup>,  
Loïc Garçon<sup>1,2</sup>, Mailys Le Guyader<sup>1</sup>, Julien Demagny<sup>1,2</sup>*

*1 Service d'Hématologie Biologique, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France*

*2 HEMATIM UE4666, Univ. Picardie Jules Verne, Amiens, France*

*3 Laboratoire Hématologie, Hôpital Haut-Lévêque, CHU Bordeaux, Bordeaux, France*

*4 Service d'Hématologie-Hémostase, CHRU Tours, Tours, France*

*5 INSERM UMR1327 ISCHEMIA, Université de Tours, Tours, France*

**Introduction/objectifs :** La thrombopénie induite par l'héparine (TIH) est un effet indésirable des héparines entraînant un état d'hypercoagulabilité chez les patients via la formation d'anticorps dirigés contre le complexe PF4-héparine. Le diagnostic de certitude de la TIH repose sur la capacité de ces complexes à activer les plaquettes de manière héparine dépendante. L'imagerie en flux est une technique combinant la cytométrie en flux et la microscopie optique, permettant d'étudier facilement la morphologie cellulaire, associée ou non à un marquage spécifique. Nous avons évalué les capacités de cette technologie à détecter l'activation plaquettaire avec des paramètres morphométriques, puis développé un test fonctionnel basé sur ceux-ci pour confirmer les diagnostics de TIH.

**Matériel & Méthode :** Vingt-huit plasmas de patients TIH+ (SRA+ ou LTA+) et quatorze plasmas TIH- (anticorps anti-PF4/H négatifs ou SRA-) ont été mélangés volume à volume avec un PRP de témoins sains en l'absence d'héparine ou en présence d'héparine faible (1 UI/mL) ou forte (500 UI/mL) dose. Les échantillons ont ensuite été acquis par imagerie en flux combinée à un marquage CD41, CD42 et CD62P.

**Résultats :** L'activation des plaquettes à l'aide de TRAP-6 nous a permis d'identifier cinq paramètres morphométriques pertinents pour détecter l'activation plaquettaire. Parmi ces paramètres, le « Major axis » a montré d'excellentes performances diagnostiques (sensibilité de 89,3% et spécificité de 92,9%). Ces performances étaient équivalentes à celles du CD62P. Le diamètre et l'aire des plaquettes ont montré des performances légèrement inférieures (sensibilité de 85,7% et spécificité de 92,9%).

**Discussion/conclusion :** Les paramètres morphométriques acquis par imagerie en flux offrent d'excellentes performances diagnostiques, et le « Major axis » offre des performances identiques à celles du marquage CD62P sur des plaquettes de témoins sains équivalents. Nos résultats ouvrent la voie au développement de tests fonctionnels plaquettaires sans marqueurs d'activation plaquettaire, réduisant ainsi les coûts et la phase pré-analytique.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Megakaryocytes are new players in viral persistence**

*Fernando Real, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR9017, Institut Pasteur de Lille, Lille 59019, France*

Despite an undetectable plasma viral load as a result of antiretroviral therapy, HIV-1-infected individuals with poor immune reconstitution harbor infectious HIV-1 within their platelets. Megakaryocytes, as platelet precursors, are the likely cellular origin of these HIV-1-containing platelets. To investigate the mechanisms that allow megakaryocytes to support HIV-1 infection, we established in vitro models of viral infection using hematopoietic stem cell-derived megakaryocytes and the megakaryocytic MEG-01 cell line. We observed HIV-1 DNA provirus integration into the megakaryocyte cell genome, self-limiting virus production, and HIV-1 protein and RNA compartmentalization, which are hallmarks of HIV-1 infection in myeloid cells. In addition, following HIV-1 infection of megakaryocyte precursors, the expression of interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3), an antiviral factor constitutively expressed in megakaryocytes, was inhibited in terminally differentiated HIV-1-infected megakaryocytes. IFITM3 knockdown in MEG-01 cells prior to infection led to enhanced HIV-1 infection, indicating that IFITM3 acts as an HIV-1 restriction factor in megakaryocytes. Megakaryocyte progenitors can be reprogrammed in Interferon-rich acute infection environment, generating terminally differentiated megakaryocytes that are tolerant to IFN $\alpha$  concerning IFITM3 responses. This reprogramming may represent a mechanism of viral persistence in the megakaryocyte/platelet compartment. Other factors differentially expressed in the bone marrow of people living with HIV may reprogram megakaryocytes as well toward cell profiles susceptible to viral infection and reservoir formation. Transcriptomic analyses indicate that HIV-1 infection induces the expression of genes associated with collagen I biosynthesis in bone marrow, what is linked to dysfunctional collagen deposition and tissue fibrosis that is associated with poor CD4 $^+$  T cell recovery and defects in megakaryopoiesis. A direct association of bone marrow fibrosis, generation of dysfunctional megakaryocytes and formation of HIV-1 reservoirs in megakaryocyte/platelet compartment is under investigation. Together, these findings indicate that megakaryocyte precursors are susceptible to HIV-1 infection, leading to terminally differentiated megakaryocytes harboring virus in a process regulated by IFITM3 and potentially other factors that may constitute druggable targets. Megakaryocytes may thus represent a neglected HIV-1 reservoir that warrants further study in order to develop improved antiretroviral therapies and to facilitate HIV-1 eradication.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Gene signature of circulating platelet-bound neutrophils is associated with poor prognosis in cancer patients**

