



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UMR_S1255 Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostasie, thrombose, transfusion

THÈSE

Présentée par

Adèle COUIDOU

Soutenue le **13 décembre 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/S spécialité : Immunologie

Etude des mécanismes cellulaires liés à l'alloimmunisation plaquettaire post- transfusionnelle et à l'état réfractaire associé

THÈSE dirigée par :

Mme Blandine MAÎTRE

DR, EFS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Christelle RETIERE

DR, EFS, Université de Nantes

M Fabrice COGNASSE

DR, EFS, Université de Saint-Etienne

EXAMINATEUR :

M Frédéric GROS

MCF, CNRS, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITÉ :

M Pierre MANGIN

DR, Inserm, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S1255

« Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostase, thrombose, transfusion »

Directeur : Docteur Pierre MANGIN

Etablissement Français du Sang (EFS) – Grand Est

10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France

Tel : +33 3 88 21 25 25, Fax : +33 3 88 21 25 21

Ce travail fut soutenu par l'Établissement Français du Sang (EFS) et par l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).



REMERCIEMENTS

Je remercie Pierre Mangin, directeur de l'UMRS1255 de m'avoir accueillie au laboratoire pendant ces cinq années et d'avoir accepté d'être membre invité de mon jury de thèse.

Je remercie particulièrement Christelle Retière, Fabrice Cognasse et Frédéric Gros d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Ces remerciements sont de coutumes mais sincères. J'ai la chance d'avoir un jury dont l'expertise n'a d'égale que leur sympathie.

Les remerciements suivants ne peuvent qu'être adressés à Blandine Maître, ma directrice de thèse et momager à temps plein. J'ai énormément appris à tes côtés sur le plan professionnel et personnel. Scientifiquement tu m'as appris à développer mes idées, à construire un schéma de pensée et à développer un esprit critique. Personnellement, tu m'as montré que tout est une question de balance entre la confiance en soi et une remise en question perpétuelle. J'ai conscience que ces remerciements sont très personnels mais ils sont à l'image de notre relation durant toutes ces années. Même si tu as essayé de garder une distance professionnelle (peut être le seul échec au cours de ces 5 années ensemble), tu m'as accompagné tout du long et tu m'as aidé à grandir. Grâce à toi je sais ce dont je suis capable et surtout je sais le type de femme que je veux devenir, merci pour tout !

Je remercie également les autres membres de notre équipe : Catherine et Gabriel. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés. Ce qui est sûr c'est qu'à vous deux vous m'aurez (presque) appris la patience ! Catherine, une véritable maman de travail, merci pour tes encouragements et ton soutien quotidien. Gabriel, collègue, ami et véritable allié au laboratoire, merci pour ton soutien, ta vision des choses m'a permis de relativiser de nombreuses fois. Laurie, membre de cœur de notre équipe, merci de m'avoir tout appris, tous ces résultats n'ont été possibles que grâce à ton coaching.

Inès et Anaïs, merci d'avoir été mes piliers au laboratoire. Anaïs, tu es la personne la plus aimante que je connaisse. L'amitié a une autre définition à tes côtés. Inès, merci d'avoir toujours été là pour m'écouter, m'apaiser et surtout me guider.

Emily, tu m'as aidé à traverser des moments délicats au cours de cette thèse grâce à tes conseils et ta force d'esprit sans faille. Merci d'avoir été là quand j'avais besoin.

Sylvie Moog, nos discussions, qui ressemblent certes à des séances de psy, ont toujours été enrichissantes et bénéfiques à mes yeux. Merci pour ça.

Véro, j'ai appris au fil du temps à découvrir une personne sensible et loyale. Je te remercie pour ton amitié et ton soutien quotidien.

Léa, nos points de vue similaires sur le monde et nos parcours nous ont rapproché. Tu es toujours d'un soutien sans faille et d'une amitié sans défaut.

Catherine S., merci pour tous tes conseils et les coups de boost que tu as su me donner sans même t'en rendre compte. Tu m'as apporté du recul quand cela a été nécessaire.

J'adresse également un grand merci à tous les membres des autres services de l'EFS avec qui j'ai pu échanger et qui ont participé de près ou de loin à la rédaction de ce manuscrit : Marie-Jöelle, Catherine, Sylvie, Guilaine, Ketty, Nolwenn, Valérie. Merci à mes collègues et ami.e.s du laboratoire : Quentin, Julie, Clarisse, David, Fabienne, Patricia, Mourad, Sacha, Marie, Noémie, Elsa, Lauriane, Kévin pour avoir rendu ces 5 années si enrichissantes.

Camille, Gabriella, Emma, Léa, Ludivine, Célia, Cloé, vous avez formé un monde parallèle où il a été plus facile de vivre durant toutes ces années. Nous voici de retour dans le monde réel dans lequel vous avez participé de près à ma réussite, merci les filles.

Merci à mes sœurs, Marine, Elise, Pauline, notre route a été semée d'embûches mais elle a été plus facile à traverser à vos côtés.

Lise, tu es d'un soutien et d'une amitié inconditionnels. Je souhaite à tout le monde d'avoir une amie aussi fidèle que toi. Tu es la meilleure amie que l'on puisse avoir.

Louis, l'amour n'est qu'amitié rendue plus vive. Merci de me supporter au quotidien et d'avoir toujours cru en moi. Voici une grande étape passée ensemble, la première d'une longue série.

Maman, la fierté de ces instants n'éloigne pas la tristesse de ton absence. Merci pour toutes les valeurs que tu nous as transmises. Tu as été un exemple de persévérance, d'acharnement et de dépassement de soi. Cette thèse a été possible grâce à toi.

TABLE DES MATIERES

<i>Abréviations.....</i>	<i>.....</i>
<i>Liste des figures.....</i>	<i>.....</i>
<i>Liste des tableaux.....</i>	<i>.....</i>
<i>Avant Propos</i>	<i>.....</i>

INTRODUCTION GENERALE

<i>I. Plaquettes sanguines et transfusions.....</i>	<i>1</i>
1. Les plaquettes sanguines.....	1
A. Historique	1
B. Morphologie	1
C. Fonctions hémostatiques	2
D. Identité immunologique des plaquettes	4
2. La transfusion de plaquettes sanguines	9
A. Les thrombopénies.....	9
B. Stratégie transfusionnelle	11
 <i>II. L’alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle</i>	<i>18</i>
1. Définition et incidence	18
2. Mécanismes immunitaires impliqués et modèles murins d’alloimmunisation anti-CMH-I	19
3. Facteurs influençant la réponse alloimmune suite à une transfusion	23
4. La rate dans les processus d’alloimmunisation	28
A. Pulpe rouge	28
B. Pulpe blanche	29
C. Zone marginale.....	31
 <i>III. L’état réfractaire.....</i>	<i>38</i>
1. Diagnostic d’un état réfractaire aux transfusions de plaquettes	38
2. Le mode d’action des anticorps anti-HLA-I	40
A. Effet des anticorps sur les plaquettes	40
B. Caractéristiques des anticorps impliqués dans l’état réfractaire.....	46
3. Réponse cellulaire et élimination des plaquettes transfusées.....	48
4. Stratégies et nouveaux axes thérapeutiques	49

OBJECTIF DE THESE	54
RESULATS EXPERIMENTAUX	56
Projet 1: Les mécanismes cellulaires liés à l'alloimmunisation plaquettaire	59
Projet 2 : L'état réfractaire	91
DISCUSSION GENERALE.....	117
CONCLUSION.....	126
<i>Annexe.....</i>	<i>128</i>
<i>Bibliographie</i>	<i>140</i>

ABREVIATIONS

ACD	Acide Citrate Dextrose
ADP	Adénosine di-phosphate
AIP	Alloimmunisation plaquettaire
ANSM	Agence nationale de la sécurité du médicament
ARN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
β2M	β-2-microglobuline
BCR	B cell Receptor
CCI	Corrected count increment
CD40L	CD40 ligand
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CP	Concentré plaquettaire
CPA	Concentré plaquettaire d'aphérèse
CPAgs	Cellule présentatrice d'antigènes
CSH	Cellule souche hématopoïétique
DC	Dendritic cell
EIR	Evènement indésirable receveur
ERTP	Etat réfractaire aux transfusions de plaquettes
EV	Extracellular vesicle
FDC	Follicular dendritic cell
FNAIT	Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia
FTY720	Fingolimod
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GR	Globule rouge
HIT	Heparin induced thrombocytopenia
HLA-I	Human leucocyte antigen I

HPA	Human platelet antigen
IdeS	Immunoglobulin degrading enzymes
IgG	Immunoglobuline G
iPSC	Induced pluripotent stem cell
ISBT	International Society of Blood Transfusion
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITP	Immune thrombocytopenia
IVIg	Intravenous Immunoglobulin
LT CD4 ⁺	Lymphocyte T CD4 ⁺
LT CD8 ⁺	Lymphocyte T CD8 ⁺
MAC	Membrane attack complex
MCP	Mélange de concentrés plaquettaires
MFI	Mean fluorescence intensity
MK	Mégacaryocyte
MRP	Macrophage de la pulpe rouge
MZB	Marginal zone B cell
MZM	Macrophage de la zone marginale
MZP	Marginal zone precursor
NEU 1	Neuraminidase 1
NK	Natural killer
NP	Numération plaquettaire
Ova	Ovalbumine
PAR	Platelet activating receptor
PF4	Platelet factor 4
P-sel	P-sélectine
PSL	Produit sanguin labile
QPA	Quantité de principe actif
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RTP	Rendement transfusionnel plaquettaire
S1P1	Sphingosine-1- phosphate-1
sCD40L	soluble CD40 ligand

TACO	Transfusion associated circulatory overload
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	T cell receptor
TFH	T follicular helper
TH1	Lymphocyte T helper 1
TH2	Lymphocyte T helper 2
TLR	Toll Like receptor
TP	Récepteur au thromboxane A2
TNF	Tumor necrosis factor
TRALI	Transfusion related lung injury
UV	Ultra-violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1: L'ultrastructure des plaquettes

Figure 2 : Images d'activations plaquettaires obtenues par microscopie électronique à balayage

Figure 3 : Les plaquettes dans l'hémostase primaire

Figure 4 : Position des gènes du CMH de classe I sur le bras court du chromosome 6

Figure 5 : Structure des molécules de classe I

Figure 6 : Schéma de la présentation antigénique par les plaquettes

Figure 7: Les systèmes HPA à la surface des plaquettes

Figure 8 : Le système antigénique ABO à la surface des plaquettes

Figure 9: Facteurs de risques impactant le seuil de transfusion selon les recommandations des transfusions de plaquettes publiées par l'HAS et l'ANSM

Figure 10 : Les trois voies d'alloimmunisation

Figure 11 : Schémas récapitulatifs des différents modèles murins d'alloimmunisation plaquettaire

Figure 12 : Facteurs influençant les risques d'évènements indésirables receveurs suite à des transfusions

Figure 13: La présentation antigénique de l'Ovalbumine par les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes

Figure 14 : Schéma de la rate humaine

Figure 15 : La pulpe blanche murine et les canaux de liaisons

Figure 16: Organisation splénique différente chez l'Homme et chez la souris

Figure 17 : Modes d'action des MZB

Figure 18 : Discrimination empirique d'un ERTD d'origine immune et non immune

Figure 19 : Stratégie transfusionnelle après un constat d'inefficacité transfusionnelle

Figure 20 : Structure d'une immunoglobuline (monomère d'IgG1)

Figure 21 : Structure du récepteur CD32a

Figure 22: Voie de signalisation du CD32a

Figure 23 : Schéma représentant l'activation des plaquettes par des anticorps anti-HLA de classe I via le récepteur CD32a

Figure 24 : Représentation du complexe d'attaque membranaire C5b9

Figure 25 : Hexamérisation des IgG1

Figure 26: Schéma de l'activation des plaquettes par les anticorps anti-HLA de classe I via le complément

Figure 27 : Processus de déglycosylation des plaquettes après activation

Figure 28 : Modulation de la glycosylation des immunoglobulines et impact sur les fonctions effectrices

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les granules plaquettaires

Tableau 2 : Echelle de gravité des saignements WHO adapté de Miller et al. Cancer 1981

Tableau 3 : Facteurs immuns et non immuns à l'origine d'état réfractaire

Tableau 4 : Propriétés des différentes sous-classes d'anticorps

AVANT PROPOS

Les plaquettes sont des fragments cellulaires anucléés dont la principale fonction est d'assurer l'hémostase. En cas de thrombopénie sévère, des transfusions de concentrés plaquettaires sont nécessaires pour éviter ou stopper des complications hémorragiques. Malgré l'amélioration constante des pratiques transfusionnelles, certaines complications peuvent encore survenir, telles que l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. L'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle décrit la production, par le receveur, d'anticorps dirigés contre les antigènes présents à la surface des plaquettes transfusées. Ces alloanticorps sont principalement dirigés contre les molécules HLA-I, des molécules présentatrices d'antigènes très polymorphes. L'alloimmunisation est asymptomatique en tant que telle mais complique significativement la prise en charge transfusionnelle ultérieure de ces patients. En effet, les alloanticorps anti-HLA-I présents chez le receveur peuvent conduire à un état réfractaire, c'est à dire une élimination rapide des plaquettes nouvellement transfusées entraînant ainsi une inefficacité thérapeutique de la transfusion. A ce jour, les mécanismes cellulaires liés à l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle ne sont pas pleinement élucidés. Les cellules immunitaires impliquées dans l'initiation de la réponse alloimmune antiplaquettaire ne sont, par exemple, pas connues. De plus, les patients alloimmunisés ne développent pas systématiquement d'état réfractaire et les caractéristiques des anticorps délétères pour les transfusions ne sont pas identifiées. Si de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été testées pour prévenir l'alloimmunisation plaquettaire et l'état réfractaire associé, le manque de compréhension des mécanismes cellulaires impliqués empêche le développement de traitements adaptés et efficaces de manière généralisée.

Ce projet de thèse consiste à comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans l'alloimmunisation et dans les états réfractaires associés. Dans ce manuscrit, nous débuterons par une introduction générale structurée en trois parties. La première est dédiée aux généralités sur les plaquettes ainsi qu'à la transfusion de concentrés plaquettaires, la deuxième est consacrée à l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle et à l'importance de la rate dans ce processus, enfin la troisième partie traite de l'état réfractaire d'origine immunologique et plus particulièrement des mécanismes d'élimination des plaquettes par les anticorps anti-HLA-I. Nous présenterons ensuite les objectifs de cette thèse et les deux grands axes sur lesquels j'ai travaillé, centrés sur les mécanismes respectifs i) de l'alloimmunisation plaquettaire et ii) des états réfractaires. Les résultats de ces projets seront présentés sous la forme de manuscrits, au nombre de deux auxquels s'ajoute une revue bibliographique. Enfin, nous discuterons des résultats, avant de terminer par une conclusion générale.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

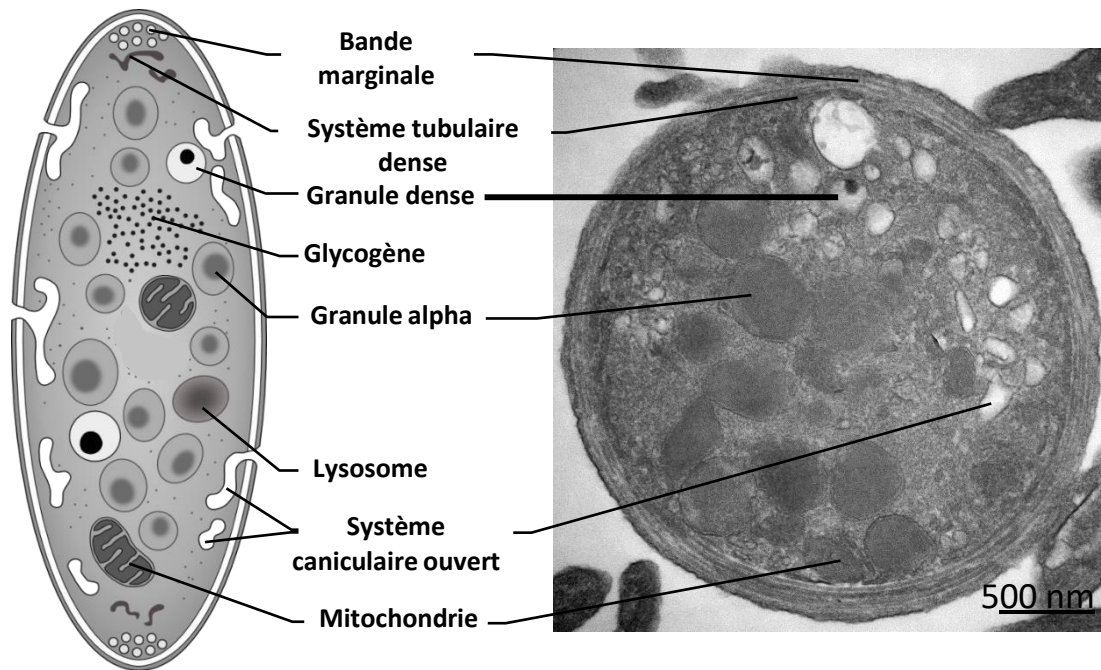


Figure 1: L'ultrastructure des plaquettes

Aspect d'une plaquette et de ses organites. A gauche, représentation schématique en coupe longitudinale. A droite, image d'une coupe équatoriale de plaquette murine obtenue par microscopie électronique à transmission.

Adaptée de Boneu and Cazenave, 1997. Figure réalisée par Fabien Pertuy

I. PLAQUETTES SANGUINES ET TRANSFUSIONS

1. LES PLAQUETTES SANGUINES

A. Historique

En 1826, Jackson Lister développa un microscope qui, grâce à la mise en place d'un objectif achromatique, permit d'augmenter la résolution de façon suffisamment importante pour pouvoir visualiser des structures cellulaires de 1 micron tels que les éléments sanguins. Cette découverte permit à George Gulliver et William Addison en 1841, d'observer et de dessiner pour la première fois des éléments du sang encore non identifiés. Durant ses observations, Addison spécula que des « granules extrêmement minuscules » étaient associés à la coagulation de la fibrine. En 1865, Max Schultz décrivit ces « agrégats irréguliers constitués de sphérules ou granules » comme étant de la poussière du sang provenant de leucocytes suite à des maladies infectieuses. Selon lui, ces sphérules sont capables de se déformer, d'engendrer des protrusions membranaires et de s'accoler les unes aux autres lorsque la coagulation débute. Si de nombreux hématologues soutinrent cette hypothèse, William Osler la réfuta en 1874 et identifia les plaquettes comme des éléments cellulaires distincts des globules blancs. Il leur attribua la capacité de s'agglutiner et d'adhérer à des filaments de fibrine (Stasi and Newland, 2011). En 1882, Giulio Bizzozero introduisit la dénomination « plaquette » (« piastrines » en italien) et fut le premier à établir leur rôle dans l'hémostase. En effet, après la réalisation d'une micro-piqûre dans une artère du mésentère de lapin, il observa un regroupement de plaquettes sur la brèche vasculaire et la formation d'un clou hémostatique qui stoppe le saignement (Lesesve, 2021).

B. Morphologie

Les plaquettes sanguines proviennent de la fragmentation de leurs précurseurs cellulaires, les mégacaryocytes présents, dans la moelle osseuse. Les mégacaryocytes sont des grandes cellules (~50µm de diamètre) qui émettent de longs prolongements cytoplasmiques dans la lumière des sinusoides. Ces éléments, appelés proplaquettes, se remodelent sous l'effet du flux sanguin pour libérer des plaquettes sanguines d'un diamètre de 2 à 5 µm et d'un volume de 7 à 12 µm³ (Boneu and Cazenave, 1997).

Les plaquettes sont des éléments cellulaires anucléés (**Figure 1**). Elles sont composées d'une membrane plasmique soutenue par un enroulement de microtubules appelé « bande marginale » qui leur confère leur forme discoïde. Pour assurer leurs fonctions hémostatiques les plaquettes s'activent et changent de forme en réponse à un stimulus.

	Granules α	Granules denses	Granules lysosomales
Diamètre	200-500nm	150nm	175-250nm
Nombre	50-80 par plaquette	3-8 par plaquette	
Pourcentage de volume cellulaire	10	1	
Contenu	Protéines de membranes (P-sélectine) Facteurs de coagulations (Facteur V, VIII, protéine S) Protéines adhésives (fibrinogène, vWF, fibronectine) Chemiokines (CXCL4 (PF4), CXCL12 (SDF-1 α)) Facteurs angiogéniques/inhibiteurs (VEGF, PDGF, angiostatines) Médiateurs immunitaires (IgG)	Cations (Ca ²⁺ , Mg ²⁺) Polyphosphates Amines bioactives (sérotonine, histamine) Nucléotides (ADP, ATP)	Hydrolases Cathepsine Elastase Collagénase Héparitinase LAMP1, LAMP2 Métalloprotéases

Tableau 1: Les granules plaquettaires

Diamètre, nombre, pourcentage du volume occupé dans la plaquette et quelques exemples du contenu granulaire. Adapté de Fitch-Tewfik and Flaumenhaft, 2013.

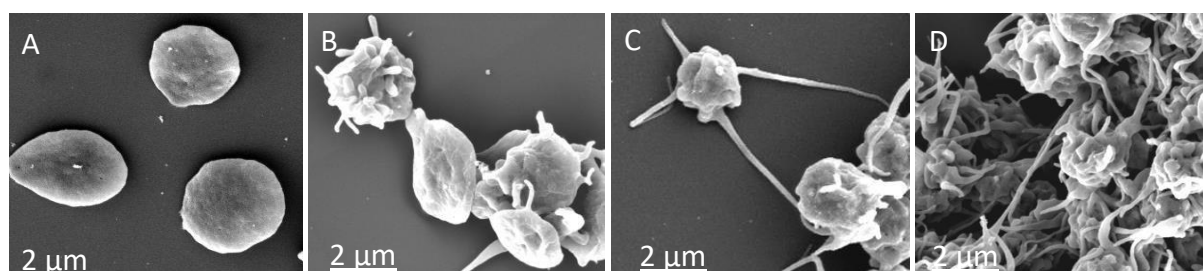


Figure 2 : Images d'activations plaquettaires obtenues par microscopie électronique à balayage

A : Plaquettes de forme discoïde (plaquettes au repos)

B : Emission de filopodes par les plaquettes encore discoïdes lors de l'activation plaquettaire

C : Plaquettes activées (sphériques) émettant des filopodes

D : Agrégat plaquettaire

Obtenues par Anita Eckly, UMR_S1255

Elles perdent leur forme discoïde, deviennent ronde et émettent des filopodes (**Figure 2**). L'émission de filopodes et l'étalement de la plaquette est possible grâce au système caniculaire ouvert. Le système caniculaire ouvert est connecté à la surface et forme des invaginations de la membrane plasmique au travers du cytoplasme. Ces invaginations forment une réserve membranaire utilisée pour l'extension des prolongements membranaires (tels que les filopodes et les lamellipodes) lors de l'activation plaquettaire. D'autre part, les plaquettes contiennent également un système tubulaire dense : un système interne de membrane lisse du réticulum endoplasmique capable de séquestrer le calcium qui constitue un régulateur de l'activation plaquettaire (Ebbeling et al., 1992).

Les plaquettes renferment trois types de granules: les granules α , δ également appelés granules denses et les granules lysosomaux (**Tableau 1**) :

- Les granules les plus abondants sont les granules α avec un nombre compris entre 50 et 80 par plaquette et un diamètre compris entre 200 et 500 nm. De forme hétérogène, les granules α contiennent de nombreuses protéines telles que des protéines de membranes (P-sélectine), des facteurs de coagulations (facteur V), des protéines adhésives (fibrinogène, facteur de von Willebrand) ainsi que des médiateurs immunitaires (IgG).
- Les granules denses, appelés ainsi car ils apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique, sont les plus petits granules plaquettaires avec 150 nm de diamètre. Ils sont présents en faible quantité, moins de 10 par plaquette. Ils contiennent plus de 70% des cations bivalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) retrouvés dans les plaquettes. On y retrouve également une très forte concentration de sérotonine (65 mM) et de nucléotides (ADP à 0,4 M et ATP à 0,6 M).
- Les granules lysosomaux sont de tailles intermédiaires avec 175 à 250 nm de diamètre. Ces lysosomes contiennent de nombreuses enzymes : des glycosidases telles que des β -N-acetylglucosaminidases, des β -glucuronidases et des β -galactosidases, mais également des protéases telles que l'acide phosphatase ou les carboxypeptidases (Thon et Italiano, 2012).

Les granules sont des composants importants pour la fonction hémostatique des plaquettes puisqu'un défaut d'ordre qualitatif ou quantitatif des granules denses et α entraîne un prolongement important du temps de saignement (Al-Huniti and Kahr, 2020; Dupuis et al., 2020).

C. Fonctions hémostatiques

La principale fonction des plaquettes est d'assurer l'hémostase, c'est-à-dire l'ensemble des processus physiologiques qui conduit à l'arrêt et à la prévention des saignements (Versteeg et al., 2013). L'hémostase est un processus physiologique constitué de trois grandes étapes. L'hémostase primaire repose sur des processus d'adhérence, d'activation et d'agrégation des plaquettes entre elles.

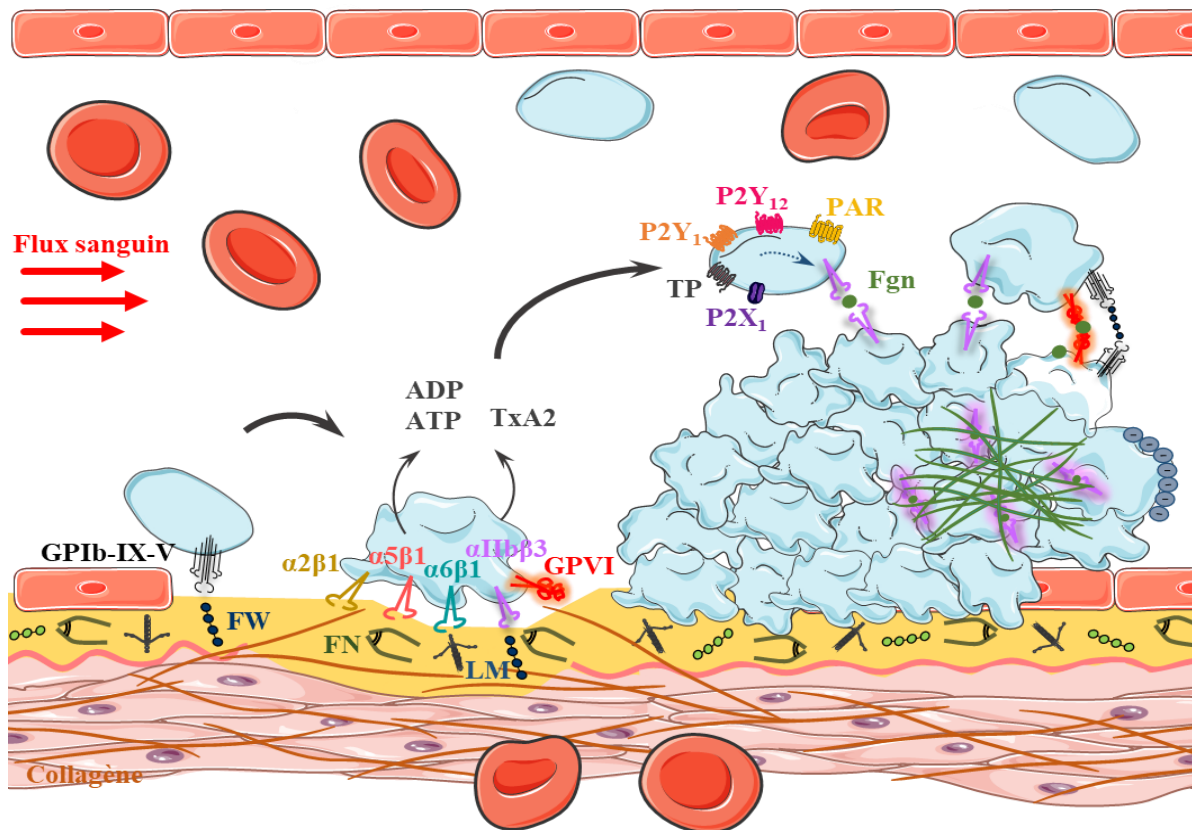


Figure 3 : Les plaquettes dans l'hémostase primaire

La plaquette permet l'hémostase primaire, c'est-à-dire le maintien de l'intégrité des vaisseaux et l'arrêt des saignements en cas de lésion du vaisseau. Pour cela les plaquettes adhèrent à la matrice sous endothéliale, s'activent et changent de forme afin d'agréger et de former un clou plaquettaire.

ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; Fgn, fibrinogène; FN, fibronectine; FW, facteur Willebrand; GP, glycoprotéine; LM, laminines; PAR, protease-activated receptor ; TP, récepteur au thromboxane et aux prostaglandines; TxA2, thromboxane A2.

D'après Muhammad Usman Ahmed, UMR_S1255.

Par la suite a lieu l'hémostase secondaire ou coagulation, une série de réactions enzymatiques qui aboutit à la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble par la thrombine. Le réseau de fibrine constitue l'armature du thrombus. Enfin, la fibrinolyse permet la dégradation du thrombus formé.

Suite à une brèche vasculaire, des protéines de matrice du sous-endothélium telles que le collagène de type I, de type III ou encore de type IV, la laminine, la fibronectine ou encore le facteur de von Willebrand, sont exposées au flux sanguin (**Figure 3**). Ces protéines de matrice sont reconnues par différentes glycoprotéines exprimées à la surface des plaquettes telles que le complexe de récepteurs GPIb-V-IX capable de lier le facteur de von Willebrand. Ces interactions entraînent l'adhérence des plaquettes au site du dommage (Clemetson, 1995; Fullard, 2004). Après l'adhérence des plaquettes à la paroi lésée, s'en suit l'activation plaquettaire notamment via l'interaction du collagène avec le récepteur GPVI qui entraîne une cascade de signalisation intracellulaire. Cette activation se traduit par un changement de forme, l'émission de filopodes ainsi que la sécrétion du contenu des granules. Les agonistes solubles sécrétés tels que l'ADP, l'ATP, le calcium ou le thromboxane A2 libéré vont amplifier l'activation plaquettaire en interagissant avec différents récepteurs présents à la surface des plaquettes environnantes : l'ATP par interaction avec le canal ionique P2X1 ou les récepteurs couplés aux protéines G, l'ADP en se fixant aux récepteurs P2Y1 et P2Y12 et le thromboxane A2 par fixation aux récepteurs TP (prostanoid TP receptor). Lors de l'activation, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ change de conformation et fixe le fibrinogène, ce qui permet de lier les plaquettes entre elles. Le fibrinogène est donc nécessaire à l'agrégation des plaquettes entre elles et à la formation du thrombus (Marguerie et al., 1979). Ce thrombus est finalement stabilisé par un réseau insoluble de fibrine, résultant de la transformation du fibrinogène en fibrine par la thrombine.

L'absence d'expression des gènes codant pour les récepteurs impliqués dans l'activation plaquettaire ou une anomalie de fonction de ces récepteurs entraîne des défauts d'hémostase. Par exemple, une anomalie quantitative ou fonctionnelle du complexe GPIb-V-IX est à l'origine du syndrome Bernard-Soulier. Les patients Bernard Soulier présentent des temps de saignements prolongés qui peuvent s'expliquer par une thrombopénie ainsi qu'une augmentation de la taille des plaquettes et un défaut d'adhérence de ces dernières sur le site vasculaire lésé (Almomani et Mangla, 2022). Les thrombasthénies de Glanzmann sont elles dues à des mutations dans les gènes codant l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ qui entraînent des temps de saignements rallongés et sont caractérisés par des saignements spontanés de la peau et des muqueuses (Nurden et al., 2011).

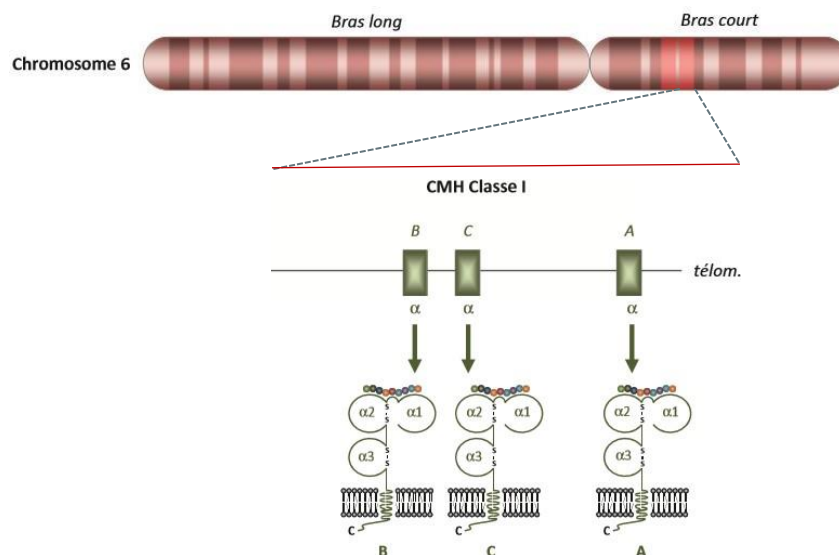


Figure 4 : Position des gènes du CMH de classe I sur le bras court du chromosome 6

Les gènes du système HLA-I sont situés sur le bras court du chromosome 6 et s'organisent en loci de classe I soit HLA-A, HLA-B, et HLA-C. Adaptée de Labalette et al. 2018

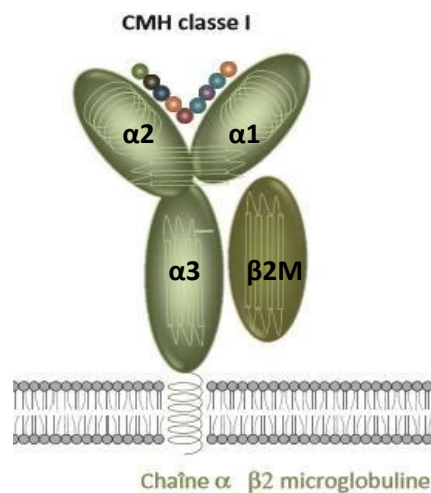


Figure 5 : Structure des molécules de classe I

Les molécules HLA-I sont composées d'une chaîne lourde polypeptidique avec 3 domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) associés de façon non covalente à une chaîne légère : la $\beta 2M$. D'après Labalette et al. 2018

D. Identité immunologique des plaquettes

Les plaquettes expriment à leur surface des antigènes variables d'un individu à l'autre qui peuvent être source d'incompatibilité immunologique lors de transfusions ou encore de grossesses. Ces antigènes constituent l'identité immunologique des plaquettes.

i. *Les molécules HLA de classe I*

Le système HLA (Human leukocyte antigen) fut découvert par Jean Dausset en 1958 après avoir étudié le sérum de patients multi-transfusés. Ces sérums contenaient des anticorps qui, une fois en contact avec des leucocytes, entraînaient leur agglutination. Il appela les antigènes leucocytaires ciblés par les anticorps le « MAC » en l'honneur des trois volontaires de ces expériences dont les initiales commençait par M, A et C (Thorsby, 2009). Dans sa publication, Dausset écrit « Dans une perspective à plus long terme, l'étude des antigènes leucocytaires pourrait revêtir une grande importance dans le domaine des transplantations de tissus, en particulier dans celui des transplantations de moelle osseuse » (Dausset, 1958). Dausset reçut le prix Nobel en 1980 pour cette découverte majeure qui instaura la notion de compatibilité immunologique. Les antigènes leucocytaires MAC correspondent aux molécules HLA-I, également appelées complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I).

Ici sont détaillés les caractéristiques des molécules HLA-I uniquement car les molécules HLA de classe II ne sont pas exprimés par les plaquettes. Les molécules HLA-I sont très polymorphes et exprimées de manière constitutive à la membrane plasmique de toutes les cellules nucléées de l'organisme ainsi que par les plaquettes. On en dénombre en moyenne 20 000 par plaquette mais cette expression peut grandement varier entre les individus (Pereira et al., 1988). A titre comparatif, 100 000 molécules HLA-I ont été identifiées à la surface des lymphocytes T et 260 000 à la surface des lymphocytes B (Bikoue et al., 1996).

Les molécules HLA-I constituent la plus grande source de polymorphisme entre deux individus et par conséquent entre les plaquettes d'un donneur et d'un receveur. Elles sont responsables de la majorité des alloanticorps générés suite à une transfusion plaquettaire (Basire and Picard, 2014).

a) Structure

Chez l'Homme, les gènes du système HLA de classe I : HLA-A, HLA-B et HLA-C sont situés sur le bras court du chromosome 6 (**Figure 4**). Chez la souris, cet ensemble de gènes est appelé système du CMH de classe I, il est porté par le chromosome 17 et s'organise en loci H-2K, H-2D (Klein et al., 1978).

Le système HLA représente les gènes les plus polymorphes du génome humain. Ils sont exprimés de manière co-dominante, ce qui signifie une expression de l'allèle paternel et de l'allèle maternel pour chaque locus. Ils codent pour une chaîne lourde polypeptidique avec trois domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) qui s'associe de façon non covalente à une chaîne légère invariable: la $\beta 2M$ pour former les molécules HLA-I (**Figure 5**). Les peptides présentés par les molécules HLA-I sont logés dans un sillon formé entre les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et un feuillet β plissé. Cette niche peut présenter des peptides de dix acides aminés. La principale région polymorphe se situe dans les zones de fixation du peptide et d'interaction avec les autres cellules. Les plaquettes expriment principalement les antigènes HLA-A et B (Mueller-Eckhardt et al., 1980). Les molécules HLA-C sont présentes sur les plaquettes mais très peu exprimées. Cette faible expression rend les molécules HLA-C non délétères pour les compatibilités immunologiques (Datema et al., 2000).

b) Origine des molécules HLA-I sur les plaquettes

L'origine des molécules HLA-I à la surface des plaquettes est discutée. Lors de la fragmentation des mégacaryocytes en plaquettes, ces dernières héritent du matériel membranaire des mégacaryotes et donc des molécules HLA-I. Au cours du vieillissement des plaquettes la quantité de molécules HLA-I à la surface des plaquettes décroît par des mécanismes encore méconnus (Angénieux et al., 2019). Lors de leur circulation, les plaquettes adsorbent aussi des molécules HLA-I solubles présentes dans le plasma (Kao et al., 1986; Zavazava, 1998). Selon l'équipe de Kapur, la majorité des molécules HLA-I à la membrane plaquettaire est dénaturée (Kapur et al., 2015), c'est-à-dire constituée uniquement d'une chaîne lourde dont la structure est potentiellement altérée et sans peptide associé, cependant, nos récents travaux indiquent que les plaquettes sont positives de manière identique après un marquage de la chaîne lourde et légère suggérant l'expression de molécules HLA-I entières. Ainsi, les deux formes peuvent cohabiter à la surface des plaquettes : des complexes entiers ainsi que des chaînes lourdes dénaturées. Des études protéomiques et des images confocales révèlent aussi la présence de molécules HLA-I complètes (chaîne lourde et légère) dans les granules α . Ces molécules HLA-I sont transloquées à la membrane lors de l'activation plaquettaire (Zufferey et al., 2014).

c) Fonctions des molécules HLA-I

Fonction du HLA-I dans les cellules nucléées

Les molécules HLA-I présentent des peptides antigéniques issus du soi ou du non-soi. Ce système de reconnaissance permet l'initiation de réponses immunes adaptatives en cas de peptides du non-soi présentés à la surface des cellules nucléées (Trivedi et al., 2007). Les peptides présentés par les molécules HLA-I sont d'origine intracellulaire, c'est-à-dire qu'ils proviennent de protéines

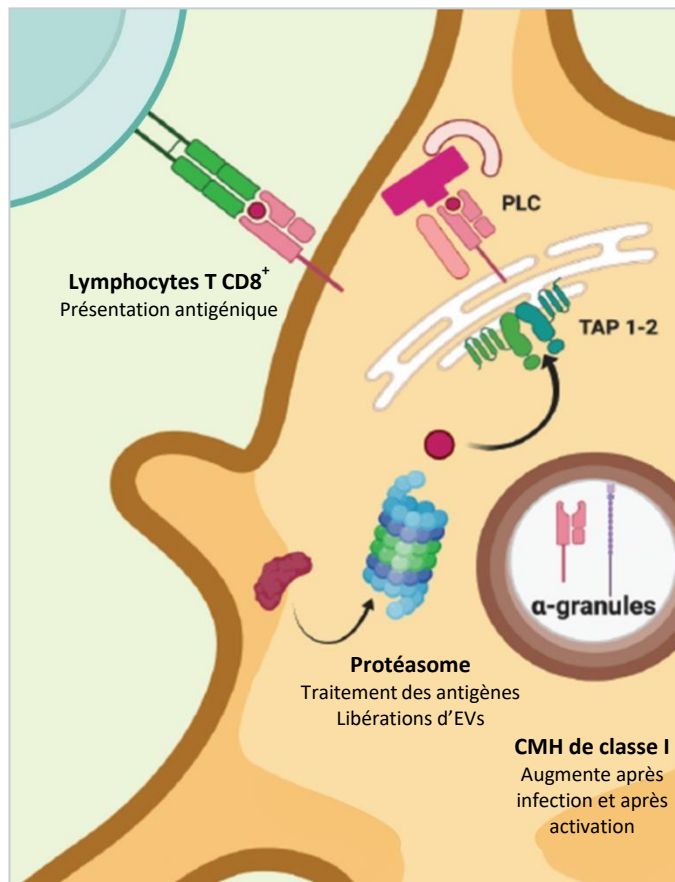


Figure 6 : Schéma de la présentation antigénique par les plaquettes

Selon Marcoux et al., les plaquettes participent au traitement et à la présentation des antigènes. Des molécules HLA-I sont localisées dans les granules α des plaquettes et sont exposées lors de la stimulation des plaquettes. Le protéasome est fonctionnel et joue de nombreux rôles dans les fonctions plaquettaires, y compris le traitement des protéines. Les molécules impliquées dans la présentation de l'antigène, telles que TAP 1 et TAP 2 et celles du complexe de chargement des peptides (PLC), sont présentes dans les plaquettes. Les peptides traités par le protéasome sont chargés sur les molécules du CMH I grâce à l'activité du PLC et présentés à la surface des plaquettes aux LT CD8⁺.

Adapté de Marcoux et al. 2020

présentes dans le cytosol. Ces protéines sont dégradées sous forme de peptides par le protéasome. Les peptides sont ensuite transportés par les protéines transporteur TAP dans le réticulum endoplasmique où ils se lient aux molécules HLA-I naissantes. Les molécules HLA-I chargées sont ainsi stabilisées et alors dirigées par des vésicules à la surface cellulaire où elles présentent les peptides aux lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺).

Si la fonction des molécules HLA-I à la surface des cellules nucléées est bien caractérisée, leur fonction à la surface des plaquettes reste discutée.

Le rôle des molécules HLA-I à la surface des plaquettes

Les plaquettes nouvellement produites contiennent les éléments nécessaires à la synthèse de protéines : ARN, réticulum endoplasmique rugueux (RER) et appareil de Golgi (Allan et al., 2022; Angénieux et al., 2016). Des analyses de plaquettes par spectrométrie de masse ont révélé dans le protéome des granules α la présence de 43 protéines impliquées dans la présentation antigénique dont les protéines de transport antigénique (TAP1 et TAP2) (Colberg et al., 2020; Zufferey et al., 2014), les composants du complexe de chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe I (Erp57, Calreticuline, Calnexin et tapasin) ainsi que les molécules de co-stimulations (CD40, ICOSL) (Zufferey et al., 2014). Les plaquettes disposeraient donc de la machinerie nécessaire à la présentation antigénique.

Plusieurs publications indiquent que les plaquettes murines présentent des antigènes étrangers à la surface des molécules CMH-I au cours d'une infection. Par cette présentation antigénique, les plaquettes seraient également capables d'activer directement les LT CD8 naifs. Ces données ont été obtenues *in vivo* et *in vitro* à partir d'un modèle de souris infectées par *Plasmodium falciparum* (Chapman et al., 2012) et d'un modèle de souris atteintes de sepsis (Guo et al., 2021). Dans ces études, les auteurs n'excluent cependant pas la possibilité d'une immunomodulation *in vivo* des LT CD8⁺ par des facteurs solubles ou des vésicules dérivées de plaquettes comme cela a été décrit par Ghio en 1999 (Ghio et al., 1999). De plus, les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes activées contiennent elles aussi un protéasome actif capable de traiter et de présenter des antigènes tels que l'ovalbumine, engendrant une réponse immune spécifique *in vitro* (Marcoux et al., 2021b). De plus, au cours de l'activation, les plaquettes humaines et murines exposent davantage de molécules HLA-I/CMH-I, provenant des granules, à leur membrane. L'augmentation du nombre de molécules HLA-I pourrait amplifier la présentation antigénique par les plaquettes et par conséquent, augmenter les interactions avec les LT CD8⁺ spécifiques de l'antigène (Marcoux et al., 2021a) (**Figure 6**).

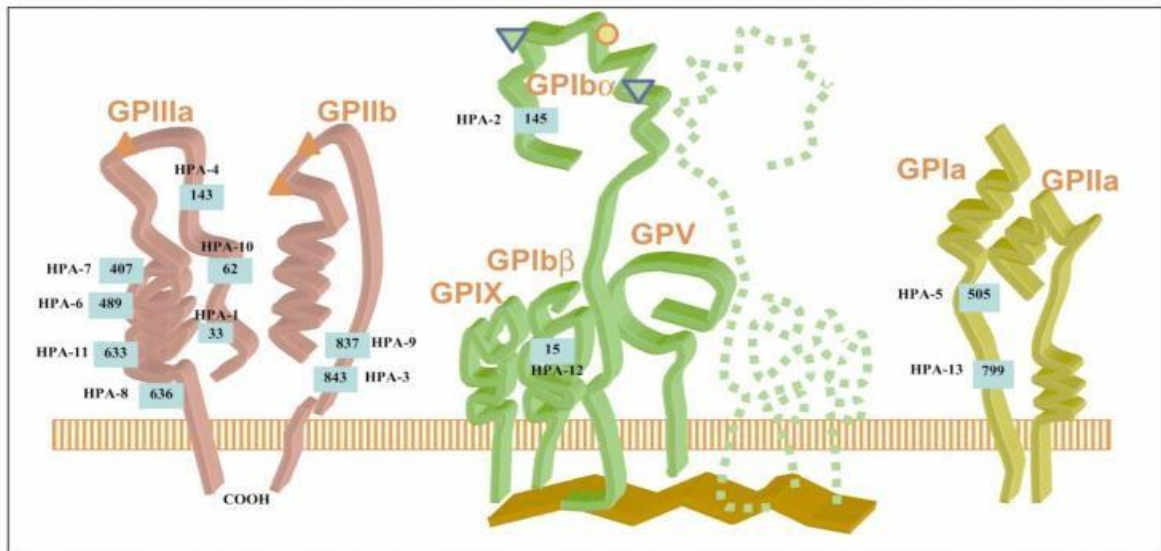


Figure 7: Les systèmes HPA à la surface des plaquettes

Les antigènes HPA sont portés par les glycoprotéines majeures présentes à la surface des plaquettes. Ici est représentée la moitié des systèmes HPA recensés. Les polymorphismes sont représentés en carré bleu. Les mutations responsables de pathologies héréditaires sont également représentées :
 ▼ Syndrome de Bernard-Soulier, ▲ Thrombasténie de Glanzmann et ● la maladie de von Willebrand.

Adaptée de Rozman et al, Transplant Immunology 2002.

Si de nombreux résultats sont en faveur d'une présentation antigénique par les plaquettes, de nombreuses questions restent en suspens. En effet, si les plaquettes jeunes contiennent tous les éléments nécessaires à la présentation peptidique, ces derniers ne persistent pas au cours du vieillissement des plaquettes. En effet, ils ne sont plus présents dès les premières 24h suivant la libération des plaquettes dans la circulation sanguine (Colberg et al., 2020). Les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes ne contiennent pas non plus de réticulum endoplasmique et sont néanmoins capables de présentation antigénique, indiquant un mécanisme indépendant du réticulum endoplasmique (Marcoux et al., 2021b). De nombreuses investigations sont encore nécessaires pour identifier la fonction des molécules HLA-I à la surface des plaquettes et leur importance physiologique. Enfin, l'importance réelle de la présentation antigénique par les plaquettes *in vivo* reste à être déterminer.

ii. Les molécules HPA

En plus du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les plaquettes portent à leur surface des antigènes qui leur sont spécifiques, les systèmes HPA (Human Platelet Antigens). Les molécules composant les systèmes HPA, nomenclature établie par le groupe de travail de l'ISBT (International Society of Blood Transfusion), désignent les antigènes présents sur les glycoprotéines plaquettaires. Vingt des trente cinq systèmes HPA décrits se situent sur l'intégrine GPIIbIIIa également appelée $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (**Figure 7**). Cette glycoprotéine est par conséquent la plus immunogène de par sa forte densité à la surface des plaquettes avec 80 000 molécules/plaquette (Curtis and McFarland, 2014). La GPIIb s'exprime sous 3 formes alléliques et présente deux polymorphismes HPA-3 et HPA-9. Les épitopes HPA-1, HPA-4, HPA-6, HPA-7, HPA-8, HPA-10 et HPA-11 sont eux localisés sur la seconde glycoprotéine du complexe, la GPIIIa, qui s'exprime sous 8 formes alléliques. La GPIIb présente un système HPA, le HPA-2a alors que les GPV et GPIX ne présentent pas de polymorphisme connu.

Certains de ces systèmes HPA jouent un rôle important dans l'alloimmunisation plaquettaire, c'est le cas des HPA-1 à HPA-5 (Curtis and McFarland, 2014). Ces antigènes sont également à l'origine de thrombocytopénies néonatales alloimmunes. Egalement appelée FNAIT de l'anglais « fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia », cette pathologie résulte d'une immunisation de la mère contre les antigènes plaquettaires du fœtus hérités du père. Les anticorps produits entraînent une thrombopénie par destruction des plaquettes du fœtus et sont associés à des hémorragies intracrâniennes à la naissance dans 10% des cas (Böhm et al., 2019).

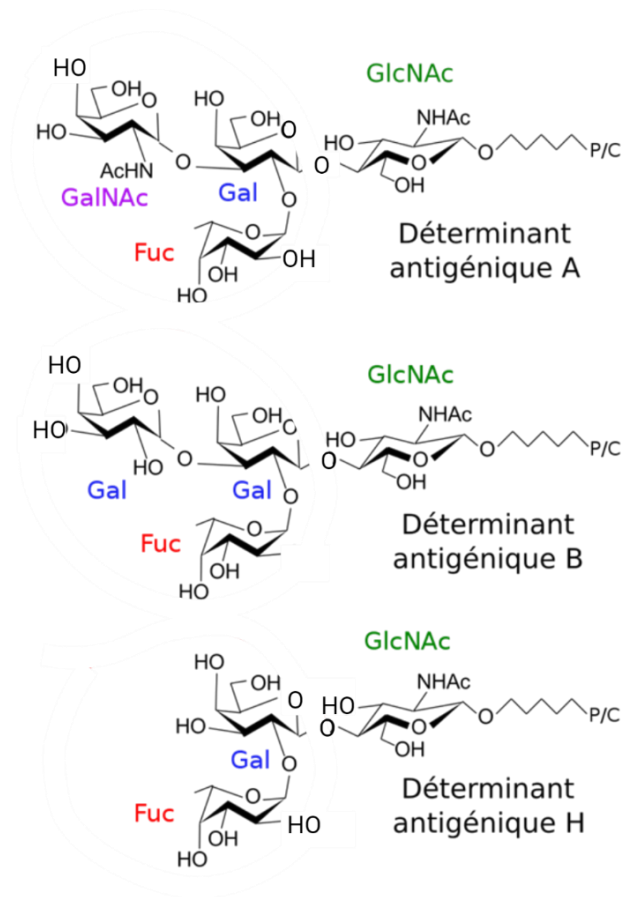


Figure 8 : Le système antigénique ABO à la surface des plaquettes

Les chaînes de sucres sont portées par des protéines (P) ou des céramides (C). GlcNAc, N-acétyl-D-glucosamine; Gal, D-galactose; GalNAc, N-acétyl-D-galactosamine; Fuc, L-fucose.

Certains polymorphismes sont plus fréquents que d'autres, c'est le cas de l'HPA-1a avec des anticorps anti-HPA1a retrouvés dans 85% des cas d'alloimmunisation maternelle (Blanchette et al., 2000). Le CD36 (ou GPIV) est également une source d'alloimmunisation fœtale et transfusionnelle. Cette glycoprotéine de la famille des récepteurs « scavenger » est exprimée à la surface des plaquettes mais également des monocytes, des macrophages, de certaines cellules endothéliales, des adipocytes, des cellules épithéliales du rein et des myocytes cardiaques (Febbraio et al., 2001). Les anticorps anti-Naka, antigène porté par le CD36, ont été identifiés la première fois chez un patient présentant un état réfractaire malgré la transfusion de produits plaquettaires HLA-compatibles (Ikeda et al., 1989 ; Tomiyama et al. 1990). Ces études ont permis de mettre en évidence un phénotype Naka/null asymptomatique présent chez seulement 0.3% de la population caucasienne mais plus fréquent chez les asiatiques (5-11%) et décrit également en Afrique de l'ouest (2.5%) (Gelhaus et al., 2001; Rać et al., 2007).

iii. *Le système ABO*

Le système ABO est un système allotypique de groupe sanguin dont les gènes sont situés sur le chromosome numéro 9. Deux allèles codominants A et B ainsi qu'un allèle amorphe O définissent la présence ou l'absence de deux antigènes A et B sur les globules rouges, les tissus et les sécrétions.

Les antigènes A et B ne sont pas les produits primaires de l'expression des gènes comme peuvent l'être les antigènes de nature protéique. Leur synthèse dépend de l'activité d'enzymes spécifiques. La première étape correspond à la synthèse de la substance H qui constitue le précurseur des antigènes A et B. L'ajout des antigènes A et B à la substance H est par la suite réalisée par des glycosyltransférases A et B, des enzymes codées par les allèles A et B. Les gènes codant pour ces enzymes sont codominants; une personne possédant les allèles A et B exprimera donc les antigènes A et B (Yamamoto, 2004). Il existe aussi un allèle silencieux entraînant l'absence de glycosyltransférase et donc d'antigène A ou B et l'existence du groupe O.

L'expression du système ABO sur les plaquettes varie énormément entre les individus mais est largement inférieure à celle retrouvée à la surface des érythrocytes, 100 fois moins en moyenne. On retrouve ainsi entre 2 000 à 16 000 antigènes AB à la surface des plaquettes A+ et/ou B+ présents sur les plaquettes des individus présentant le phénotype érythrocytaire correspondant (Curtis et al., 2000; Garraud et al., 2023).

Ces antigènes du système ABO sont des déterminants d'oligosaccharides présents sur les glycoprotéines et notamment sur la GPIIb (Dunstan et al., 1985) (**Figure 8**).

2. LA TRANSFUSION DE PLAQUETTES SANGUINES

Jusqu'en 1668, les chercheurs pensaient que le sang était un liquide qui se déplaçait dans un sens puis dans l'autre dans le corps, tel « les marées de la mer ». William Harvey fut le premier à décrire le sang comme étant un liquide dans une circulation systémique fermée par des vaisseaux sanguins. Il proposa également la mécanistique : le cœur avait un rôle de pompe et les deux ventricules, par contractions, permettaient de propulser le sang. La première transfusion d'animal à humain date de 1667 et est attribuée à Jean-Baptiste Denis, qui s'occupait d'un patient souffrant de fièvre depuis des mois, à qui il transfusa du sang d'agneau. Si ce patient survécut, les transfusions inter-espèces engendrèrent de nombreux décès. En 1818, James Blundell, un gynécologue obstétricien, réalisa la première transfusion inter-humaine afin de contrôler des hémorragies post-partum. James Blundell se heurta à deux notions qui empêchèrent le bon déroulement des transfusions : la notion d'incompatibilité et de coagulation. En effet, les transfusions ne purent être efficace qu'après la découverte des groupes sanguins ABO en 1900 par Karl Landsteiner, puis de l'anticoagulant, le citrate de sodium en 1914 par Albert Hustin et enfin de l'antigène Rh(D) par Karl Landsteiner et Alexander Solomon Wiener en 1940 (Learoyd, 2012). Les transfusions de produits sanguins furent alors de plus en plus maîtrisées pour atteindre les procédés thérapeutiques usuels que nous connaissons aujourd'hui.

A. Les thrombopénies

Chez l'homme, les plaquettes circulent dans le sang durant 8 à 10 jours à une concentration physiologique de 150 000 à 400 000 plaquettes/ μL (Boneu et Cazenave, 1997). Le terme « thrombopénie » est utilisé lorsque la numération plaquettaire est anormalement basse. Si officiellement, cette numération est considérée comme anormale lorsqu'elle est inférieure à 150 000 plaquettes/ μL , une numération comprise entre 150 000 à 100 000 plaquettes/ μL et stable depuis plusieurs mois chez un patient ne présentant pas de facteur de risque, révèle certes un dysfonctionnement mais n'engendre pas de risques hémorragiques (Stasi, 2012). Lorsque les thrombopénies atteignent des seuils critiques, avec une numération inférieure à 10 000 plaquettes/ μL , elles sont alors appelées thrombopénies sévères. La quantité de plaquettes ne permet plus d'assurer correctement l'hémostase entraînant ainsi des risques hémorragiques importants (Humbrecht et al., 2018).

Si 10 000 plaquettes/ μL suffisent à assurer l'hémostase, il est à noter que dans l'état actuel de nos connaissances, nous n'avons pas encore compris pourquoi la concentration physiologique de plaquettes circulantes est de 150 000 $\text{plt}/\mu\text{L}$ ou plus. Une hypothèse est qu'une quantité de plaquettes si élevée servirait de réserve en cas de consommation importante suite à une inflammation par exemple. En effet, en cas d'état inflammatoire, les plaquettes peuvent être consommées au niveau de l'endothélium activé (McFadyen et Kaplan, 2015). Une numération physiologique importante pourrait également être utile pour assurer leurs autres fonctions puisque les plaquettes sont entre autres des acteurs importants des réponses immunitaires (Cloutier et al., 2018). Cette dualité de fonction, immunitaire et hémostatique, pourrait expliquer la grande réserve de plaquettes circulantes même si de nombreuses interrogations subsistent sur leurs rôles au-delà des fonctions hémostatiques.

Les thrombopénies peuvent avoir différentes origines. Les thrombopénies dites **centrales** sont dues à un défaut de production des plaquettes par la moelle osseuse lors de pathologie (i.e. myélofibrose (Sastow et al., 2022)) ou de traitement (i.e. chimiothérapie aplasante (Kuter, 2015)) altérant la capacité de la moelle osseuse à produire des cellules sanguines. Les thrombopénies dites **périphériques** sont dues à une consommation excessive des plaquettes circulantes. Cette consommation peut-être le fruit d'une séquestration splénique dans les situations de splénomégalie par exemple (Aster, 1966; Saab et Brown, 2019) ou être directement liée à l'état inflammatoire du patient. La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est, par exemple, à l'origine d'une consommation de plaquettes en périphérie. La CIVD est un syndrome acquis sous-jacent à diverses pathologies ou conditions inflammatoires (i.e. destruction d'organes, sepsis, cancer) qui se caractérise par une activation de la coagulation de manière systémique (Taylor et al., 2001). Une consommation accrue de plaquettes peut également survenir lors de la grossesse. Ces thrombopénies gestationnelles surviennent dans 10% des cas et l'origine reste mal définie (Habas et al., 2022). Une hypothèse est que les plaquettes maternelles circulent dans le placenta et peuvent être consommées dans les chambres intervillieuses du placenta afin d'assurer l'intégrité de cette zone. La chambre intervillieuse constitue un lieu d'échange de gaz, de nutriments et de déchets entre les vaisseaux de la mère et ceux du fœtus mais également une barrière pour que le sang de la mère et de l'enfant ne se mélangent pas (Reese et al., 2019).

Grade de saignement WHO	Exemples de saignements
1	Epistaxie ≤30 min dans les dernières 24h Petechie des muqueuses ou de la peau Hémorragie oropharyngée ≤30 min Faible saignement vaginal anormal
2	Epistaxie ≥30 min dans les dernières 24h Hémorragie articulaire Hématémèse Hématurie visible Hémoptysie Hémorragie rétinienne sans trouble de la vue
3	Hémorragie nécessitant une transfusion de globules rouges au-delà des besoins transfusionnels habituels Saignement associé à une instabilité hémodynamique modérée
4	Saignement associé à une instabilité hémodynamique Sévère hémorragie fatale Hémorragie du SNC sur l'imagerie

Tableau 2 : Echelle de gravité des saignements WHO adapté de Miller et al. Cancer 1981

B. Stratégie transfusionnelle

Historiquement, les patients présentant des thrombopénies profondes responsables d'hémorragies et nécessitant un apport de plaquettes ont été transfusés avec du sang total. Les premières préparations de plaquettes à partir de dons de sang eurent lieu au début des années 1960 en utilisant la technique de séparation des constituants du sang. Elles furent utilisées pour maîtriser des thrombopénies profondes induites par des chimiothérapies (Gaydos et al., 1962). Aujourd'hui, la stratégie transfusionnelle se base sur une attitude prophylactique ou curative et dépend à la fois du type de pathologie et des caractéristiques du patient. Il est important de noter que la stratégie transfusionnelle décrite ici est celle de la France mais qu'elle varie en fonction des pays. Si de nombreuses indications sont identiques entre les pays, des indications de transfusions internationales et consensuelles sont encore manquantes (Estcourt et al., 2017; Humbrecht et al., 2018; Kaufman et al., 2015)

Transfusions curatives

Les transfusions curatives reposent sur la nécessité de contrôler un saignement déjà présent en cas de déficit qualitatif ou quantitatif des plaquettes ou d'hémorragie massive. Des saignements importants peuvent survenir après un traumatisme, suite à une opération chirurgicale lourde ou encore en conditions de thrombopénies sévères avec l'apparition de saignements spontanés. Les saignements suivent un système de classement établi par l'organisation mondiale de la santé (**Tableau 2**); le grade 0 : pas de saignement ; le grade 1 évoque des pétéchies, des ecchymoses et autres saignements légers ; les saignements de grade 2 comprennent les hémorragies qui ne nécessitent pas la transfusion de globules rouges telles que les épitaxies, les hématémèses ou encore les hématuries. Les transfusions sont recommandées pour stopper un saignement dès le grade 3 (Slichter, 2007). La gradation 4 correspond à des hémorragies engageant le pronostic vital. En fonction du contexte clinique, les transfusions peuvent reposer sur des concentrés plaquettaires seuls mais sont le plus souvent accompagnées de transfusions de concentrés de globules rouges et de transfusion de plasma notamment en cas d'hémorragie massive. S'il n'y a pas de consensus établi sur le ratio idéal, les volumes de globules rouges et de plasma transfusés sont plus importants que ceux des concentrés plaquettaires. Concernant les hémorragies massives, le protocole favorise la perfusion de composants sanguins dans un ratio proche de la composition du sang total (c'est-à-dire une unité de plasma, une unité de plaquettes : notion anglo-saxonne correspondant à 10^{11} plaquettes et une unité de globules rouges) mais aucun bénéfice de ce ratio comparativement à un ratio d'une unité de plaquettes et une de plasma pour deux culots de globules rouges n'a été déterminé (Trudeau, 2021).

A	• 10 G.L⁻¹ si aucun facteur de risque ;
B	• 20 G.L⁻¹ : si fièvre ≥ 38,5 °C, infection, hypertension artérielle, mucite de grade ≥ 2, lésion à potentiel hémorragique, cinétique de décroissance rapide de la NP en 72 heures ;
C	• 50 G.L⁻¹ : ○ si CIVD-fibrinolyse ; ○ si geste invasif : ponction lombaire, biopsie médullaire, cathéter central, endoscopie digestive et biopsie, endoscopie bronchique et lavage broncho-alvéolaire ou brosse, ponction biopsie hépatique, ponction transbronchique, avulsions dentaires ;
AE	○ si traitement anticoagulant.

Figure 9: Facteurs de risques impactant le seuil de transfusion selon les recommandations des transfusions de plaquettes publiées par l'HAS et l'ANSM

A: Preuve scientifique établie

B: Présomption scientifique

C: Faible niveau de preuve

AE: Accord d'experts

Concernant les patients présentant un déficit qualitatif des plaquettes, notamment les patients Glanzmann et Bernard Soulier, les plaquettes transfusées et les plaquettes endogènes présentent des différences structurales à l'origine d'alloimmunisation anti-GPIIb/IIIa pour les Glanzmann et anti-GPIb-V-IV pour les Bernard Soulier (Curtis et McFarlàand, 2014). Ainsi, les indications thérapeutiques usuelles de transfusion tendent à être remplacées par des thérapies de substitution telles que des traitements pharmacologiques à base d'acide tranexamique, un inhibiteur de la fibrinolyse, de facteur VIIa, un élément clé de l'hémostase secondaire ou encore de desmopressine qui entraîne la libération de facteur de von Willebrand par liaison aux récepteur V2 à la surface des cellules endothéliales et qui facilite ainsi l'adhésion des plaquettes (Humbrecht et al., 2018). Si les traitements pharmacologiques sont contre-indiqués, inefficaces ou s'il y a un risque élevé d'hémorragie, une transfusion de plaquettes est alors envisagée pour ces patients (Estcourt et al., 2017).

Transfusions prophylactiques

Les transfusions prophylactiques reposent sur la nécessité d'une quantité minimale de plaquettes circulantes pour assurer l'hémostase et a pour but de prévenir la survenue d'une hémorragie chez un patient thrombopénique. Pour les patients sans facteur de risque hémorragique associé, le seuil d'indication de transfusion a longtemps été fixé à 20 000 plaquettes/ μ L suite à une étude réalisée en 1962. Cette étude a révélé une corrélation entre numération plaquettaire et hémorragie chez 92 patients nouvellement diagnostiqués pour une leucémie aigüe. Les auteurs ont alors établi qu'une numération supérieure à 20 000 plaquettes/ μ L était rarement associée à une hémorragie sévère. Cependant, cette étude présente une faiblesse importante puisqu'une partie des patients de la cohorte était traitée par aspirine pour diminuer la fièvre. Les saignements visibles chez les patients ayant une numération plus faible peuvent ainsi être dus à une incapacité fonctionnelle des plaquettes et non à une numération trop basse (Gaydos et al., 1962; Vadhan-Raj, 2009). En effet, une étude publiée par Slichter et al. en 1978 montrant que des saignements spontanés surviennent lorsque la numération est inférieure à 5 000 plaquettes/ μ L, suggère qu'une numération de 5 000 plaquettes/ μ L est suffisante pour éviter des saignements spontanés (Slichter and Harker, 1978). Basé sur cette étude et de nombreuses autres publiées dans les années 90, une conférence pour obtenir un consensus a été organisée par le Royal College of Physicians à Edimbourg en 1997. Les scientifiques ont alors diminué le seuil indicatif de transfusion à 10 000 plaquettes/ μ L pour les patients sans facteur de risque (Benjamin and Anderson, 2002; Contreras, 1998). Cette indication transfusionnelle varie cependant pour les patients sous anticoagulant, atteints d'une CIVD ou/et d'un sepsis (**Figure 9**). Ce seuil évolue également dans un contexte périopératoire car les seuils de numération plaquettaire justifiant la transfusion sont à pondérer par l'existence de facteurs de risques hémorragiques. Le seuil est ainsi

ramené à 50 000 plaquettes/ μ L en cas de transplantation hépatique, 75 000 plaquettes/ μ L pour le domaine obstétrical et 100 000 plaquettes/ μ L en cas de neurochirurgie, de ponction rachidienne ou de chirurgie du segment postérieur de l'œil. Il est à noter que les transfusions prophylactiques sont déconseillées lorsque l'origine de la thrombopénie est périphérique et non traitée, notamment en cas : d'hypersplénisme, de CIVD, de purpura thrombopénique auto-immun et de thrombopénie médicamenteuse (recommandations HAS - 2021). En effet, si la cause de la thrombopénie n'est pas traitée, les plaquettes transfusées risquent d'être également éliminées menant à une inefficacité transfusionnelle.

Dose de plaquettes à transfuser

Si les indications de transfusions prophylactiques sont régulièrement soumises à débat, la dose de plaquettes à transfuser l'est également. Trois types de concentrés plaquettaires ont été étudiés dans la littérature, une faible dose ($\leq 2 \times 10^{11}$ plaquettes), une dose classique (4×10^{11} plaquettes) et une dose élevée ($> 4,5 \times 10^{11}$ plaquettes). Dans l'étude « SToP », comptabilisant 119 patients thrombopéniques dans 3 pays différents, des hémorragies de grade 4 ont été retrouvées dans 5% des patients transfusés avec une faible dose de plaquettes contre aucun pour les patients transfusés avec un dosage classique. Ces résultats ont mis fin à l'étude suite à un risque relatif trop important (Heddle et al., 2009). Pour Slichter et al., les trois doses de concentrés plaquettaires n'ont pas eu d'influence sur la survenue des effets indésirables aux transfusions sur les patients, ni sur la survenue d'hémorragies de stade 2, point limite de l'expérience (Slichter et al., 2010). Suite à des essais cliniques réalisés sur des patients d'hémo-oncologie, la France a opté pour des concentrés à haute dose : 0,5 à $0,7 \times 10^{11}$ plaquettes pour 10 kg, ce qui correspond à un nombre de plaquette compris entre 2 et 8×10^{11} plaquettes par transfusion. Ceci représente 2 à 8 fois la production journalière de plaquettes (Humbrecht et al., 2018). Le but ici est de ne pas être limitant dans les transfusions et de remonter la numération au maximum. A titre indicatif, la France est le seul pays qui adapte la dose des plaquettes à transfuser en fonction du poids des patients, les autres pays tels que les Etats-Unis ou encore le Royaume-Uni transfusent des unités de concentré plaquettaire dont le dosage précis est inconnu (Estcourt et al., 2017; Kaufman et al., 2015; Kolakoski, 2012). Il est à noter que les études sur les doses de plaquettes à transfuser ont été réalisées dans le cadre de transfusions prophylactiques. A ce jour, aucun essai clinique n'établit de dose adaptée en cas d'hémorragie et les différents articles sur le sujet évoquent des ratios de concentrés plaquettaires (nombre de CP en fonction du nombre de culots de globules rouges et de plasma transfusés) et non des doses précises.

Les différents types de concentrés plaquettaires

Deux types de concentrés plaquettaires (CP) sont autorisés en France, tous deux déleucocytés par un procédé détaillé ultérieurement. Les mélanges de concentrés plaquettaires (MCP) et les concentrés plaquettaires issus d'aphérèse (CPA). Ces deux CP diffèrent dans leur prélèvement et la préparation avant la transfusion. Le CPA provient de l'extraction sélective des plaquettes par aphérèse chez un donneur de sang. L'aphérèse est une méthode de séparation des différents éléments sanguins : par différents procédés de centrifugation, les composés sanguins sont séparés avec les plaquettes et le plasma d'une part et les globules rouges et globules blancs d'autre part, qui sont eux réinjectés au patient. Le MCP provient du mélange d'au maximum 8 couches leucoplaquettaires de plusieurs donneurs de même groupe ABO. Les MCP sont préparés à partir de donneurs masculins, de femmes nullipares ou ayant eu des enfants, mais ne doivent pas contenir plus de 2 couches leucoplaquettaires provenant de femmes non nullipares non testées pour les anticorps anti-HLA. Ces couches leucoplaquettaires sont extraites à partir de dons de sang total. Dans les MCP comme les CPA, une partie du plasma est enlevée des poches et remplacée par une solution additive de conservation afin de limiter les événements indésirables receveurs tels que les réactions allergiques ou le TRALI (transfusion related lung injury). De plus, ce procédé permet d'extraire le plasma des poches et de produire des unités plasmatiques. La solution de conservation contient 30 mM d'acétate, 26 mM de phosphate, 77 mM de NaCl et 10 mM de citrate et est ajoutée au concentré plaquettaire dans une proportion de 60 à 65% pour 35% à 40% de plasma (Isola et al. 2021). Aujourd'hui en France, dans 70% des cas, les transfusions sont réalisées à partir de MCP. Dans les 30% restants, les transfusions sont réalisées à partir de CPA (HAS – rapport hémovigilance 2021). La prescription de CPA en faveur de MCP a longtemps été débattue en raison d'un potentiel immunogénique et d'un risque infectieux plus important pour les MCP. Cette hypothèse repose sur une multitude de donneurs et donc différentes sources de leucocytes présents dans la poche pourraient augmenter les risques d'immunisation et d'infection. Le CPA provient d'un seul donneur et limiterait donc ces risques. Cette théorie n'a plus lieu d'être depuis la généralisation de la déleucocytation et de l'inactivation des pathogènes, et est réfutée par de nombreuses études (Schrezenmeier et Seifried, 2010). Les chiffres d'hémovigilance rapportent même une incidence d'évènement indésirable receveur (EIR) plus importantes avec les CPA (8.9 pour 100 000) qu'avec les MCP (5 pour 100 000) (chiffre de 2016 à 2021, Rapport hémovigilance ANSM 2022). Aujourd'hui seules deux situations imposent le recours à un CPA : la transfusion de patients alloimmunisés avec des plaquettes au phénotypage connu (détaillé partie III. 1) ce qui exclut par définition l'usage de MCP. Les transfusions pour les patients pédiatriques sont également basées sur des CPA fractionnés (procédé non approuvé pour les MCP) ce qui permet d'adapter la dose en fonction du poids du patient et d'éviter une surcharge volumique sans modifier la concentration du produit.

Compatibilité ABO

En première intention et malgré une faible exposition des antigènes ABO à la surface des plaquettes, les CP sont transfusés en respectant la compatibilité ABO entre le donneur et le receveur. Il est néanmoins possible de transfuser dans toutes les combinaisons (HAS – recommandations 2021) cependant un rendement transfusionnel optimal n'est pas assuré avec une perte de rendement estimée à -2249 plaquettes/ μ L en cas d'incompatibilité ABO (Humbrecht et al., 2018). Il est également nécessaire de vérifier l'absence d'anticorps dirigés contre les antigènes A et B, appelés hémolysines, ou à une absence des antigènes ciblés par ces derniers. Dans l'urgence, il peut être intéressant de transfuser des CP dont la majorité du plasma présent dans la poche a été remplacée par une solution additive afin d'éliminer les anticorps naturels anti-A et ou anti-B potentiellement (Garraud et al., 2023).

Durée de stockage

En France, les concentrés plaquettaires (CP) sont conservés sous agitation douce à une température régulée entre 20°C et 24°C pour une durée maximale de 7 jours. Le risque de développement d'agents infectieux lors du stockage à température ambiante a été considérablement réduit depuis que les poches de CP sont traitées avec de l'amotosalène psoralène qui s'intercale dans l'ADN et permet l'inactivation des pathogènes après illumination aux ultraviolets A, procédé décrit en partie II. 3). La durée de conservation reste limitée pour préserver au maximum les fonctions plaquettaires. En effet, la durée de stockage entraîne une détérioration de la qualité des concentrés plaquettaires suite à l'apparition de lésions de stockage, détaillées en paragraphe II. 3), et affecte la survie post-transfusionnelle des plaquettes (Isola et al., 2021). Le résultat de plusieurs études montre que l'intervalle entre deux transfusions est plus important (0,25 jours de plus) après la transfusion de CP conservés moins de 3 jours par rapport à ceux conservés plus de 4 jours (Kreuger et al., 2017). A noter que les méthodes de préparations des CP et la solution additive ajoutée influent sur ces lésions de stockage. L'élimination du citrate dans les MCP limite les effets délétères du stockage sur le métabolisme plaquettaire, l'activation spontanée et l'apoptose et améliore l'agrégation plaquettaire (Isola et al., 2021). Si les lésions de stockage s'accumulent au cours de la conservation, la valeur de recirculation des plaquettes après 5 jours de conservation est néanmoins comprise entre 70 et 80% de la valeur attendue au premier jour de conservation et suffit pour conserver une efficacité clinique pour la prévention et l'arrêt des saignements (Andreu et al., 2007) (HAS, Transfusion de plaquettes - recommandations pour la pratique clinique 2015).

En France, la majorité des transfusions plaquettaires est réalisée à partir de concentrés plaquettaires datant de plus de 4 jours (4,3 jours en moyenne pour l'année 2022, portail décisionnel EFS). Ce délai

moyen entre le prélèvement et la transfusion s'explique par la durée des différents procédés de préparation des poches. Les étapes de constitution des mélanges de couches leuco-plaquettaires et d'inactivation des pathogènes ainsi que l'acheminement pour certains centres transfusionnels rendent la délivrance des CP sur site impossible avant la fin du 2^{ème} jour de conservation. Après respect des critères de choix d'un CP (compatibilité ABO, dose, présence d'hémolysines), les CP sont ensuite transfusés par date d'ancienneté afin de limiter la péremption des PSL. Avant toute transfusion, une vérification visuelle est néanmoins effectuée lors du choix du CP afin d'éliminer les poches présentant tout signe de préactivation plaquettaire. Lors de cette vérification, les CP dont les plaquettes ne reflètent plus la lumière suite à un changement de forme lors d'une activation (passage de discoïde à sphérique) sont éliminés. Il s'agit d'une évaluation du « swirling » plaquettaire, encore appelée tournoiement (Mathai et al., 2006). De même, les CP présentant des agrégats visibles sont éliminés.

Déleucocytation

Depuis 1998, en France, les concentrés plaquettaires sont déleucocytés, afin de limiter la transmission virale, le risque d'alloimmunisation et les réactions fébriles aux transfusions (Slichter, 2007). Cette déleucocytation est réalisée grâce à un filtre directement intégré dans le dispositif de prélèvement. Cette technique de filtration permet la rétention des leucocytes par leur taille. Elle permet d'aboutir à un chiffre de leucocytes résiduels inférieur à 1×10^6 leucocytes/CP. A titre indicatif, les CP aux Etats-Unis contiennent une quantité inférieure à 5×10^6 leucocytes/CP (Ng et al., 2018). Cette déleucocytation participe à la bonne tolérance des transfusions en limitant les lésions de stockage (libération d'enzymes, de cytokines ou de vésicules dérivées de leucocytes), les risques viraux et bactériens ainsi que la densité antigénique injectée lors des transfusions (Ng et al., 2018).

Rendement d'une transfusion

Selon la HAS, toute ordonnance de prescription de CP doit comporter obligatoirement le poids du patient, la numération plaquettaire datée et la posologie souhaitée par le prescripteur en fonction de la pathologie. Ces informations sont indispensables pour permettre à l'établissement de sélectionner le CP le plus approprié et au prescripteur de calculer le rendement de recirculation plaquettaire (CCI pour corrected count increment). Ce rendement se base sur le calcul suivant :

$$CCI = \frac{[NP \text{ après transfusion} - NP \text{ avant transfusion}] \times \text{surface corporelle (m}^2\text{)} \times 100}{\text{Nombre de plaquettes transfusées (x } 10^{11}\text{)}^*}$$

Les numérations plaquettaires sont exprimées en $G.L^{-1}$. Si la valeur du CCI est inférieure à 7, ceci indique que le rendement transfusionnel n'est pas satisfaisant. Ce calcul n'a de valeur que pour les patients thrombopéniques qui ne saignent pas. En situation hémorragique, le seul critère fiable et objectif d'efficacité de la transfusion est l'arrêt du saignement.

Plusieurs groupes ont rapporté l'intérêt de mesurer la numération plaquettaire à 10 min car elle pourrait être aussi informative que la numération à 1 heure (O'Connell et al., 1988). Cependant, cet article étudie le rendement chez des patients thrombopéniques stables, transfusés avec des CP datant de moins de 3 jours et HLA compatibles. Ces conditions « idéales » ne correspondent pas à la réalité ni en terme de « qualité » de CP délivré ni en terme de contexte clinique des patients dont la majorité présentent plusieurs facteurs de consommations plaquettaires rapides capables d'influencer la numération entre 10 min et 1h. Une autre étude sur patients atteints de pathologies plus variées révèle que les plaquettes ont besoin d'au moins 60 minutes pour s'équilibrer dans l'espace intravasculaire. Par conséquent, pour une meilleure fiabilité, la numération ne doit pas être mesurée dans l'heure qui suit la fin de la transfusion (Brubaker et al., 1998).

II. L'ALLOIMMUNISATION PLAQUETTAIRE POST-TRANSFUSIONNELLE

Malgré la mise en place de mesures préventives et d'importants progrès dans l'amélioration des pratiques transfusionnelles, des événements indésirables plus ou moins graves sont toujours rapportés chez les receveurs. La gravité de ces événements indésirables est définie par une échelle de grade de sévérité : le grade 1 correspond à un événement indésirable receveur (EIR) non sévère, le grade 2 à un EIR sévère, le grade 3 à une menace vitale immédiate alors que le grade 4 désigne les décès. Parmi les effets indésirables receveurs causés par tous les produits sanguins labiles (PSL) confondus, l'œdème de surcharge pulmonaire (TACO : Transfusion associated circulatory overload) et la lésion pulmonaire aigue liée à la transfusion (TRALI : Transfusion related lung injury) sont les principales causes de décès. Ces syndromes de détresse respiratoire aiguë surviennent dans les 6 heures suivant une transfusion sanguine. Le TACO se caractérise par un œdème pulmonaire hydrostatique, tandis que le TRALI se manifeste par un œdème pulmonaire de perméabilité (Semple et al., 2019). Les alloimmunisations isolées sont également à l'origine d'effets indésirables receveurs mais induisent principalement des grades 1 (95,5% de grade 1) (HAS - Rapport hémovigilance 2021). Leur incidence est de 75,6 pour 100 000 CP transfusés.

1. DEFINITION ET INCIDENCE

Le terme d'alloimmunisation isolée est évoqué lors d'un constat de la présence d'alloanticorps chez un patient transfusé, qui n'avait pas été détecté lors d'analyses antérieures. Ces anticorps peuvent être de nature diverse : anti-érythrocytaires, anti-leucocytaires ou anti-plaquettaires. Parmi les alloimmunisations isolées, l'alloimmunisation plaquettaire (AIP) est définie par une production d'anticorps par le receveur, dirigés contre des alloantigènes présents à la surface des plaquettes du donneur. Pour que l'alloimmunisation plaquettaire soit qualifiée de post-transfusionnelle, les anticorps ne doivent pas être détectés chez le patient avant la transfusion or il n'est pas habituel de pratiquer des analyses biologiques à la recherche d'alloanticorps avant et après transfusion.

Ainsi, l'absence de recherche d'anticorps en routine entraine une sous-estimation importante de l'alloimmunisation isolée anti-plaquettaire, 0,1% des cas selon l'ANSM en 2018 (ANSM-Santé / 2018). De plus, les patients reçoivent fréquemment des transfusions de produits sanguins de différentes natures (GR, plasma, plaquettes) ce qui complique l'imputabilité de l'alloimmunisation (Goswamy et al., 2021; Recommandations de l'HAS 2015).

L'alloimmunisation est en tant que telle asymptomatique, mais les alloanticorps produits peuvent entraîner des complications lors de transfusions récurrentes et/ou lors de greffes d'organes. En effet, les alloanticorps produits peuvent conduire à l'élimination des plaquettes nouvellement transfusées entraînant une inefficacité transfusionnelle appelée état réfractaire, qui fera l'objet d'une partie détaillée (paragraphe III page 2). Lors des transfusions de concentrés plaquettaires, les sources d'alloimmunisation anti-HLA-I sont multiples : elles peuvent être dues aux leucocytes résiduels présents dans la poche, aux plaquettes elles même qui expriment ces alloantigènes ou aux vésicules extracellulaires d'origine plaquettaire et/ou leucocytaire qui expriment également des molécules HLA-I à leur surface (Marcoux et al., 2021b; Pavenski et al., 2012).

Avant 1995, date de la généralisation de la déleucocytation en France, l'alloimmunisation isolée non érythrocytaire était beaucoup plus courante, due à la présence de leucocytes dans les concentrés plaquettaires. En 1994, une étude internationale rapporte une diminution de l'incidence de l'alloimmunisation de 46 à 25% (Engelfriet and Reesink, 2003) dans les pays appliquant la déleucocytation. Dans la même dynamique, l'étude TRAP datant de 1997 décrit une alloimmunisation deux fois plus importante lorsque les produits sanguins ne sont pas déleucocytés (55% d'alloimmunisation anti-HLA-I après la transfusion de produits non transformés contre 28% après déleucocytation) (Jackman et al., 2014; NCT00000589, 1999). La déleucocytation a ainsi eu un impact direct sur les risques d'alloimmunisation anti-HLA-I et a permis une diminution significative des EIR. La déleucocytation des PSL, largement encouragée par la législation européenne, a également été appliquée dans toute l'Europe.

2. MECANISMES IMMUNITAIRES IMPLIQUES ET MODELES MURINS D'ALLOIMMUNISATION ANTI-CMH-I

Afin d'étudier les mécanismes et les acteurs impliqués dans le processus d'alloimmunisation, il est nécessaire de développer des modèles murins qui reproduisent la différence de compatibilité entre les plaquettes d'un donneur et celles d'un receveur au niveau des molécules du CMH-I. Dans le processus d'alloimmunisation, la détection des antigènes du non-soi peut être réalisée par différents types cellulaires. Trois voies d'alloimmunisation ont été décrites dans la littérature. La première voie dite **directe** repose sur une reconnaissance du complexe HLA-I-peptide exprimé à la surface d'une cellule présentatrice du donneur par les LT CD8⁺ receveur.

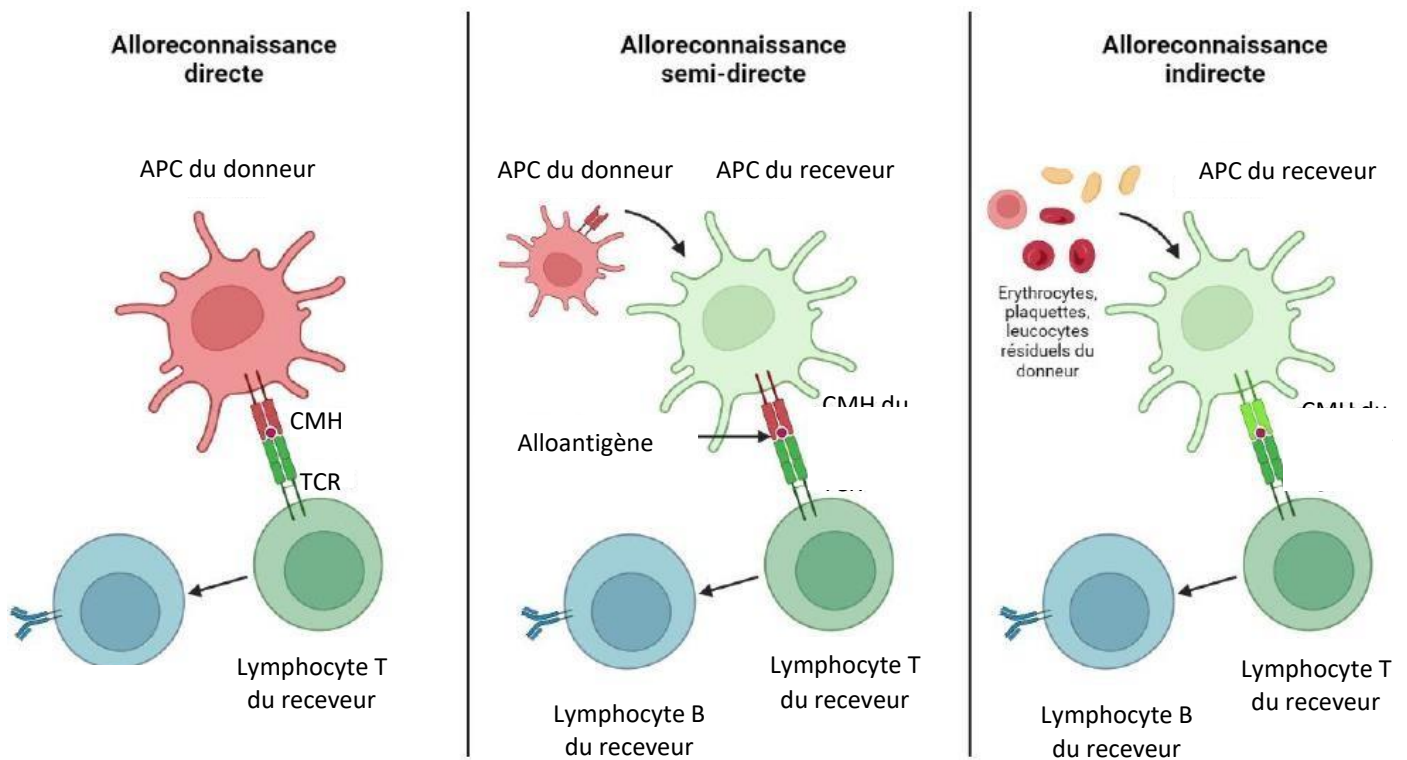


Figure 10 : Les trois voies d'alloimmunisation

Sont représentées les trois voies d'alloimmunisation décrites: l'alloimmunisation directe avec une reconnaissance du complexe allogénique CMH-I-peptide exprimé à la surface d'une CPAgs du donneur par les lymphocytes T du receveur. La deuxième voie de reconnaissance est dite indirecte et est médiée par les CPAgs du receveur. Ces CPAs internalisent les alloantigènes circulants, ils sont alors digérés dans des compartiments endosomaux avant d'être chargés et présentés à la surface par des molécules du CMH-II. Une autre voie a été décrite, semi-directe, avec une présentation des complexes CMH-I-peptides intacts et entiers du donneur à la surface des CPAgs du receveur mais également une présentation des antigènes allogéniques du donneur par le HLA-II. Adaptée du manuscrit de thèse de Mehdi KHELFA 2023.