*Pacôme Lecot<sup>1</sup>, Maude Ardin<sup>1</sup>, Sébastien Dussurgey<sup>2</sup>, Vincent Alcazer<sup>1</sup>, Lyvia Moudombi<sup>1</sup>, Manuela Pereira Abrantes<sup>1</sup>, Margaux Hubert<sup>1</sup>, Aurélie Swalduz<sup>3</sup>, Hector Hernandez-Vargas<sup>1</sup>, Alain Viarí<sup>4</sup>, Christophe Caux<sup>1</sup>, Marie-Cécile Michallet<sup>1</sup>*

*1 TERI (Tumor Escape, Resistance and Immunity) Department, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.*

*2 Université de Lyon, SFR Biosciences, ENS de Lyon, Inserm US8, CNRS UMS3444, Lyon, France.*

*3 Department of Lung and Thoracic Medical Oncology, Centre Léon Bérard, Lyon, France.*

*4 Synergie Lyon Cancer, Plateforme de Bio-informatique 'Gilles Thomas', Lyon, France.*

Beyond their critical role in hemostasis, platelets physically interact with neutrophils to form neutrophil-platelet aggregates (NPAs), enhancing neutrophil effector functions during inflammation. NPAs may also promote disease worsening in various inflammatory diseases. However, characterization of NPAs in cancer remains totally unexplored. Using ImageStreamX (ISX) imaging flow cytometer, we were not only allowed able to detect CD15+ CD14- CD36+ ITGA2B+ NPAs in both healthy donors' (HDs) and cancer patients' bloods, but we also showed that NPAs result from the binding of platelets preferentially to low-density neutrophils (LDNs) as opposed to normal-density neutrophils (NDNs). By reanalyzing two independent public scRNAseq data of whole blood leukocytes from cancer patients and HDs, we could identify a subset of neutrophils with high platelet gene expression that may correspond to NPAs. Moreover, we showed that cancer patients' derived NPAs possessed a distinct molecular signature compared to the other neutrophil subsets, independently of platelet genes. Gene ontology (GO) term enrichment analysis of this NPAs-associated neutrophil transcriptomic signature revealed a significant enrichment of neutrophil degranulation, chemotaxis and trans-endothelial migration GO terms. Lastly, using The Cancer Genome Atlas (TCGA), we could show by multivariate Cox analysis that the NPAs-associated neutrophil transcriptomic signature was associated with a worse patient prognosis in several cancer types. These results suggest that neutrophils from NPAs are systemically primed by platelets empowering them with cancer progression capacities once at tumor site. NPAs may therefore hold clinical utility as novel noninvasive blood prognostic biomarker in cancer patients with solid tumors.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Une nouvelle mutation de la tubuline  $\beta 1$  associée à un profil prothrombotique dépendant de l'axe GPVI et de la sécrétion**

*Toscane Viellard<sup>1</sup>, Christelle Repérant<sup>1</sup>, Jean Solarz<sup>1</sup>, Jean-Claude Bordet<sup>2</sup>, Cécile Denis<sup>1</sup>, Delphine Borgel<sup>1</sup>, Alexandre Kauskot<sup>1#</sup>, Frédéric Adam<sup>1#</sup>*

*1 INSERM U1176 (Hémostase - Inflammation - Thrombose HITH), Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre*

*2 Laboratoire d'Hémostase, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron*

*# « shared senior authorship »*

Introduction : Le rôle de la tubuline  $\beta 1$  (TUBB1) dans la fonction plaquettaire n'est pas très clair. Notre objectif est de caractériser l'impact d'une nouvelle mutation (p.P160L) de TUBB1 dans l'activation plaquettaire.