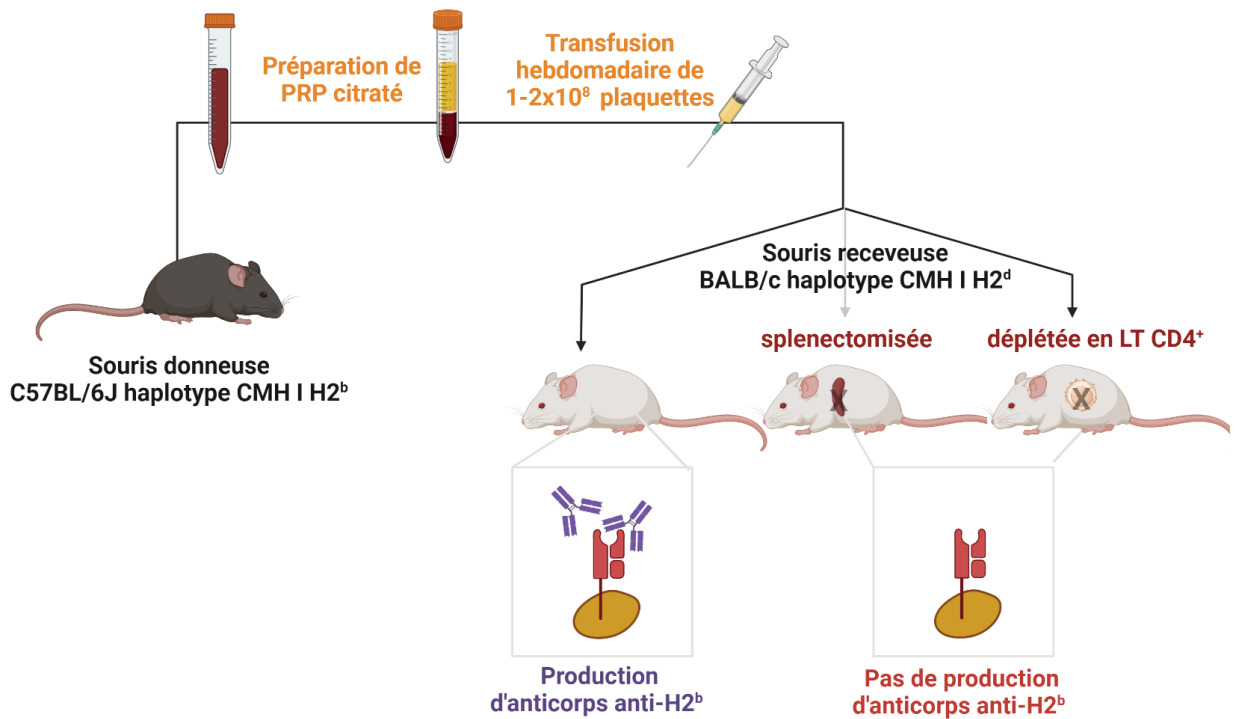
Cette reconnaissance directe est en cause dans les rejets de greffe après transplantation d'organes solides, suite à la présence de leucocytes du donneur dans le greffon (Boardman et al., 2016). La deuxième voie de reconnaissance est dite **indirecte** et est médiée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPAgs) du receveur. Ces CPAgs internalisent les alloantigènes circulants, ils sont alors dégradés dans des compartiments endosomaux avant d'être chargés et présentés à la surface des molécules du CMH-II (Semple et al., 1995). Ces CPAgs sont ensuite en mesure d'initier une réponse alloimmune par interaction avec les lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺). Comme décrit ci-dessous, c'est cette voie de présentation qui est privilégiée dans l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. Une autre voie, **semi-directe**, a été décrite avec une présentation des complexes CMH-I-peptides intacts et entiers du donneur à la surface des CPAgs du receveur mais également une présentation des antigènes allogéniques du donneur par les molécules CMH-II du receveur (Bang et al., 2000) (**Figure 10**).

Mécanismes de présentations antigéniques et réponse alloimmune humorale

L'un des premiers modèles murins d'alloimmunisation plaquettaire a été développé par l'équipe de John Semple. Ce modèle se base sur des transfusions de plaquettes entre deux souris d'haplotype CMH-I différents. Les souris donneuses C57BL/6J sont d'haplotype H2^b et les souris receveuses BALB/c d'haplotype H2^d. Les transfusions de plaquettes (2×10^8) de la souris donneuse C57BL/6J à la souris receveuse BALB/c sont réalisées de manière hebdomadaire durant plusieurs semaines et mènent à une production d'alloanticorps anti-H2^b (Semple et al., 1995) (**Figure 11A**).

Afin d'évaluer si la présentation antigénique se fait via des interactions directes des CPAgs du donneur avec le système immunitaire du receveur, des études *in vitro* ont été réalisées. L'incubation de plaquettes avec des leucocytes allogéniques a permis de mettre en évidence une expansion et une activation de lymphocytes LT CD4⁺. La réponse induite ici est donc médiée par le CMH-II or les plaquettes en sont dépourvues. Ainsi la réponse immune impliquée est **indirecte** : les CPAgs du donneur internalisent et dégradent les alloantigènes avant de les présenter via le CMH-II aux LT CD4 naïfs (Semple et al., 1995). D'autres expériences réalisées par la même équipe confirment cette hypothèse. Le transfert adoptif de CPAgs, préalablement incubés avec des plaquettes allogéniques, et réinjectées dans une souris déclenche une réponse alloimmune par cette dernière (Bang et al., 2000). La réponse alloimmune est inhibée lorsque les CPAgs sont incubées en présence d'un inhibiteur de la phagocytose (colchicine) et de la voie endosomale de traitement des antigènes (aminoguanidine) (**Figure 11B**). Ces résultats indiquent une présentation antigénique indirecte : les alloantigènes sont internalisés dans la voie endosomale et présentés par le CMH-II des CPAgs de la souris receveuse. Dans le modèle murin similaire développé par l'équipe de Zimring, les auteurs identifient les anticorps

A) Schéma du modèle d'alloimmunisation par transfusions multiples



B) Schéma du modèle d'alloimmunisation par transfert adoptif

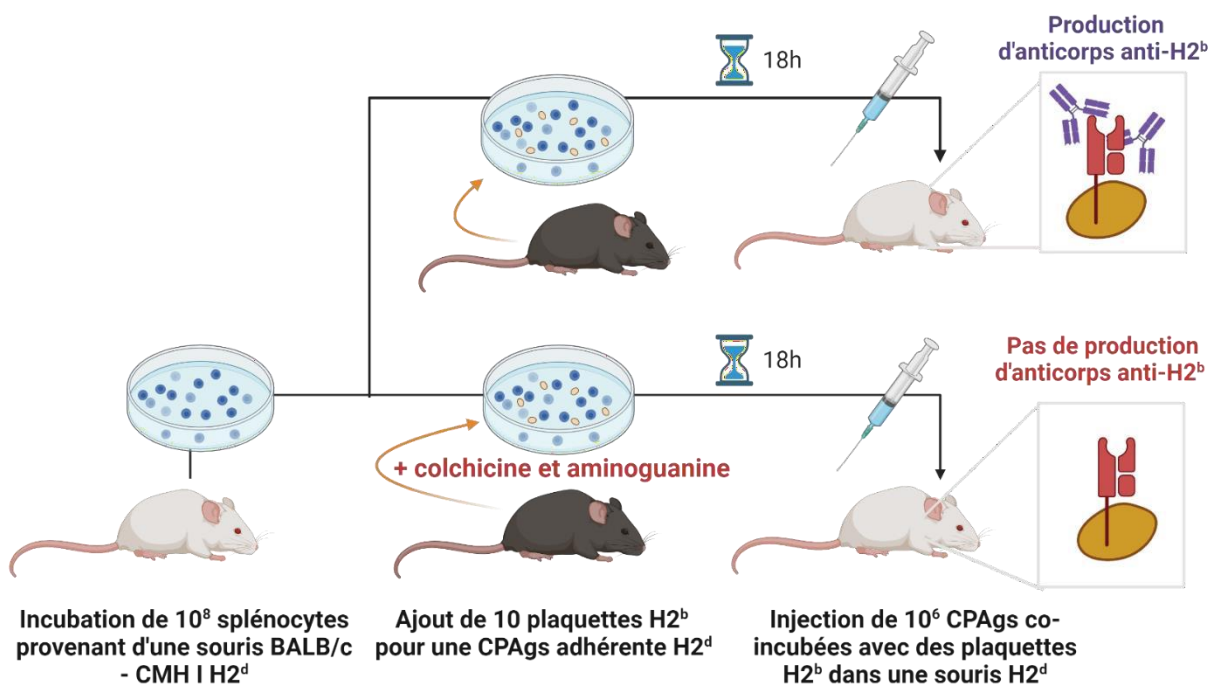


Figure 11 : Schémas récapitulatifs des différents modèles murins d'alloimmunisation plaquettaire

comme présentant des recombinaisons de classe, indiquant la participation des lymphocytes B et des LT CD4⁺ dans le processus immunitaire. L'importance des LT CD4⁺ a par la suite été confirmée car après leur déplétion, les transfusions n'induisent plus de production d'anticorps (**Figure 11A**). D'autre part, en utilisant un transfert adoptif de lymphocytes CD4⁺ spécifiques de l'allo-antigène, ils ont mis en évidence leur prolifération dans la rate (Gilson et Zimring, 2012). Enfin, une splénectomie de la souris receveuse prévient l'alloimmunisation induite par les transfusions, ce qui témoigne du rôle crucial de la rate dans cette réponse immune (Gilson et Zimring, 2012) (**Figure 11A**). Ce modèle murin d'alloimmunisation a ainsi permis d'identifier le mécanisme prédominant de présentation des alloantigènes transfusés comme étant indirect, d'identifier des acteurs majeurs de cette réponse tels que les lymphocytes B et T CD4⁺ et enfin, a révélé l'importance de la rate dans ce processus.

Il existe également une autre voie de présentation des alloantigènes **semi-directe**, avec une présentation des complexes HLA-I-peptides intacts et entiers du donneur à la surface des CPAs du receveur mais également une présentation des antigènes allogéniques du donneur par le système HLA-II du receveur (Saris and Pavenski, 2020). La présentation de complexes HLA-I-peptide du donneur par les CPAs du receveur est possible suite à la phagocytose de microvésicules contenant des récepteurs membranaires ou suite à de la trogocytose c'est à dire la capture d'une portion de membrane d'une cellule cible par une autre cellule qui l'expose ensuite à sa surface (Schriek et al., 2022). Ce phénomène d'échange de membranes n'a pas été décrit dans le cas des transfusions mais a été mis en lumière dans le rejet de greffe allogénique. Utilisant un modèle murin de transplantation cardiaque, Harper et al. ont démontré une présentation antigénique de complexes CMH-I-peptides entiers et de peptides allogéniques digérés à la surface des cellules dendritiques de la souris receveuse. Cette présentation antigénique semi-indirecte permet de booster l'alloimmunité : d'une part en activant les LT CD8⁺ via le complexe CMH-I-peptide entier et d'autre part de stimuler la différenciation et le développement des LT CD4⁺ en LT helper par l'exposition des peptides allogéniques digérés sur le CMH-II (Harper et al., 2015). Bien que ce mécanisme n'ait pas été décrit dans la prise en charge des alloantigènes plaquettaires, il est tout à fait envisageable que les deux mécanismes co-existent puisque les réponses alloimmunes post-transfusionnelles incluent une réponse humorale mais également une réponse cellulaire.

Réponse alloimmune cellulaire

Si les modèles murins nous ont permis de décortiquer la réponse alloimmune humorale, ils ont également permis d'identifier une réponse alloimmune cellulaire associée (Semple et al., 1995).

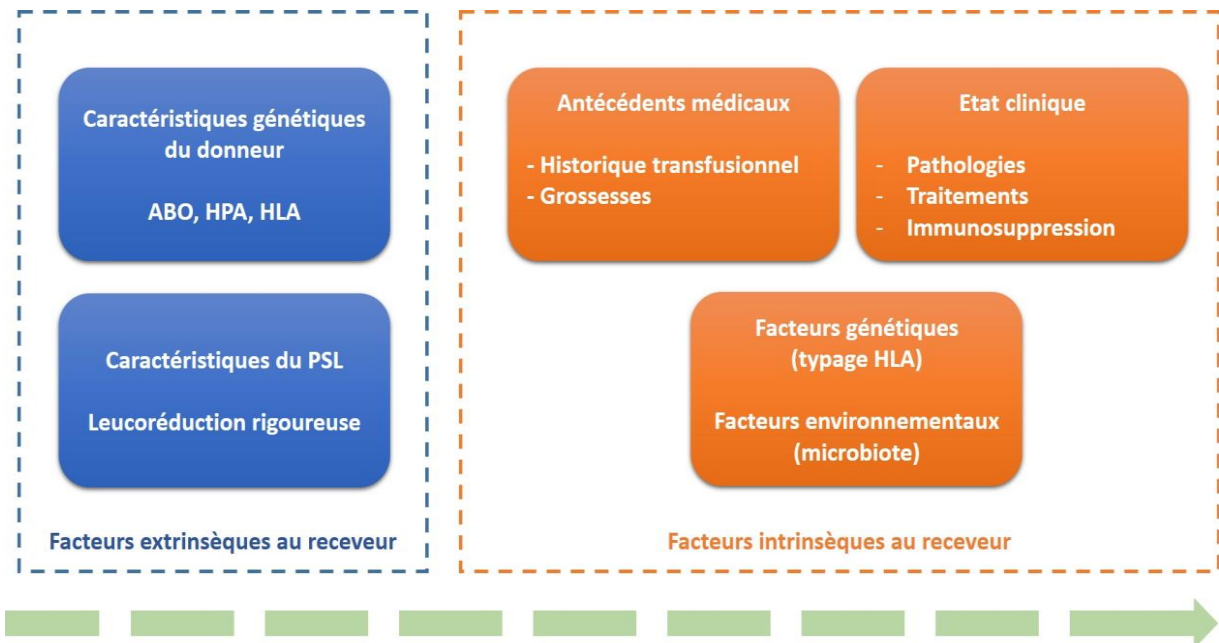
Arthur et al. ont étudié l'immunité cellulaire dans l'état réfractaire à partir d'un modèle murin d'alloimmunisation. Ils ont développé ce modèle à partir de souris μ MT déficientes en lymphocytes B

et donc incapables d'initier une réponse humorale. Dans ces souris immunisées, les plaquettes transfusées circulent durant 24h après la transfusion avant d'être éliminées. Ainsi, une réponse cellulaire est également mise en jeu dans l'état réfractaire d'origine immune chez la souris (Arthur et al., 2016). Ces données apportent des éléments importants pour le développement d'axes thérapeutiques : cibler la réponse humorale ne suffirait pas à éviter l'élimination des plaquettes transfusées. Toutefois, l'élimination des plaquettes médiée par la réponse cellulaire ne survient pas immédiatement après la transfusion. On peut imaginer que ce délai permettrait de faire remonter la numération des patients de manière temporaire, ce qui laisserait le temps aux médecins de prendre en charge les patients et de traiter la cause de la thrombopénie en fonction de la pathologie.

De plus, ce modèle murin a permis d'étudier l'implication d'autres acteurs cellulaires tels que les Natural Killer (NK). Ils ne sont pas impliqués directement dans l'élimination des plaquettes transfusées mais orientent les réponses immunes en coopération avec les LT CD8⁺. Les NK libèrent dans les 24h après la transfusion initiale une quantité importante d'IFN γ (Sayeh et al., 2004b). Cette cytokine facilite la prolifération des B et oriente la réponse humorale vers une production d'IgG2a (Snapper and Paul, 1987). Dans le modèle murin d'alloimmunisation, les transfusions de plaquettes en l'absence de LT CD8⁺ mènent à une production d'anticorps précoce avec une majorité d'IgG2a comparée à la condition en présence de LT CD8⁺. Ces résultats indiquent que les LT CD8⁺ permettent d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse TH1 en inhibant l'IFN γ libéré par les NK (Sayeh et al., 2004b).

Limites et intérêts des modèles murins

Ces modèles murins, bien que nécessaires à une meilleure compréhension des mécanismes de l'alloimmunisation post-transfusionnelle, ont néanmoins des limites évidentes. Les patients alloimmunisés présentent généralement de nombreuses spécificités d'anticorps, des quantités variables et parfois des anticorps anti-HPA associés. Bien que réalisable, il est difficile de reproduire une telle polyimmunisation chez la souris. De plus, de nombreux patients s'alloimmunisent suite aux transfusions nécessaires dans un contexte de traitement aplasiant tel que la chimiothérapie. Or ces traitements influent sur le système immunitaire et ne sont pas étudiés sur les modèles animaux. Enfin, les transfusions réalisées ne reproduisent pas la réalité, les plaquettes transfusées dans ces modèles peuvent être qualifiées de « fraîches » et ne présentent pas les lésions de stockages qui peuvent être associées à de l'immunomodulation.



Allo-immunisation

Figure 12 : Facteurs influençant les risques d'évènements indésirables receveurs suite à des transfusions
Les facteurs intrinsèques et extrinsèques au receveur qui impactent les risques d'effets indésirables receveurs et particulièrement les risques d'alloimmunisation sont représentés ici. Adapté du mémoire de Pauline Jamain, 2018.

Ainsi, bien que le modèle murin ait permis d'identifier certains acteurs des réponses alloimmunes post-transfusionnelle, il peut encore être amélioré pour intégrer des paramètres importants qui influent sur la réponse immune induite par les transfusions.

3. FACTEURS INFLUENÇANT LA REPONSE ALLOIMMUNE SUITE A UNE TRANSFUSION

Système immunitaire du receveur (Figure 12)

Comme expliqué précédemment, la présentation des alloantigènes transfusés est médiée par un mécanisme indirect via l'internalisation et la présentation des allopeptides par le CMH-II des receveurs. Une étude réalisée par Sayeh et al. indique que dans un modèle murin d'alloimmunisation plaquettaire, les souris exprimant les CMH-II I-A et I-E produisent significativement plus d'alloanticorps comparées aux souris exprimant uniquement le CMH-II I-A. Lorsque les auteurs font exprimer de manière transgénique le CMH-II I-E dans ces souris pourvues uniquement de CMH-II I-A, les transfusions induisent une immunisation forte indiquant que le CMH-II I-E favoriserait le développement d'une réponse alloimmune. Afin d'identifier le mécanisme impliqué, les auteurs ont déplété les LT CD8⁺ dans les souris exprimant uniquement le CMH-II I-A. Cette déplétion a permis de restaurer une réponse alloimmune forte dans ces souris. Ainsi, ces résultats indiquent que le CMH-II I-A inhibait la réponse alloimmune humorale via les LT CD8⁺ par des mécanismes inconnus. Le phénotype CMH-II du receveur serait ainsi un élément décisif pour les risques d'alloimmunisation (Sayeh et al., 2004a). L'état du système immunitaire du receveur est également un élément majeur qui influence le développement d'une réponse alloimmune après transfusion. Lors de la transfusion, des antigènes étrangers pénètrent l'organisme. Par définition, le système immunitaire est censé initier une réponse immune dirigée contre ces antigènes. Ainsi, il paraît presque étonnant que tous les receveurs ne s'alloimmunisent pas. Une hypothèse est que les non répondeurs auraient une quantité et une activité plus importante des lymphocytes T régulateurs (CD38, CD27, CTLA4...), présenteraient une diminution importante des lymphocytes T folliculaires Helper et une augmentation de l'immune checkpoint PD1 à la surface des LT CD4⁺. A contrario, les LT CD4⁺ des répondeurs présenteraient des niveaux d'activation plus importants et exprimeraient davantage de CD40, de l'OX40 ou encore des TLR8. Ce dernier point est particulièrement intéressant car la signalisation du TLR8 inhibe les Tregs (Khelfa et al., accepté dans *Frontiers in Immunology*). Ainsi, la surexpression des marqueurs d'activation des LT et l'inhibition des LT regs contribuent probablement à la réponse alloimmune chez ces patients alors qu'un profil plus immunosuppresseur est retrouvé chez les patients non alloimmunisés.

De plus, l'exposition des alloantigènes *in utero* augmente les risques d'alloimmunisation après transfusion. Ce constat, réalisé par l'équipe de John Semple, a été déterminé dans un modèle murin de gestation et de transfusion. Des souris H2^d ne présentent pas d'alloimmunisation suite à une gestation d'un fœtus H2^d et H2^b ou une transfusion de plaquettes H2^{d/b}. A contrario, la grossesse cumulée aux transfusions entraîne une production d'alloanticorps significative (Poston et al., 2021). Des données similaires sont disponibles chez l'Homme. L'étude TRAP rapporte le cas de femmes ayant un antécédent de grossesse sans anticorps anti-HLA-I détectables au moment de l'inclusion dans l'étude. Ces femmes se sont plus fortement alloimmunisées après des transfusions de plaquettes comparées à des femmes nullipares ou des hommes. De nombreuses études rapportent la disparition des alloanticorps après l'accouchement, ainsi il est possible que malgré l'absence d'alloanticorps au moment de l'étude, le système immunitaire de ces femmes était déjà sensibilisé par la grossesse (Etude TRAP, 1999).

Caractéristiques des plaquettes transfusées / des poches

Les caractéristiques des plaquettes transfusées influent fortement la capacité d'un CP à induire une alloimmunisation. Ici sont listés les paramètres capables d'influencer l'initiation d'une réponse humorale chez les receveurs. Pour rappel, le type de concentrés plaquettaires, le MCP, réalisé à partir de 8 donneurs ou le CPA, concentré d'aphérèse à partir d'un don de sang, n'influe pas sur le risque d'immunisation comme le rapporte les chiffres d'hémovigilance 2021.

Lésions de stockage

Le stockage des plaquettes pendant 7 jours à température ambiante est associé à des modifications des paramètres biologiques qui peuvent affecter les plaquettes. En effet, les plaquettes consomment les nutriments présents dans la poche. Lorsqu'un élément devient limitant, les plaquettes entrent en apoptose, augmentant la quantité de débris cellulaires dans la poche et la production de lactate qui acidifie le milieu (Mittal and Kaur, 2015). Les débris relargués et la diminution du pH peuvent être à l'origine d'une activation plaquettaire lors de laquelle les plaquettes relarguent le contenu de leur granules dans la poche. On y retrouve ainsi des chimiokines telles que du platelet factor 4 et RANTES, toutes deux impliquées dans le développement de l'inflammation (Mittal and Kaur, 2015). Elles expriment également à leur membrane des éléments granulaires tels que la P-sélectine (P-sel), le CD40 ligand et des phosphatidylsérines. Après 5 jours de stockage, on observe également un clivage de la GPIb et une diminution de PAR4, un récepteur à la thrombine impliqué dans l'agrégation plaquettaire (Sinauridze et al., 2007). A la surface des plaquettes, l'augmentation de la P-sel et le clivage de la GPIb α sont associés à une diminution de la survie des plaquettes transfusées. Le stockage des plaquettes engendre également une exposition de phosphatidylsérine importante à leur surface.

Selon des tests *in vitro* réalisés par Saris et al., l'exposition de phosphatidylsérine favorise l'internalisation des plaquettes par les cellules dendritiques, facilitant ainsi la présentation antigénique et l'initiation d'une réponse alloimmune (Saris et al., 2018a).

Ces lésions de stockages participent à la capacité immunogène des plaquettes par des mécanismes décrit ci-dessous :

- **Le CD40Ligand**

Les plaquettes stockées libèrent du CD40 ligand soluble (sCD40L), le CD154, membre de la famille des TNF. Le CD40L est une protéine transmembranaire qui peut être clivée en forme soluble. Initialement décrit sur les lymphocytes T CD4⁺, le CD40L interagit avec le CD40 à la surface des lymphocytes B mais également des monocytes, macrophages et cellules endothéliales. Il a été décrit que le sCD40L plaquettaire participe à la réaction immune, en activant les cellules endothéliales qui libèrent des chimiokines. Ces dernières sont, à leur tour, responsables du recrutement des leucocytes sur le site vasculaire lésé (Henn et al., 1998). De plus, un rôle du CD40L dans l'activation des lymphocytes B est maintenant avéré : l'interaction CD40L-CD40 fournit un signal essentiel à la différenciation des lymphocytes B et à la production d'IgG et d'IgM (Liu et al., 2021). La production de sCD40L dans les concentrés plaquettaires est détectable après 3 jours de stockage et est suffisante pour activer *in vitro* les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques (Aloui et al., 2014). Dans un modèle murin d'alloimmunisation anti-GR, le blocage spécifique du CD40L par un anticorps bloquant prévient l'expansion de LT CD4⁺ spécifiques ainsi que la formation de centres germinatifs et la production d'alloanticorps (Natarajan et al., 2017).

- **Les vésicules extracellulaires**

Lors du stockage, les plaquettes et les leucocytes résiduels relarguent des vésicules extracellulaires (EV) (Marcoux et al., 2019). Ces vésicules extracellulaires sont produites par bourgeonnement de la membrane plasmique et sont délimitées par une bicouche lipidique. Elles sont dérivées de plaquettes activées et expriment donc les marqueurs d'activation plaquettaire tels que la phosphatidylsérine. Ces caractéristiques leur confèrent une activité procoagulante forte. Les microparticules, sous catégories de vésicules extracellulaires, expriment à leur surface les récepteurs GPIIb/IIIa et GPIb/IX et contiennent une grande quantité de platelet activating factor (PAF) et du CD40L (Cognasse et al., 2015).

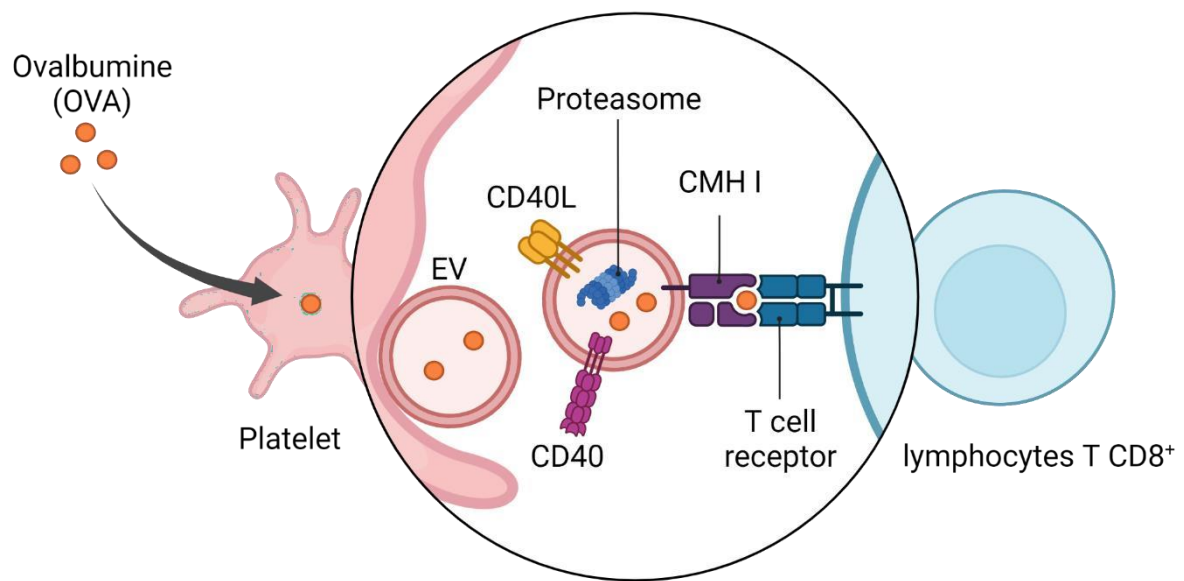


Figure 13: La présentation antigénique de l'Ovalbumine par les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes

Schéma représentatif de la présentation antigénique par des vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes qui assurent la présentation croisée de l'Ovalbumine aux LT CD8⁺. Les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes contiennent un protéasome actif capable de traiter les antigènes. Schéma réalisé par Biorender

Une fois transfusées ces vésicules extracellulaires et plus précisément les microparticules, ont de nombreuses fonctions immunomodulatrices : elles augmentent la fonction phagocytaire des monocytes ainsi que leur différenciation, elles augmentent la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dendritiques et les lymphocytes mais diminuent la cytotoxicité des NK (Noulsri, 2021). Les microparticules dérivées de plaquettes contiennent une quantité importante de CD40L à leur surface et ont récemment été identifiées comme capable d'induire, après une co-culture, une expression forte de CD27, CD86 et une production d'immunoglobulines par des lymphocytes B, soulignant leur potentiel activateur (Noulsri, 2021). De plus, récemment, ces vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes ont été décrites comme exprimant des molécules HLA-I à leur surface (Marcoux et al., 2021b) (**Figure 13**). Ces vésicules extracellulaires peuvent également participer à l'alloimmunisation suite à leur pinocytose par des CPAgs et à l'exposition des alloantigènes à la surface des molécules CMH-II (Pavenski et al., 2012).

- La densité antigénique

La densité d'alloantigènes injectée au receveur est un paramètre important à considérer. Le nombre de molécules HLA-I à la surface des plaquettes varie grandement entre les individus (10 000 – 30 000 sites/plaquettes (Janson et al., 1986)). De plus, les plaquettes nouvellement synthétisées, dites jeunes, expriment plus fortement les molécules HLA-I que les plaquettes vieillissantes (Angénieux et al., 2023, 2019). En effet, par des mécanismes encore méconnus, l'expression des molécules HLA-I membranaires à la surface des plaquettes diminue en fonction du temps. Le lien entre cette densité antigénique à la surface des plaquettes et leur immunogénicité (leur capacité à induire une réponse alloimmune) a été montré dans un modèle murin. Aslam et al. ont rapporté que la transfusion de plaquettes jeunes, avec une forte expression des molécules CMH-I, induit une production significativement plus importante d'IgG anti-CMH-I que des plaquettes stockées pendant 72h dans une souris allogénique (Aslam et al., 2008). La corrélation entre densité antigénique et potentiel immunogénique a également été démontrée dans l'alloimmunisation anti-globule rouge (GR). Dans un modèle murin d'alloimmunisation anti-GR, la transfusion de GR qui expriment 800 copies de l'antigène KEL1 ne parvient pas à entraîner une production d'anticorps dans la souris immunisée. A contrario, la transfusion de GR exprimant un antigène similaire (KEL2) en plus grande copie (1200/globule rouge), permet l'observation d'une réponse immune rapide après la première transfusion (Hendrickson et Tormey, 2016). De plus, Arthur et ses collaborateurs ont également démontré que dans un modèle murin d'alloimmunisation anti-GR, une forte densité antigénique entraîne une réponse humorale mais

une faible densité antigénique, en plus de ne pas entraîner de réponse, permettait une tolérance de la souris receveuse face à l'antigène transfusé (Arthur et al., 2017).

Si la densité antigénique membranaire diminue, le nombre de molécules HLA solubles augmente au cours du stockage. Les molécules HLA-I solubles peuvent être générées par protéolyse ou par excrétion. Ces molécules solubles peuvent être constituées du complexe entier avec l'antigène ou uniquement de chaînes lourdes (Zavazava, 1998). Divers résultats sont retrouvés dans la littérature sur l'effet de ces molécules CMH-I solubles présentes dans la poche sur le système immunitaire. Aslam et al. décrit que la transfusion de plaquettes CMH-I⁺, et non pas les molécules CMH-I solubles, permet de prolonger le délai avant un rejet de greffe de peau alloimmune chez une souris. Les auteurs soulignent la nécessité d'une grande quantité de molécules CMH-I à la surface des plaquettes pour observer cette immunomodulation puisque la transfusion de plaquettes stockées n'engendre pas de survie du greffon (Aslam et al., 2008). D'autres soulignent un potentiel immunogénique des molécules HLA-I solubles dans les poches de concentrés plaquettaires : selon Ghio et al., les molécules HLA-I solubles dérivées de leucocytes auraient des capacités immunomodulatoires par interférence avec les LT CD8⁺, en empêchant ainsi la reconnaissance d'autres antigènes par les TCR déjà en liaison avec les HLA solubles (Ghio et al., 1999). Tout comme les vésicules dérivées de plaquettes et leucocytes, les molécules HLA solubles peuvent être internalisées et présentées par les CPAs du receveur et initier une réponse immune (Pavenski et al., 2012).

Réduction des pathogènes

Depuis 2005, les concentrés plaquettaires sont traités physico-chimiquement par l'ajout d'un psoralène, l'amotosalène qui permet d'éliminer les risques de transmission d'agents pathogènes. L'amotosalène s'intercale de façon réversible entre les régions hélicoïdales de l'ADN et de l'ARN. L'illumination par les UVA conduit à la formation de liaisons covalentes avec les bases pyrimidiques des acides nucléiques. Les génomes ainsi réticulés des agents pathogènes et des leucocytes ne peuvent plus fonctionner ni se répliquer (Hechler et al., 2013; Schlenke et al., 2008). L'inactivation des pathogènes par agents intercalant de l'ADN et illumination aux UV permettrait également de limiter les risques de l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. L'irradiation des poches aux UV inactivent les molécules du CMH-II à la surface des CPAs du donneur et limitent ainsi les risques d'immunisations directes par le receveur (Adane and Enawgaw, 2022).

Si ce bénéfice a été constaté chez la souris après traitement Mirasol (Tran et al., 2019), il varie grandement chez l'Homme (Jackman et al., 2014; Kaidarova et al., 2022). Concernant l'amotosalène, les résultats indiquent que ce procédé d'inactivation des pathogènes n'a pas d'effet sur les risques d'alloimmunisation (Butler et al., 2013).

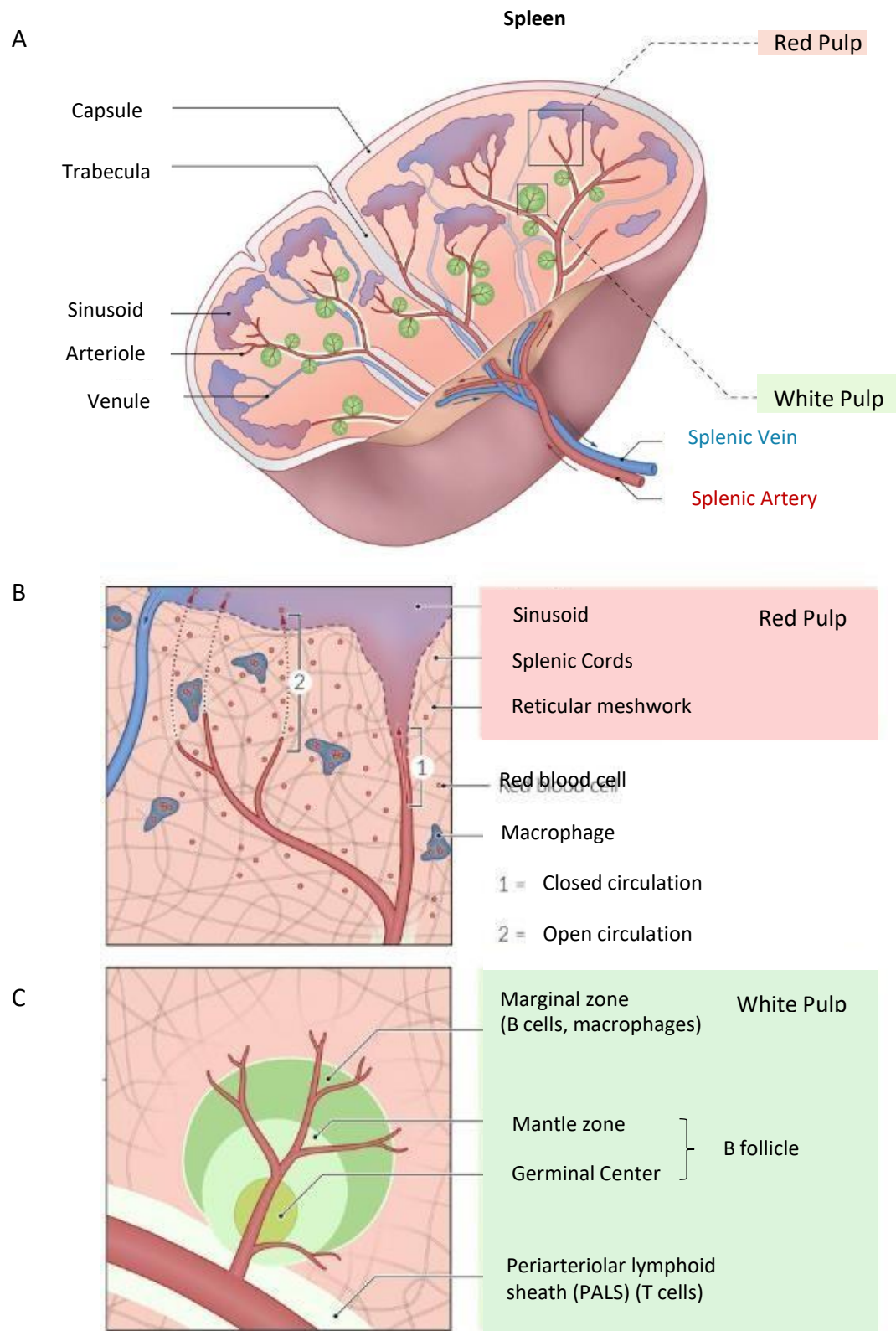


Figure 14 : Schéma de la rate humaine

- a) Coupe transversale de rate
- b) Zoom sur la pulpe rouge et la circulation sanguine splénique
- c) Zoom sur la pulpe blanche

Ces données indiquent que le stockage des plaquettes est un facteur de risque non négligeable pour l'alloimmunisation et constitue une cible pour de nouveaux axes thérapeutiques.

4. LA RATE DANS LES PROCESSUS D'ALLOIMMUNISATION

Les études sur les modèles murins étudiés précédemment révèlent une fonction majeure de la rate dans l'initiation de la réponse alloimmune anti-plaquettaire. Nous étudierons ainsi cet organe en détails.

La rate est un organe lymphoïde secondaire très structuré dont la principale fonction est la filtration du sang et l'orchestration des réponses immunitaires (**Figure 14**). La rate n'est pas un organe vital mais sa dysfonction ou son absence ont d'importantes conséquences telles que l'augmentation d'infections bactériennes généralisées et de thromboembolies (Kristinsson et al., 2014). La rate est un organe dans lequel circulation ouverte et fermée co-existent. Le sang arrive dans l'organe par des artérioles. Une partie du sang est déversée dans la zone marginale, circulation dite ouverte car le sang n'est plus contenu dans des vaisseaux. Ce sang regagnera ensuite la circulation fermée. L'autre partie du sang poursuit sa circulation dans les sinusoides, circulation dite fermée.

Les différents compartiments de la rate ont un rôle bien défini et des populations cellulaires immunitaires spécifiques à leur fonction. Cet organe est organisé en trois parties distinctes détaillées ci-dessous : la pulpe blanche, la pulpe rouge et la zone marginale. Des différences fonctionnelles et structurales entre les rates murines et humaines seront également évoquées au cours de cette partie.

A. Pulpe rouge

La pulpe rouge occupe 75% de l'organe et contient majoritairement les sinus veineux, les fibroblastes et les fibres réticulaires ainsi qu'un grand nombre de macrophages. La principale fonction de cette zone est la filtration du sang, l'élimination des vieilles hématies et le recyclage du fer contenu dans ces dernières. Pour rejoindre la circulation fermée depuis la pulpe rouge, les érythrocytes doivent se déformer et passer à travers un réseau de fibres réticulaires menant aux sinus veineux. Cependant, les érythrocytes âgés n'ont plus la même plasticité membranaire et en sont incapables. Ils sont alors éliminés par le système de filtration de la rate impliquant les macrophages de la pulpe rouge.

Les macrophages de la pulpe rouge sont spécialisés dans l'élimination des érythrocytes âgés mais également dans l'élimination de tous éléments opsonisés par des anticorps ou par le complément. Chez la souris, ces macrophages expriment fortement le marqueur F4/80 et les intégrines $\alpha 9\beta 1$ (Kurotaki et al., 2015). Les macrophages de la pulpe rouge possèdent également des récepteurs nécessaires à l'établissement de leurs fonctions, tels que le CD163, un récepteur à l'hémoglobine, les récepteurs aux immunoglobulines Fc γ R (parmi lesquels le Fc γ RIIa/CD32a uniquement chez l'Homme), les récepteurs aux compléments mais également des Toll Like receptors (TLR 4 et 9) impliqués dans les réponses immunitaires innées en cas d'infection bactérienne (Mebius and Kraal, 2005).

De nombreux leucocytes impliqués dans les réponses immunitaires innées et adaptatives sont également situés dans la pulpe rouge, c'est le cas des neutrophiles, monocytes et des cellules dendritiques. Les plasmocytes y sont également relocalisés après différenciation dans le compartiment de la pulpe blanche afin que les anticorps produits se retrouvent plus rapidement dans la circulation sanguine (Nolte et al., 2000).

B. Pulpe blanche

La pulpe blanche occupe les 25% restants et se situe autour des vaisseaux branchiaux artériels. Cette zone diffère entre les rates humaines et murines notamment dans l'organisation des zones T appelées gaine lymphoïde périartériolaire chez l'Homme et des follicules B autour des vaisseaux branchiaux artériels. La pulpe blanche, dont l'architecture ressemble à celle d'un ganglion, assure l'une des principales fonctions de la rate : l'orchestration des réponses immunitaires. Elle s'organise en zones distinctes :

La zone T contient principalement des lymphocytes T naïfs ainsi que des cellules dendritiques et des lymphocytes B en transit. La rétention de ces cellules est assurée par les chimiokines CCL21 et CCL19 produites par les fibroblastes et par des interactions physiques via les intégrines ($\alpha L\beta 2$ et $\alpha 4\beta 1$) (Lewis et al., 2019).

Les follicules B contiennent principalement des lymphocytes B naïfs ainsi que des cellules dendritiques folliculaires : des cellules dendritiques non phagocytaires qui exposent les antigènes dans le follicule et qui expriment fortement les récepteurs au complément. Ces cellules sont les principales productrices de CXCL13, la chimiokine responsable du maintien des LB dans la zone dédiée. Les follicules B contiennent également les centres germinatifs : des structures anatomiques transitoires formées suite à la rencontre avec un antigène.

Les lymphocytes T et B pénètrent dans la zone de la pulpe blanche de la rate à partir de la zone marginale via des canaux de liaison (BC). Les cellules pénètrent d'abord dans la zone des lymphocytes T de la pulpe blanche dans laquelle les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) constituent l'élément stromal prédominant. Dans les zones de cellules B appelées follicules, les cellules stromales forment un réseau moins dense et les cellules dendritiques folliculaires (FDC) y jouent un rôle important dans l'activation des cellules B. Les follicules sont entourés par la zone marginale (MZ). Les canaux de liaison constituent également la voie de sortie des lymphocytes de la pulpe blanche. Les lymphocytes B qui ont subi une différenciation et une maturation dans les follicules peuvent quitter la pulpe blanche pour se localiser en tant que plasmocytes (PC) dans la pulpe rouge (RP). Adaptée de Kraul et al. 2012

Ces structures sont initiées après l'activation et la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T folliculaires helper (TFH) par une CPAg ayant capturé un antigène. Les lymphocytes B présents dans le follicule reçoivent un premier signal d'activation après la reconnaissance par le récepteur des cellules B (BCR) d'un antigène et son exposition sur le CMH-II. Les lymphocytes B activés migrent alors à l'interface du follicule avec la zone T où ils reçoivent le deuxième signal d'activation et de survie par l'interaction du CD40/CD40L avec les TFH préalablement activés par le même antigène. Ces lymphocytes B se déplacent alors à l'interface de la zone T afin de produire des anticorps à faible affinité et à courte durée de vie ; d'autres iront dans le centre germinatif, où ils subiront un processus de maturation avec recombinaison de classe et hypermutation somatique. Ces étapes de maturation résultent en des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes produisant des anticorps à haute affinité pour l'antigène. Les centres germinatifs peuvent être identifiés, chez l'Homme comme chez la souris par les marqueurs IgD^{low}, FAS+, PNA+ et pour la souris uniquement GL7+ (Young and Brink, 2021).