Matériel et méthodes : Les fonctions plaquettaires d'un modèle murin «knock-in» porteur de la mutation p.P160L ont été évaluées in vivo et in vitro chez les souris contrôles (WT), hétérozygotes (HET) et homozygotes (KI).

Résultats : Dans un modèle de thrombose in vivo, l'occlusion des artérioles est significativement plus rapide chez HET et KI par rapport aux WT (WT:  $38 \pm 5$  min ; HET:  $25 \pm 2$  min ; KI:  $22 \pm 2$  min ;  $p < 0,01$ ). Lorsque le sang est perfusé in vitro dans une chambre de perfusion sur matrice de collagène à un taux de cisaillement artériolaire, la taille des thrombi HET et KI est deux fois plus importante par rapport à WT. Par ailleurs, l'activation de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$ , déterminée par cytométrie, est significativement augmentée en réponse à la convulxine (Cvx)(HET:  $39 \pm 3\%$  ; KI:  $123 \pm 4\%$  ;  $p < 0,001$ ) par rapport à WT, mais normale à l'ADP et la thrombine. Le blocage des voies d'amplification (traitement apyrase et indométacine) restaure une activation normale de l'intégrine, et l'exposition de P-sélectine (marqueur de sécrétion) est significativement augmentée (HET:  $20 \pm 3\%$  ; KI:  $53 \pm 3\%$  ;  $p < 0,001$ ) par rapport à WT en réponse à la Cvx. L'ensemble de ces résultats indiquent que la mutation p.P160L de TUBB1 induit une hyperactivation plaquettaire dépendante de l'axe GPVI via la sécrétion plaquettaire. Enfin, l'analyse de l'ultrastructure des plaquettes HET et KI par microscopie électronique à transmission montre une désorganisation des microtubules (MTs) de la bande marginale, associée à une diminution d'incorporation de TUBB1 mutée dans les MTs. En effet, après sédimentation des MTs par ultracentrifugation,  $48 \pm 12\%$  des plaquettes HET et  $31 \pm 10\%$  des plaquettes KI présentent une incorporation de TUBB1 dans les MTs contre  $73 \pm 3\%$  chez WT. Ces résultats indiquent que la mutation p.P160L perturbe le réseau de MTs.

Conclusion : Pour la première fois, nous mettons en évidence qu'une mutation de la TUBB1 peut être associée à un risque prothrombotique dépendant de l'axe GPVI et de la sécrétion, probablement dû à une désorganisation des MTs.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Do mitochondria-derived reactive oxygen species modulate platelet activation and aggregation?**

*Franciele de Lima<sup>1</sup>, Sofia Esperti<sup>1</sup>, Alexandre Leuc<sup>2</sup>, Elie Nader<sup>1</sup>, Anne-Laure Peugnet<sup>3</sup>, Damien Rousset<sup>4</sup>, Yesim Dargaud<sup>2</sup>, Hamdi Rezigue<sup>2</sup>, Christophe Nougier<sup>2</sup>, Carine Halfon-Domenech<sup>3</sup>, Philippe Connes<sup>1</sup>*

*1 Laboratoire LIBM, UR7424, Equipe "Biologie Vasculaire et du Globule Rouge", Faculté de Médecine Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon*

*2 Laboratoire "Hémostase et Thrombose", UR4609, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France*

*3 Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, CNRS UMR 5023, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon*

*4 Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique (IHOPe), Hospices Civils de Lyon, Lyon, France*

Introduction and goals: Previous studies have shown that platelets play an important role in the pathophysiology of sickle cell disease (SCD). Increased platelet activation has been reported and would contribute to the progression of clinical complications such as vaso-occlusive crises. In addition, increased production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) in platelets from SCD patients have been found to correlate to bioenergetic dysfunction and mitochondrial hyperpolarization. Our study investigated and compared the levels of mitochondria-derived ROS between SCD patients and healthy controls, as well as platelet activation markers and calcium levels, and platelet aggregation.