Un canal de liaison existe entre la pulpe rouge et la pulpe blanche (**Figure 15**). Ce canal est une extension directe de la zone T, il contient aussi bien des lymphocytes T que des plasmocytes. Ce canal de liaison constitue la voie de circulation des lymphocytes pour retourner dans la circulation sanguine depuis la pulpe rouge et la zone marginale. On y retrouve également des cellules dendritiques CD4⁺ (DC CD4⁺) dont la principale fonction est l'initiation de réponse immunitaire extra folliculaire dépendante d'antigènes présentés par les lymphocytes T (Gatto et al., 2013). Les cellules dendritiques 33D1⁺ CD4⁺, murines comme humaines, expriment un récepteur couplé au protéine G (GPR183). Ce récepteur permet par interaction avec son ligand, le 7 α ,25-OHC, de maintenir les DC CD4⁺ dans la zone mais participe également à leur homéostasie et à leur capacité d'activation des lymphocytes B et T (Gatto et al., 2013). Cette capacité d'activation a été mise en cause dans l'alloimmunisation anti-GR. En effet, dans des souris dépourvues de cellules dendritiques 33D1⁺ par expression de toxine diphtérique associée à Zbtb46, un facteur de transcription nécessaire à leur développement, les globules rouges portant l'antigène HOD (HEL fusionné à de l'Ovalbumine et à l'antigène humain Duffy_b) n'induisent pas de production d'alloanticorps (Calabro et al., 2016a). De manière intéressante, une pré-activation des DC 33D1+ avant la transfusion initiale prévient également l'alloimmunisation. Ces résultats suggèrent que dans le cadre de l'alloimmunisation anti-GR HOD, les DC 33D1⁺ capturent l'antigène et initient une réponse immune via une activation des LT CD4⁺ (Calabro et al., 2016a). Des résultats identiques sont retrouvés dans des souris déficientes pour le gène IRF4 et donc dépourvues de DC CD4⁺ où les transfusions de globules rouges HOD n'induisent pas d'alloimmunité (Grabowska et al., 2018). Si leur implication dans l'alloimmunisation anti-GR est avérée, un potentiel rôle dans l'alloimmunisation anti-plaquettaire n'a pas été décrit.

C. Zone marginale

La zone marginale murine

La zone marginale se trouve à la limite entre la pulpe blanche et la pulpe rouge et est séparée des follicules B par le sinus marginal. Elle contient un grand nombre de vaisseaux artériels terminaux et est en contact constant avec le sang libéré dans l'organe (Cerutti et al., 2013; Lewis et al., 2019).

Une fois dans la zone marginale, les différents constituants du sang sont dirigés soit dans la pulpe blanche pour les lymphocytes soit dans la pulpe rouge pour les plaquettes et érythrocytes grâce à des gradients de chimiokines. Cet emplacement est idéal pour que les CPAs localisées dans la zone marginale puissent examiner les antigènes et éliminer les pathogènes provenant de la circulation sanguine. On y retrouve donc de nombreuses CPAs telles que les cellules dendritiques $CD4^+CD8^-DCIR2^+$ et les cellules B de la zone marginale (MZB) soutenues par un réseau de fibroblastes réticulaires (Lewis et al., 2019).

Chez la souris, deux types distincts de macrophages y sont également représentés : les macrophages de la zone marginale et les macrophages métalophiliques. Les premiers sont identifiables par l'expression des récepteurs SIGNR1 (Specific ICAM-3 Grabbing Non-Integrin), une lectine de type C impliquée dans la reconnaissance des polysaccharides et MARCO (Macrophage associated receptors with collagenous structure) et un « scavenger receptor » impliqué dans la liaison des bactéries (Kang et al., 2003; Kraal et al., 2000). Les macrophages métalophiliques expriment SIGLEC1 (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) également appelé CD169+ et sont localisés le long du sinus marginal, à l'interface avec la pulpe blanche. Le sinus marginal est bordé par les cellules de revêtement du sinus MaDCam+, et délimite la zone marginale de la pulpe blanche (Kraal and Mebius, 2006).

Il est important de noter que les différentes zones de la rate sont des compartiments interdépendants et interconnectés. Un déséquilibre dans la composition d'une zone altère directement la composition des zones adjacentes. Cet équilibre a pu être déterminé dans des souris déficientes pour un type cellulaire donné, qui présentaient des organisations cellulaires anormales. C'est le cas pour les souris déficientes en enzyme cholesterol-25-hydroxylase qui sont incapables de synthétiser le $7\alpha,25-OHC$, le ligand des DC $CD4^+DCIR2^+$. Dans ces souris, comme attendu, les DC $CD4^+DCIR2^+$ ne se localisent plus dans le canal de liaison et dans la zone marginale mais cette déficience impacte également les lymphocytes B, qui sont alors anormalement distribués dans la rate (Gatto et al., 2013). La localisation des DC $CD4^+DCIR2^+$ est également dépendante de la présence des macrophages SIGNR1+ puisque leur déplétion entraîne la relocalisation complète des DC $CD4^+DCIR2^+$ dans la zone marginale.

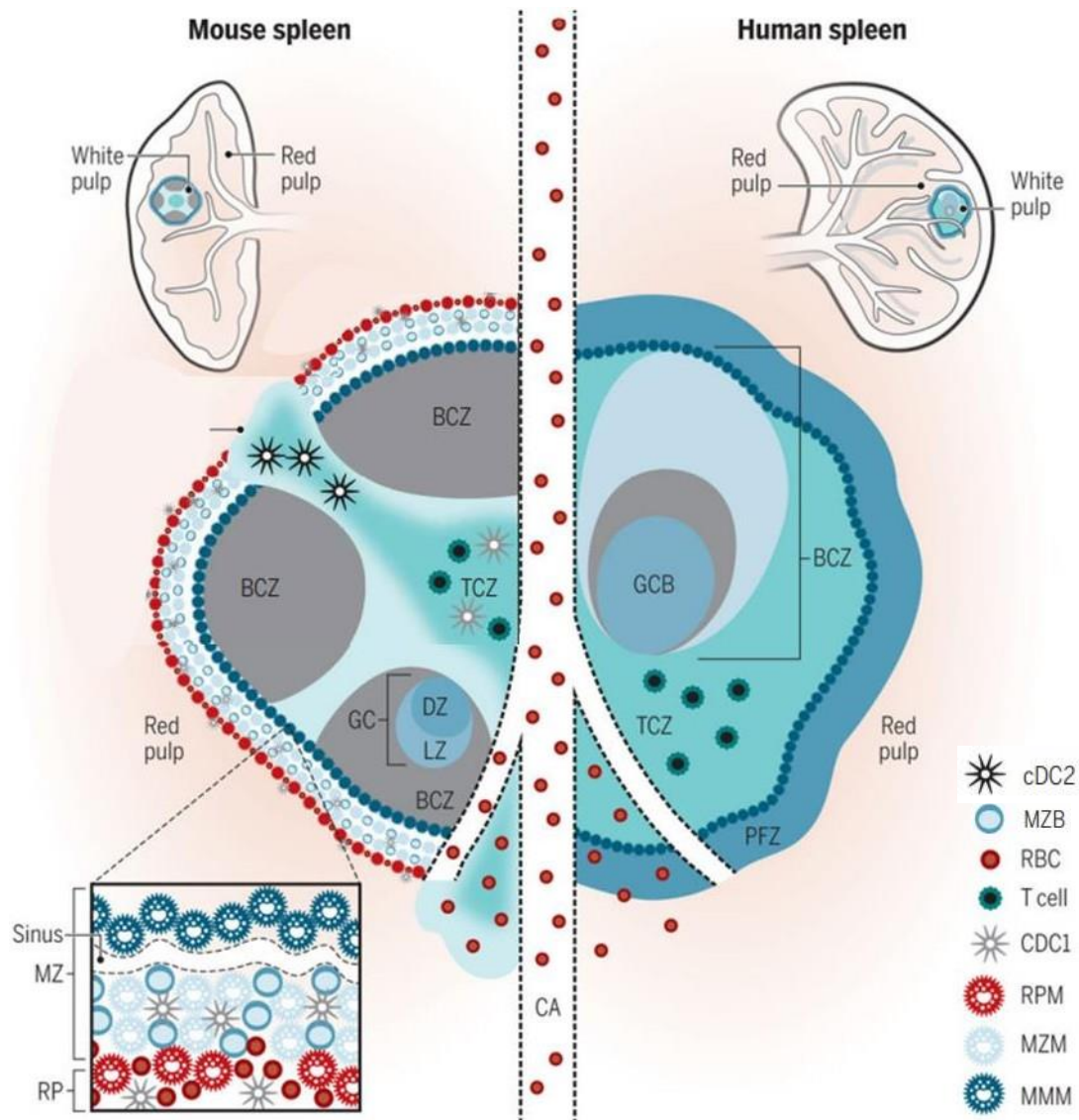


Figure 16: Organisation splénique différente chez l'Homme et chez la souris

(Gauche) Rate murine (Droite) rate humaine

Les zones des cellules T (TCZ) et des cellules B (BCZ) (zone claire, LZ, et la zone foncée, DZ) se situent à l'intérieur de la pulpe blanche. À l'interface entre la pulpe blanche et la pulpe rouge, se trouve la zone marginale (MZ, également appelé la zone périfolliculaire (PFZ) chez l'Homme). Les macrophages CD169+ (MMM) forment un anneau concentrique autour de la pulpe blanche avec les macrophages de la zone marginale (MZM) et les cellules MZB.

Chez l'Homme, les cellules MZB entourent les cellules B activées formant un centre germinatif (GC). La localisation homéostatique des sous-ensembles de cellules dendritiques (DC) chez la souris est illustrée avec les cDC2 dans le canal de liaison (BC) et les cDC1 dans la TCZ, MZ et la pulpe rouge. La libération de sang dans la zone marginale à partir d'une artériole centrale (AC) est illustrée.

Adaptée de Lewis et al.

De même, l'absence des MZB dans une souris CD19KO ou leur relocalisation dans le follicule B par traitement FTY720 résulte en un déplacement des DC CD4⁺DCIR2⁺ dans la zone marginale. Ces deux populations cellulaires sont en compétition d'espace pour la zone marginale : lorsque la niche de MZB est reconstruite dans ces souris, les DCIR2⁺ se repositionnent comme initialement (Liu et al., 2020; Pirgova et al., 2020). Par conséquent, l'organisation des différents compartiments cellulaires de la rate permet une interaction optimale entre les différentes sous populations et est finement régulée par leur inter-dépendance. Cette co-dépendance des différentes populations spléniques est également importante fonctionnellement : de nombreuses interactions facilitent l'initiation de réponses immunes telles que cela a été décrit pour les macrophages CD169⁺ qui capturent et transfèrent l'antigène aux cellules dendritiques afin que ces dernières activent efficacement les LT CD4⁺ pour initier une réponse adéquate. Cette collaboration est importante pour les réponses immunes aux pathogènes et participe également à la tolérance du soi (Grabowska et al., 2018).

La zone marginale humaine

Chez l'Homme, l'existence de cette zone marginale est controversée. Les rates humaines disposent bien d'une zone qui possède le même type de fonction de distribution et de filtration du sang : la zone périfolliculaire (Sasou, 2021) (**Figure 16**). A contrario de la zone marginale murine, cette zone n'est pas séparée des follicules par le sinus marginal et est en contact direct avec la pulpe rouge. Certains décrivent la zone périfolliculaire comme étant l'équivalent de la zone marginale murine (Sasou, 2021) alors que d'autres la considèrent comme une zone additionnelle à la zone marginale murine (Steiniger et al., 2006). J'évoque ici la zone marginale comme décrivant la zone marginale murine ainsi que l'équivalent chez l'Homme, la zone périfolliculaire.

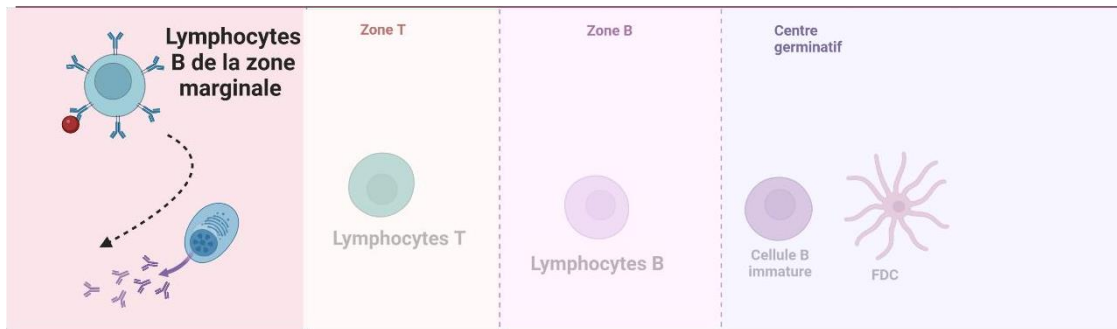
La zone marginale humaine ne contient pas de macrophages métallophiliques. Les macrophages de la zone marginale (MZM) expriment de manière beaucoup plus faible le marqueur CD169⁺ (SIGLEC). A contrario des macrophages de la pulpe rouge (MRP) murins, les MRP humains n'expriment pas le marqueur F480⁺. Les phénotypes des deux sous types de macrophages (MZM et MRP) sont donc similaires, ce qui rend difficile la distinction entre les deux populations chez l'Homme (Lewis et al., 2019).

i. MZB murines

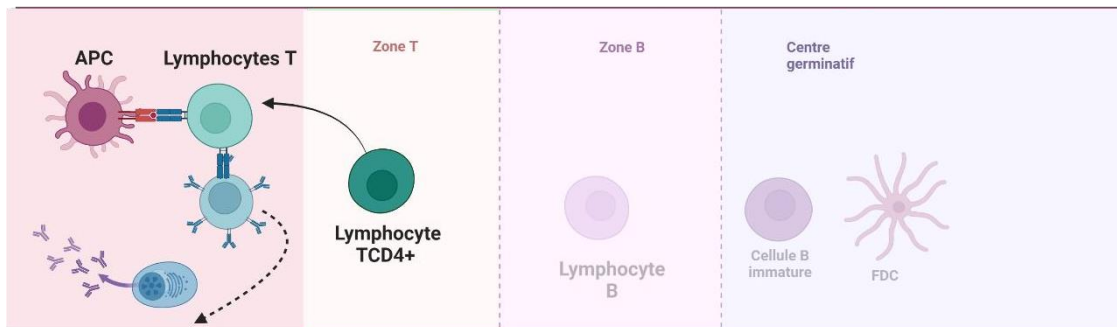
a) Description

Les MZB sont des lymphocytes B situés dans la zone marginale de la rate. Lors de leur développement, les MZB diffèrent des lymphocytes B folliculaires par leur surexpression de NOTCH2. En conditions homéostatiques, elles participent à la clairance des micro-organismes mais également à l'élimination.

Différenciation extrafolliculaire en plasmocytes, indépendante des lymphocytes T CD4⁺



Différenciation extrafolliculaire en plasmocytes, dépendante des lymphocytes T CD4⁺



Formation de centre germinatif, lymphocytes TCD4⁺ dépendant

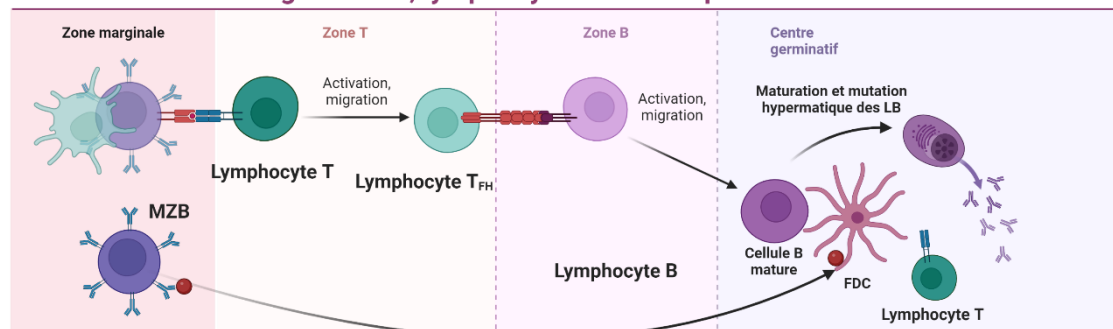


Figure 17 : Modes d'action des MZB

Les lymphocytes B de la zone marginale (MZB) participent aux réponses immunes par 3 mécanismes principaux: une différenciation directe en plasmocytes, une différenciation extrafolliculaire dépendante des LT CD4⁺ ou encore une participation à la formation des centres germinatifs, soit par dépôt des antigènes aux cellules dendritiques folliculaires (FDC) soit par activation des LT. Réalisée avec Biorender

des cellules autologues apoptotiques par la production d'anticorps naturels (Cerutti et al., 2013). Idéalement situées pour capter les antigènes qui circulent dans le sang, ils constituent la première ligne de défense contre les bactéries encapsidées. Les MZB ont des caractéristiques qui leur sont propres : un récepteur de cellule B (BCR) polyréactif dont la force de signalisation est faible. Ils possèdent également à leur surface des TLR (1, 2, 3, 4, 7, 9), des récepteurs aux compléments CD21/CD35 ainsi que des immunoglobulines de surface naïves IgM et des récepteurs aux lipides microbiens CD1d. Les MZB n'expriment cependant pas l'IgD, ce qui permet de les distinguer des lymphocytes B folliculaires. Ils ont une grande capacité à activer les lymphocytes T CD4⁺ de la zone T grâce à une forte expression du CMH-II ainsi que des molécules de co-stimulation CD80, CD86 (Martin and Kearney, 2002).

Contrairement aux lymphocytes B folliculaires, des études chez les rongeurs révèlent que les MZB sont non circulantes mais ils transitent entre la zone marginale et les follicules B grâce à un gradient de Sphingosine 1 phosphate (S1P, ligand des S1P1) et de CXCL13 (ligand des récepteurs CXCR5) (Cinamon et al., 2004). L'interaction du S1P avec les récepteurs de la Sphingosine 1 phosphate 1 (S1P1) à la surface des MZB entraîne une forte expression des molécules d'adhérence LFA-1 ($\alpha 2\beta 2$) et VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$). Ces intégrines interagissent avec les molécules ICAM-1 et VCAM-1 des cellules stromales afin de maintenir les MZB dans la zone marginale (Lu and Cyster, 2002). La signalisation S1P1 s'oppose à la signalisation CXCR5. Lorsque les MZB ont capturé un antigène via leurs récepteurs aux compléments par exemple, l'expression des récepteurs S1P1 est diminuée. L'attraction des récepteurs CXCR5 pour leur ligand CXCL13 entraîne alors la relocalisation des MZB dans la pulpe blanche. Après un certain temps, les MZB retrouvent une expression membranaire de S1P1 suffisante pour retourner dans la zone marginale (Cinamon et al., 2008).

b) Mécanismes d'action (Figure 17)

Rôle dans la réponse humorale et capture des antigènes

Pour le développement d'une réponse humorale efficace via la formation de centres germinatifs, l'acquisition d'antigènes par les lymphocytes B folliculaires et par les LT CD4⁺ est une étape obligatoire. Suite à la capture d'un antigène, les MZB migrent de la zone marginale vers le follicule B afin de délivrer lesdits antigènes aux cellules dendritiques folliculaires et d'initier indirectement une réponse humorale. En effet, l'importance des MZB dans les réponses humorales a été évaluée dans une souris CXCR5 déficiente. Ces souris présentent une absence de récepteurs CXCR5, le récepteur à la chimiokine responsable de l'attraction des MZB dans le follicule. Les MZB ne peuvent donc plus migrer vers le follicule B et sont immobilisées dans la zone marginale. Dans ces conditions, les auteurs observent une accumulation de complexes antigène-complément au niveau des MZB dans la zone

marginale et une diminution drastique des complexes antigène-complément exposés à la surface des FDC (Cinamon et al., 2008).

Les MZB ont également la capacité de présenter des antigènes directement aux LT CD4⁺. En effet si les MZB expriment fortement les molécules du CMH-II ainsi que les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, ils ont également une activité phagocytaire qui leur permet d'acquérir des antigènes. L'activité phagocytaire des MZB a ainsi été déterminée par des tests *in vitro* de phagocytose de billes recouvertes d'un antigène reconnu par les lymphocytes B : NIP-OVA. Selon ces tests, les MZB phagocytent les billes autant que les lymphocytes B folliculaires. L'utilisation d'un modèle *in vivo* a permis d'identifier que cette phagocytose était dépendante de la voie RhoGTPase (Martínez-Riaño et al., 2018). Récemment, un autre mécanisme d'acquisition d'antigène a été décrit : la trogocytose. La trogocytose par les MZB est possible grâce au récepteur du complément CR2 qui reconnaît le composant 3 du complément (C3) lié au CMH-II chargé de peptides à la surface des cellules dendritiques spléniques. Les MZB peuvent alors digérer la partie de la membrane entourant les complexes pMHCII-C3 des cellules dendritiques et les exprimer à leur surface (Schriek et al., 2022).

Le rôle des MZB comme potentielle CPAgs activatrices de LT CD4⁺ est d'ailleurs illustré dans des pathologies autoimmunes médiées par des anticorps notamment dans le cas du lupus. Dans un modèle de souris lupique, les MZB autoréactives présentent une distribution anormale dans la rate avec une accumulation à l'intérieur des follicules B. Ces MZB autoréactives ont échappé à l'exclusion folliculaire et sont idéalement situées pour interagir avec des lymphocytes T et B. Zhou et al. observent *in vitro* une activation importante des LT CD4⁺ par les MZB autoréactives. Ce déplacement de MZB dans le follicule a lieu dans les premiers stades de la maladie, lorsqu'il n'y a pas encore d'autoanticorps sécrétés, indiquant un possible rôle des MZB dans l'initiation de la réponse autoimmune lupique (Zhou et al., 2011). Une hypothèse serait que les MZB en répondant de manière aberrante aux stimulations des TLR et des complexes immuns se relocalisent à l'intérieur des follicules pour initier une réponse LT CD4⁺ dépendante.

Différenciation directe

Les MZB sont également capables de se différencier directement en plasmocytes grâce à un stade de pré-activation constitutif et une forte expression d'un facteur de transcription plasmablastique (BLIMP1). Cette différenciation est accompagnée d'une commutation de classe et une possible production d'IgM, IgG et IgA. Les anticorps produits ne présentent cependant pas de haute affinité pour l'antigène. Cette production rapide d'anticorps à faible affinité permet de palier le délai entre la rencontre avec un antigène et la production d'anticorps à haute affinité (Cerutti et al., 2013).

Par exemple, les pathogènes de type *Streptococcus pneumonia* sont capables de lier directement le C3d, une protéine du complément. Le complexe C3d-polysaccharide sera alors capté par les récepteurs CD21/35 exprimés en grand nombre à la surface des MZB. Cette interaction entraînera l'activation et la différenciation des MZB en plasmocytes sécréteurs d'anticorps à faible affinité (Breukels et al., 2005). Un antigène capté par d'autres CPAs peut également être transmis aux MZB, entraînant leur différenciation. Ce phénomène a été décrit notamment pour les macrophages de la zone marginale ainsi que les cellules dendritiques capables de transmettre un antigène dérivé du sang aux MZB (Balázs et al., 2002; Koppel et al., 2008).

Ce processus de différenciation directe des MZB en plasmocytes sécréteurs d'anticorps à faible affinité de manière extrafolliculaire a été décrit dans le modèle murin d'alloimmunisation anti-GR suite à la transfusion de l'antigène KEL. La déplétion des MZB dans ce modèle ou l'utilisation de souris déficientes NOTCH2 prévient la production d'alloanticorps anti-GR. A contrario, la déplétion des LT CD4⁺ et des lymphocytes B folliculaires n'influent pas sur la réponse alloimmune indiquant une réponse immune LT CD4⁺ et B folliculaires indépendantes (Patel et al., 2018).

Différenciation extrafolliculaire dépendante des LT CD4⁺

Les MZB peuvent également être activées par des LTCD4⁺ au préalable activés par des CPAs environnantes ayant capté un antigène. Lesdites CPAs, cellules dendritiques ou MZB elles même, activent les LT CD4⁺ (Chappell et al., 2012). Cette activation résulte en une expansion clonale, une différenciation en lymphocytes T Helper et la sécrétion de cytokines (IL4, IL13 et IL10). Une fois différenciés, les lymphocytes TH2 à l'aide des CPAs induisent la différenciation des MZB en plasmablastes sécréteurs d'IgG (Song and Cerny, 2003). Cette différenciation a lieu dans la zone marginale et est indépendante des follicules B, elle est alors dite : extrafolliculaire CD4 dépendante.

Ce mécanisme d'activation des MZB a lui aussi été décrit dans l'alloimmunisation anti-GR mais cette fois dans un modèle d'immunisation à l'antigène HOD. Dans ce modèle d'immunisation chez des souris dépourvues de MZB, les auteurs n'observent pas de production d'anticorps. Néanmoins, la prolifération des LT CD4⁺ n'est pas impactée et pourrait être due à l'activation induite par des DC CD4⁺DCIR2⁺. A l'instar de la déplétion des MZB, la déplétion des LT CD4⁺ inhibe la réponse immune. Les transfusions de ces antigènes dans des souris déficientes pour les récepteurs S1P1 ou dans des souris déficientes en lymphocytes B folliculaires engendrent une production d'anticorps (Zerra et al., 2021). Ces résultats indiquent que les MZB sont nécessaires à l'alloimmunisation à l'antigène HOD indépendamment de leur migration entre la zone marginale et le follicule B.

Ces données et la présence d'alloanticorps en absence de lymphocytes B folliculaires révèlent une réponse immune extrafolliculaire LT CD4⁺ dépendante.

En résumé, les MZB murines participent à la détection et à l'élimination des pathogènes véhiculés par le sang par divers mécanismes. En plus d'être idéalement situées dans la zone marginale les MZB possèdent des récepteurs nécessaires à la capture des antigènes du sang et sont capables de se différencier directement en plasmocytes sécréteurs d'anticorps à faible affinité. De par leur forte capacité d'interaction avec les LT CD4⁺ et les cellules dendritiques, les MZB peuvent s'activer en réponse à un stimulus ou fonctionner comme CPAgs. Les MZB ont également un rôle clef dans la formation des centres germinatifs puisqu'ils amènent l'antigène aux FDC évoluant constamment entre la zone marginale et le follicule B. Toutes ces caractéristiques font des MZB des candidates intéressantes dans l'étude des mécanismes d'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. Cependant, ces cellules n'ont pas tout à fait les mêmes caractéristiques chez l'Homme.

ii. MZB humaines

a) Caractéristiques immunes

Les MZB humaines et murines possèdent un phénotype comparable (IgM^{high}CD21^{high} CD23-) même si les MZB humaines n'expriment pas CD1d mais une isoforme de la même famille : le CD1c. Contrairement aux MZB murines, les MZB humaines expriment l'IgD (Appelgren et al., 2018), sont circulantes et sont donc retrouvées dans d'autres organes lymphoïdes secondaires que la rate. On en retrouve ainsi dans la paroi interne du sinus subcapsulaire des ganglions lymphatiques, dans l'épithélium de la crypte des amygdales et sous l'épithélium du dôme des plaques de Peyer dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) (Weill et al., 2009).

Les MZB humaines arborent des hypermutations somatiques et sont caractérisées par l'expression de la molécule CD27, membre de la famille des TNF récepteurs (Pillai et al., 2005). L'expression du CD27 fut autrefois utilisée pour classer les populations en cellules mémoires, ce qui perturba longtemps l'étude de cette population alors classée en lymphocytes B mémoires. Si les MZB présentent des mutations somatiques, le taux de mutations est diminué de moitié par rapport aux lymphocytes B ayant permuté de classe. La présence d'hypermutations somatiques dans les gènes des immunoglobulines en absence d'expansion clonale due à une interaction avec un antigène soutient l'hypothèse que cette catégorie de cellules B se développe dans les premières années de vie sans l'engagement d'une réponse antigène dépendante. L'expression de CD27, grâce à des caractérisations histologiques, a permis de faire la distinction entre les B de la zone marginale et du manteau du follicule.

Quelques lymphocytes B CD27⁻ IgD^{high} peuvent se trouver dans la zone marginale mais correspondent sûrement à des lymphocytes B folliculaires en transit (Weill et al., 2009).

b) Différenciation

L'origine des MZB humaines n'est pas encore pleinement élucidée et donne lieu à de nombreux débats. Les lymphocytes B sont produits dans la moelle osseuse et subissent différentes étapes de maturation allant de la phase translationnelle T1 à T2 puis T3. Récemment, Tull et al. a proposé que les MZB humaines dérivent de lymphocytes B translationnels précurseurs des Marginal Zone B cells (MZP), en stade T2. Ces MZP de phénotype IgM^{high}, CD27⁻, CD24⁺ et CD45RB^{MEM55+} (épitope dépendant de la glycosylation) engagent la voie NOTCH2 et sont recrutés dans les GALT suite à une forte expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (Tull et al., 2021). Arrivés dans les centres germinatifs des GALT, les MZP entreprennent une hypermutation somatique et une phase d'expansion pour donner des MZB (Tull et al., 2021). La même équipe a récemment publié une étude protéomique révélant en réalité deux sous types de MZB appelés MZB1 et MZB2 (Siu et al., 2022). Les MZB1 sont plus abondantes dans tous les tissus et relèvent de la maturation des précurseurs IgM^{high}. Les MZB2 possèdent une signature NOTCH2 et correspondent sûrement aux analogues des MZB murines puisqu'elles ont un faible taux d'hypermutation somatique. Ces MZB2 sont particulièrement importantes dans l'immunité antivirale puisqu'elles expriment l'hélicase d'ARN DDX21 impliquée dans la dégradation des ARN messagers (Siu et al., 2022).

Les MZB humaines ont récemment été identifiées comme des régulatrices clés des réponses autoimmunes via le FcγRIIb, un récepteur aux fragments Fc inhibiteur de l'activation des MZB. L'expression de cet inhibiteur est diminuée dans des modèles de souris atteintes de lupus et chez des patients atteints de sclérose en plaque (Trend et al., 2020). Cette diminution de l'expression de FcγRIIb est associée à une augmentation de l'activation extrafolliculaire des B et à une production d'autoanticorps (Barlev et al., 2021). L'activation de ce récepteur par un anticorps ciblant à la fois le FcγRIIb et le BCR permet de limiter l'immunité humorale dans une souris SCID greffée avec des PBMC provenant de donneurs sains ou atteints de lupus érythémateux systémique (Horton et al., 2011). Ainsi, les MZB sont des candidates désignées pour leurs rôles dans diverses pathologies immunes à médiation humorale parmi lesquelles l'alloimmunisation plaquettaire. Ces cellules et plus particulièrement le récepteur FcγRIIb constituent des potentielles cibles thérapeutiques à creuser.

Causes non immunitaires	Causes immunitaires
Fièvre, infection ou sepsis	Anticorps anti-HLA de classe I
Saignement	Incompatibilité ABO
Consommation des plaquettes (CIVD, anémie hémolytique microangiopathique)	Anticorps anti-HPA
Médicaments (amphotéricin B, vancomycin, ATG, interférons)	Anticorps dirigé contre des complexes médicaments-glycoprotéines de plaquettes
Séquestration splénique	
Réaction du greffon contre l'hôte	
Qualité du concentré plaquettaire	

Tableau 3 : Facteurs immuns et non immuns à l'origine d'état réfractaire

Ce tableau récapitule les facteurs immuns et non immuns à l'origine de mauvais rendement transfusionnel. Ces facteurs ne sont pas exclusifs.

III. L'ETAT REFRACTAIRE

1. DIAGNOSTIC D'UN ETAT REFRACTAIRE AUX TRANSFUSIONS DE PLAQUETTES

Définition d'un état réfractaire aux transfusions de plaquettes

L'inefficacité transfusionnelle plaquettaire est évoquée lorsque la numération plaquettaire après une transfusion de CP n'atteint pas la numération théorique attendue. Lorsque deux inefficacités transfusionnelles successives sont constatées, un diagnostic d'état réfractaire aux transfusions de plaquettes (ERTP) peut être envisagé. Pour éviter des biais induits par la qualité du CP, le diagnostic de l'état réfractaire ne peut être posé que si la quantité de principe actif (QPA) du CP est adaptée au poids du patient avec une identité ABO compatible et un CP conservé moins de 72 heures. Si dans ces conditions, 24h après la deuxième transfusion, le rendement est mauvais (RTP <0,2 ou un CCI<7), l'état réfractaire aux transfusions de plaquettes est avéré.

Etiologie des états réfractaires

Les états réfractaires aux transfusions plaquettaires peuvent avoir deux étiologies distinctes non mutuellement exclusives (**Tableau 3**):

- Origine non immune

Comme évoqué dans la partie alloimmunisation (partie II), de nombreux facteurs d'origine non immune peuvent conduire à un état réfractaire tels que des facteurs directement liés aux propriétés du produit transfusionnel (QPA inadaptée, temps de conservation prolongée, incompatibilité ABO) ou encore des facteurs directement liés au patient et à sa pathologie: fièvre avec ou sans infection documentée, CIVD, splénomégalie ou encore des traitements médicamenteux.

- Origine immune

L'inefficacité transfusionnelle peut aussi être due à une incompatibilité immunologique impliquant un anticorps. Si les anticorps présents ne sont pas dirigés contre les globules rouges, l'incompatibilité est dite non érythrocytaire. Après constatation d'un état réfractaire, s'il est retrouvé chez le patient un anticorps anti-HLA ou anti-HPA, l'incompatibilité immunologique non érythrocytaire également appelé ERTP d'origine immune peut être évoquée.

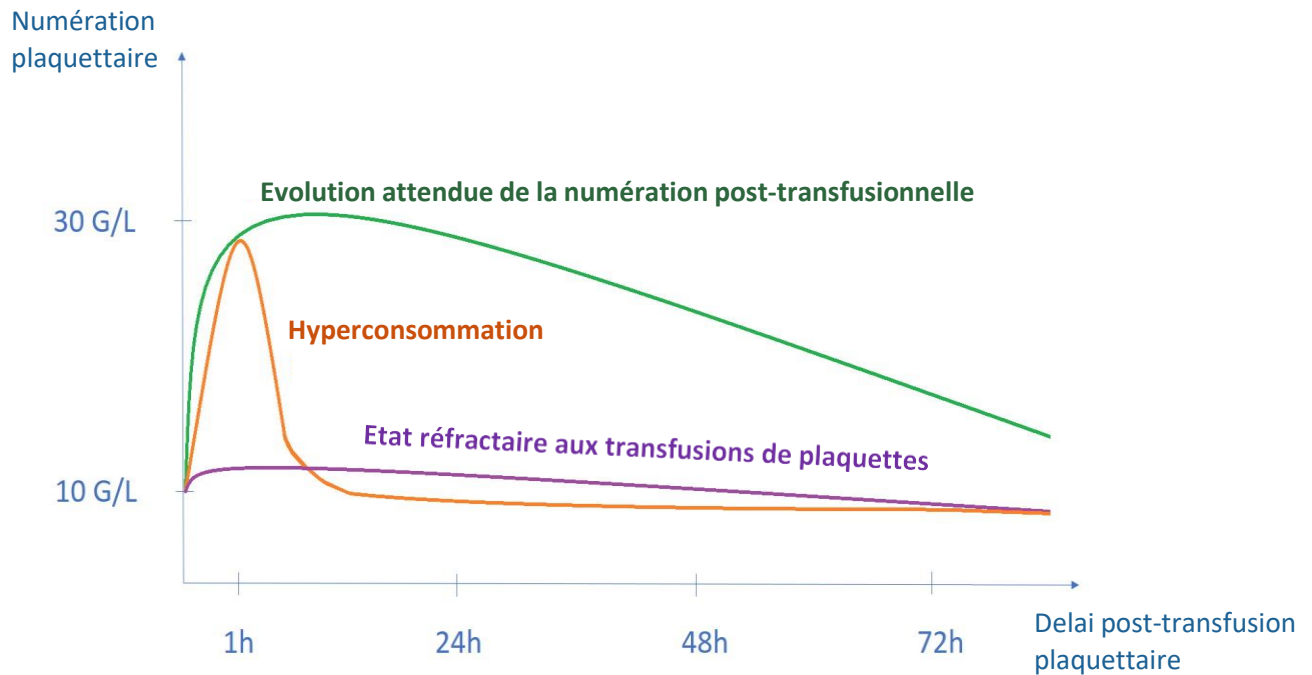


Figure 18 : Discrimination empirique d'un ERTTP d'origine immune et non immune

Schéma représentant la numération plaquettaire en fonction du délai post-transfusion. La courbe verte illustre l'évolution attendue de la numération post-transfusionnelle. Une faible numération à 24h mais satisfaisante à 1h indiquerait une cause non immune (courbe orange). Une numération non satisfaisante à 1h et 24h indiquerait une origine immunitaire telle que la présence d'anticorps anti-HLA de classe I (courbe violette).

Réalisée par Pauline Jamain.

Incidence

Selon l'ANSM, l'incidence de l'ERTP d'origine immune est directement corrélée à celle de l'alloimmunisation anti-HLA chez les receveurs. Elle est donc plus forte chez les femmes ayant eu des enfants et chez les patients multitransfusés. Selon le rapport d'hémovigilance 2021 de l'ANSM, l'incidence des incompatibilités immunologiques (érythrocytaires et non érythrocytaires) est de 51 pour 100 000 CPA transfusés et 33,7 pour 100 000 MCPs transfusés. Cet EIR induit principalement des grades 1 et 2 et 73% des déclarations d'incompatibilités immunologiques concernent des anticorps dirigés contre le système HLA. En effet, parmi ces EIR, 93% des anticorps retrouvés sont dirigés contre le système HLA de classe I (Chiffres du rapport d'hémovigilance 2021).

Il est à noter que le diagnostic d'un ERTP dépend de nombreux facteurs. Hormis les caractéristiques que doit respecter le CP, l'identification d'un anticorps anti-HLA ou anti-HPA est nécessaire au diagnostic. Cependant, la recherche de tels anticorps est rare et entraîne une sous-estimation importante de cet événement indésirable receveur. De plus, définir une incompatibilité immunologique nécessite d'exclure tous les autres facteurs de consommation plaquettaire or, les causes immunitaires et non immunitaires ne sont pas mutuellement exclusives et coexistent souvent chez le patient.

Discrimination empirique d'un ERTP d'origine immune ou non (Figure 18)

L'ERTP d'origine immune est difficile à diagnostiquer pour les raisons évoquées ci-dessus. Basé sur une publication datant de 1980, certains services hospitaliers utilisent la numération plaquettaire à 1h et 24h après une transfusion pour définir l'origine de l'inefficacité transfusionnelle (Daly et al., 1980). Un mauvais rendement constaté à 1h et 24h après la transfusion indiquerait une origine immunologique alors qu'un mauvais rendement à 24h uniquement mettrait en cause une origine non immunologique. Il est cependant compliqué en pratique d'obtenir une numération plaquettaire du patient 1h après la transfusion car cela nécessite par définition un surcroît d'activité dans les services hospitaliers où les patients sont pris en charge.

Prise en charge des patients en ERTP

Aujourd'hui, le traitement des patients en ERTP d'origine immune repose sur la transfusion de CP dit HLA compatibles. En premier intention, un CP dont le phénotype HLA-A et HLA-B est identique à celui du receveur sera recherché dans le stock. Si aucun CP ne correspond, une recherche sera lancée au niveau régional pour identifier un donneur HLA-Identique.

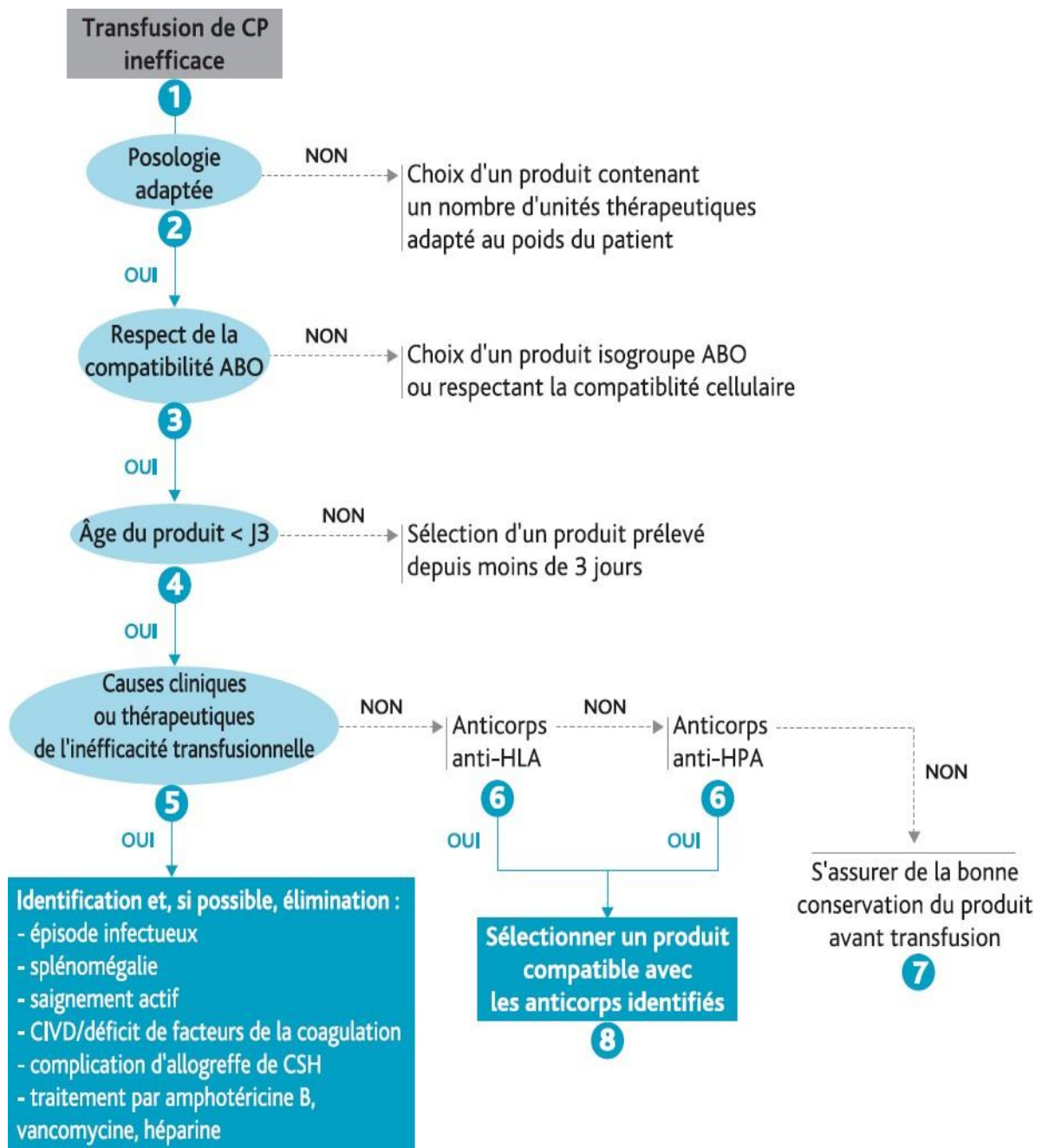


Figure 19 : Stratégie transfusionnelle après un constat d'inefficacité transfusionnelle

D'après Pauline Jamain

Enfin, si ces recherches ne donnent aucun résultat, un CP n'exprimant pas les antigènes ciblés par les anticorps produits par le receveur (antigènes permissifs) sera prescrit. Cependant, trouver un donneur compatible peut être compliqué pour les patients polyimmunisés et est difficilement applicable en cas d'urgence. De plus, la réserve de donneurs dont le phénotype HLA est connu est limitée et demande une logistique importante (**Figure 19**).