Methods: Blood samples were collected in 3.6% citrate tubes from 13 SCD and 8 healthy individuals to obtain washed platelets. Flow cytometry was used to assess mitochondrial ROS, P-selectin and intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>) levels, with and without TRAP6. Antimycin A (AA), an inhibitor of complex III of mitochondrial respiration, was also used. Platelet aggregation was assessed in a transmitted light aggregometer using TRAP6 25µM.

Results: SCD patients had higher levels of mitochondria-related ROS compared to healthy volunteers (P=0.003) and SCD platelets were more activated at baseline than platelets from controls (P=0.02). No difference was observed in Ca<sup>2+</sup> levels. Platelet aggregation with TRAP or TRAP and AA was lower in patients than in controls (P=0.003). The use of AA caused an increase in ROS in both groups (P<0.001) but did not change platelet aggregation. The use of TRAP increased P-selectin in both groups but without any impact on mitochondrial ROS.

Discussion and conclusion: The literature showed that patients have high levels of platelet mitochondria ROS, which could promote platelet activation. The inhibition of complex III of mitochondrial respiration resulted in an increase of ROS generation without any change in platelet aggregation. Further activation of platelets was not accompanied by increased mitochondrial ROS generation and platelet aggregation. The lower platelet aggregation confirmed by our study could be the consequence of a refractory state of platelets from continual in vivo activation. The dysfunction in platelet mitochondrial respiration could lead to alterations in platelet bioenergetics, which could contribute to a worsening of the patients clinical condition. We are currently exploring the activity of all the respiratory chain of mitochondria into SCD and healthy platelets and plan to investigate the associations with clinical severity.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**Contrôle mécanosensible de la dynamique de l'actine dans la fonctionnalité  
de la GPIb $\alpha$  par MICAL1**

*Jean Solarz<sup>1</sup>, Christelle Soukaseum<sup>1</sup>, Christelle Repérant<sup>1</sup>, Cécile Denis<sup>1</sup>, Dominique Baruch<sup>2</sup>, Frédéric Adam<sup>1</sup>, Alexandre Kauskot<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>INSERM U1176, Université Paris Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>2</sup>INSERM U1140, Université Paris Cité, Paris, France

Introduction : L'adhérence initiale des plaquettes sur la paroi vasculaire dépend de l'interaction du facteur Willebrand (vWF) avec son récepteur, la glycoprotéine Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ). La partie cytoplasmique de la GPIb $\alpha$  est associée avec des protéines du cytosquelette dont l'actine. L'actine est en dynamique entre une forme polymérisée et dépolymérisée, régulée en partie par la protéine MICAL1 responsable de la dépolymérisation par oxydation. Cependant, le rôle de cette dynamique dans la GPIb $\alpha$  reste largement sous-étudié, et celui de MICAL1 est inconnu.

Matériel & Méthodes : Un modèle murin « knock-out » (KO) pour MICAL1 a été généré et comparé aux « wild-type » (WT). Deux inhibiteurs de l'actine ont été utilisés (dépolymérisant : Latrunculine A, LatA ; polymérisant : Jasplakinolide ; Jasp). Les plaquettes ont été perfusées sur matrice de vWF à 1500s<sup>-1</sup> pour étudier la vélocité (« rolling ») et l'adhérence.

Résultats : L'actine et GPIb $\alpha$  : la co-immunoprécipitation (co-IP) de la GPIb $\alpha$  montre un recrutement d'actine fibrillaire (F-actine) avec le récepteur après fixation du vWF aux plaquettes ( $x20 \pm 2$ ,  $p < 0,01$ ). En flux sur matrice de vWF, la dépolymérisation par LatA ralentit la vitesse de rolling des plaquettes alors que son accumulation par Jasp augmente cette vitesse (contrôle :  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{m/s}$  ; LatA :  $0.9 \pm 0.1 \mu\text{m/s}$  ; Jasp :  $2.6 \pm 0.1 \mu\text{m/s}$ ,  $p < 0,001$ ). Ce résultat suggère que la dynamique de l'actine associée avec la GPIb $\alpha$  régule l'interaction entre GPIb $\alpha$  et le vWF en condition hémodynamique.