Modèle murin d'ERTP

Afin d'étudier les mécanismes d'élimination des plaquettes transfusées dans un receveur alloimmunisé, un modèle murin a été mis en place. Ce modèle murin se base sur une souris receveuse précédemment immunisée par des transfusions de plaquettes allogéniques. Après vérification que cette souris a bien produit des alloanticorps, la transfusion de plaquettes allogéniques fluorescentes (par marquage avec une sonde ou par utilisation de plaquettes GFP+) permet de mesurer le temps de circulation plaquettaire *in vivo* et de déterminer ainsi si les souris sont en état réfractaire (Couvidou et al., 2022; Waterman et al., 2016). En tenant compte des limites déjà évoquées du modèle murin d'alloimmunisation utilisé pour mimer l'état réfractaire et notamment l'immunisation contre un seul haplotype et l'absence de CD32a chez la souris, ce modèle permet d'étudier les caractéristiques et le mode d'action des anticorps anti-CMH-I impliqués dans l'élimination des plaquettes ciblées.

2. LE MODE D'ACTION DES ANTICORPS ANTI-HLA-I

Différents mécanismes d'élimination des plaquettes par les anticorps antiplaquettaires ont été décrits dans un contexte de thrombopénie immune et plus rarement dans un contexte d'état réfractaire. Ces différents mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs.

A. Effet des anticorps sur les plaquettes

Ci-dessous sont détaillés les principaux mécanismes connus de l'effet des anticorps ciblant les plaquettes.

i. Opsonisation

Si l'importance de l'opsonisation par les anticorps anti-HLA-I n'a pas été largement décrite, les anticorps anti-plaquettaires peuvent fonctionner comme opsonines et entraîner la

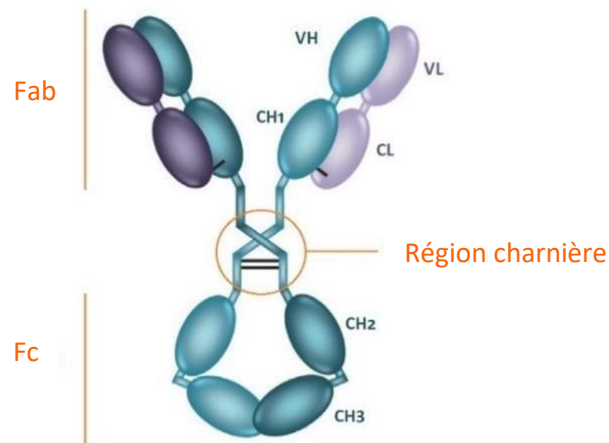


Figure 20 : Structure d'une immunoglobuline (monomère d'IgG1)

Les immunoglobulines sont composées de deux chaînes lourdes reliées à deux chaînes légères. Les chaînes légères comportent deux domaines appelés VL (variable light) et CL (constant light) alors que les chaînes lourdes en possèdent quatre pour les IgG, les IgD et les IgA appelés VH (variable heavy) et CH1, CH2, CH3 (constant heavy 1, 2 et 3) auxquels s'ajoute un cinquième domaine constant CH4 pour les IgM et les IgE.

On distingue deux zones: la partie Fab (fragment antigen binding) et la partie Fc (fragment crystallisable). Chaque monomère d'immunoglobuline comporte deux fragments Fab constitués de l'association entre les domaines VH-VL-CH1-CL. L'association des domaines VH et VL constitue le site de reconnaissance de l'antigène. Le fragment Fc quant à lui est formé de la partie constante des deux chaînes lourdes associant les domaines CH2-CH3, voire CH4. Une région charnière assure la liaison entre les fragments Fab et Fc tout en offrant une certaine flexibilité aux deux bras de l'immunoglobuline. Adaptée par Pauline Jamain, selon Chevailler et al. 2018.

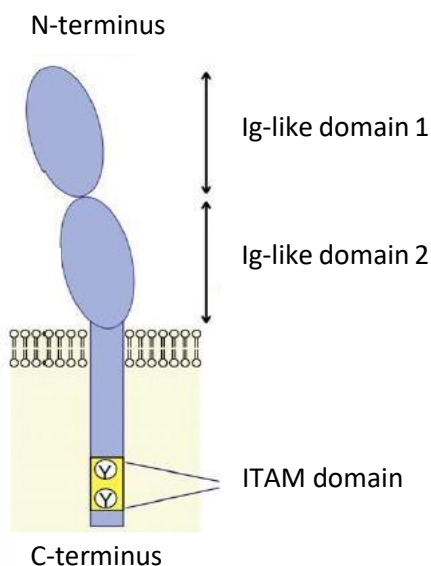


Figure 21 : Structure du récepteur CD32a

Le CD32a est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 (~ 40 kDa) avec deux domaines extracellulaires de type Ig, dont le second assure la liaison avec l'IgG. Le CD32a contient un motif d'activation basé sur la tyrosine des immunorécepteurs (ITAM) dans son domaine cytoplasmique qui transduit les voies de signalisation de manière autonome après le regroupement du récepteur. Adaptée de Arman Krauel et al. 2015

phagocytose des plaquettes ciblées *in vitro* (Handin and Stossel, 1974). *In vivo* la partie Fc des alloanticorps (**Figure 20**) se fixe sur les récepteurs FcR exprimés par les cellules du système réticulo-endothélial entraînant leur activation ainsi qu'une phagocytose (Aslam et al., 2016).

L'opsonisation est un processus immunitaire analysable *in vitro* par test de phagocytose par des monocytes après incubation des plaquettes avec les sérums de patients alloimmunisés. Takashira et ses collaborateurs ont d'ailleurs proposé un test *in vitro* de phagocytose des plaquettes incubées avec les sérums de patients à utiliser en routine. Les estimations des quelques tests réalisés corrèlent avec les CCI obtenus 1h après la transfusion chez des patients alloimmunisés. Ces tests permettraient donc de prédire les résultats de la transfusion plaquettaire en fonction de la phagocytose induite par les sérums de patients (Takahashi et al., 2017). Cependant, la mise en place de ces tests en routine est difficilement applicable car cela nécessite l'utilisation de plaquettes phénotypées et ciblées par les alloanticorps, une logistique supplémentaire dans un processus déjà compliqué. Enfin, il est établi que la densité des molécules HLA-I exprimée à la surface des plaquettes varie d'un donneur à l'autre. Des tests de phagocytose *in vitro* ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la densité antigénique à la surface des plaquettes et leur propension à être phagocytées par des macrophages. Sur la base de ces résultats, des plaquettes exprimant moins d'antigènes pourraient être utilisées pour traiter en priorité les patients réfractaires (Saris et al., 2018b).

ii. Activation

a) Rôle du CD32a

La fonction du récepteur CD32a

Le FcγRIIa également appelé CD32a est un récepteur exprimé par de nombreux types cellulaires tels que les cellules dendritiques, les monocytes ou encore les neutrophiles (**Figure 21**). Il est l'unique récepteur aux fragments Fc des immunoglobulines à être exprimé à la surface des plaquettes humaines mais est absent des plaquettes de souris (Bruhns, 2012). Il s'agit d'un récepteur transmembranaire à chaîne unique avec un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) cytoplasmique lui permettant de transduire des voies de signalisation. Le CD32a, présent entre 900 et 5000 copies à la surface des plaquettes humaines, est un récepteur à faible affinité pour les IgG monomériques mais présente une affinité plus importante pour les complexes immuns (Karas et al., 1982). Le regroupement de molécules FcγRIIa/CD32a induit par les complexes immuns initie la phosphorylation du motif ITAM contenu dans la queue cytoplasmique du récepteur et active la signalisation en aval via Syk (tyrosine kinase de la rate) (**Figure 22**).

ITAM

Immunes complexes

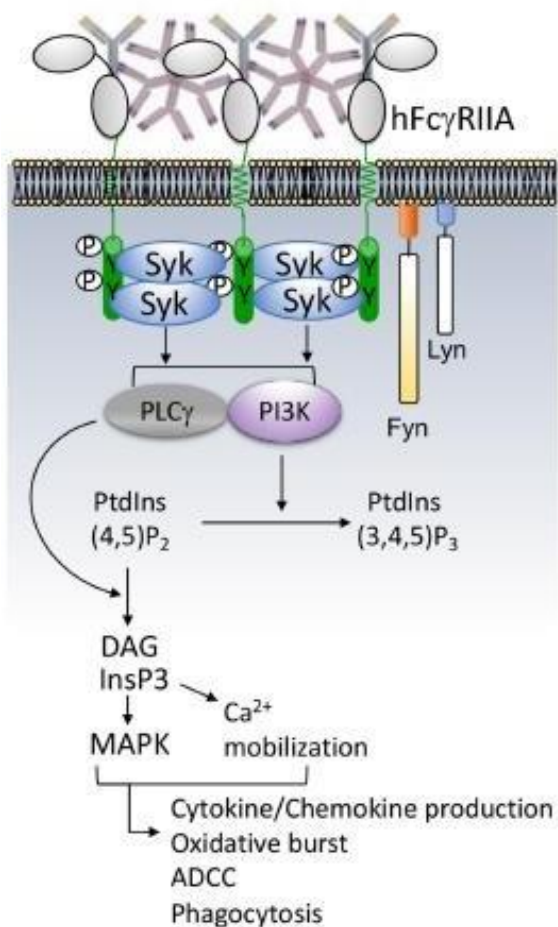


Figure 22: Voie de signalisation du CD32a

La fixation de complexes immuns à la surface du CD32a induit la phosphorylation des deux résidus tyrosine du motif ITAM par les kinases Src Lyn et Fyn, responsables du recrutement et de la phosphorylation de Syk, induisant une activation cellulaire par les voies de signalisation PLCγ et PI3K. Le PLCγ convertit le PI(4,5)P2 en IP3 et en DAG. L'IP3, un phosphate d'inositol soluble, entraîne une mobilisation du Ca^{2+} tandis que le DAG active la MAPK. PI3K convertit le PI(4,5)P2 en PI(3,4,5)P3, ce qui permet le recrutement d'intermédiaires de signalisation via leur domaine d'homologie pleckstrine (PH).

Selon Ben Mkaddem et al. 2019

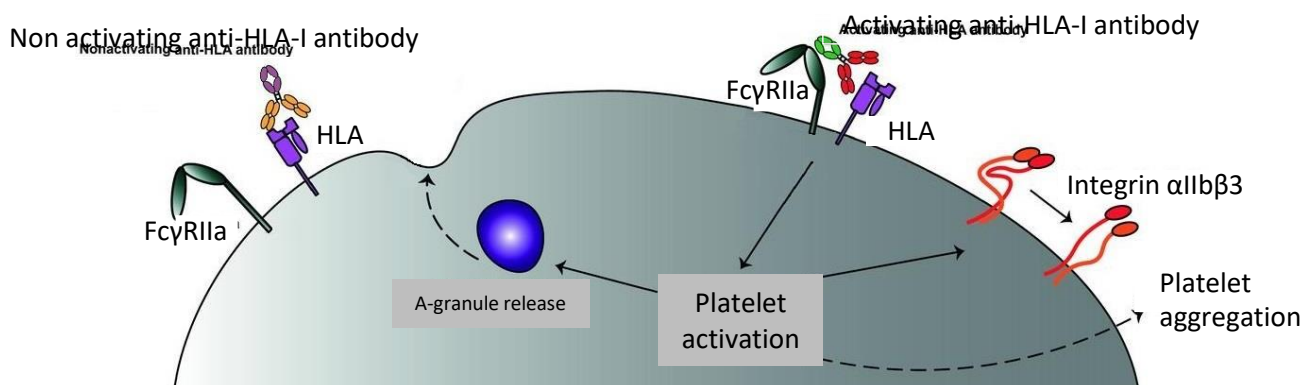


Figure 23 : Schéma représentant l'activation des plaquettes par des anticorps anti-HLA de classe I via le récepteur CD32a

Les anticorps anti-HLA-I se fixent au récepteur CD32a, menant à l'activation des plaquettes et à leur sécrétion et agrégation. D'après Rijkers et al. 2018

Ce processus entraîne la libération des réserves intracellulaires de Ca^{2+} , la dégranulation, la sécrétion de cytokines et l'activation cellulaire (Arepally and Padmanabhan, 2021).

Dans de nombreuses pathologies médiées par/impliquant des anticorps, la thrombopénie est due à l'activation des plaquettes par des anticorps antiplaquettaires via le CD32a. C'est le cas pour les thrombopénies immunes, les thrombopénies médicamenteuses (héparine ou Roxifiban) (Pedicord et al., 2003) ou dans le cadre du lupus (Hollerbach et al., 2019).

Rôle du CD32a dans l'état réfractaire immunologique

En 1996, Carroll et ses collaborateurs publièrent un article sur l'activation des plaquettes par un anticorps anti-CMH-I monoclonal de souris. Après avoir testé trois anticorps monoclonaux IgG2a dirigés contre les molécules HLA-I, ils observèrent une activation des plaquettes CD32a dépendante en présence du pan-HLA-I W6/32 (Rubinstein et al., 1992). Dans la même dynamique, Rijkers et al. ont testé l'activation plaquettaire induite par 8 anticorps monoclonaux IgG1 dirigés contre les molécules HLA-I. Deux de ces anticorps ont entraîné la sécrétion de P-selectine, l'activation de l'intégrine GPIIb/IIIa ainsi que l'agrégation des plaquettes (**Figure 23**). Cette activation, intra-plaquettaire, a été complètement inhibée par l'ajout d'inhibiteurs du CD32a, indiquant une activation dépendante de ce récepteur. Certains sérums de patients en ERTp ont également entraîné une activation des plaquettes CD32a dépendante comme le montre l'exposition de P-selectine à la surface de ces dernières (Rijkers et al., 2018). Si l'activation CD32a dépendante par certains anticorps est avérée *in vitro*, des tests *in vivo* sont encore nécessaires pour lier ce mécanisme d'activation à l'élimination des plaquettes transfusées dans les patients réfractaires.

Au vu de son rôle dans de nombreuses pathologies à médiation humorale, ce récepteur constitue une cible thérapeutique pour de nombreuses pathologies immunitaires telles que la thrombopénie induite par l'héparine (HIT) et pourrait en devenir une pour l'ERTp. Goldman et al. ont testé l'efficacité de plusieurs inhibiteurs de BTK (Bruton's tyrosine kinase), un élément de la voie de signalisation du CD32a sur l'activation des plaquettes induite *in vitro* par des sérums de patients atteints de HIT. Plusieurs inhibiteurs ont permis de prévenir l'activation plaquettaire induite par les sérums de patients. Afin de tester l'action *in vivo* de l'ibrutinib, les auteurs ont administré une dose de 280 mg cet inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton à trois patients. Leur sang a ensuite été prélevé 3 heures après le traitement et les tests *in vitro* d'activation à l'anticorps anti-CD9, connu pour activer les plaquettes via le CD32a, ne permettaient pas d'induire une activation plaquettaire, témoignant de la possible application de cet inhibiteur en thérapeutique (Goldmann et al., 2019).

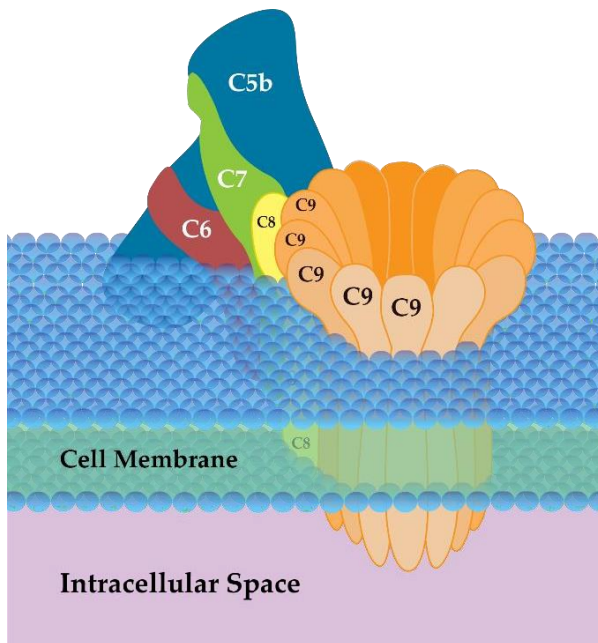


Figure 24 : Représentation du complexe d'attaque membranaire C5b9

Le complexe C5b9 entraîne la formation de pores à travers les cellules. Ces pores sont à l'origine de la lyse cellulaire ou, dans le cas des plaquettes, de l'activation.

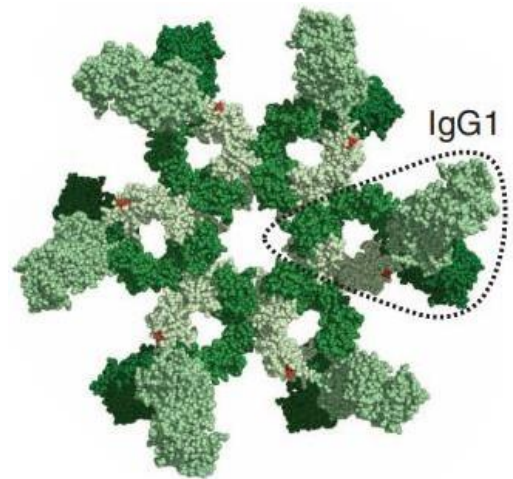


Figure 25 : Hexamérisation des IgG1

Les IgG1 s'organisent en hexamères et facilitent le recrutement de la molécules C1q du complément.

D'après Diebolder et al. 2014

b) Rôle du complément

Interaction entre le complément et les plaquettes

Le système du complément est un ensemble de plus de 20 protéines plasmatiques ayant pour la plupart une activité enzymatique, et qui s'activent en cascade pour participer aux réponses immunes. Il existe trois voies d'activation du système du complément : la voie classique est initiée par la fixation d'une molécule de C1q à des immunoglobulines ayant opsonisé une cellule. La voie alternative repose sur la déposition directe du C3b et la voie des lectines par une reconnaissance des résidus glycaniques à la surface d'une cellule par un complexe composé de lectines (Mannan-binding lectin) (Sarma and Ward, 2011). Les trois voies mènent à la formation de C3 convertases qui aboutissent *in fine* à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (MAC) C5b-9 créant des pores dans une membrane plasmique (**Figure 24**). Dans les différentes voies d'activation du complément, certaines molécules jouent le rôle d'opsonines, c'est le cas du C1q et des fragments du C3. Ces protéines sont directement reconnues par les récepteurs du complément à la surface des cellules phagocytaires et initient leur internalisation (Gasque, 2004).

Depuis les années 2000, d'étroites interactions entre les plaquettes et le système du complément sont décrites. Les plaquettes expriment à leur surface deux types de récepteurs aux molécules C1q appelés C1qR (Hamad et al., 2010). L'un interagit avec la partie collagen-like du C1q, le cC1qR et l'autre se lie au domaine globulaire du C1q et se nomme gC1qR (Peerschke and Ghebrehiwet, 1998). A l'état de repos, les plaquettes fixent le complément en faible quantité mais ne s'activent pas grâce à la présence de protéines membranaires inhibitrices : C1 INH, CD55, CD59 ou encore Clusterin qui empêchent la formation du complexe d'attaque membranaire (Meinke et al., 2019). Après activation par un agoniste, le C1q se fixe en grande quantité sur les plaquettes, initiant ainsi la voie classique du complément qui participe à l'activation plaquettaire (Peerschke et al., 2006). Le C3b peut également se lier directement au CD62P exposé à la surface des plaquettes activées. Ces résultats indiquent que l'activation des plaquettes favorise le dépôt du complément à leur surface (Del Conde et al., 2005). Suite à la fixation du C3b sur les plaquettes, la voie alternative de la cascade du complément entre en jeu et conduit finalement à la formation du MAC. Le MAC induit un influx de calcium dans la plaquette et participe à son activation et à son élimination (Meinke et al., 2019).

Les plaquettes non activées après opsonisation par des anticorps peuvent également entraîner le recrutement et l'activation du complément. Les complexes immuns formés d'IgG forment un plateau idéal pour la molécule du C1q, ce qui initie la voie classique du complément et mène à l'agrégation des plaquettes (Peerschke and Ghebrehiwet, 1997) (**Figure 25**).

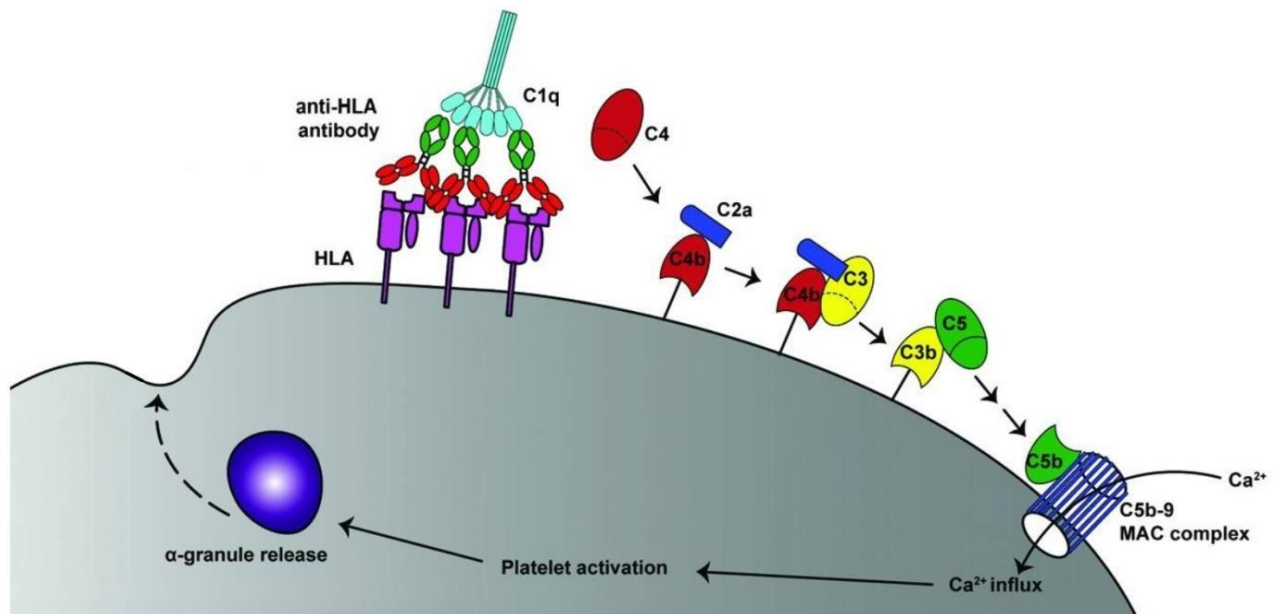


Figure 26: Schéma de l'activation des plaquettes par les anticorps anti-HLA de classe I via le complément

La fixation des anticorps à la surface des molécules HLA-I recruterait les molécules du C1q à la surface des plaquettes, entraînant l'activation de la voie classique du complément. Cette voie mène à la formation du complexe d'attaque membranaire à la surface des plaquettes et ainsi leur activation.

D'après Rijkers et al. 2018

Rôle du complément dans l'état réfractaire d'origine immune

En 1996, Anderson et ses collaborateurs ont été les premiers à publier l'effet de sérums de patients contenant des anticorps anti-HLA sur les plaquettes. 8 sérums testés sur 9 ont entraîné une aggrégation des plaquettes. L'ajout d'anticorps anti-C8 et C9, bloquant la formation du complexe d'attaque membranaire, a inhibé l'activation induite par les sérums. Ces résultats indiquent donc une activation dépendante du complément et indépendante du CD32a (Brandt et al., 1996). Le W6/32, un anticorps monoclonal, déjà décrit par Rubinstein en 1992 pour activer les plaquettes de manière CD32a dépendante, permet également un recrutement important du complément sur les plaquettes opsonisées ainsi qu'une lyse de ces dernières dépendante du complément (Pokrass et al., 2013). Ces résultats laissent penser que l'activation médiée par l'anticorps pourrait également être due au complément.

Dans la continuité des résultats obtenus sur l'activation dépendante du CD32a induite par les anticorps anti-HLA-I, le groupe de Rijkers a investigué le rôle du complément dans ce processus. L'inhibition de la voie classique du complément, par des anticorps anti-C1q ou C5, empêche l'activation plaquettaire médiée par des anticorps monoclonaux humains anti-HLA-I (**Figure 26**). Des sérums de patients contenant des anticorps anti-HLA-I ont également activé le complément à la surface de plaquettes. Pour Rijkers et ses collaborateurs, l'activation induite par les anticorps anti-HLA-I peut être totalement bloquée par l'inhibition du récepteur CD32a avec l'anticorps monoclonal IV.3 en combinaison avec l'inhibiteur de la voie classique du complément, l'Eculizumab. Ces résultats suggèrent que les voies d'activation du CD32a et du complément pourraient agir en synergie (Rijkers et al., 2019). La capacité des anticorps à activer le complément dépendrait, selon les auteurs, aussi bien de la densité antigénique que de l'affinité des anticorps. Il serait intéressant d'identifier les facteurs des anticorps qui facilitent l'activation des plaquettes via le complément plutôt qu'une activation médiée par le CD32a.

c) Désialylation

La glycosylation des plaquettes

Les plaquettes disposent d'acides sialiques à l'extrémité des chaînes glycanes à leur surface. L'importance de ces acides sialiques sur les plaquettes est aujourd'hui discutée. Pour certains, la quantité d'acide sialique décroît au cours de la vie de la plaquette par un mécanisme non précisément décrit impliquant des enzymes sialydases. Récemment, il a également été décrit que les plaquettes activées sont désialylées (**Figure 27**). Lorsque l'acide sialique est éliminé, le β -galactose, situé en amont dans la chaîne glycanes est alors exposé.

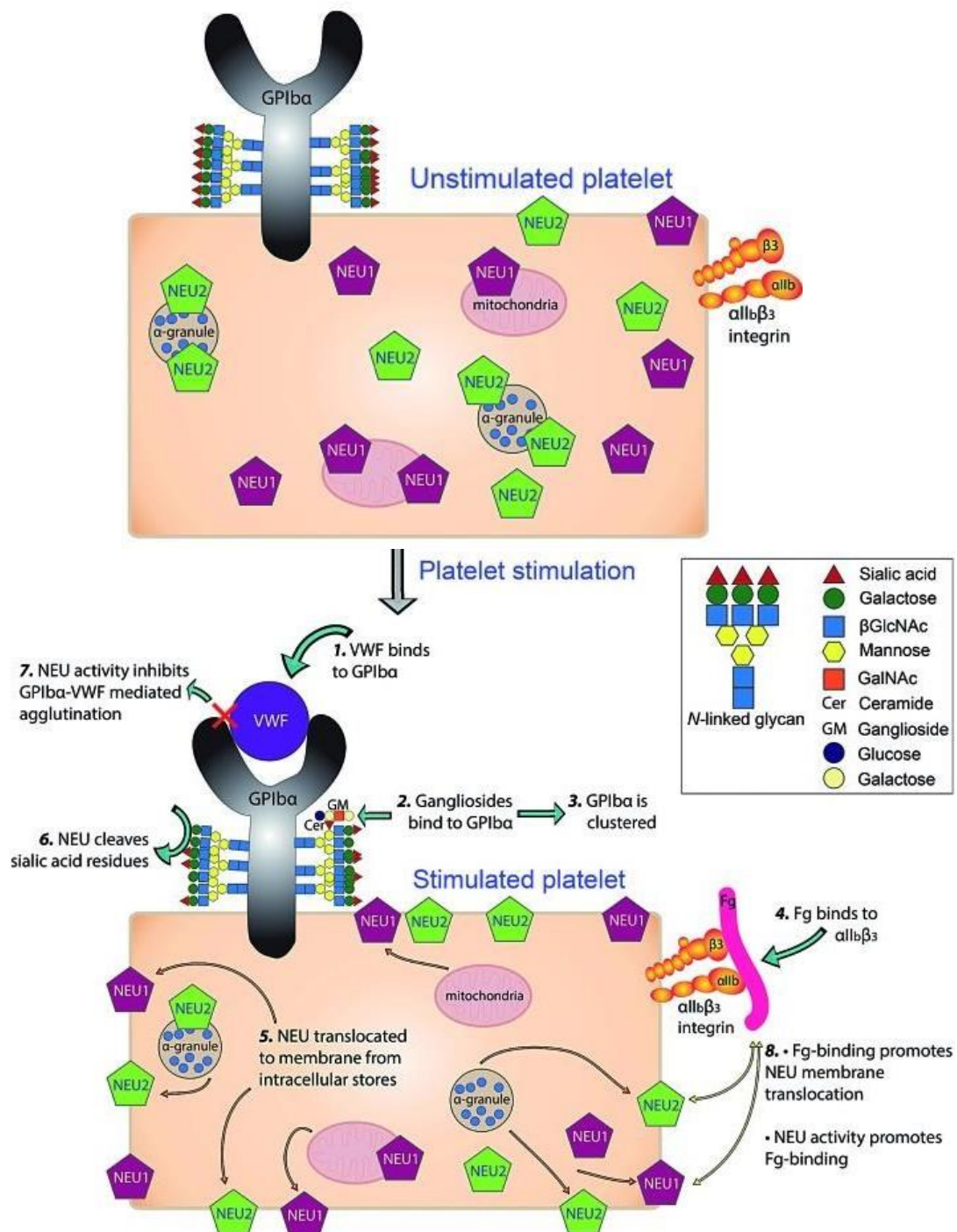


Figure 27 : Processus de déglycosylation des plaquettes après activation

Modèle proposé par Maarks et al. 1) La liaison du facteur von Willebrand (VWF) à la glycoprotéine Iba (GPIba) conduit potentiellement à 2) la liaison des gangliosides (GM), 3) le cluster des GPIba, conduisant à 4) la liaison du fibrinogène à l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -intégrine, 5) NEU1 et NEU2 transloquent vers la membrane plasmique à partir des mitochondries ou des α -granules respectivement, 6) la neuramidase (NEU) clive l'acide sialique, 7) l'activité de la NEU inhibe l'agglutination médiée par le VWF et 8) le fibrinogène favorise l'association membranaire de la NEU dans une boucle de rétroaction. Adaptée de Maarks et al. 2020

Une fois désialylées, les plaquettes sont séquestrées dans le foie et éliminées par les cellules de Kupffer, un sous-ensemble de phagocytes professionnels du foie. La collaboration entre les récepteurs d'Ashwell Morell et les lectines de galactose des macrophages, toutes deux exprimées par les cellules de Kupffer, a en effet été décrite pour éliminer efficacement les plaquettes désialylées (Deppermann et al., 2020). Plus récemment, il a été décrit que le récepteur lectine de type C, CLEC4F, spécifiquement exprimé sur les cellules de Kupffer, reconnaît les glycanes désialylés et participe à l'élimination de ces plaquettes (Jiang et al., 2021). La désialylation des plaquettes circulantes au cours du temps pourrait constituer un des processus physiologiques d'élimination des plaquettes âgées (Lasne et al., 2020).

Rôle de la désialylation dans l'état réfractaire d'origine immune

La question de la désialylation potentielle des plaquettes au cours de l'état réfractaire immunologique par les anticorps anti-HLA-I est encore ouverte. Cette hypothèse n'a pas encore été explorée pour les états réfractaires induits par les anticorps anti-HLA-I. Dans d'autres pathologies telles que les thrombopénies immunitaires, les autoanticorps entraînent la désialylation des plaquettes qui conduit à leur élimination dans le foie.

Dans la thrombocytopénie immune, les autoanticorps sont majoritairement dirigés contre la GPIb α et la GPIIbIIIa. Les anticorps anti-GPIb α réticulent les sous-unités GPIb α , ce qui déclenche une signalisation intracellulaire et l'activation des plaquettes qui conduit à la sécrétion du contenu des granules et de neuraminidase stockée dans le cytoplasme. La neuraminidase 1 (NEU1) libérée désialyle les résidus d'acide sialique de surface, en particulier sur la GPIb α . L'élimination des résidus sialiques terminaux volumineux facilite l'assemblage des sous unités GPIb et déclenche l'activation, formant ainsi une boucle d'activation (Li et al., 2015). Dans ce cas, l'activation est directement liée à la désialylation des plaquettes.

Contrairement aux anticorps anti-GPIb, les anticorps anti-GPIIbIIIa entraînent la désialylation des plaquettes de manière CD32a dépendante (Li et al., 2015). En effet, la littérature fait état d'un patient Glanzmann atteint d'ITP dont les anticorps anti-GPIIbIIIa entraînent la désialylation des plaquettes, laquelle est abrogée en présence d'un inhibiteur du CD32a. Cette désialylation n'est pas associée à une activation plaquettaire (Zheng et al., 2020). Les anticorps anti-GPIIbIIIa entraînent une translocation importante de NEU1 à la membrane sans marqueurs d'activation. Si les auteurs ne décrivent pas le mécanisme impliqué dans la libération de neuraminidase sans activation plaquettaire, ils évoquent l'importance de la signalisation du récepteur CD32a dans ce processus. Dans un modèle murin d'ITP ayant produit des anticorps anti-GPIIbIIIa, cibler les sialidases par Oseltamivir permet d'augmenter le temps de circulation des plaquettes humaines ciblées (Zheng et al., 2022).

Il est envisageable que ce processus de désialylation, associé ou non à l'activation, soit également impliqué dans l'élimination des plaquettes par les anticorps anti-HLA-I. Si cette hypothèse venait à être confirmée, cela ouvrirait de nouveaux axes thérapeutiques comme cela l'a été pour des patients atteints d'ITP.

La littérature fait état de deux patients atteints d'ITP traités avec succès avec un inhibiteur de sialydases : l'Oseltamivir. Ce traitement de référence pour la grippe a été administré au premier patient afin de traiter cette infection. Le traitement eut un effet inattendu, celui d'augmenter la numération plaquettaire du patient initialement thrombopénique (Alioglu et al., 2010). L'autre cas concerne un patient non répondeur aux traitements conventionnels, y compris les corticostéroïdes, les immunoglobulines injectées en intraveineuses (IVIg), la thrombopoïétine humaine recombinante, le Rituximab, le Ranazol et la Vindésine (Shao et al., 2015)

L'opsonisation, l'activation dépendante du CD32a ou du complément et la désialylation sont ainsi les principaux mécanismes d'élimination des plaquettes médiés par des anticorps décrits dans la littérature. Cependant, les conclusions concernant le rôle des anti-HLA-I reposent sur des tests *in vitro* et nécessiteraient de plus amples investigations *in vivo*. Il sera également important de déterminer l'importance relative de chaque mécanisme afin d'établir des perspectives thérapeutiques prometteuses.

B. Caractéristiques des anticorps impliqués dans l'état réfractaire

Les patients alloimmunisés ne développent pas tous un état réfractaire aux transfusions plaquettaires. Ce constat, décrit dans l'étude TRAP de 1997, indique que certains anticorps disposent de caractéristiques qui leur confèrent une pathogénicité (Etude TRAP, 1999).

Connaître les caractéristiques des anticorps délétères pour les transfusions permettrait d'identifier les anticorps pathogéniques chez un patient et ainsi d'adapter le choix des produits transfusés. Ceci élargirait le champ possible des donneurs compatibles pour traiter les patients en état réfractaire.

i. *Sous-classe des anticorps*

Les isotypes impliqués dans les états réfractaires immunologiques sont principalement des IgG (Laundy et al., 2004). Les IgG sont divisées en quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les différences structurelles entre chaque sous-classe résident dans la composition en acides aminés de leur chaîne lourde et ont un impact décisif sur la région charnière ainsi que sur leur abondance relative.

	IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
General								
Molecular mass (kD)	146		146		170		146	
Amino acids in hinge region	15		12		62 ^a		12	
Inter-heavy chain disulfide bonds	2		4 ^b		11 ^a		2	
Mean adult serum level (g/l)	6.98		3.8		0.51		0.56	
Relative abundance (%)	60		32		4		4	
Half-life (days)	21		21		7/~21 ^a		21	
Placental transfer	++++		++		++/++++ ^a		+++	
Antibody response to:								
Proteins	++		+/-		++		++ ^e	
Polysaccharides	+		+++		+/-		+/-	
Allergens	+		(-)		(-)		++	
Complement activation								
C1q binding	++		+		+++		-	
Fc receptors								
FcγRIIIa _{F158}	++	1.2	-	0.03	++++	7.7	-	0.20
FcγRIIIa _{V158}	+++	2.0	+	0.07	++++	9.8	++	0.25
FcRn (at pH < 6.5)	+++		+++		++/++++ ^a		+++	

Tableau 4 : Propriétés des différentes sous-classes d'anticorps

Adapté de Vidarsson et al. 2014

La capacité d'un anticorps à recruter le complément est grandement impactée par sa sous-classe. En effet, les IgG1 et IgG3 sont les plus efficaces pour le recrutement et l'activation du complément (**Tableau 4**). Les IgG2 sont eux également capables de recruter le complément mais uniquement en cas de taux d'anticorps très élevée. A contrario, les IgG4 en sont incapables (Vidarsson et al., 2014). Les différentes sous-classes ont également des affinités différentes pour les récepteurs Fc. Le récepteur CD32a, unique récepteur Fc présent sur les plaquettes humaines, a une meilleure affinité pour les IgG3 et IgG1, suivi par les IgG2 et les IgG4 (Vidarsson et al., 2014).

Il est décrit que les transfusions sont à l'origine d'une production d'anticorps majoritairement de sous-classe IgG1 alors que les grossesses et les rejets de greffes sont plus souvent associés à une expansion de toutes les sous-classes (Lowe et al., 2013). La présence d'une sous-classe dépend du degré de commutation de classe, qui elle-même dépend de l'activation des cellules T. Ainsi, la tendance à stimuler plusieurs sous-classes lors du rejet d'un greffon peut être due à un plus grand degré d'activation spécifique des cellules T par rapport à la réponse contre une transfusion sanguine. La présence d'IgG3 chez des patients transplantés du foie est associée à un risque de rejet de greffe important comparé aux autres sous-classes (Kaneku et al., 2012). A ce jour, aucune publication n'établit de corrélation entre les sous-classes d'IgG des anti-HLA-I et les ERTp. Un article datant de 1993 révèle que des anticorps anti-HPA induisent l'agrégation des plaquettes de manière sous-classe dépendante. Les IgG1 induiraient une activation Fc-dépendante alors que les IgG2 recruteraient le complément (Reys et al., 1993).

De plus, une étude réalisée chez des babouins suggère que les sous-classes peuvent influencer la localisation de la séquestration des plaquettes. Les auteurs ont montré que les plaquettes étaient séquestrées dans la rate lorsque l'anticorps antiplaquettaire était de type IgG1, alors que les IgG2 conduisaient principalement à une élimination hépatique (Coetzee et al., 2000). Les différentes sous-classes d'anticorps anti-HLA-I pourraient ainsi être corrélées à des effets distincts sur les plaquettes (Vidarsson et al., 2014). Toutes ces observations indiquent qu'il pourrait être utile d'identifier l'importance relative des sous-classes d'alloanticorps dans les mécanismes d'élimination des plaquettes par ces derniers.

Lorsque l'on est confronté à un état réfractaire immunologique chez un patient polyimmunisé, hiérarchiser la pathogénicité des sous-classes pourrait permettre d'élargir le champ des donneurs compatibles.

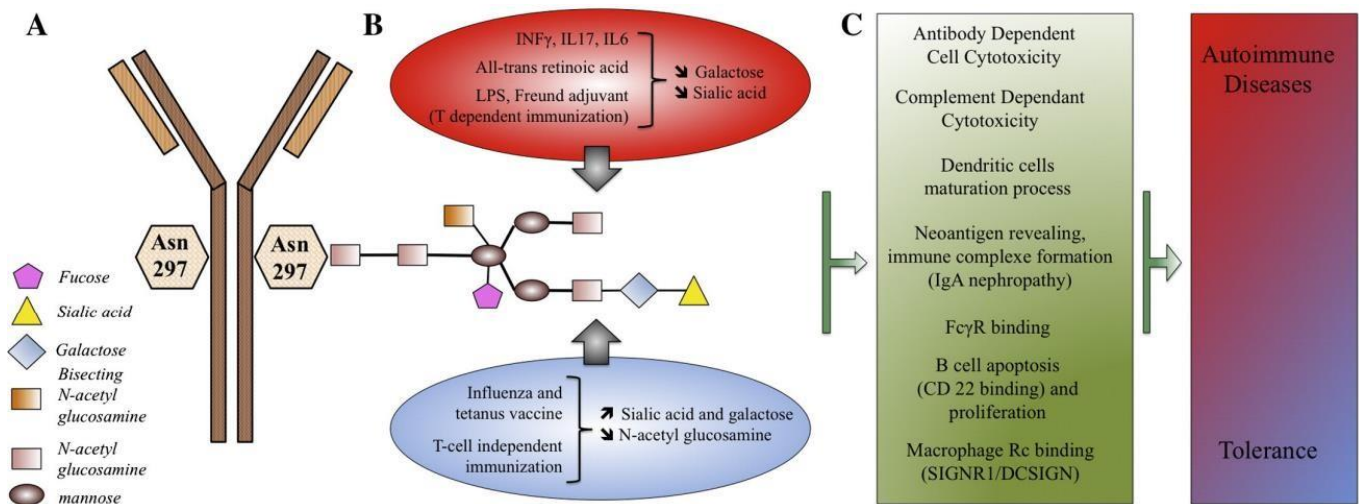


Figure 28 : Modulation de la glycosylation des immunoglobulines et impact sur les fonctions effectrices

- Les N-glycans se situent sur le fragment constant des immunoglobulines sur l'asparagine 297, liés à une structure centrale composée de 4N-acétyl glucosamine et de 3 résidus de mannose.
- Plusieurs facteurs environnementaux ou immunologiques peuvent affecter le processus de glycosylation.
- Les N-glycane ont un impact sur les fonctions des immunoglobulines, modulant le système immunitaire vers des conditions pro-inflammatoires ou de tolérance.

Adapté de Goulabchand et al., 2014

ii. *Glycosylation des anticorps*

Les anticorps possèdent deux chaînes glycanes attachées aux asparagines 297 sur chaque chaîne lourde (Jennewein and Alter, 2017). Elles sont essentielles au maintien de la structure fonctionnelle et peuvent évoluer en fonction du temps, de l'âge, de la maladie ou des facteurs environnementaux. Elles affectent l'affinité des anticorps pour les récepteurs Fc ainsi que leur capacité à mobiliser le complément (Anthony and Nimmerjahn, 2011) (**Figure 28**).

L'analyse de sérums de patients alloimmunisés révèle que la glycosylation des anticorps anti-HLA-I est très variable. Kapur et al. ont montré que les IgG anti-HLA-I prélevées chez des patients allo-immunisés en ERT sont plus galactosylés et sialylés que les IgG1 sériques totales. Les taux de fucosylation ne varient pas entre les patients et les donneurs sains (Kapur et al., 2014). Selon Van Osch, la galactosylation des IgG renforcerait leur pouvoir d'activateur du complément en favorisant l'hexamérisation des anticorps qui constitueraient alors une plate-forme optimale pour la liaison du C1q (Osch et al., 2020). Récemment, la même équipe a également évalué l'impact de la glycosylation des anticorps sur la phagocytose de plaquettes opsonisées. La phagocytose n'a pas été affectée par les différences au niveau des chaînes glycanes, possiblement car cette dernière est principalement médiée par le FcγRI, dont l'affinité n'est pas modifiée par la glycosylation (Tij et al., 2023).

3. REPONSE CELLULAIRE ET ELIMINATION DES PLAQUETTES TRANSFUSEES

Comme évoqué dans la partie II. 2), Arthur et al. ont mis au point un modèle murin d'alloimmunisation plaquettaire dans des souris μ MT déficientes en lymphocytes B. Dans ces souris, les plaquettes sont éliminées de la circulation 24h après la transfusion, indiquant une réponse cellulaire associée à l'alloimmunisation. Ainsi les deux réponses immunes humorale et cellulaire coexistent et entraînent l'élimination des plaquettes transfusées de manière différée. Si les LT CD8⁺ ont été décrits comme impliqués dans l'élimination des plaquettes transfusées, le mécanisme d'élimination lui n'a pas été étudié par les auteurs. Classiquement, une fois les LT CD8⁺ naïfs activés et différenciés en LT CD8⁺ cytotoxiques, ils sont capables de libérer des granzymes et perforines. Ces molécules endommagent les cellules cibles et entraînent leur apoptose. Les mécanismes précis d'élimination cellulaire n'ont pas été décrits dans le cadre de l'état réfractaire mais une hypothèse dans le cadre de l'ITP a été décrite par Qiu et al. Les LT CD8⁺ cytotoxiques seraient également capables, en plus du mécanisme granzyme/perforine, de désialyler les plaquettes et ainsi, de conduire à leur élimination. Cette hypothèse a été émise car la co-incubation de lymphocytes provenant de patients ITP avec des plaquettes entraînent la désialylation de ces dernières et l'expression de NEU1 (Qiu et al., 2016).