MICAL1 et GPIb $\alpha$  : la co-IP de la GPIb $\alpha$  montre un recrutement de MICAL1 avec le récepteur après fixation du vWF aux plaquettes ( $x17 \pm 3$ ,  $p < 0,05$ ). Ce recrutement est inhibé par la dépolymérisation de la F-actine (inhibition :  $73 \pm 11\%$ ,  $p < 0,01$ ). Ce résultat indique que la F-actine est responsable de la localisation de MICAL1 avec la GPIb $\alpha$ .

MICAL1 et adhérence : Aucune différence de phénotype plaquettaire entre les plaquettes KO et WT n'est observée en absence de flux sur matrice de vWF. En revanche en flux, des défauts sont observés : la vélocité des plaquettes KO est augmentée (KO :  $2.06 \pm 0.09 \mu\text{m/s}$  ; WT :  $1.41 \pm 0.08 \mu\text{m/s}$ ,  $p < 0,001$ ), et l'adhérence/stabilité des plaquettes sont diminuées (stabilité KO :  $53 \pm 3\%$  ; WT :  $76 \pm 3\%$ ,  $p < 0,001$ ). Moléculairement, la co-IP de la GPIb $\alpha$  des plaquettes de souris KO MICAL1 après perfusion sur vWF montre une augmentation de l'actine associée à la GPIb $\alpha$  comparée aux WT ( $292 \pm 78\%$ ,  $p < 0,05$ ). Ces résultats indiquent que MICAL1 régule la quantité de F-actine associée avec la GPIb $\alpha$  nécessaire à l'adhérence des plaquettes sur vWF.

Conclusion : Nous montrons pour la première fois que MICAL1 est un nouveau partenaire moléculaire impliqué dans la signalisation mécanosensible de la GPIb $\alpha$  en régulant la dynamique de l'actine.



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

**PARTICIPANTS**

|                 |                 |                                       |
|-----------------|-----------------|---------------------------------------|
| ADAM            | Frédéric        | frederic.adam@inserm.fr               |
| ANGENIEUX       | Catherine       | catherine.angenieux@efs.sante.fr      |
| ARTHAUD         | Charles Antoine | charles-antoine.arthaud@efs.sante.fr  |
| AUBRON          | Cecile          | cecile.aubron@chu-brest.fr            |
| AUGROS          | Johanna         | johanna.augros@etu.univ-tours.fr      |
| BACHELOT-LOZA   | Christilla      | christilla.bachelot-loza@u-paris.fr   |
| BARRE           | Elsa            | elsa.barre@efs.sante.fr               |
| BOBE            | Regis           | regis.bobe@inserm.fr                  |
| BORRET          | Maxime          | maxime.borret@inserm.fr               |
| CARRE           | Julie           | julie.carre@chu-poitiers.fr           |
| CHAVARIN        | Patricia        | patricia.chavarin@efs.sante.fr        |
| COGNASSE        | Fabrice         | fabrice.cognasse@univ-st-etienne.fr   |
| DE LIMA         | Franciele       | franciele_lima@yahoo.com              |
| DE WREEDE       | Anaëlle         | anaelle.de-wreede@chu-lyon.fr         |
| DEMAGNY         | Julien          | demagny.julien@chu-amiens.fr          |
| DERICQUEBOURG   | Amy             | amy.dericquebourg@chu-lyon.fr         |
| DESILLES        | Jean-Philippe   | jpdesilles@gmail.com                  |
| DEVAUX          | Marine          | marine.devaux.ext@efs.sante.fr        |
| DUBOEUF         | Sébastien       | sebastien.duboeuf@efs.sante.fr        |
| DUCHEZ          | Anne-Claire     | anne-claire.duchez@efs-sante.fr       |
| ERIBON          | Sandrine        | sandrine.rochette-eribon@efs.sante.fr |
| EYRAUD          | Marie Ange      | marie-ange.eyraud@efs.sante.fr        |
| IORE            | Mathieu         | mathieu.ioire@chu-bordeaux.fr         |
| FOUASSIER       | Marc            | marc.fouassier@chu-nantes.fr          |
| FRANCOIS        | Marion          | marion.francois@efs.sante.fr          |
| GAUSSEM         | Pascale         | pascale.gaussem@aphp.fr               |
| GIANNOLI        | Catherine       | catherine.giannoli@efs.sante.fr       |
| GRATACAP        | Marie-Pierre    | marie-pierre.gratacap@inserm.fr       |
| HAMZEH-COGNASSE | Hind            | hamzeh@univ-st-etienne.fr             |
| HEESTERMANS     | Marco           | marco.heestermans@efs.sante.fr        |
| HERANNEY        | Chloé           | chloe.heranney@gmail.com              |
| HO-TIN-NOE      | Benoit          | benoit.ho-tin-noe@inserm.fr           |
| HURDEBOURCQ     | Mathilde        | mathilde.hurdebourcq@stago.com        |
| IOBAGIU         | Cristina        | cristina.iobagiu@efs.sante.fr         |
| JOLLIVE         | Noémie          | noemie.jollive.ext@efs.sante.fr       |
| JOURDI          | Georges         | georges.jourdi@aphp.fr                |
| KAUSKOT         | Alexandre       | alexandre.kauskot@inserm.fr           |