4. STRATEGIES ET NOUVEAUX AXES THERAPEUTIQUES

Comme l'expression des molécules HLA-I à la surface des plaquettes et leur reconnaissance par les alloanticorps sont responsables de la majorité des ERTI immuns, les stratégies futures visant à éviter l'inefficacité transfusionnelle se concentrent sur la réduction de l'expression des antigènes HLA ou sur la modulation des effets des anticorps.

Plaquettes universelles HLA-I

Une nouvelle option thérapeutique pour transfuser les patients en état réfractaire serait de transfuser des plaquettes dépourvues de molécules HLA-I à leur surface. La première tentative pour éliminer, ou au moins diminuer, l'expression des molécules HLA-I sur les plaquettes était basée sur une modification chimique. Le traitement acide des cellules humaines et murines permet d'éliminer l'antigénicité des molécules du CMH de classe I sans provoquer de mort cellulaire significative (Sugawara et al., 1987). Sur la base de cette découverte, plusieurs méthodes de préparation de plaquettes appauvries en HLA-I ont été rapportées. L'incubation de CPA avec de l'acide citrique à pH3 permet en effet de réduire l'expression des molécules HLA-I de 71% et diminue la fixation de C3c de 11,5 fois (Mirlashari et al., 2021a).

Ce traitement entraîne cependant une pré-activation des plaquettes qui n'affecte toutefois pas leur réponse à la thrombine, un puissant agoniste, comparée à des plaquettes non traitées à l'acide citrique. Cependant, la capacité d'activation des plaquettes traitées à l'acide citrique mériterait d'être évaluée en réponse à des agonistes faibles tels que l'ADP. Ce traitement a néanmoins abrogé la lyse induite par la fixation du complément et a réduit la phagocytose médiée par les anticorps (Meinke et al., 2016). Suite à ces résultats prometteurs, l'équipe de Hetland a réalisé une analyse protéomique qui a révélé des modifications plaquettaires minimales après traitement à l'acide. Ces modifications n'affectent cependant pas leurs fonctions (Mirlashari et al., 2021b).

Malgré l'absence d'effets négatifs sur les protéines impliquées dans la coagulation et l'hémostase, ces résultats doivent encore être confirmés par des tests fonctionnels. Cette approche est donc attrayante car elle pourrait théoriquement convenir à une production de masse à un coût raisonnable. Cependant, aucune méthode n'a encore été approuvée pour un usage clinique et la recherche est toujours en cours dans ce domaine.

Une alternative prometteuse au traitement chimique pourrait être l'utilisation de plaquettes déficientes en molécules HLA-I générées *in vitro*. Différentes méthodes de production de plaquettes *in vitro* ont été rapportées, qui diffèrent par la source des cellules souches : cellules souches

pluripotentes induites (iPSC) ou progéniteurs hématopoïétiques (cellules CD34+). Les iPSC présentent des caractéristiques intéressantes telles que leur capacité d'autorenouveau mais ne permettent pas d'obtenir un rendement de production *in vitro* élevé (<10 plaquettes/MK). A contrario, les CD34+ ont un faible coût et permettent un rendement élevé (100-150 plaquettes/MK) (Strassel et al., 2018). Chacune de ces pistes présente donc des avantages et des inconvénients pour le développement d'un produit transfusionnel.

Les molécules HLA-I doivent former un hétérodimère entre une chaîne lourde et une chaîne légère, la β 2-microglobuline, pour être exprimées de manière stable à la membrane plasmique. La stratégie utilisée jusqu'à présent pour obtenir des cellules dépourvues de molécules HLA-I à leur surface repose sur la suppression du gène de la β 2-microglobuline. Ces modifications sont réalisées par diverses techniques : ARN interférence, shRNA ou encore CRISPR Cas9. Ces modifications génétiques n'impactent pas la différenciation des progéniteurs en mégacaryocytes producteurs de plaquettes, ni la fonctionnalité de ces dernières qui sont toujours en capacité d'exprimer des marqueurs d'activation après stimulation à l'ADP et la thrombine. Avec ces méthodes, l'expression des molécules HLA-I est diminuée jusqu'à 82% (Figueiredo and Blasczyk, 2021). L'expression résiduelle restante des molécules HLA-I peut sembler problématique mais constitue en réalité un avantage pour les plaquettes produites *in vitro* lorsqu'injectées *in vivo*, afin d'éviter la cytotoxicité dépendante des NK. Ainsi, il a été montré que des plaquettes déficientes en HLA-I produites à partir d'iPSC ont circulé avec succès dans un modèle murin d'état réfractaire immun dont les souris sont pourvues de NK humains (Suzuki et al., 2020).

Plus récemment, les résultats du premier essai clinique de plaquettes produites *ex vivo* montrent qu'il s'agit d'un produit sûr, mais il reste limité à la production autologue (Avanzi et al., 2016). Une optimisation est donc nécessaire avant que les plaquettes de culture puissent devenir une alternative plausible au produit sanguin compatible HLA.

Cibler la voie du complément

Le complément constitue une cible thérapeutique puisqu'il a été mis en cause dans l'élimination des plaquettes induite par les alloanticorps anti-HLA-I. Une étude pilote a en effet été menée pour évaluer l'efficacité de l'écilizumab chez des patients en état réfractaire. L'écilizumab est un anticorps monoclonal qui inhibe le composant C5 du complément, composant commun aux trois voies d'activation et nécessaire à la formation du complexe d'attaque membranaire. Cette étude préliminaire a été réalisée chez 10 patients en état réfractaire qui ne présentent pas d'autres facteurs d'élimination des plaquettes. Sur les 10 patients immunisés et traités, le traitement a induit une

tolérance des transfusions en HLA-Incompatibles chez 4 patients. Après quelques jours de traitement, la quantité de transfusion réalisée avait diminué de moitié (Vo et al., 2020). Un essai clinique portant sur une cohorte plus importante devrait permettre de tirer des conclusions définitives concernant cette stratégie. Cependant, il est important de garder à l'esprit le coût élevé d'un tel traitement qui, même s'il s'avère efficace, se limitera à la prise en charge de patients en impasse transfusionnelle avérée mais ne permettra pas de traiter tous les ERTD d'origine immunitaire.

Réutilisation des médicaments antinéoplasiques

Une des stratégies vise directement le système immunitaire pour éviter un développement des anticorps et de l'état réfractaire associé à ces derniers. Cette approche prophylactique repose sur des médicaments antinéoplasiques.

Le rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 exprimé par les lymphocytes B qui entraîne la déplétion de ces derniers durant 6 à 9 mois. Après 3 injections hebdomadaires, ce traitement a permis d'augmenter la numération plaquettaire après transfusions chez 7 patients réfractaires atteints d'anémie aplasique ou de syndrome myélodysplasique (Liu et al., 2015). Cependant, deux profils de réponse ont été identifiés : une réponse précoce et transitoire ainsi qu'une réponse tardive et continue. La première réponse est peut-être due à la saturation du système réticulo-endothélial par les lymphocytes B opsonisés alors que la deuxième réponse réside dans une diminution de la production d'alloanticorps sur du long terme. Ce traitement présente donc le grand avantage d'augmenter la numération plaquettaire des patients sur une période suffisamment longue pour traiter la pathologie sous-jacente. Le rituximab ne cible cependant pas les plasmocytes à longue durée de vie, responsables de la production des alloanticorps de manière continue. Un autre traitement cible ces cellules : le daratumumab. Cet anticorps monoclonal anti-CD38 couramment utilisé dans le traitement du myélome entraîne la déplétion des plasmocytes à longue durée de vie pour une durée comprise entre 1 et 3 mois. Ce traitement s'est également révélé capable d'augmenter la numération plaquettaire après des transfusions chez 7 patients en état réfractaire, auparavant traités sans succès par rituximab (Migdady et al., 2020). De la même manière, le bortézomib, un inhibiteur spécifique du protéasome 26S, permet de cibler les plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Le mécanisme précis n'a pas été décrit mais l'hypothèse réside dans l'inactivation par le traitement des cellules dendritiques qui sont alors incapables de stimuler l'expansion des plasmocytes. L'article publié par Miki et al. fait état d'une patiente traitée pour un myélome multiple, dont la quantité d'anticorps anti-HLA-I a drastiquement diminué après traitement Bortézomib. Cette diminution a eu comme effet une amélioration significative des réponses cliniques aux transfusions de plaquettes provenant de donneurs HLA non compatibles (Miki et al., 2009).

En outre, plusieurs études décrivent un impact de ces médicaments sur la numération plaquettaire, ce qui signifie que ces considérations devraient être prises en compte dans la conception de futures stratégies pharmacologiques pour gérer la ERTIP immunologique (Giezen et al., 2012; Lonial et al., 2005). Ces différentes approches semblent prometteuses mais doivent être validées sur une plus grande cohorte de patients.

Immunoglobulines intraveineuses et échanges plasmatiques

Une stratégie utilisée dans les maladies liées aux anticorps repose sur la modulation des anticorps eux-mêmes. L'immunoglobuline intraveineuse (Ivlg), définie comme l'utilisation d'une combinaison d'anticorps obtenus à partir de donneurs humains sains, ou l'échange de plasma (PE) ont été rapportés comme un traitement efficace pour les patients atteints d'ERTIP (Cid et al., 2015; Kurtzber et al., 1987). Le bénéfice clinique du traitement par Ivlg pourrait être dû au blocage des récepteurs Fc exprimés par le système réticulo-endothélial. D'une part les plaquettes opsonisées ne seraient plus éliminées par ces macrophages, et d'autre part, les Ivlg moduleraient les effets des anticorps par interférence avec le complément (Ballow, 1997). Cette hypothèse n'explique cependant pas les effets immunomodulateurs à long terme des Ivlg. Samuelsson et al. ont proposé que l'activité anti-inflammatoire de l'Ivlg est médiée par la surexpression du récepteur Fc inhibiteur, FcγRIIb, car l'Ivlg n'a pas d'effets protecteurs sur un modèle murin de thrombose immunitaire chez des souris dépourvues de ce récepteur (Samuelsson et al., 2001).

Les Ivlg pourraient également saturer les récepteurs Fc néonataux, appelés FcRn. Les FcRn sont des molécules exprimées par les leucocytes et les cellules endothéliales, qui contrôlent la demi-vie des IgG et de l'albumine. Ces récepteurs Fc sont spécialisés dans la liaison des IgG ce qui les protègent de la dégradation à l'intérieur des lysosomes. Ainsi les FcRn permettent aux anticorps liés de circuler plus longtemps. L'administration d'Ivlg permettrait de saturer ces récepteurs, entraînant ainsi la dégradation plus rapide des anticorps anti-HLA-I circulants (Ballow, 1997). Cependant, Crow et al. ont suggéré que le mécanisme d'action des Ivlg est indépendant des FcRn car les Ivlg ont amélioré la numération plaquettaire dans un modèle murin de PTI chez des souris déficientes en FcRn de manière comparable aux souris WT (Crow et al., 2011).

Les Ivlg agissent donc de multiples manières sur le système immunitaire mais les preuves de leur utilité dans les cas de ERTIP immun font encore défaut et une vaste étude clinique devrait être menée pour tirer des conclusions définitives sur leur efficacité potentielle dans ce contexte particulier.

IdeS

L'enzyme de dégradation de l'IgG de *S. pyogenes* (IdeS) est une protéase à cystéine qui clive la région charnière des chaînes lourdes des IgG, générant un fragment F(ab')₂ et deux fragments Fc (von Pawel-Rammingen et al., 2002). La dégradation des IgG permet l'absence d'anticorps durant une à deux semaines, le temps de synthèse de nouvelles IgG. Comme l'IdeS peut neutraliser sélectivement et rapidement la fonction effectrice médiée par la partie Fc des IgG humaines, il s'agit d'une nouvelle thérapie prometteuse pour traiter les troubles induits par des anticorps. IdeS n'est cependant pas spécifique et clive toutes les IgG présentes dans le plasma. Son injection entraîne alors de sérieux risques d'infection pour le patient. Cette limite a été palliée dans une étude décrivant l'utilisation d'une protéine recombinante comportant l'extrémité N-terminale de l'IdeS et l'extrémité C-terminale d'un fragment variable à chaîne unique d'un anticorps CD32a. Cette protéine se lie spécifiquement à toutes les cellules exprimant le récepteur CD32a, y compris les plaquettes et peut ainsi neutraliser spécifiquement les anticorps anti-plaquettes. Cette technologie a été testée dans un modèle murin de thrombocytopénie immunitaire et de manière intéressante, les plaquettes dont les enzymes de dégradation des IgG sont liées à la surface sont protégées contre la clairance médiée par des anticorps (Lynch et al., 2022). Des tests *in vitro* montrent également que les plaquettes circulantes ne s'activent et ne s'agrègent plus en présence d'héparine et d'anticorps anti-héparine dans des canaux microfluidiques coatés avec du facteur von-Willebrand (Kizlik-Masson et al., 2019). Il est à noter que cette technologie a déjà été utilisée pour désensibiliser des patients avant une transplantation de rein. Sur les 25 patients inclus dans l'étude, 24 patients traités par IdeS (accompagnée pour la moitié de Rituximab et de Ivlg) n'ont pas rejeté la greffe de manière hyperaiguë malgré une transplantation HLA-non compatible. L'unique rejet de greffe hyperaiguë a été causé par la présence avant la greffe d'anticorps IgM et IgA non anti-HLA, des anticorps non ciblés par IdeS (Jordan et al., 2017). Cette technologie ne prévient cependant pas l'alloimmunisation impliquée dans le rejet de greffe chronique. Cet effet immédiat (élimination des anticorps dans les 6 heures après l'injection) serait néanmoins très utile pour tolérer les transfusions non HLA compatibles chez les patients alloimmunisés et serait idéal pour traiter les ERTD d'origine immune. Ce traitement prometteur présente néanmoins une limite importante : dans l'état actuel des choses, il ne pourra être administré qu'une unique fois par patient car le receveur s'immunise contre IdeS (Winstedt et al., 2015).

OBJECTIFS DE THESE

Suite à une transfusion plaquettaire, certains receveurs peuvent produire des alloanticorps dirigés contre les antigènes présents à la surface des plaquettes transfusées. Parmi ces antigènes, les molécules HLA de classe I sont particulièrement immunogènes. La présence de ces alloanticorps dans la circulation du receveur n'est pas symptomatique en tant que telle mais complique la prise en charge des patients dans un contexte de greffe mais aussi de transfusion. En effet, chez ces patients, la présence de tels alloanticorps peut conduire à une élimination rapide de la circulation des plaquettes transfusées menant ainsi à une inefficacité thérapeutique appelée état réfractaire. Afin de limiter la survenue de cette réponse allo-immune spécifique et de l'état réfractaire associé et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, il est nécessaire d'avoir une meilleure compréhension globale de ces complications post-transfusionnelles. Ainsi, **mon projet de thèse vise à identifier les mécanismes cellulaires impliqués dans l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle et l'état réfractaire associé**. Ce travail est construit autour de deux axes :

Première axe : L'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle

Le premier axe de ma thèse a eu pour objectif d'identifier les mécanismes cellulaires de la réponse allo-immune plaquettaire post-transfusionnelle. Pour identifier les acteurs cellulaires jouant un rôle clé dans cette réponse immune spécifique, je me suis focalisée sur la rate, un organe complexe de par son rôle important à la fois dans la physiologie plaquettaire et dans l'orchestration de la réponse immune. Ce travail repose principalement sur un modèle murin d'alloimmunisation plaquettaire que j'ai mis en place au laboratoire. A partir de ce modèle, nous avons étudié les interactions entre les plaquettes transfusées et les cellules spléniques du receveur. Suite aux observations réalisées, nous avons utilisé différents traitements *in vivo* ciblant les cellules immunitaires d'intérêt afin de confirmer leur rôle dans le processus d'alloimmunisation.

Deuxième axe : Le processus d'état réfractaire aux transfusions plaquettaires

Le deuxième axe de ma thèse a porté sur l'état réfractaire et sur l'effet des anticorps anti-HLA-I sur les plaquettes. En reconnaissant les allo-antigènes exprimés à la surface des plaquettes, ces derniers entraînent leur élimination rapide de la circulation du receveur. Cependant le mode d'action de ces anticorps n'est pas connu et semblerait dépendre du type d'alloanticorps produits. En effet, certains patients bien qu'immunisés, ne développent pas d'état réfractaire, indiquant une pathogénicité de certains anticorps seulement. Les caractéristiques qui leur confèrent cette pathogénicité ont été peu

étudiées dans l'état réfractaire aux transfusions de plaquettes. Ainsi, nous avons étudié *in vitro* l'effet des anticorps anti-HLA-I sur les fonctions plaquettaires en étudiant particulièrement les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation plaquettaire. D'autre part, afin de documenter plus précisément l'incidence et les facteurs associés aux états réfractaires, nous avons mis en place une étude clinique en collaboration avec un département d'onco-hématologie hospitalier de Strasbourg. Ce deuxième axe à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche clinique a eu pour but d'identifier les propriétés des anticorps associées à un état réfractaire.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

PROJET 1

LES MECANISMES CELLULAIRES DE LA REPONSE ALLOIMMUNE PLAQUETTAIRE POST-TRANSFUSIONNELLE

A) INTRODUCTION

L'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle décrit la production par le receveur, d'anticorps dirigés contre les antigènes présents à la surface des plaquettes transfusées. Ces alloanticorps sont principalement dirigés contre les molécules HLA-I, des molécules présentatrices d'antigènes très polymorphes. Lors d'une transfusion sanguine, les plaquettes du donneur entrent dans la circulation sanguine du receveur et transitent par la rate où elles interagissent avec le microenvironnement splénique, zone primordiale pour l'orchestration des réponses allo-immunes. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents propres à la réponse allo-immune anti-plaquettaire restent mal caractérisés. Plus précisément, l'identité des cellules présentatrices d'antigènes qui prennent en charge les plaquettes transfusées est, dans l'état actuel des choses, encore méconnue.

Nous avons développé au laboratoire un modèle murin d'alloimmunisation plaquettaire mimant l'incompatibilité au niveau du CMH-I entre un donneur et un receveur. Après une transfusion de plaquettes allogéniques, l'incompatibilité des antigènes plaquettaires entre la souris donneuse (haplotype H2^b) et receveuse (haplotype H2^d) entraîne une production d'alloanticorps dirigés principalement contre les molécules de classe I portées par les plaquettes de la souris donneuse. Ce modèle nous a permis d'étudier les interactions entre les plaquettes transfusées et les cellules spléniques du receveur et de pouvoir cibler *in vivo* certaines cellules afin de comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents de la réponse allo-immune anti-plaquettaire.

La rate est un organe très structuré avec une zone particulièrement d'intérêt pour les antigènes sanguins : la zone marginale. Cette zone constitue en effet un emplacement idéal pour le criblage des antigènes véhiculés par le sang. Parmi les cellules spléniques présentes dans cette zone, les cellules B de la zone marginale (MZB) sont capables d'initier une réponse immune spécifique à l'antigène reconnu par différents mécanismes : une sécrétion directe d'anticorps, une activation des lymphocytes T CD4⁺ et le dépôt d'antigènes aux centres germinatifs. Ces cellules ont été décrites comme importantes dans l'alloimmunisation anti-érythrocytaire mais leur rôle dans l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle n'a pas été étudié jusqu'à présent.

Les caractéristiques des MZB ainsi que leur implication dans l'alloimmunisation anti-érythrocytaire, nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les MZB pourraient être impliquées dans l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. Afin de confirmer ou non cette hypothèse, nous avons ciblé les MZB chez la souris receveuse et mesuré les conséquences de cette déplétion sur l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'un manuscrit publié en décembre 2022 dans le journal *Blood Advances*, pour lequel je suis première auteure.

Marginal zone B cells are responsible for the production of alloantibodies following platelet transfusion in mice

Adele Couvidou, Catherine Ange-nieux, Laurie Ruch, Pierre H. Mangin, Christian Gachet, and Blandine Maître

UMR_S1255, INSERM, Strasbourg, France; Etablissement Français du Sang-Grand Est, Strasbourg, France; Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France; and Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Key Points

- Alloantibody production following platelet transfusion relies on marginal zone B cells.
- Pharmacological approach targeting MZB prevents antiplatelet antibody production and the associated refractory state in a mouse model.

Alloimmunization against platelets remains a potentially serious adverse transfusion event. Alloantibodies produced by the recipient, mainly directed against human leukocyte antigen class I donor antigens, can compromise the therapeutic efficacy of subsequent transfusions, and may lead to refractoriness. Because the mechanism of anti-HLA alloantibody formation is poorly understood, this study aimed to identify the cells involved in the platelet immune response by focusing on the spleen, the main organ that orchestrates this alloimmune response. In the spleen, transfused allogeneic platelets are located in the marginal zone and interact with marginal zone B (MZB) cells, a specialized B-cell population implicated in the capture and follicular delivery of blood-borne antigens. To study the involvement of MZB cells in alloantibody production, we used a murine model reproducing major histocompatibility complex incompatibility between a donor (H2^b) and recipient (H2^d) that occurs during platelet transfusion. Following weekly H2^b platelet transfusions, recipient H2^d mice produced anti-H2^b immunoglobulin G, which induced a refractory state upon subsequent transfusions. Specific immunodepletion of MZB cells or their displacement from the marginal zone to the B-cell follicles by treatment with an S1P1 antagonist before each transfusion prevented significant alloantibody formation. Under these conditions, transfused platelets were still circulating after 24 hours, whereas they were rapidly removed from circulation in alloimmunized mice. The identification of MZB cells as key players in the platelet alloimmune response opens up new perspectives for minimizing platelet alloimmunization and avoiding the associated refractory state in frequently transfused patients.

Introduction

Platelet transfusions are essential to prevent or stop bleeding in patients with thrombocytopenia who present with traumatic injuries, those undergoing surgery, or those receiving chemotherapy. Despite significant progress in platelet transfusion practice over the last few decades, alloimmunization against donor antigens remains a major concern. The production of alloantibodies, mainly directed against human leukocyte antigen class I (HLA I) molecules expressed on the cell surface of transfused donor platelets, can compromise the therapeutic efficacy of subsequent transfusions and may result in a refractory state. A refractory status is defined as an inadequate increment in the posttransfusion

Submitted 24 June 2022; accepted 2 December 2022; prepublished online on *Blood Advances* First Edition 9 December 2022; final version published online 12 April 2023. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008411>.

Data are available on request from the corresponding author, Blandine Maître (blandise.maître@efs.sante.fr).

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2023 by The American Society of Hematology. Licensed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), permitting only noncommercial, nonderivative use with attribution. All other rights reserved.

platelet count determined 1 hour after transfusion.¹ The rapid removal of transfused platelets from the circulation of the recipient leads to transfusion failure and is associated with poor outcomes.² At present, patients with platelet refractoriness are managed by transfusing HLA-matched or cross-matched platelets, which is limited by the difficulty of finding sufficient numbers of compatible donors.^{3,4}

However, the mechanism of alloantibody formation after transfusion is poorly understood. Concerning red blood cells, 2 studies have proposed a role of the spleen in the initiation of anti-erythrocyte alloantibody production, suggesting that this organ might also be important for antiplatelet antibody generation.^{5,6} This is in agreement with work in mouse models highlighting the importance of the splenic microenvironment and CD4⁺ T cells in the platelet alloimmune response.⁷ However, the cellular mechanism underlying the initial capture of transfused platelets and how CD4⁺ T cells become activated are still totally unknown.⁷

The spleen is a highly structured lymphoid organ playing a major role in the induction of antibody responses against blood-borne antigens.⁸ Blood cells first enter the spleen through the marginal zone (MZ), an important transit area between the white and the red pulp.⁸ In this region, several specialized immune cells act as sentinels by trapping blood-borne antigens and initiating an appropriate immune response.⁹ Among them, marginal zone B (MZB) cells constitute a specialized innate-like B-cell population capable of mediating the prompt detection of blood-borne antigens.¹⁰ Depending on the nature of the antigen, MZB cells can differentiate into antibody-producing plasmablasts, either directly or after prior activation by CD4⁺ T cells, initiating in both cases an extra-follicular antibody response. Following red blood cell transfusion in mice, MZB cells have indeed been reported to induce a CD4 T-dependent or CD4 T-independent response, which can occur independently of follicular B cells.⁵ MZB cells can also act as antigen-presenting cells by capturing blood-borne antigens in the MZ and migrating to the follicles, where they deliver them to follicular dendritic cells.¹¹ This shuttling between the MZ and the follicles is mediated by the expression of CXCR5 and sphingosin-1-phosphate receptor (S1P1) at the surface of MZB cells and by their respective ligands CXCL13, secreted by follicular dendritic cells, and S1P, which is abundant in the MZ.¹¹ All these characteristics make MZB cells particularly attractive candidates among the cells potentially involved in platelet alloimmunization.

In this study, we evaluated the role of MZB cells in the response to platelet antigens following allogeneic transfusion. We observed that the transfused platelets were localized in the splenic marginal zone near MZB cells. Using a murine model of platelet alloimmunization, we showed that this response was CD4 T-dependent, and that elimination of MZB cells by either immunodepletion or pharmacological treatment significantly decreased the alloimmune response and prevented the subsequent development of a refractory state.

Materials and methods

Mice

C57BL/6J (H-2^b) and BALB/C (H-2^d) mice were purchased from the Charles River Laboratories and Envigo, respectively. Ethical approval for animal experiments was obtained in accordance with

European Union Directive 2010/63/EU. This study was approved by the Regional Ethics Committee for Animal Experimentation of Strasbourg, CREMEAS (CEEA 35).

Platelet alloimmunization model

A previously described murine model of platelet alloimmunization was used, with minor modifications.¹² Blood was drawn from the abdominal aorta of anesthetized C57BL/6J mice into citrate (3.15%) anticoagulant. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 1900× g for 1 minute, and the platelet count was determined using a Scil Vet ABC automatic cell counter (Scil Animal Care Company, Holtzheim, France) set to murine parameters. An aliquot (1×10^8 platelets) of this platelet suspension was injected retro-orbitally into transiently anesthetized BALB/C mice. One platelet transfusion was performed every week for 3 consecutive weeks. Seven days after each transfusion, a blood sample to evaluate antibody production was collected by severing the tail of the anesthetized mice.

Cellular depletion

MZB cells were depleted 48 hours before platelet transfusion by intraperitoneal injection of an anti-mouse CD11a mAb (100 µg, clone M17/4; Bioxcell, Lebanon, NH) and an anti-mouse CD49d mAb (100 µg, clone PS/2; Bioxcell) or isotype-matched control antibodies (rat immunoglobulin G2a (IgG2a), clone 2A3, and rat IgG2b, clone LTF-2; Bioxcell) diluted in phosphate buffered saline.¹³ Depletion of MZB cells was assessed by quantifying CD45⁺ B220⁺ IgM⁺ CD23[−] CD21⁺ splenocytes by flow cytometry.

CD4⁺ T cells were depleted 4 and 2 days before platelet transfusion by intraperitoneal injection of anti-mouse CD4 mAb (250 µg, clone GK1.5; BioXcell) or isotype-matched control antibodies (rat IgG2b, clone LTF-2; Bioxcell) diluted in phosphate buffered saline. The depletion of CD4⁺ T cells was assessed by quantifying CD45⁺ CD4⁺ cells in the blood and spleen using flow cytometry. The efficiency of CD4⁺ T-cell depletion was assessed in peripheral blood samples with APC rat anti-mouse CD4 (clone RM-45) (supplemental Data 7).

FTY720 treatment

FTY720 (0.5 mg/kg) or vehicle (injectable water) was administered by intraperitoneal injection 48 and 3 hours before the first transfusion and 5 and 2 days before each of the following transfusions.

Refractory state model

Washed platelets were prepared as previously described¹⁴ and labeled with Oregon green CFDA-SE (0.01 mM) before the last centrifugation. To mimic platelet refractoriness, alloimmunized BALB/C mice were transfused with 2×10^8 CFDA-SE washed platelets isolated from C57BL/6J mice. At different time points after transfusion (5 minutes, 2 hours, 24 hours, 48 hours, and 72 hours), blood samples were collected by severing the tail and diluting them in EDTA (6 mM). The blood was then incubated with anti-GPIIb/IIIa mAb (RAM.1, 2 µg/mL) and FcR blocking reagent (1:200) for 20 minutes. The samples were diluted in fluorescence-activated cell sorting buffer for flow cytometric analysis. The kinetics of the elimination of transfused platelets were determined by calculating the proportion of Oregon green positive platelets among $10\,000$ RAM.1⁺ platelets.

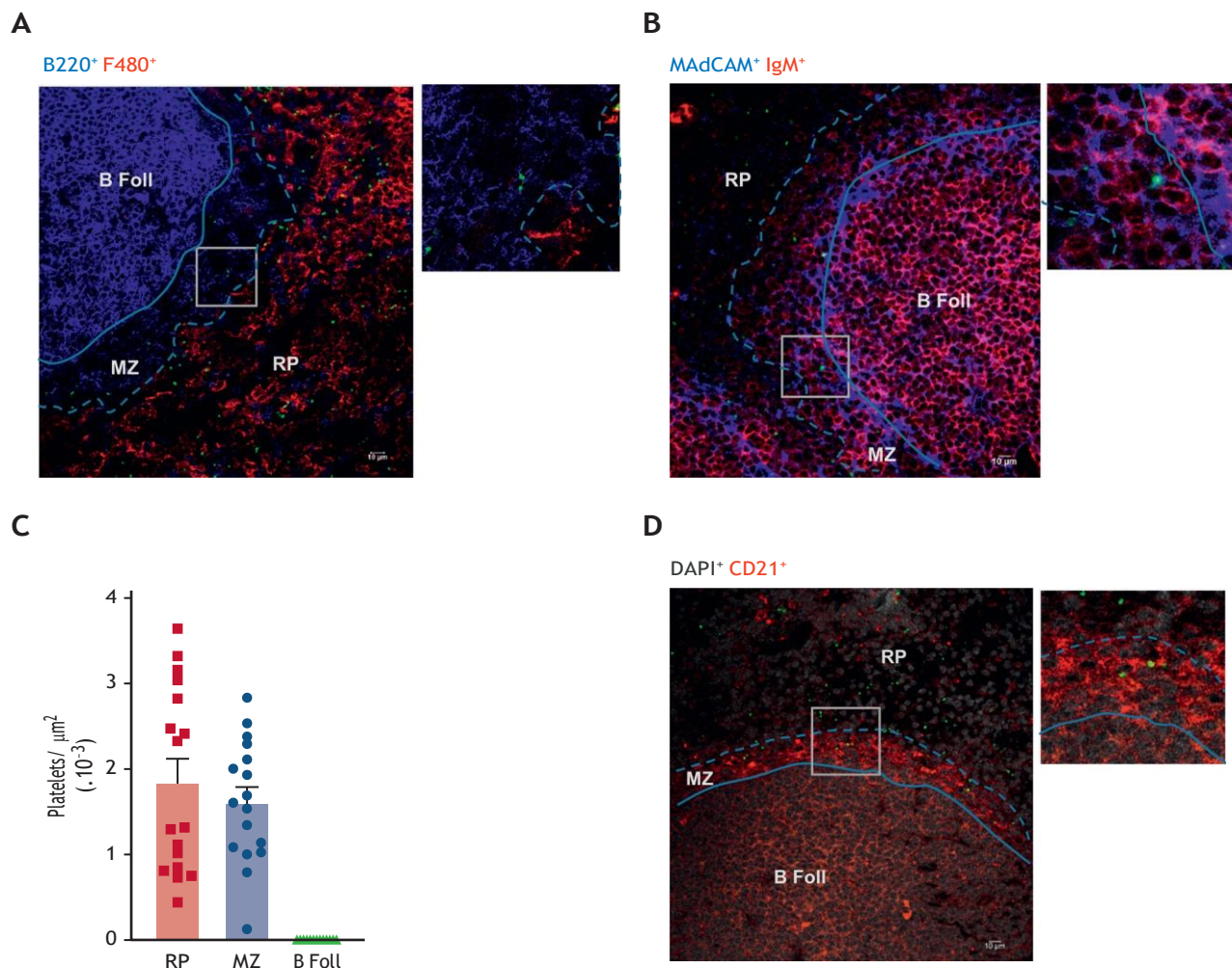


Figure 1. Transfused platelets are mainly localized in the RP and MZ of the spleen. Immunostaining of spleen sections from H2^d BALB/C mice 2 hours after transfusion with 1×10^8 CFDA-SE-labeled H2^b platelets (green) isolated from C57BL/6J mice. (A) Macrophages were detected using F4/80 (red) and B cells were detected using B220 staining (blue). (B) The MZ is delineated using IgM staining (red) for MZB cells and MadCam staining (blue) for sinus-lining cells. (C) Quantification of platelets transfused into different compartments of the spleen. Results are expressed as the number of platelets per μm^2 ($n = 17$). (D) Five minutes before sacrifice, mice received a retro-orbital injection of APC anti-mouse CD21/35 (1 μg) to label MZB cells (red) *in vivo*. The dashed and full lines delineate the RP and follicle areas, respectively. Scale bar, 10 μm . Original magnification $\times 400$. The right panels show the magnifications of the areas corresponding to the white squares on the left panels. B Foll, B-cell follicle; MZ, marginal zone; RP, red pulp.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.02 software (GraphPad, San Diego, CA). All values are reported as the mean $\pm$ standard error of the mean and were analyzed using one- or two-way analysis of variance followed by a Dunn test or Bonferroni post hoc test, depending on the normal distribution of the data established using the Shapiro-Wilk test.

An extended methods section is available in the supplemental Material.

Results

Transfused platelets interact with MZB cells in the spleen

Because the spleen represents a major site of alloimmune responses, we aimed to identify the precise localization of transfused

allogeneic platelets within this organ, to gain insight into the cellular mechanism underlying the platelet-specific alloimmune response.⁷ To allow their *in situ* detection after transfusion, platelets were labeled *ex vivo* with an Oregon green CFDA-SE fluorescent probe. Two hours after transfusion, immunofluorescence images indicated that CFDA-SE-labeled platelets were located in the red pulp of the spleen, an area characterized by the presence of F4/80⁺ macrophages, but not B220⁺ B lymphocytes (Figure 1A). Although transfused platelets were not detected in the B-cell follicles (B220^{high} F480⁻) (Figure 1A), some were found in an area located between the follicle and the red pulp, likely in the MZ. To precisely delineate the MZ from the B-cell follicle, spleen sections were costained with anti-immunoglobulin M (IgM) and anti-MadCam antibodies (Figure 1B). Quantification of platelets in the different areas confirmed the absence of platelets in the follicles, while the platelet density in the MZ and the red pulp (RP) were similar (MZ, $1.6 \times 10^{-3} \pm 0.1 \times 10^{-3}$ platelets/ μm^2 ; RP, $1.8 \times 10^{-3} \pm 0.2 \times 10^{-3}$

platelets/ μm^2 ; not significant (ns), $n = 17$) (Figure 1C). The same trend was observed after syngeneic transfusion, showing that the MZ and RP are privileged regions of transfused platelet accumulation in the spleen (supplemental Data 1A-B).

Because MZB can rapidly react with blood-borne antigens and seems to colocalize with transfused platelets, we wondered whether platelets could interact with this subset of B lymphocytes. To address this question and identify MZB cells more precisely, we injected a fluorescent antibody against mouse CD21/35 2 hours after the transfusion and 5 minutes before harvesting the spleen.¹¹ Confocal microscopy images revealed that the transfused platelets in the MZ colocalized with MZB cells (Figure 1D), as confirmed by the calculation of Mander's coefficient (0.9163). This interaction was also confirmed by ex vivo staining of spleen sections with anti-CD1d antibody (supplemental Data 2B).

To find out whether the localization changed over time, we conducted experiments at different time points (ie, 10 minutes, 2 hours, and 24 hours posttransfusion). After 10 minutes, as at 2 hours, transfused platelets were found mainly in the MZ and RP (supplemental Data 2A-B and 3A-B). After 24 hours, the quantity of detectable transfused platelets was lower, and some of them were found inside the B-cell follicles. Notably, this localization over time was similar between syngeneic and allogeneic transfused platelets (supplemental Data 1C, 2C, and 3C).

Finally, several costainings between platelets and different immune cell subsets within the MZ (ie, dendritic cells [CD11c⁺], marginal zone macrophages [MARCO⁺], and marginal metallophilic macrophages [CD169⁺]) were performed. We did not find any colocalization between platelets and CD11c⁺ dendritic cells with CD169⁺ metallophilic macrophages. However, we observed that some platelets interacted with MARCO⁺ macrophages, indicating a potential role for this subset in the alloimmune response (supplemental Data 4).

Altogether, our results indicate that some of the transfused platelets accumulate in the MZ, where they mainly interact with MZB cells, suggesting a potential role for the latter in the initiation of the platelet alloimmune response.

Development of a mouse model of platelet alloimmunization and transfusion refractoriness

To determine whether the interaction of transfused platelets with MZB cells has functional consequences on alloantibody production and the associated refractoriness to transfusion, we developed a murine model of platelet alloimmunization. This model, adapted from that of Waterman et al relies on the difference in HLA I haplotype between a donor and a recipient.¹² Recipient BALB/C mice with a major histocompatibility complex (MHC) I H2^d haplotype were transfused weekly for 3 consecutive weeks with platelets isolated from C57BL/6J mice with an MHC I H2^b haplotype (Figure 2A). Flow cytometric analyses revealed the presence of anti-IgG, in the serum of immunized BALB/C mice (Figure 2B-C). The epitopes recognized by these alloantibodies were expressed on the surface of platelets from C57BL/6J mice, but were absent from BALB/C platelets (Figure 2B). Seven days after the second transfusion (Figure 2B), antibody production reached a plateau after the third transfusion (Figure 2C). The epitopes recognized by

these alloantibodies were expressed by lymphocytes (CD3⁺ Ram1⁻) but not by erythrocytes (Ter119⁺), strongly suggesting that the targets were MHC I H2^b molecules (Figure 2D) without excluding possibly disparate minor antigens. IgM alloantibodies were detected 3 days after the second and third transfusions, but their quantity decreased after 7 days (supplemental Data 5). To examine the consequences of alloantibody production on transfusion refractoriness, alloimmunized H2^d mice were transfused with CFDA-SE-labeled H2^b platelets, and the half-life of the transfused platelets was calculated. As shown in Figure 2E, transfused H2^b platelets exhibited a half-life of 48 h in the circulation of naive mice, whereas they were eliminated within the first 2 hours after the circulation of alloimmunized animals after the second immunization. Thus, 2 immunizations of recipient MHC I H2^d mice led to specific anti-MHC I H2^b IgG production, which was sufficient to mimic transfusion refractoriness.

Alloantibody production following platelet transfusion depends on MZB cells

Our mouse model of platelet alloimmunization enabled us to assess the role of MZB cells in alloantibody production. We used an immunodepletion strategy targeting the CD11a and CD49d integrins expressed on the surface of MZB cells.¹³ Flow cytometric analyses indicated that 95% of MZB cells were eliminated from the spleen of recipient mice by the anti-CD11a and anti-CD49d antibodies compared with their isotype controls (IgG1 and IgG2a) (Figure 3A-B). Immunodepletion was also confirmed using immunofluorescence (supplemental Data 6). In the alloimmunization model, immunodepleting MZB cells in recipient mice reduced the level of alloantibodies by 4.5-fold after the second transfusion and by 2.5-fold after the third transfusion (mean fluorescence intensity [MFI], 136 ± 36 vs 30 ± 3 ; 7 days posttransfusion 2, $P < .01$; MFI, 240 ± 47 vs 96 ± 41 ; 7 days posttransfusion 3, $P < .05$; mice that received isotype control vs MZB cell-depleted mice, respectively; $n = 18$) (Figure 3C). We then investigated whether the decrease in antibody production observed in MZB cell-depleted animals was sufficient to prevent transfusion refractoriness. Interestingly, at 2 hour after transfusion, 84% of the transfused platelets were still circulating in MZB cell-depleted mice, whereas only 7% remained in control animals (84% vs 7%, 2 hours; $P < .001$; MZB cell-depleted vs control mice, respectively; $n = 8-9$) (Figure 3D). In addition, after 24 hours, 50% of transfused platelets were still present in the circulation of MZB cell-depleted animals, whereas almost all transfused platelets had been cleared from the circulation of control mice (48% vs 3%, 24 hours, $P < .05$; MZB cell-depleted vs control mice, respectively; $n = 8-9$) (Figure 3D), indicating that unlike control immunized mice, MZB cell-depleted immunized mice did not present a refractory state.

Taken together, these observations identified a crucial role for MZB cells in IgG production associated with transfusion refractoriness.

The MZB cell-mediated platelet alloimmune response relies on CD4⁺ T cells

MZB cells are known to induce a CD4 T-cell-dependent or independent response leading to the production of antibodies against erythrocytes.⁵ Therefore, we examined whether the MZB cell-dependent platelet alloimmune response required CD4⁺ T cells. Before each platelet transfusion, recipient mice were injected with anti-mouse CD4 antibody or the corresponding isotype control.

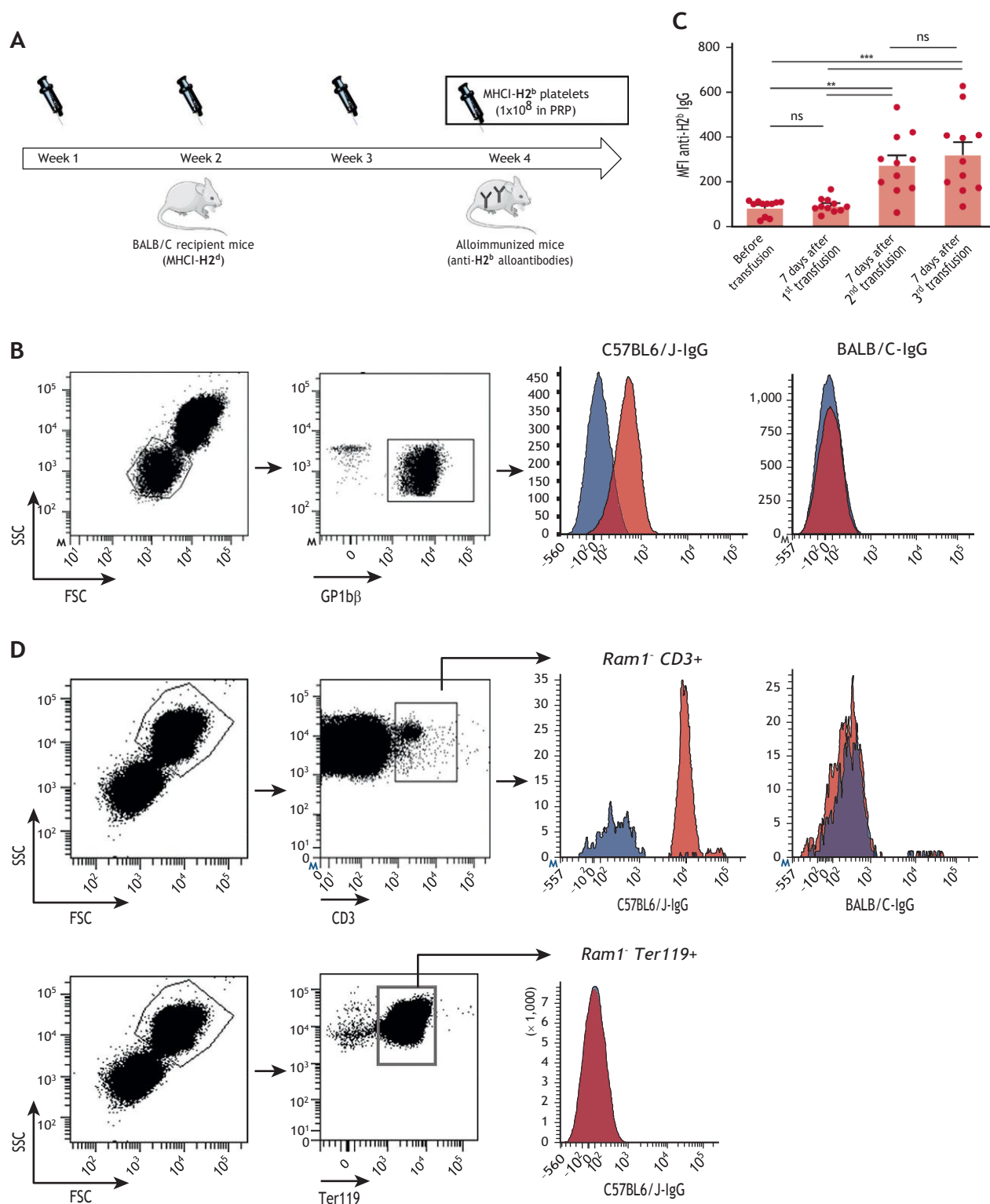


Figure 2. Murine model of platelet alloimmunization. (A) Experimental design to induce antiplatelet alloantibody production. BALB/C (H2^d) mice were immunized weekly for 3 weeks with 1×10^8 platelets in PRP isolated from C57BL/6J (H2^b) mice. (B) IgG antibodies production in immunized BALB/C mice was evaluated 7 days after each transfusion by flow cytometry. Left panels indicate representative dot plots of the gating strategy used to identify platelets with an anti-GP1b β antibody. Right panels indicate representative histograms of the fluorescence of Alexa-488 GaM IgG antibodies on platelets from C57BL/6J (H2^b) or BALB/C (H2^d) mice preincubated with the serum of immunized (red) or nonimmunized (blue) BALB/C mice. (C) Mean fluorescence intensity of Alexa-488 GaM IgG antibodies bound to H2^b platelets preincubated with the serum of immunized BALB/C mice (MFI $\pm$ SEM; ** $P < .01$; 1-way ANOVA; $n = 11$) (D) Representative dot plots of the gating strategy used to identify erythrocytes (left upper panels) and

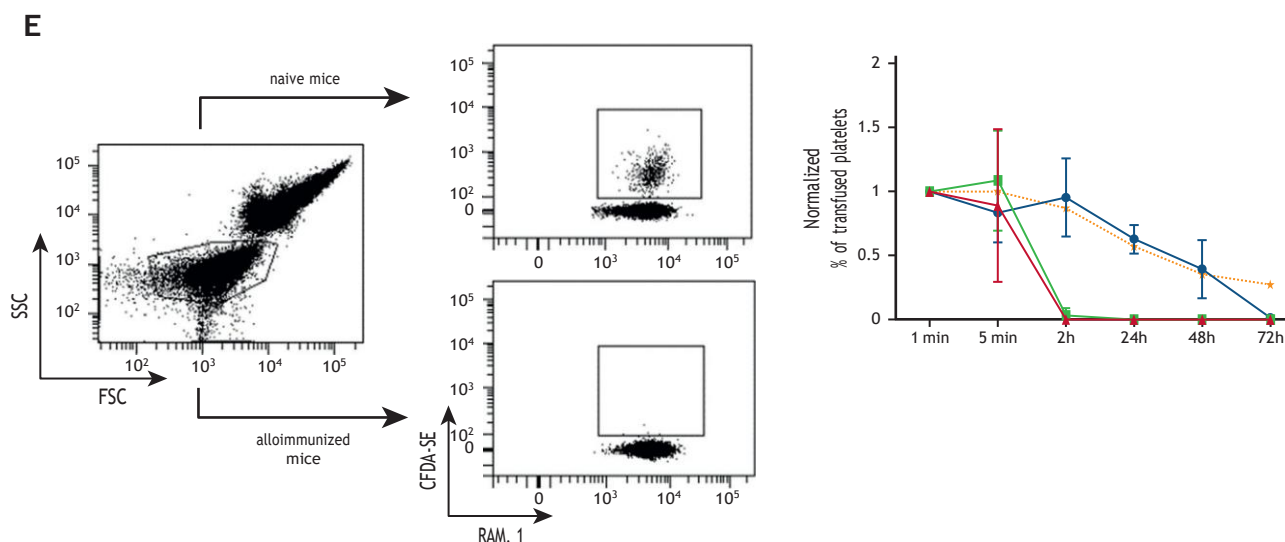


Figure 2 (continued) T-lymphocytes (left lower panels). Representative histograms of the fluorescence of IgG antibodies bound to erythrocytes (Ter119⁺) (right upper panel) and T-lymphocytes (CD45⁺ CD3⁺, Ram1⁺) (right lower panels) from C57BL/6J and BALB/C mice (red, immunized mice; blue, nonimmunized mice). (E) The Alloimmunized BALB/C mice were injected with 2×10^8 Oregon green CFDA-SE-labeled platelets from C57BL/6J mice. Left panel indicates representative dot plots of the gating strategy used to determine the kinetics of the elimination of transfused platelets in naive or alloimmunized mice. Right panel indicates the kinetics of elimination of transfused platelets. They were evaluated by calculating the percentage of Oregon green-positive transfused platelets among 10 000 RAM.1⁺ platelets at each time point after transfusion in nonimmunized (orange) and immunized mice 1 week after the first (blue), second (green), and third alloimmunizations (red), and normalized to those obtained at time 1 minute ($n = 3$). FSC, forward scatter; SEM, standard error of the mean; SSC, side scatter.

The efficiency of CD4⁺ T-cell depletion in the spleen of recipient mice was confirmed by flow cytometric analyses (supplemental Data 7). As seen in [Figure 4A](#), CD4⁺ T-cell depletion resulted in a drastic reduction in alloantibody production (MFI, 322 ± 111 vs 58 ± 5 ; 7 days posttransfusion 2, $P < .05$; MFI, 436 ± 155 vs 51 ± 3 ; 7 days posttransfusion 3; $P < .001$; mice that received isotype control vs CD4⁺ T-cell-depleted mice, respectively; $n = 7$), showing that the platelet alloimmune response depended markedly on CD4⁺ T cells. Consistent with this observation, CD4⁺ T-cell-depleted immunized mice did not present any signs of transfusion refractoriness, as illustrated by the high proportion of transfused platelets remaining in the circulation after 2 and 24 hours, as compared with the control animals in which almost all platelets were cleared after 2 hours (91% vs 2%, 2 hours; $P < .001$; 65% vs 0%, 24 hours; $P < .001$; CD4⁺ T-cell-depleted vs control mice, respectively; $n = 7$) ([Figure 4B](#)). These results demonstrate that the MZB cell-dependent antiplatelet alloantibody response relies on CD4⁺ T cells.

A pharmacological approach relocating MZB cells prevents alloantibody production and the associated transfusion refractoriness

Our results identified MZB cells as a major factor in the platelet alloimmune response and subsequent refractory state. Hence, we investigated whether a pharmacological approach targeting these cells could prevent platelet alloimmunization. To test this hypothesis, recipient mice were treated with fingolimod (FTY720), an S1P receptor (S1P1) drug analog, which induces the relocation of MZB cells to the follicles, thereby inhibiting their function in the MZ.¹¹ Already 3 hours later, immunofluorescence

images of the spleen showed that FTY720 treatment efficiently displaced MZB cells to the follicles and excluded them from the MZ ([Figure 5A](#)). The relocation of MZBs in the follicles was still visible 2 days after the injection of FTY720 (supplemental Data 8). Anti-H2^b IgG antibody production was reduced sevenfold in FTY720-treated mice compared with animals that received vehicle control 7 days after the second transfusion and fivefold after the third transfusion (MFI, 287 ± 54 vs 40 ± 4 ; 7 days after the second transfusion, $P < .01$; MFI, 366 ± 72 vs 74 ± 13 ; 7 days after the second transfusion 3, $P < .01$; control vs FTY720-treated mice, respectively; $n = 11-14$) ([Figure 5B](#)). The proportion of transfused platelets persisting in the circulation was also much higher than that in control mice, in which almost all platelets were cleared after 2 hours (55.8% vs 0.5%, 2 hours; $P < .01$; 18% vs 0.5%, 24 hours; $P < .05$; FTY720-treated vs control mice, respectively; $n = 12$) ([Figure 5C](#)), showing that the treatment prevented transfusion refractoriness. These data provide evidence that a pharmacological approach inducing the relocation and sequestration of MZB cells in B-cell follicles could avoid the alloimmune response and associated refractoriness to platelet transfusion.

Discussion

Although posttransfusion platelet alloimmunization remains a major adverse transfusion event, a lack of understanding of the underlying cellular mechanisms hampers the design of therapeutic approaches to prevent this antibody response. In this study, we identified splenic MZB cells as key players in alloantibody production following platelet transfusions in mice. We showed that allogeneic transfused platelets interacted with MZB cells in the marginal zone and that this interaction is important,

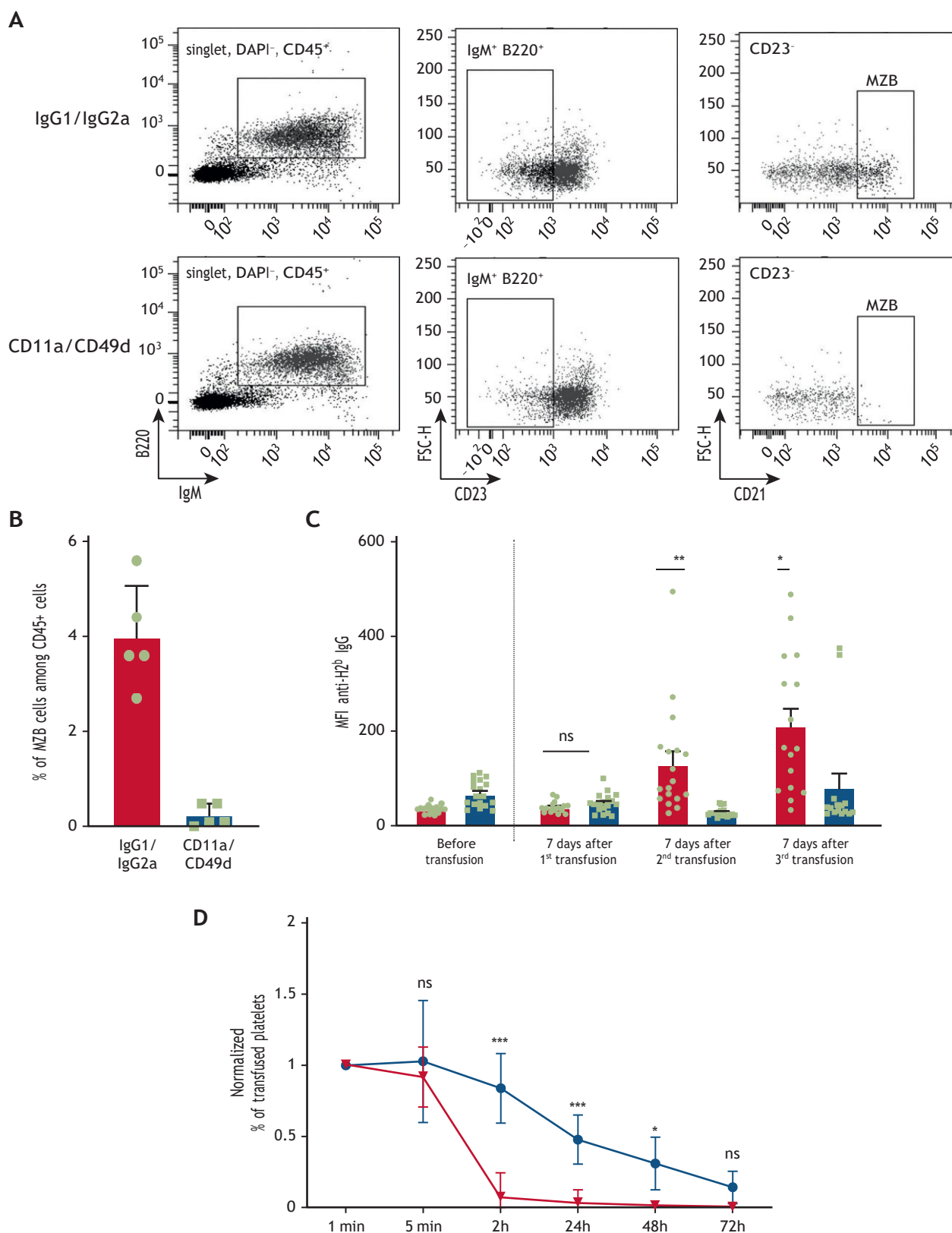


Figure 3. MZB cell immunodepletion decreases anti-H2b antibody production in alloimmunized mice. (A) Representative dot plots of the gating strategy used for quantification of splenic MZB cells (B220⁺ IgM⁺ CD23⁻ CD21⁺⁺). BALB/C recipient mice were treated with anti-mouse CD11a and anti-mouse CD49d antibodies (lower panels)

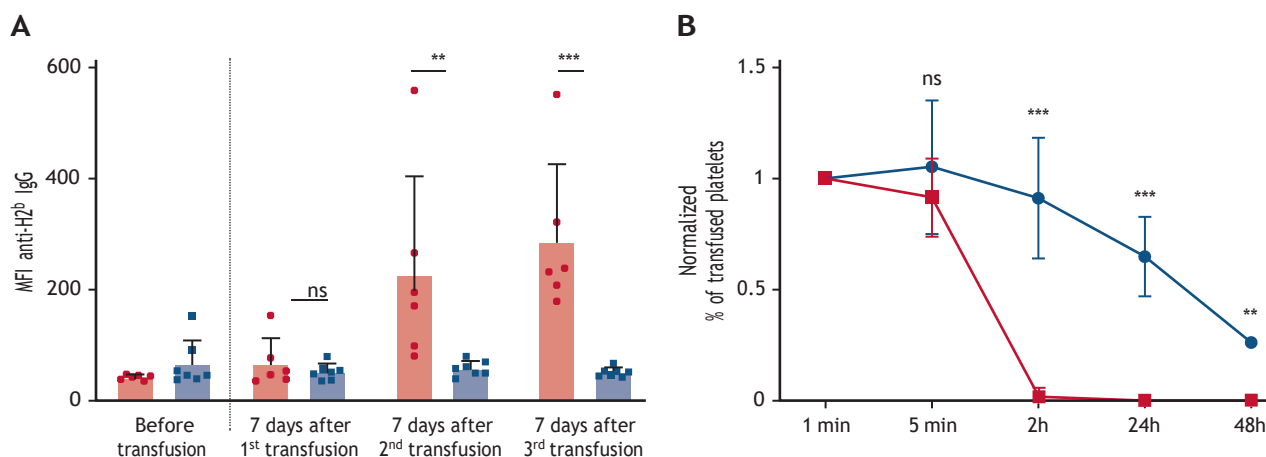


Figure 4. MZB cell-mediated platelet alloimmune response relies on CD4⁺ T cells. (A) BALB/C mice were treated 4 and 2 days before each transfusion with an immunodepleting antibody against CD4⁺ T cells or their respective isotype-matched controls. Anti-H2^b IgG antibody production was evaluated 7 days after each transfusion by flow cytometry in CD4⁺ T cell immunodepleted (blue bars) BALB/C mice and in control mice that received an isotype control (red bars). Results are presented as the mean fluorescence intensity of Alexa-488 GaM IgG antibodies bound to H2^b platelets (MFI ± SEM, n = 8). (B) Alloimmunized BALB/C mice were injected with 2.10⁸ Oregon green CFDA-SE-labeled platelets from C57BL/6J mice. The kinetics of elimination of transfused platelets were determined from the percentage of Oregon green-positive platelets among 10 000 RAM.1⁺ platelets in CD4⁺ T cell depleted (blue line) and mice that received isotype control (red line) at each time point (± SEM; **P < .01; ***P < .001; 2-way ANOVA; n = 7). ANOVA, analysis of variance; SEM, standard error of the mean.

because immunodepletion of MZB cells or their relocation outside the MZ prevented antiplatelet alloantibody production. We also demonstrated that this response relies on CD4⁺ T cells. Finally, we obtained evidence that the decrease in the level of alloantibodies observed in the absence of MZB or CD4⁺ T cells was sufficient to significantly increase the survival of transfused platelets.

An indirect and/or semidirect pathway of allorecognition is thought to be the primary mechanism of induction of platelet alloimmunization, which means that transfused platelets or their microparticles have to be internalized by the antigen presenting cells of the recipient to initiate a response.³ MZB cells have been reported to phagocytose large antigen-coated particles in a BCR-dependent manner¹⁵ and to internalize complement-coated antigens via CD21/35 receptors.¹⁶ Colocalization between MZB (CD21⁺) cells and transfused platelets was observed, indicating a direct interaction between these 2 populations. However, further studies are required to investigate internalization specifically. We cannot exclude interactions between the transfused platelets and other immune cells from the MZ. MZ macrophages have been described to regulate MZB-mediated antibody production.¹⁷ Recently, pharmacological removal of this subset of macrophages has been reported to inhibit red blood cell immunization in a murine model, suggesting that macrophages could be indirectly involved in the antigen transfer to MZB.¹⁸ We observed interactions between transfused platelets and MZ macrophages MARCO⁺ indicating that this subset could be involved in the platelet alloimmune

response. Further studies on the fate of MZB cells after their interaction with platelets are required and will need to be performed using intravital microscopy to follow these cells over time and determine in which organ compartment and at which stage of the process internalization takes place.

If there are no reports of alloantigenic platelet integrin variants between inbred strains, we cannot exclude the role of MZB in alloimmunization against human platelet antigens (HPA) especially in humans. Further studies are necessary to investigate the possible role of MZB in this process. Concerning red blood cell alloimmunization, several mechanisms involving MZB cells have been proposed depending on the alloantigen. This response has been described to depend or not on CD4⁺ T cells and follicular B cells,^{5,6} whereas for platelet alloimmunization, only 1 report has highlighted the importance of CD4⁺ T cells in a murine model.⁷ Our findings are in accordance with this latter study since we showed that the platelet immune response relied on both MZB and CD4⁺ T cells. Interestingly, MZB cells have been reported to efficiently induce CD4⁺ T-cell expansion *in vitro* and *in vivo*, suggesting a direct interaction between MZB and CD4⁺ T cells.¹⁹ The localization of MZB cells within the MZ is instrumental, as their relocation upon FTY720 treatment prevented antibody production; however, a direct or indirect effect of MZB immunodepleting antibodies on CD4⁺ T cells cannot be excluded. Thus, among the different possible mechanisms of action of MZB cells, we propose that the immune response after platelet transfusion is dependent on CD4⁺ T cells and the shuttling of MZB cells to the follicles.

Figure 3 (continued) or their respective isotype-matched controls (IgG1 and IgG2a, upper panels). (B) Quantification of the percentage of splenic MZB cells among the CD45⁺ cells in mice treated with anti-CD11a/CD49d antibodies or their isotype controls (n = 5). (C) Anti-H2^b IgG antibody production was evaluated weekly by flow cytometry in immunodepleted MZB cell (blue bars) and mice that received isotype control (red bars) BALB/C mice. Results are presented as the mean fluorescence intensity (MFI ± SEM) of Alexa-488 GaM IgG antibodies bound to H2^b platelets (*P < .05; **P < .01; 1-way ANOVA; n = 18). (D) The kinetics of elimination of transfused platelets were determined as the percentage of Oregon green-positive platelets among 10 000 RAM.1⁺ platelets in MZB cell depleted (blue line) and control mice (red line) at each time point (± SEM; **P < .01; ***P < .001; 2-way ANOVA; n = 8-9). ANOVA, analysis of variance; SEM, standard error of the mean.

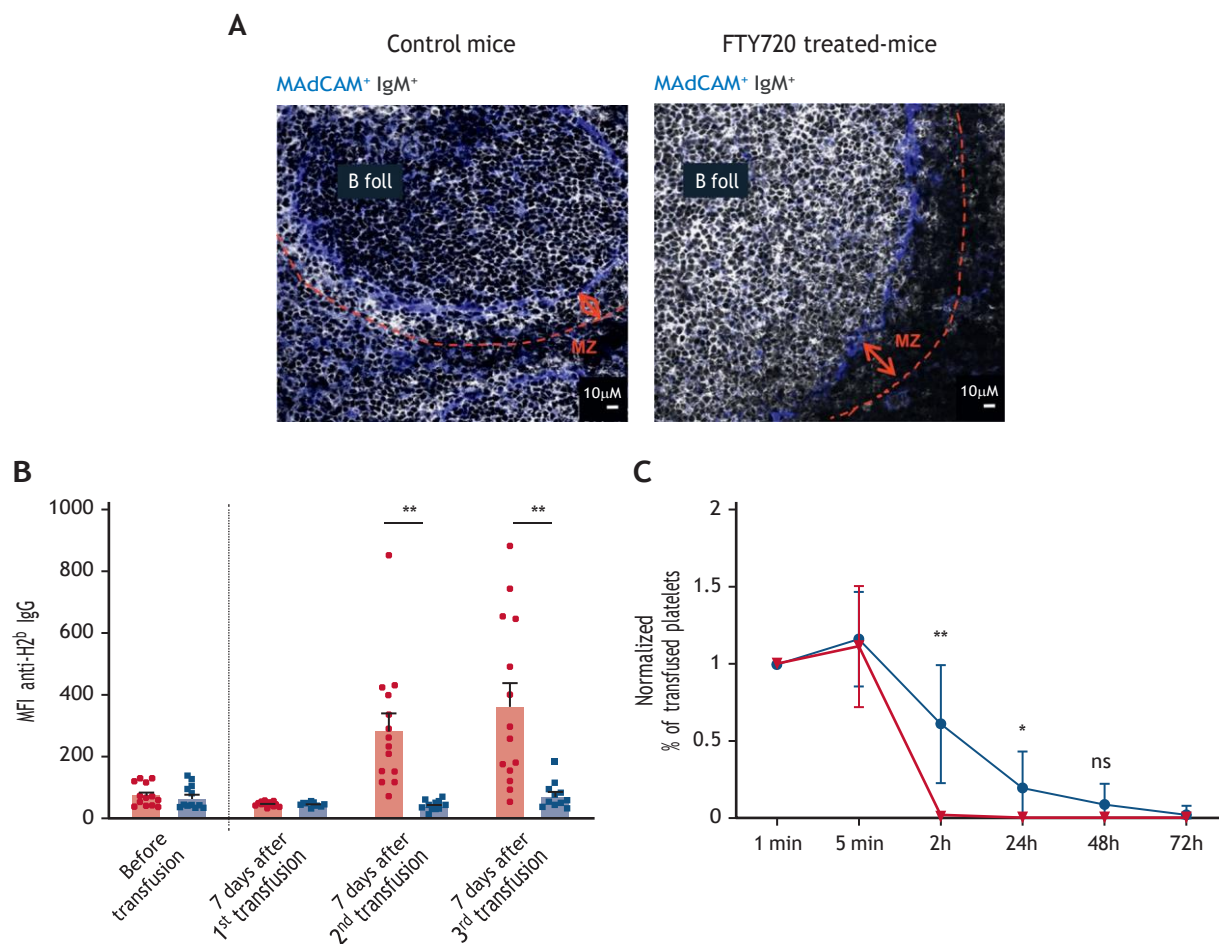


Figure 5. Alloimmunized mice treated with FTY720 produce fewer alloantibodies than the control mice. BALB/C (H2^d) mice were injected intraperitoneally with FTY720 (0.1 mg/kg) 5 days, 2 days and 3 hours before each transfusion with 1×10^8 H2^b platelets isolated from C57BL/6J mice or with vehicle control. (A) Representative images of spleen sections from mice treated with FTY720 (right panel) or vehicle (left panel) stained for IgM (gray) to detect marginal zone B cells, and MadCam (blue) to delineate the marginal sinus. The dashed lines indicate marginal zones. Scale bar, 10 μ m. Original magnification $\times 400$. (B) The level of anti-H2^b IgG antibodies was evaluated weekly by flow cytometry in FTY720 (blue bars) and vehicle control (red bars) -treated BALB/C mice. Results are presented as the mean fluorescence intensity (MFI $\pm$ SEM) of Alexa-488 GaM IgG antibodies bound to H2^b platelets (ns, $P > .05$; $^*P < .05$; 1-way ANOVA; $n = 12-14$). (C) Alloimmunized BALB/C mice were injected with 2×10^8 Oregon green CFDA-SE-labeled platelets from C57BL/6J mice. The kinetics of elimination of transfused platelets were deduced from the percentage of Oregon green-positive platelets among 10 000 RAM.1⁺ platelets in FTY720-treated (blue line) and control mice (red line) at each time point ($\pm$ SEM; $^{**}P < .01$; $^*P < .05$; 2-way ANOVA; $n = 12$). ANOVA, analysis of variance; B Foll, B cell follicle; MZ, marginal zone; SEM, standard error of the mean.

Because murine and human MZB cells share many common properties, but also present some striking differences, the question arises as to whether our observations in mice can be translated to humans. Indeed, the human and mouse spleens differ structurally, in particular in the marginal zone.²⁰ The human marginal zone is less clearly delimited than the murine one and is also in constant contact with blood released into the RP.^{8,21} Moreover, unlike murine MZB cells, human MZB cells circulate and are not restricted to the splenic marginal zone. Despite these differences, human and rodent MZB cells share common attributes, including the ability to respond rapidly to blood-borne antigens by trapping them and delivering them to appropriate immune compartments, suggesting that our study is relevant to elucidating the human alloimmune response.²² Phagocytosis assays with human splenocytes are needed to explore in detail the interactions between platelets and MZB cells.

We found that FTY720 treatment had a significant impact on alloantibody production and the survival of transfused platelets. To date, FTY720 has been approved for the treatment of relapsing multiple sclerosis. However, FTY720 induces the sequestration of lymphocytes in lymph nodes, and this immunosuppressive action limits some of its other potential applications.²³ We showed here that this agent can be administered only a few hours before transfusion and that its effects are reversible after 5 days, in line with the previous reports.¹¹ The use of this molecule at a given time, a few hours before transfusion, could be of interest as it would avoid a long-term lymphopenic effect while still preventing alloantibody production. It should be noted that in FTY720-treated mice, the delivery of antigens to follicular dendritic cells by MZB cells was not completely abolished, and residual transport could occur, an observation already made in another model.¹¹ Therefore, these results provide a

rationale for targeting MZB cells by FTY720 treatment to significantly reduce alloimmunization after transfusion of human platelets.

The work presented here identifies MZB cells as cells that drive alloimmunization following platelet transfusion. These results open up new pharmacological perspectives to minimize platelet alloimmunization and prevent the associated refractory state from developing in frequently transfused patients.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM and Etablissement Français du Sang. The authors thank M. Freund and her collaborators for animal care and J. Mulvihill for revising the language of the manuscript.

References

1. Stanworth SJ, Navarrete C, Estcourt L, Marsh J. Platelet refractoriness—practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. *Br J Haematol*. 2015;171(3):297-305.
2. Kerkhoffs JL, Eikenboom JC, Van de watering LM, Van Wordragen-vlaswinkel RJ, Wijermans PW, Brand A. The clinical impact of platelet refractoriness: correlation with bleeding and survival. *Transfusion*. 2008;48(9):1959-1965.
3. Saris A, Pavenski K. Human leukocyte antigen alloimmunization and alloimmune platelet refractoriness. *Transfus Med Rev*. 2020;34(4):250-257.
4. Moncharmont P. Platelet component transfusion and alloimmunization: where do we stand? *Transfus Clin Biol*. 2018;25(3):172-178.
5. Zerra PE, Patel SR, Jajosky RP, et al. Marginal zone B cells mediate a CD4 T cell dependent extrafollicular antibody response following rbc transfusion in mice. *Blood*. 2021;138(8):706-721.
6. Patel SR, Gibb DR, Girard-pierce K, et al. Marginal zone B cells induce alloantibody formation following RBC transfusion. *Front Immunol*. 2018;9:2516.
7. Gilson CR, Zimring JC. Alloimmunization to transfused platelets requires priming of CD4+ T cells in the splenic microenvironment in a murine model. *Transfusion*. 2012;52(4):849-859.
8. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):606-616.
9. Kraal G, Mebius R. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol*. 2006;250:175-215.
10. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):323-335.
11. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW JR, Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol*. 2008;9(1):54-62.
12. Waterman HR, Kapp LM, Munday A, Odem-davis K, Zimring JC. Transfusion-induced alloimmunization and platelet refractoriness in a mouse model: mechanisms and interventions. *Transfusion*. 2016;56(1):91-100.
13. Lu TT, Cyster JG. Integrin-mediated long-term b cell retention in the splenic marginal zone. *Science*. 2002;297(5580):409-412.
14. Cazenave JP, Aleil B, Wiesel ML, Laforet M, Isola H. In vitro evaluation of pooled buffy coat platelets treated with photochemical pathogen inactivation using amotosalen. *Vox Sang*. 2004;86(3):201-202.
15. Martinez-Riano A, Bovolenta ER, Mendoza P, et al. Antigen phagocytosis by B cells is required for a potent humoral response. *EMBO Rep*. 2018;19(9):e46016.
16. Zhang L, Ding Z, Xu H, Heyman B. Marginal zone B cells transport IgG3-immune complexes to splenic follicles. *J Immunol*. 2014;193(4):1681-1689.
17. Aichele P, Zinke J, Grode L, Schwendener RA, Kaufmann SH, Seiler P. Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J Immunol*. 2003;171(3):1148-1155.
18. Arthur CM, Patel SR, Sharma A, et al. Clodronate inhibits alloimmunization against distinct red blood cell alloantigens in mice. *Transfusion*. 2022;62(5):948-953.
19. Attanavanich K, Kearney JF. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol*. 2004;172(2):803-811.
20. Steiniger BS. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology*. 2015;145(3):334-346.
21. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):118-132.
22. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:267-285.
23. Lublin F, Miller DH, Freedman MS, et al. Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (informs): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10023):1075-1084.

Authorship

Contribution: A.C., C.A., L.R., and B.M. performed experiments and analyzed data; A.C. and B.M. designed the research; A.C., P.H.M., C.G., and B.M. wrote the manuscript; and all authors critiqued and approved the final version of the manuscript.

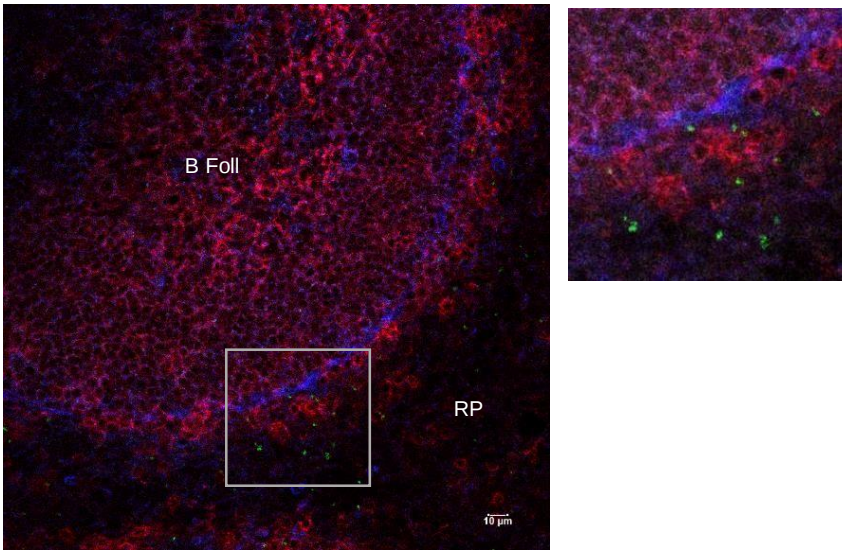
Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: A.C., 0000-0002-4141-6219; C.A., 0000-0002-0475-1165; P.H.M., 0000-0001-9522-6261; C.G., 0000-0003-1303-4210.

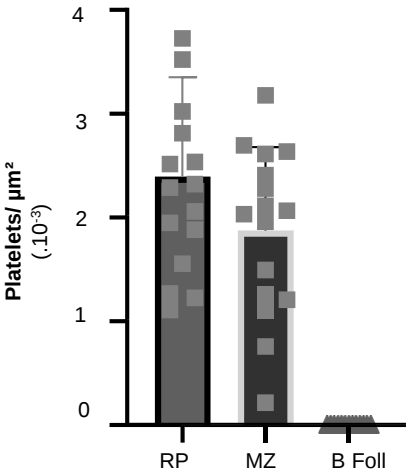
Correspondence: Blandine Maître, UMR_S1255 INSERM, Université de Strasbourg Etablissement Français du Sang-Grand Est 10 rue Spielmann, BP 36 F-67065 Strasbourg, Cedex, France; email: blaindine.maitre@efs.sante.fr.

A 2H after transfusion

MAdCAM+IgM+

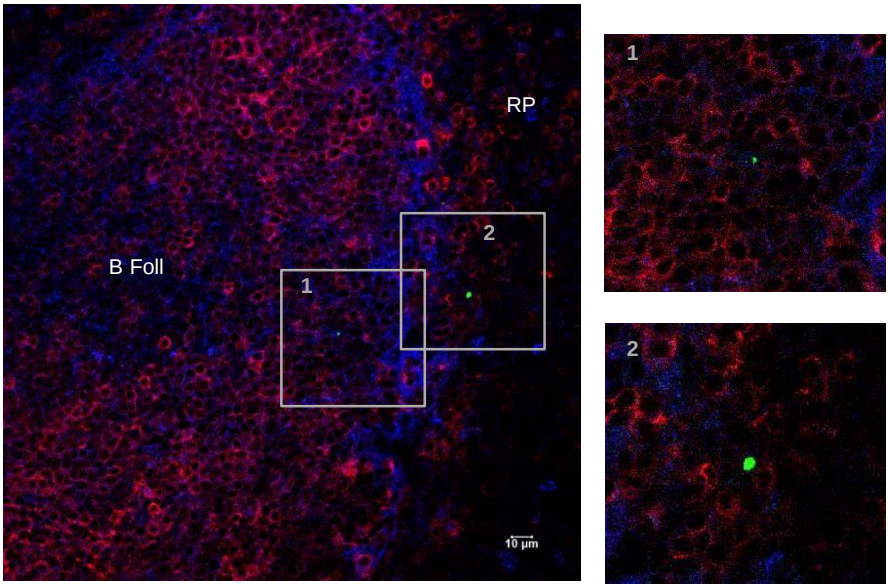


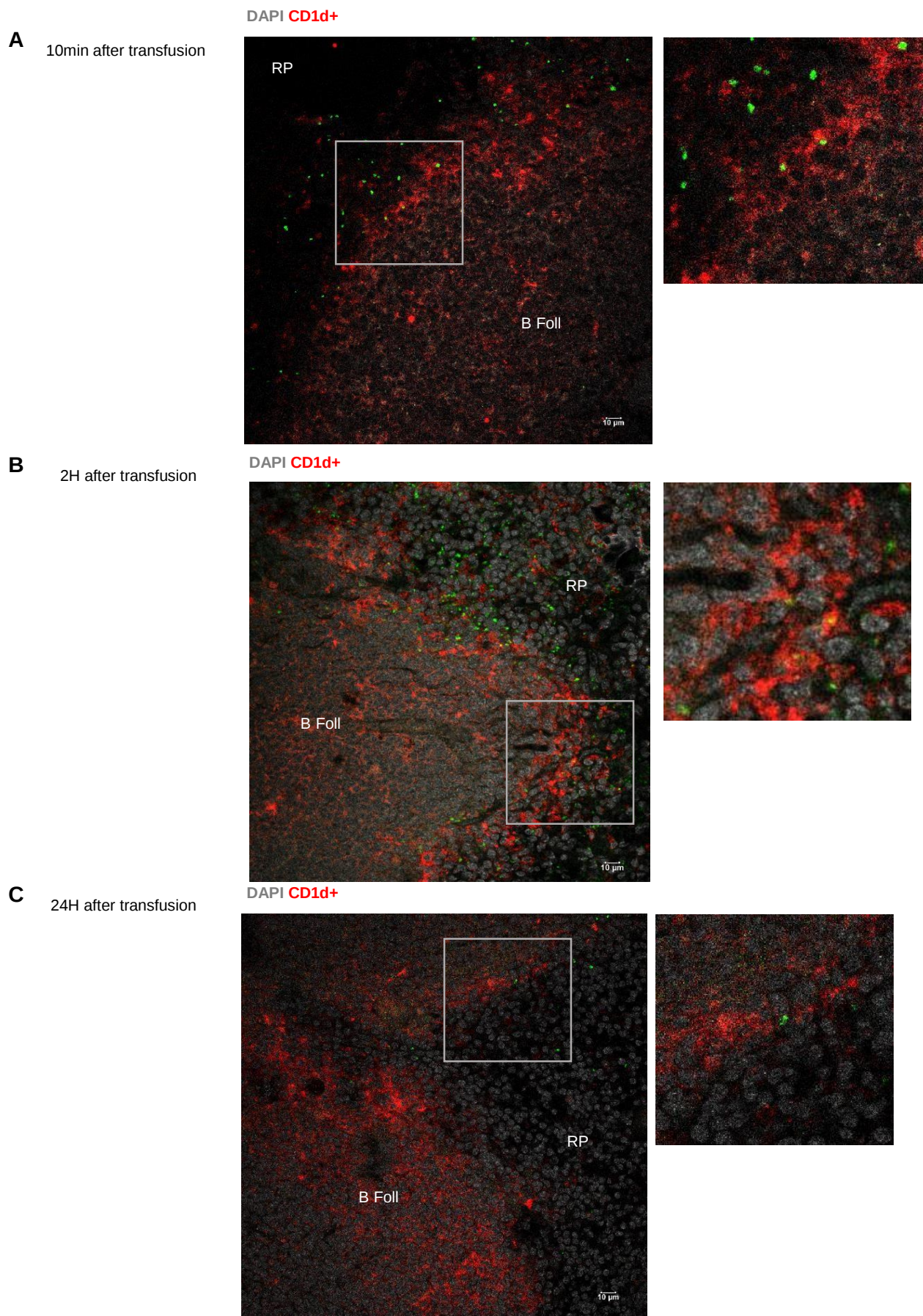
B

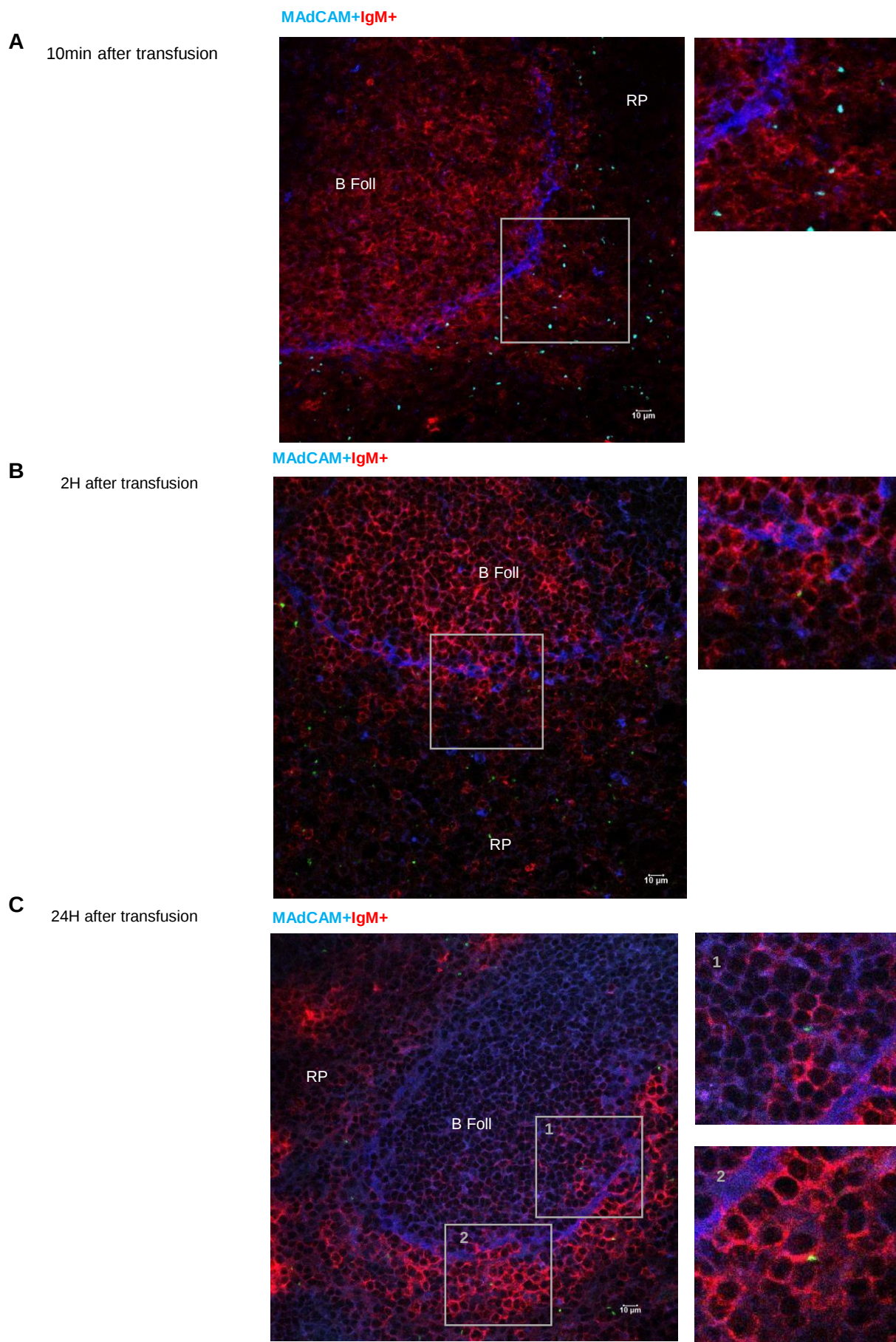


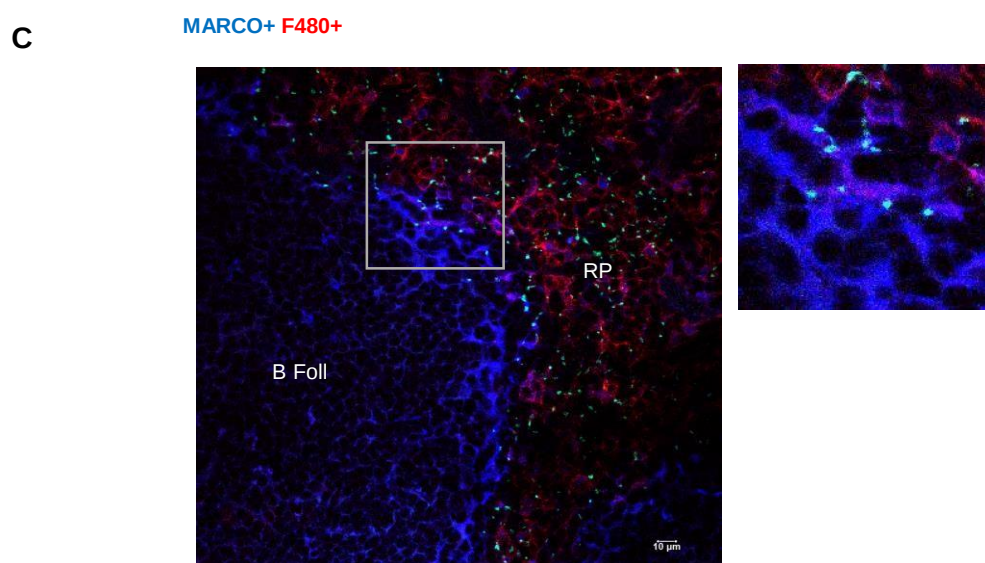
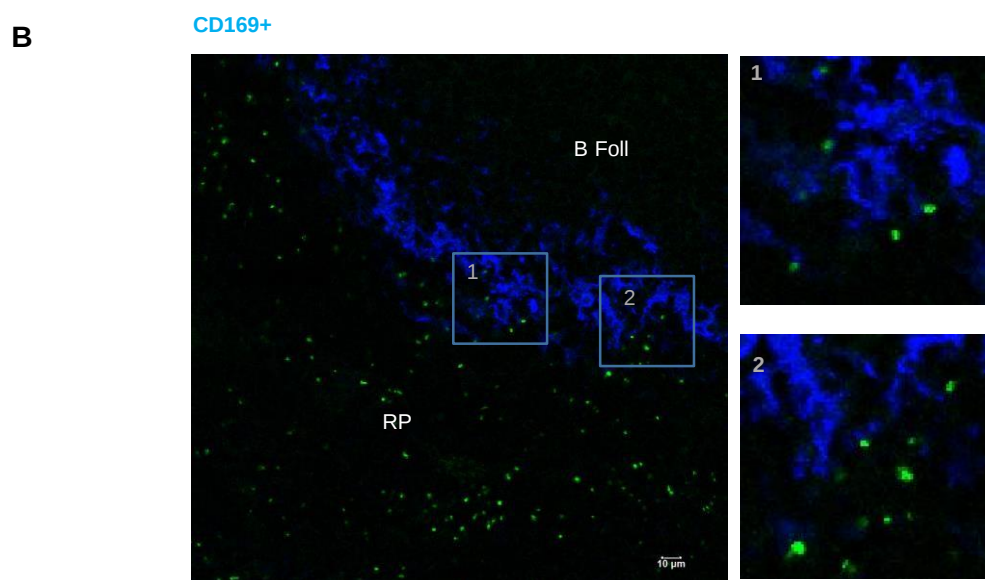
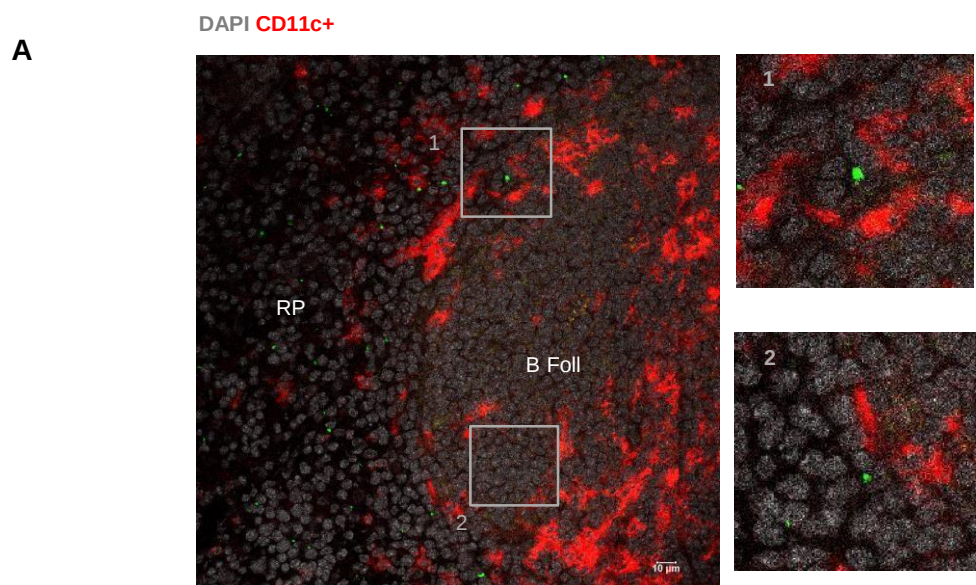
C 24H after transfusion