**11<sup>ème</sup> Rencontre du Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes (CFPM)  
Université Jean Monnet de Saint-Etienne - 08 et 09 Octobre 2024**

|                |                 |  |
|----------------|-----------------|--|
| LEON           | Catherine       | catherine.leon@efs.sante.fr              |
| LEUCI          | Alexandre       | a.leuci@outlook.fr                       |
| MAILLOT        | Victorine       | Victorine.maillot@efs.sante.fr           |
| MAITRE         | Blandine        | blandine.maitre@efs.sante.fr             |
| MANGIN         | Pierre          | pierre.mangin@efs.sante.fr               |
| MAVOUNA        | Sabrina         | sabrina.mavouna@inserm.fr                |
| MAZHARIAN      | Alexandra       | alexandra.mazharian@inserm.fr            |
| MELICINE       | Sophie          | sophie.melicine@aphp.fr                  |
| MICHALLET      | Marie Cécile    | marie-cecile.michallet@lyon.unicancer.fr |
| MONTMARTIN     | Aurélié         | aurelie.montmartin@univ-st-etienne.fr    |
| OHLMANN        | Philippe        | philippe.ohlmann@stago.com               |
| PANICOT-DUBOIS | Laurence        | laurence.panicot-dubois@univ-amu.fr      |
| PERROT         | Astride         | astride.perrot@inserm.fr                 |
| POENOU         | Geraldine       | geraldine.poenou@gmail.com               |
| POGGI          | Marjorie        | marjorie.poggi@univ-amu.fr               |
| PRIER          | Amélie          | amelie.prier@efs.sante.fr                |
| RASLOVA        | Hana            | hana.raslova@gustaveroussy.fr            |
| REAL           | Fernando        | fernando.real@cnsr.fr                    |
| REPERANT       | Christelle      | christelle91@hotmail.fr                  |
| RIBES          | Agnès           | ribes.a@chu-toulouse.fr                  |
| ROJAS JIMÉNEZ  | Gabriel         | Gabriel.RojasJimenez@efs.sante.fr        |
| ROLLIN         | Jérôme          | jerome.rollin@univ-tours.fr              |
| SADOUL         | Karin           | karin.sadoul@univ-grenoble-alpes.fr      |
| SEVERIN        | Sonia           | sonia.severin@inserm.fr                  |
| SOLARZ         | Jean            | jean.solarz@inserm.fr                    |
| SOUKASEUM      | Christelle      | christelle.soukaseum@inserm.fr           |
| TARDY          | Brigitte        | brigitte.tardy@chu-st-etienne.fr         |
| VANDEN-BOSSCHE | Arnaud          | arnaud.vanden.bossche@univ-st-etienne.fr |
| VIELLARD       | Toscane         | toscane.viellard@inserm.fr               |
| YAKUSHEVA      | Alexandra       | alexandra.yakusheva@efs.sante.fr         |
| ZIESSSEL       | Emma            | emma.ziessel@etu.u-paris.fr              |
| ALESSI         | Marie-Christine | marie-christine.alessi@ap-hm.fr          |