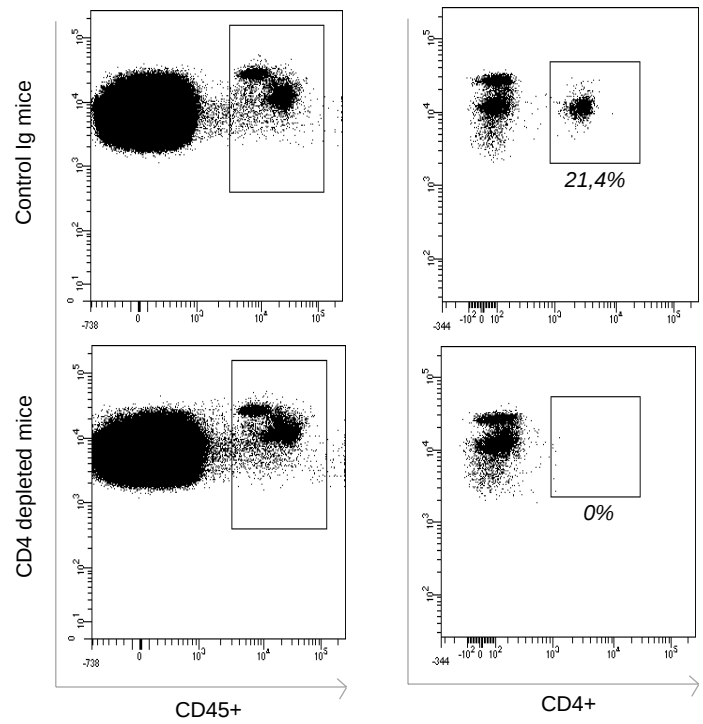
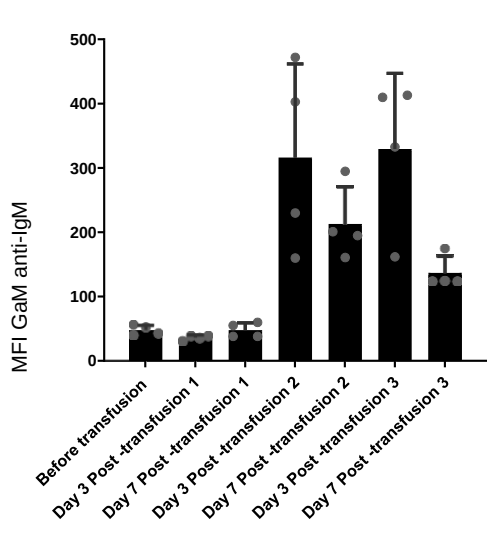
MAdCAM+IgM+





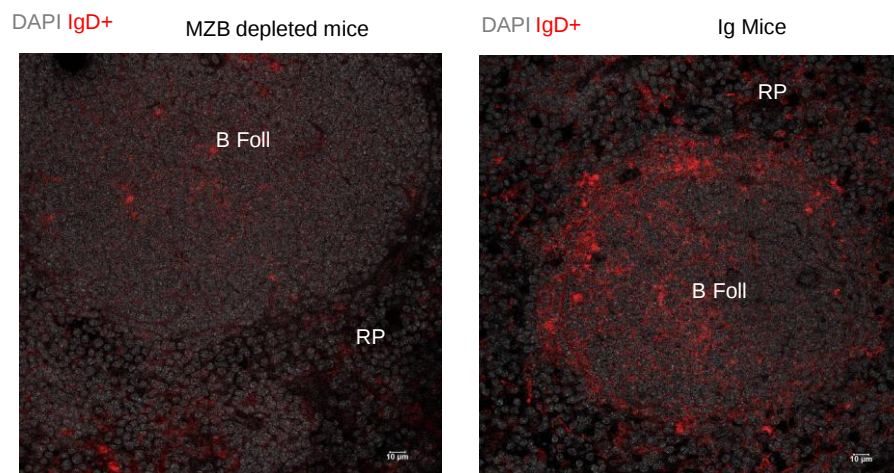




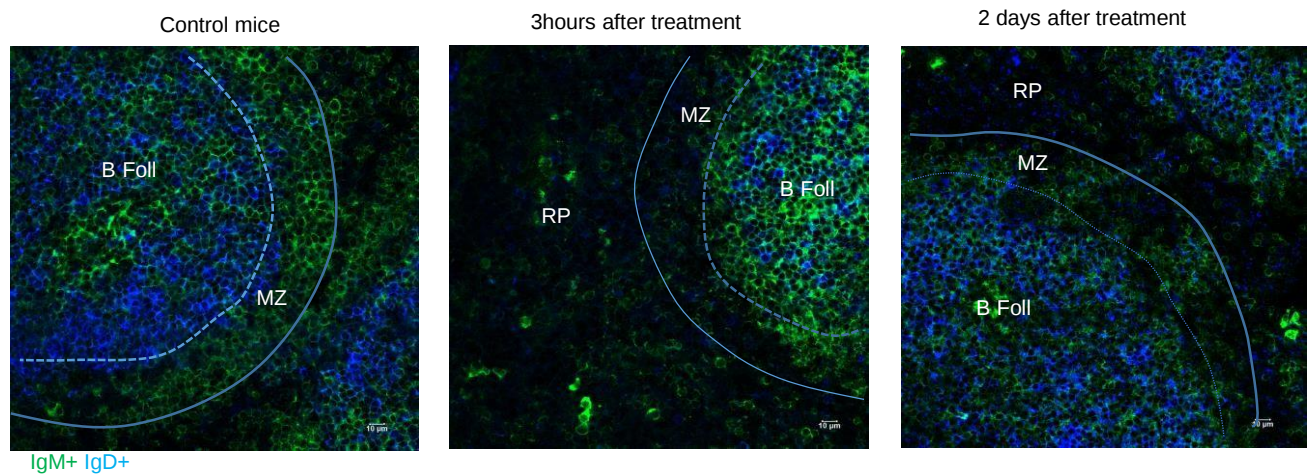


Supplemental data 5

Supplemental data 7



Supplemental data 6



Supplemental data 8

SUPPLEMENTAL METHODS

Reagents

Acid citrate dextrose (ACD) anticoagulant and Tyrode's buffer containing 0.35% human albumin (TA 0.35%) were prepared in our laboratory as previously described¹. The FcR blocking reagent (FcRb) was from Macs Miltenyi Biotec (Paris, France). The FACS (fluorescence-activated cell sorting) buffer was prepared in our laboratory (DPBS 1x, 1% BSA and 6 mM EDTA). The fluorescent probe CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) coupled to Oregon green was from Invitrogen Molecular Probes (Carlsbad, USA) and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) from Sigma-Aldrich (Rueil-Malmaison, France). Fingolimod (C₁₉H₃₃NO₂-HCl), also called FTY720, was purchased from Merck and BD Pharm Lyse lysing solution from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Mowiol was produced in our laboratory and contained Mowiol, glycerol, tris buffer and DABCO.

Antibodies for flow cytometry and immunohistology

A rat monoclonal antibody (mAb) against the extracellular domain of platelet GPIIb/IIIa (RAM.1) was produced and coupled to Alexa-647 or Alexa-568 in our laboratory². APC-Cy7 anti-mouse CD3 (clone 17A2), APC anti-mouse CD4 (Clone RM-45), Alexa-700 and PE-Cy7 anti-mouse CD45 (clone 30-F11), Alexa-647 anti-mouse F4-80 (clone BM8), biotin anti-mouse B220 (clone RA3-6B2), biotin anti-mouse Madcam (clone MECA-367), biotin IgD (clone 11-26c.2a), Alexa-647 anti-mouse CD21 (clone 7E9) and APC anti-mouse CD1d (clone 1B1) were purchased from Biolegend. FITC anti-mouse CD45 (clone 30F11), APC-Cy7 anti-mouse B220 (clone RA3-6B2), Alexa-647 anti-mouse IgM (clone RMM-1), PE-Vio770 anti-mouse CD23 (clone REA1068) and PE anti-mouse CD21 (clone 7A9) were obtained from Miltenyi Biotec. APC anti-mouse Ter 119+ (clone Ter 119+), PE anti-mouse CD21 (clone 8D9), Texas-red streptavidin, Alexa-488 goat anti-mouse (GaM) IgM (clone A21042) and Alexa-488 GaM IgG

(clone A11001) were from Thermofischer. Alexa-647 anti-mouse CD21/35 (clone 7G6) was purchased from BD Biosciences.

Flow cytometry

The spleen was removed and dissociated in FACS buffer. The resulting cell suspension was filtered through a 40 μm filter, centrifuged at $300 \times g$ for 10 min and resuspended in BD Pharm Lyse lysing solution to lyse red blood cells. Splenocytes were then centrifuged at $300 \times g$ for 10 min and resuspended in FACS buffer. Fc γ receptors were blocked with FcR blocking reagent, before staining the cells with a cocktail of fluorescent-conjugated antibodies. The samples were analyzed by flow cytometry (LSRFortessa™ cell analyzer, BD Biosciences) using BD FACSDiva software.

Serology

Samples (30 μL) of blood from alloimmunized and non alloimmunized mice were collected into dry tubes by severing the tail of anesthetized mice and the blood was allowed to clot for 2 h at 37°C. The serum was collected and stored at -80°C until analysis by flow cytometry. Anticoagulated whole blood from C57BL6/J mice was diluted in FACS buffer, centrifuged and incubated for 45 min with the serum and FcR blocking reagent. The suspension was then washed and incubated with a secondary antibody (Alexa-488 GaM IgG or IgM, 5 $\mu\text{g/mL}$; Invitrogen). After washing, an Alexa-647 anti-platelet GPIIb β mAb was added (RAM.1, 1 $\mu\text{g/mL}$) and the samples were diluted in FACS buffer for flow cytometric analysis. The production of alloantibodies was evaluated by gating RAM.1⁺ platelets and recording the mean fluorescence intensity (MFI) of Alexa-488 GaM IgG or IgM.

Immunohistology

The spleen and liver were harvested and immediately snap-frozen in optimal cutting temperature (OCT) embedding medium. The organs were cut into 7 μm thick sections using a cryostat and fixed in cold acetone. The fixed sections were incubated in glycine buffer (100

mM) and blocked with PBS containing 0.5% BSA. The samples were then incubated with the appropriate fluorescent-conjugated antibodies for 1 h at room temperature, using DAPI to stain the nuclei. Sections were mounted in Mowiol and images were acquired under a Leica S8 confocal microscope. All microscopic images were analyzed using the open source imageJ-based Fiji distribution.

Histological quantification of platelets and evaluation of colocalization

BALB/C mice received a retro-orbital injection of 1.10^8 CFDA-SE washed platelets isolated from C57BL/6J mice. Two hours later, the spleens were harvested and prepared for histology as described above. In some experiments, the mice received a retro-orbital injection of an anti-mouse CD21/35 mAb (1 μ g) to specifically stain MZB cells ³. Platelets were quantified by calculating the number of platelets per specific area in the red pulp, white pulp or marginal zone (cells/ μ m²). The different areas were determined by delineating the staining: B follicles were determined by a high density of DAPI staining and were delineated by MAdCAM staining; the marginal zone was delineated by IgM⁺ staining outside the MAdCAM staining; the red pulp was determined as the last area with no nuclei density, no IgM and MAdCAM staining. The Manders split coefficient was used to determine the degree of colocalization between CFDA-SE⁺ transfused platelets and CD21⁺ cells corresponding to marginal zone B cells specifically in the marginal zone. This degree of colocalization was evaluated using CellProfiler Software and was based on the analysis of 12 images from 2 different mice.

SUPPLEMENTAL LEGENDS

Supplemental data 1: Analysis of syngeneic transfusion

(A, C) Immunostaining of spleen sections from BALB/C mice (A) 2 hours or (C) 24hours after transfusion with 1.10^8 CFDA-SE-labeled $H2^d$ platelets (green) isolated from BALB/C mice. Marginal zone was delineated using IgM staining (red) for marginal zone B cells and sinus-lining cells using MadCam staining (blue). B Foll, B cell follicle; RP, red pulp. Scale bar, 10 μm . The right panels are magnifications of the areas corresponding to the white squares on the left panels. (B) Quantification of transfused platelets in different compartments of the spleen. Results are expressed as the number of platelets per μm^2 (n=16).

Supplemental data 2: CD1d and DAPI staining on spleen sections after allogeneic transfusion

Immunostaining of spleen sections from BALB/C mice (A) 10min, (B) 2hours or (C) 24hours after transfusion with 1.10^8 CFDA-SE-labeled $H2^b$ platelets (green) isolated from C57Bl6/J mice. Marginal zone was delineated using CD1d staining (red) for marginal zone B cells and delineation of B follicle using high DAPI density (grey). The right panels are magnifications of the areas corresponding to the white squares on the left panels. B Foll, B cell follicle; RP, red pulp. Scale bar, 10 μm .

Supplemental data 3: IgM and MAdCAM staining on spleen sections after allogeneic transfusion

Immunostaining of spleen sections from BALB/C mice (A) 10min, (B) 2hours or (C) 24hours after transfusion with 1.10^8 CFDA-SE-labeled $H2^b$ platelets (green) isolated from C57Bl6/J mice. Marginal zone was delineated using IgM staining (red) for marginal zone B cells and

sinus-lining cells using MadCam staining (blue). The right panels are magnifications of the areas corresponding to the white squares on the left panels. B Foll, B cell follicle; RP, red pulp. Scale bar, 10 μ m.

Supplemental data 4: Staining of Immune cells on spleen sections 2 hours after allogeneic transfusion

Immunostaining of spleen sections from BALB/C mice 2 hours after transfusion with 1.10^8 CFDA-SE-labeled H2^b platelets (green) isolated from C57Bl6/J mice. (A) Dendritic cells were labeled using CD11c staining (red) and delineation of B follicle using high DAPI density (grey). (B) Marginal metallophilic macrophages were labeled using CD169 staining (blue). (C) Marginal zone macrophages and red pulp macrophages were respectively labeled using MARCO (blue) and F4/80 (red) staining. The right panels are magnifications of the areas corresponding to the white squares on the left panels. B Foll, B cell follicle; RP, red pulp. Scale bar, 10 μ m.

Supplemental data 5: IgM detection by flow cytometry in a murine model of platelet alloimmunization

Anti-H2^b IgM antibodies production in alloimmunized BALB/C mice was evaluated 2 times/week by flow cytometry.

Supplemental data 6: CD1d staining on spleen sections from MZB depleted mice or control mice

Immunostaining of spleen sections from BALB/C mice treated with CD11a and CD49d antibodies to deplete marginal zone B cells (left) or with isotype control (right). Marginal zone

B cells were detected using CD1d staining. B Foll, B cell follicle; RP, red pulp. Scale bar, 10 μm .

Supplemental data 7: Efficacy of splenic CD4⁺ T cells depletion evaluated by flow cytometry

Representative dot plots of the gating strategy used for the quantification of T CD4⁺ cells in the blood of recipient mice. BALB/C mice were treated 4 and 2 days before each transfusion with an immunodepleting antibody against CD4⁺ T cells or with isotype control. T CD4⁺ cells detection was evaluated with anti-CD4 RM4-5 clone.

Supplemental data 8: Efficacy of FTY720 treatment evaluated by immunohistology

BALB/C (H2^d) mice were injected intraperitoneally with FTY720 (0.1 mg/kg) or with vehicle control (PBS) 5 days, 2 days and 3 hours before each transfusion of 1.10^8 H2^b platelets isolated from C57BL/6J mice. Representative images of spleen sections from mice treated with FTY720 stained for IgM (green) to detect marginal zone B cells and IgD (blue) to delineate the B follicle. Lines indicate the marginal zone. B Foll, B cell follicle; MZ, marginal zone. Scale bar, 10 μm .

1. Cazenave JP, Aleil B, Wiesel ML, Laforet M, Isola H. In vitro evaluation of pooled buffy coat platelets treated with photochemical pathogen inactivation using amotosalen. *Vox Sang*. 2004;86(3):201-202.
2. Perrault C, Moog S, Rubinstein E, et al. A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb/IIIa modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost*. 2001;86(5):1238-1248.
3. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW, Jr., Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol*. 2008;9(1):54-62.

C) CONCLUSION

Cette étude a permis de démontrer un rôle des MZB dans l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. Les analyses par imagerie révèlent une colocalisation entre les MZB et les plaquettes transfusées 10 min et 2 heures après la transfusion. Dans le modèle murin d'alloimmunisation, cibler les MZB par immunodéplétion ou par un traitement pharmacologique permet d'éviter la production d'alloanticorps induite par les transfusions. De plus, dans ces conditions expérimentales les souris ne développent pas d'état réfractaire. Cibler les MZB permet donc d'éviter l'état réfractaire associé aux transfusions.

Dans notre modèle murin, l'alloimmunisation plaquettaire est dépendante à la fois des LT CD4+ et de la présence des MZB dans la zone marginale. Ces résultats indiquent que les MZB participent à la réponse allo-immune par une activation extrafolliculaire dépendante des LT CD4+ uniquement ou par activation des centres germinatifs. Si nous avons démontré le rôle des MZB dans la réponse allo-immune plaquettaire, des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer si les MZB sont responsables de la prise en charge directe des allo-antigènes.

Les MZB participent-elles à la prise en charge directe des allo-antigènes plaquettaires?

Les MZB présentent toutes les caractéristiques nécessaires pour pouvoir prendre en charge directement les allo-antigènes circulants. En effet, il a été montré que ces cellules étaient capables de phagocyter des billes d'une taille supérieure à 3 μ M par un mécanisme médié par le BCR et dépendant des protéines G RhoGTPase régulatrices du remodelage de l'actine (Martínez-Riaño et al., 2018). On peut ainsi supposer que les MZB pourraient phagocyter des plaquettes allogéniques dont la taille est de 3 à 5 μ M chez la souris. D'autre part, les MZB possèdent à leur surface des récepteurs aux compléments (Gray et al., 1984). Cela n'a pas été décrit auparavant mais il est possible que lors du vieillissement des plaquettes, ces dernières fixent davantage de molécules du complément, ce qui induirait leur reconnaissance et leur internalisation par les MZB. Les MZB seraient ensuite capable de présenter ces antigènes.

Des expériences complémentaires de co-cultures de plaquettes fluorescentes allogéniques et de MZB syngéniques permettront de déterminer si les MZB sont capables d'internaliser et de présenter les allo-antigènes aux LT CD4+ syngéniques. Des expériences *in vivo* pourraient être également réalisées après avoir marqué les plaquettes transfusées avec une sonde sensible au pH, qui n'émettra de la fluorescence qu'une fois les plaquettes phagocytées. Ainsi, nous pourrions identifier par microscopie intravitale bi-photonique en injectant des anticorps dirigés contre différentes sous populations de

cellules immunes ou par microscopie confocale après fixation et co-marquage, les cellules immunitaires responsables de la phagocytose des plaquettes transfusées.

Récemment, il a été décrit que les MZB étaient également capables de prendre en charge des antigènes par trogocytose c'est-à-dire, l'acquisition d'une portion de membrane initialement présente à la surface d'une autre cellule telle que les cellules dendritiques (Schriek et al., 2022). Cette portion de membrane capturée peut avoir à sa surface des récepteurs tels que les molécules du CMH de classe I ou II dans le cas de cellules présentatrices d'antigènes. La trogocytose permet donc aux MZB d'acquérir de nouveaux récepteurs et possiblement, en fonction de l'expression constitutive des récepteurs de co-stimulation, d'augmenter leur capacité à stimuler d'autres cellules immunes. Les MZB ayant trogocytées des membranes en provenance des cellules dendritiques, comme cela a été décrit par Schriek et al., peuvent activer les lymphocytes T CD4+ par les molécules du CMH-II chargées d'antigènes générées par la DC. Il est envisageable que les MZB trogocytent des cellules présentatrices d'allo-antigènes ayant capturées des allo-antigènes et initient des réponses immunes dans le modèle murin d'alloimmunisation plaquettaire. Il serait intéressant d'évaluer l'importance de la trogocytose entre les MZB et les cellules dendritiques ou encore les macrophages dans le processus d'alloimmunisation. Des expériences de transfert adoptif permettront de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Dans ces expériences, des cellules dendritiques dont les membranes ont été marquées avec une sonde fluorescence de type PKH26, seront incubées avec des plaquettes allogéniques. Dans un deuxième temps, ces cellules dendritiques chargées d'allo-antigènes seront incubées avec des MZB. A cette étape, nous pourrions vérifier un échange de membrane entre les cellules dendritiques et les MZB par cytométrie en flux. L'injection des MZB préalablement incubées avec les DC *in vitro* dans une souris receveuse naïve, nous permettra d'analyser la capacité de ces MZB à initier une réponse immune.

D'autres cellules immunitaires sont-elles impliquées dans la prise en charge des allo-antigènes ?

L'implication d'autres cellules immunitaires dans l'alloimmunisation plaquettaire n'a pas été décrite dans la littérature mais un rôle des cellules dendritiques 33D1+ dans l'alloimmunisation anti-GR a été établi par l'équipe de Stéphanie Eisenbarth. Dans un modèle murin d'alloimmunisation anti-érythrocytaire, une déplétion ou une pré-activation des cellules dendritiques 33D1+, une sous-population de cellules dendritiques situées dans le canal de liaison, permet de prévenir la production d'alloanticorps (Calabro et al., 2016b). Cet article révèle également que les macrophages participent à la capture des antigènes d'origine érythrocytaire à la surface des GR. Un rôle des macrophages dans l'alloimmunisation anti-GR a également été évoqué par Arthur et al. puisqu'une déplétion des macrophages de la zone marginale par faible dose de clodronate prévient l'alloimmunisation anti-

érythrocytaire dans un modèle murin dédié (Arthur et al., 2022). Ainsi, une implication des cellules dendritiques et des macrophages dans la prise en charge des allo-antigènes a été établie dans un contexte d'alloimmunisation anti-GR. A contrario, aucun rôle de ces cellules dans l'alloimmunisation plaquettaire n'a été décrit à ce jour mais les plaquettes et les globules rouges transfusés ont le même schéma de circulation, il est donc envisageable que ces CPAs aient également un rôle dans la capture des allo-antigènes plaquettaires. Pour confirmer cette hypothèse, des expériences de transfert adoptif de cellules immunitaires pré-incubées avec des plaquettes allogéniques puis transférées dans une souris receveuse seraient un moyen d'identifier les cellules capables d'initier une réponse allo-immune.

Interdépendance des cellules spléniques de la zone marginale

L'implication des cellules dendritiques, des macrophages et des MZB dans la détection et la prise en charge des allo-antigènes ne sont pas mutuellement exclusives et pourraient constituer différentes voies d'internalisation des antigènes. Cette hypothèse est d'autant plus tangible que les cellules présentes dans la zone marginale sont interdépendantes et collaborent pour l'orchestration des réponses immunitaires.

Dans le modèle murin d'alloimmunisation anti-GR décrit par Arthur et al., le protocole utilisé pour cibler les macrophages de la zone marginale repose sur un traitement de liposome clodronate à faible dose. Un effet secondaire de ce traitement est la délocalisation des MZB de la zone marginale vers le follicule B, qui ne sont alors plus idéalement situées pour capter les antigènes sanguins (Karlsson et al., 2003). Ainsi, s'il est possible que les macrophages de la zone marginale participent à la capture des antigènes, il est également envisageable que les MZB soient en réalité l'élément central de la réponse allo-immune anti-GR, cible indirecte du traitement par clodronate.

La complexité de cette interdépendance des cellules de la zone marginale rend l'identification des cellules immunitaires importantes dans les processus d'alloimmunisation très compliquée. Dans notre étude, il est envisageable que l'absence de MZB dans la zone marginale, suite à la déplétion ou au traitement pharmacologique, ait entraîné une désorganisation de cette zone puisque les cellules dendritiques 33D1+ et les MZB sont en compétition d'espace pour la zone marginale (Liu et al., 2020). Ainsi, il faut envisager que le déplacement des MZB ait pu altérer la localisation des cellules dendritiques 33D1+ et ait pu avoir des répercussions sur la présentation antigénique ou l'activation des LT CD4+ par ces dernières.

Dans l'état actuel de nos connaissances, nos résultats indiquent que cibler les MZB, par traitement FTY720 ou par immunodéplétion prévient l'alloimmunisation et l'état réfractaire associé. Ainsi, bien

que leur rôle dans la capture des antigènes n'ait pas été établi, les MZB sont un élément central de la réponse immune chez la souris. Comme évoqué dans l'article, les MZB humaines ne possèdent pas les mêmes caractéristiques que les MZB murines, elles sont circulantes et expriment différents marqueurs. Ainsi pour transposer ces recherches chez l'Homme, il sera nécessaire d'identifier si les MZB humaines ont les mêmes fonctions par des expériences réalisées *in vitro* afin d'évaluer la capacité des MZB humaines mises en présence de plaquettes allogéniques, à induire l'activation de lymphocytes T.

PROJET 2

L'ETAT REFRACTAIRE AUX TRANSFUSIONS DE PLAQUETTES

A) Revue

L'état réfractaire aux transfusions de plaquettes d'origine immune décrit l'élimination rapide des plaquettes transfusées par des anticorps anti-HLA-I présents dans la circulation du receveur. En France, le diagnostic d'un état réfractaire immun repose sur de nombreux critères stringents tels que la détection d'anticorps anti-HLA-I chez le patient et une absence de cause non immune. Le respect de ces critères stricts conduit à une sous-estimation de l'incidence des états réfractaires et ne reflète pas la réalité clinique et les nombreuses impasses transfusionnelles auxquelles les cliniciens des services d'onco-hématologie doivent faire face.

L'état réfractaire d'origine immunologique reste donc un défi à relever dans les services d'onco-hématologies où les patients nécessitent un support transfusionnel important. Plusieurs verrous dus à une méconnaissance des mécanismes conduisant à un état réfractaire empêchent une prise en charge optimale de ces patients.

Lorsque nous avons commencé à travailler sur ces questions, nous avons réalisé qu'une synthèse des connaissances actuelles sur les mécanismes d'élimination des plaquettes par les anticorps anti-HLA-I et les caractéristiques de ces derniers potentiellement importants pour leur pathogénicité était nécessaire. Nous avons donc rédigé une revue publiée en février 2023 dans le journal *Frontiers in Immunology*, pour laquelle je suis première auteure (Couvidou et al., 2023).

Nous décrivons les défis actuels en matière d'état réfractaire aux transfusions plaquettaires et détaillons les principales caractéristiques des anticorps impliqués qui pourraient être prises en compte. Enfin, cette revue détaille également les différentes pistes thérapeutiques déjà employées et les futures stratégies qui permettront de dépasser cette inefficacité thérapeutique.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Christophe Picard,
Établissement Français du Sang (EFS),
France

REVIEWED BY
Harold Cliff Sullivan,
Emory University, United States
Fabrice Cognasse,
INSERM U1059 Santé Ingénierie Biologie,
France

*CORRESPONDENCE
Blandine Maître
✉ blandine.maître@efs.sante.fr

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Alloimmunity and Transplantation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 16 December 2022
ACCEPTED 31 January 2023
PUBLISHED 09 February 2023

CITATION
Couvidou A, Rojas-Jiménez G, Dupuis A
and Maître B (2023) Anti-HLA Class I
alloantibodies in platelet transfusion
refractoriness: From mechanisms and
determinants to therapeutic prospects.
Front. Immunol. 14:1125367.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1125367

COPYRIGHT
© 2023 Couvidou, Rojas-Jiménez, Dupuis
and Maître. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Anti-HLA Class I alloantibodies in platelet transfusion refractoriness: From mechanisms and determinants to therapeutic prospects

Adèle Couvidou^{1,2,3,4}, Gabriel Rojas-Jiménez^{1,2,3,4},
Arnaud Dupuis^{1,2,3,4} and Blandine Maître^{1,2,3,4*}

¹UMR_S1255, INSERM, Strasbourg, France, ²Etablissement Français du Sang-Grand Est, Strasbourg, France, ³Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France, ⁴Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Patients with hematological disorders and severe thrombocytopenia require extensive and iterative platelet transfusion support. In these patients, platelet transfusion refractoriness represents a serious adverse transfusion event with major outcomes for patient care. Recipient alloantibodies against the donor HLA Class I antigens expressed at the cell surface of platelets result in a rapid removal of transfused platelets from the circulation and thus, therapeutic and prophylactic transfusion failure leading to a major bleeding risk. In this case, the only way to support the patient relies on the selection of HLA Class I compatible platelets, an approach restricted by the limited number of HLA-typed donors available and the difficulty of meeting the demand in an emergency. However, not all patients with anti-HLA Class I antibodies develop refractoriness to platelet transfusions, raising the question of the intrinsic characteristics of the antibodies and the immune-mediated mechanisms of platelet clearance associated with a refractory state. In this review, we examine the current challenges in platelet transfusion refractoriness and detail the key features of the antibodies involved that should be considered. Finally, we also provide an overview of future therapeutic strategies.

KEYWORDS

HLA class I, alloantibodies, transfusion, platelets, refractoriness (platelets)

Introduction

The management of patients with severe thrombocytopenia may require extensive and iterative platelet transfusion support. A serious complication of these multiple transfusions is the platelet transfusion refractory state (PTR), characterized by ineffective transfusion efficiency. Immune and non-immune causes can lead to PTR. Non-immune factors, which account for 80% of PTR cases, include all causes of platelet hyperconsumption such as acute inflammatory conditions, e.g. infection, splenomegaly or disseminated intravascular

coagulation (1). On the other hand, immune factors, i.e. adaptive immune response through humoral and cellular components, which play a role in approximately 20% of patients with PTR, include antibodies directed against HLA Class I (HLA-I) molecules and/or against human platelets antigens (HPA). Nonetheless, anti-HLA-I antibodies are considered to be the main cause of immune-mediated PTR. In both cases, PTR is associated with serious outcomes, including longer hospital stays (2), higher treatment costs, excessive use of labile blood products, and increased risk of death (3, 4).

The anti-HLA-I antibodies associated with PTR may lead to the clearance of transfused platelets, resulting in ineffective platelet transfusions to prevent and/or stop bleeding. Immune PTR can potentially be circumvented by using HLA I-matched platelets, i.e. perfectly HLA I-matched platelets between donor and recipient, platelets carrying only antigens against which the recipient has not developed antibodies (permissive antigens) (5, 6) or crossmatched platelets (7). However, finding a suitable donor can be difficult, especially in the case of a highly immunized patient. Indeed, this method necessitates knowledge of the recipient's HLA phenotype and access to a large database of donors with a known HLA phenotype. This requires a significant amount of time and workload, sometimes incompatible with the urgency of transfusion support. According to the "Trial to reduce alloimmunization to platelets" (TRAP) study, the presence of anti-HLA-I antibodies in the recipient is correlated to refractoriness. Platelet concentrate preparation processes, such as leukoreduction or platelet concentrate storage time, which impact alloantibody production, are parameters that indirectly influence the incidence of PTR (8). Nevertheless, not all patients with anti-HLA-I antibodies develop PTR upon platelet transfusions, raising the question of the antibodies' intrinsic features associated with PTR. Identifying the mechanisms by which platelets are removed from the circulation and determining the characteristics of anti-HLA-I antibodies associated with PTR would improve the management of patients who require transfusion support.

In this review, we describe the clinical criteria for PTR and outline the main features of HLA-I antibodies which could be considered in the context of transfusion deadlock. Finally, we discuss the current challenges of PTR and provide a brief perspective on future therapeutic strategies.

Definition and diagnosis criteria of platelet transfusion refractoriness

In non-bleeding patients with thrombocytopenia, PTR is defined as two repeated transfusion failures with, ABO-identical platelets and a quantity adapted to the patient's weight. In addition, in some countries, the notion of "fresh" platelets (i.e. less than 3 days of storage) is included in this definition, which reinforces the stringency of the criteria for concluding a PTR. To assess proper response to platelet transfusion, one must follow platelet count increments at 60 minutes and 24h post transfusion. The corrected count increment (CCI) is widely used to assess the post-transfusion platelet increment. The CCI is derived from the following equation: $((\text{Platelet count after transfusion} - \text{platelet count before transfusion}) \times \text{body surface area (m}^2) \times 100) / (\text{Number of platelets transfused} \times 10^{11})$.

There is no consensus yet on the threshold of the CCI value indicating a PTR. The TRAP study defined refractoriness as a CCI value < 5000 (9) but a CCI < 7500 is also an accepted value to indicate a PTR (10). Studies have shown that platelets need at least 60 minutes to equilibrate in the intravascular space, which is why platelet counts should not be measured before 1 hour after the end of the transfusion (11). However, several groups have reported the relevance of taking the platelet count at 10 min for practical reasons and because the 10 min count might be as informative as the platelet count at 1h (12).

Theoretically, the calculation of the CCI at 1h and at 24h can be used to discriminate immune from non-immune PTR. In non-immune PTR, the platelet count rises 1 hour after platelet transfusion but falls again after 24 hours, whereas in immune PTR, the transfused platelets are rapidly cleared from the circulation and there is no increase in platelet count 1 hour after transfusion (13, 14).

Once refractoriness has been confirmed, non-immune causes must be explored and ruled out in order to ascertain an immune PTR. Bleedings, infections, inflammatory conditions, or drug interference should be considered before testing the presence of anti-HLA-I antibodies and requesting HLA-matched platelets (15). However, in patients with hematological disorders, immune and non-immune factors are often not mutually exclusive and may be present simultaneously (6, 16, 17). All the criteria required for defining a refractory state are very strict, and not necessarily compatible with daily clinical practice. In particular, CCI is of no value in thrombocytopenic patients who bleed. In this situation, the only way to ascertain the efficiency of platelet transfusion is to observe the arrest of bleeding. Depending on the patient's pathology and the country in which the clinical study is conducted, the occurrence of PTR can range from 10% to 49% (18). This wide range of incidence possibly reflects the variability due to the challenge of diagnosing PTR.

Mechanisms leading to clearance of transfused platelets during an immune PTR

Anti-HLA-I alloantibodies can lead to clearance of transfused platelets. Several mechanisms for antibody-mediated platelet clearance have been described (Figure 1A):

Opsonisation

The first function of antibodies is to act as opsonins to promote phagocytosis of sensitized platelets (19). Antibodies are fixed to the target, leading to activation of Fc receptors and phagocytosis. Anti-HLA-I antibodies or auto-antibodies directed against platelets, in case of immune thrombocytopenia (characterized by an isolated thrombocytopenia), appear to be partially caused by IgG-mediated platelet destruction in the spleen (20). Moreover, internalization of platelets with high HLA-I density by macrophages has been shown to be significantly increased in contrast to platelets coming from patients with low HLA-I density at the surface. Thus, the degree of antibody opsonisation and antigen expression directly correlates with

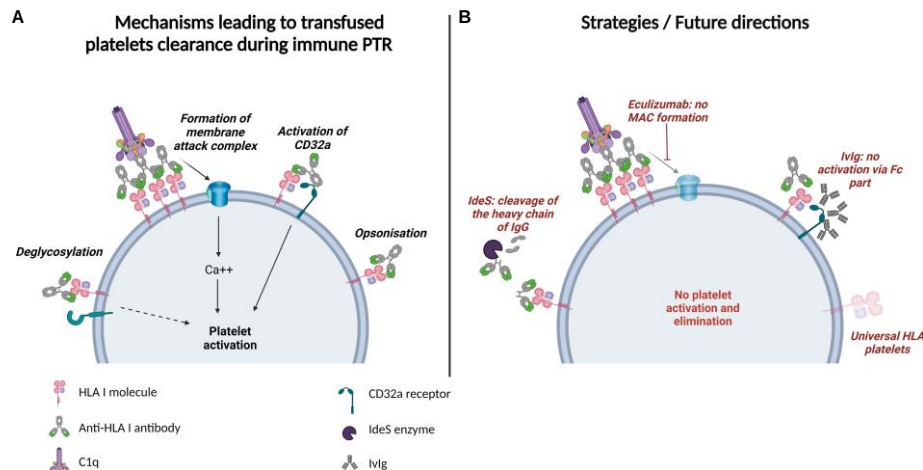


FIGURE 1

Mechanisms of platelet elimination and prospective therapies in HLA Class I-alloantibody-mediated PTR. (A) Potential mechanisms leading to transfused platelets clearance during immune platelet transfusion refractoriness. Anti HLA Class I-alloantibodies can opsonize platelets or lead to their activation via deglycosylation, formation of membrane attack complex or CD32a receptor mobilization. (B) Strategies/Future directions in platelet transfusion refractoriness: cleavage of the heavy chain of IgGs by IdeS enzyme, inhibition of the membrane attack complex formation with Eculizumab, inhibition of Fc receptor mobilization with Ivlg, and transfusion of universal HLA platelets that do not express HLA molecules on the surface.

antibody-mediated internalization of platelets by macrophages, suggesting that platelets expressing fewer antigens could be used in priority to treat refractory patients (21).

Activation

Platelet activation mediated by anti-HLA-I antibodies could partially explain immune platelet clearance during refractoriness. Some antibodies directed against HLA-I molecules have been reported to induce platelet activation (22, 23). Depending on both the antibodies and the recognized epitopes, two mechanisms have been described. First, anti-HLA-I antibodies can mobilize the FcγRIIa/CD32a expressed on the cell surface of platelets, which leads to platelet activation. FcγRIIa is a low affinity receptor for IgG subclasses. It bears an intracellular immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) that mediates cell activation upon its crosslinking by IgG-immune complexes (24). HLA-I antibodies can initiate the signaling cascade, leading to ITAM phosphorylation and consequent platelet activation (22). Using human monoclonal antibodies that recognize different epitopes of HLA-I on platelets, the same group showed that blocking the classical pathway of the complement, by using anti-C1q or anti-C5 (Eculizumab) antibodies, inhibited to some extent the level of platelet activation. Finally, the activation induced by anti-HLA-I antibodies can be fully abrogated by the inhibition of the CD32a receptor with monoclonal antibody IV.3 in combination with complement classical pathway inhibitor Eculizumab, meaning that both FcγRIIa and complement activation pathways can act in synergy (23).

Desialylation

Antibody-mediated platelet clearance can also be explained by deglycosylation. In immune thrombocytopenia, anti-GPIIb

antibodies cross-link GPIIb subunits, initiating activation and signaling. The activation of platelets conducts to granule secretion, after which released CD62P and NEU1 desialylate surface sialic acid residues, particularly on GPIIb. The removal of the bulky terminal sialic residues facilitates assembly of the GPIIb complex and also triggers activation, thus forming an activation loop (25). Once desialylated, platelets are trapped in the liver where they can be cleared by Kupffer cells, a subset of liver professional phagocytes. A collaboration between Ashwell Morell receptors and macrophage galactose lectins, both expressed by Kupffer cells, has been described to eliminate efficiently desialylated platelets (26). More recently, the C-type lectin receptor, CLEC4F, expressed specifically on Kupffer cells, has been reported to recognize desialylated glycans and to participate in the clearance of aged platelets (27). The question of potential desialylation of platelets during PTR is still open.

Intrinsic features of anti-HLA-I antibodies

As not all HLA-I antibodies induce platelet refractoriness, analysis of antibodies' features can be relevant to identify those capable of pathogenicity. Here we describe the main features of HLA-I antibodies that should be taken into consideration in a PTR context.

Isotypes and IgG subclass

The isotypes involved in PTR are predominantly IgG (28). IgGs, the major immunoglobulins in serum, are divided into four subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. The differences between each subclass lie in the amino acid composition of their heavy chain and have a decisive impact on the hinge region as well as in their relative abundance. Each subclass has therefore a particular

profile, particularly in terms of ability to activate the complement cascade, with IgG1 and IgG3 being more efficient in complement activation than IgG2 and IgG4, and their affinity for the Fc receptors (FcR), meaning that anti-HLA-I antibody subclasses could correlate with distinct effects on platelets (29). Moreover, a study performed in baboons suggested that the subclasses could influence the location of platelet sequestration. They showed that platelets were sequestered in the spleen when the anti-platelet antibody was IgG1, whereas IgG2 led mostly to liver elimination (30). A link between anti-HLA-I antibody subclasses and allograft outcome has also been studied, suggesting a correlation between complement fixation and allograft failure (31). All of these observations indicate that it might be useful to consider the HLA-I antibody subclass when facing an immune PTR.

Glycosylation

IgG glycans are essential for the maintenance of functional structure and can evolve depending on time, age, disease, or environmental factors. The glycosylation of antibodies affects their affinity for FcR and their ability to mobilize complement (32) thus potentially modulating their ability to activate platelets.

Analysis of sera from alloimmunized patients showed that Fc glycosylation of anti-HLA-I antibodies is highly variable. Using recombinant glycoengineered anti-HLA monoclonal antibodies with variable Fc glycosylation, Van Osch et al. showed that galactosylation of human anti-platelet IgG enhances complement activation by promoting hexamerization of hIgG1 which constitutes an optimal platform for C1q to bind (33). Furthermore, Kapur et al. showed that anti-HLA-I IgG, collected from alloimmunized patients in PTR or from patients with neonatal thrombocytopenia, are more galactosylated than total serum IgG1 levels, but they do not present different levels of sialylation and fucosylation. Modulation of galactosylation can affect IgG clearance *in vivo* and predisposes them for further modification by the addition of sialic acid. By contrast, anti-human platelet antigens antibodies are less fucosylated than total serum IgG1, leading to enhanced phagocytosis of IgG-bound platelets and increased disease severity (34). Accordingly, HLA-specific afucosylated IgG1 have been proposed to be a potential predictor of antibody pathogenicity (35), illustrating the importance of sugars in antibody functions.

Antigen specificity

As analyzed by Wang et al., in a 204-patient cohort, alloantibodies were directed towards the most prevalent HLA-I A and B molecules in that population (36). WIM8E5, an anti-HLA-I monoclonal antibody that recognizes an epitope on all HLA-A antigens, except for HLA-A3 and HLA-A32 (and reduced binding to HLA-A2), has been suggested to fix complement depending on the number of epitopes available for it; however, it remains to be determined if the identity of these epitopes matters, or just the number of binding sites on HLA-I available on platelets for a given antibody (23).

It has also been proposed that a higher diversity in the antibody specificity correlates with a higher level of HLA-I antibodies as detected by screening. It is likely that the greater the range of specificities, the higher the probability that an antibody will recognize HLA-I antigens on transfused platelets (37). This scenario becomes particularly relevant in multi-transfused (i.e. oncohematologic) patients where multiple exposures could potentially boost titers of specific anti-HLA-I antibodies, as well as elicit antibody responses to new alloantigens (38).

It is possible that the presence of anti-idiotypic antibodies directed against the variable regions of anti-HLA-I antibodies can regulate the latter's abundance (39). It remains to be studied if the anti-idiotypic antibodies recognize preferentially some V regions in anti-HLA-I with determined specificities for particular HLA antigens.

Strategies/Future directions

Since the expression of HLA-I molecules on the surface of platelets and their recognition by alloantibodies are responsible for the majority of immune PTR, future strategies to avoid transfusion refractoriness focus on either reducing the expression of HLA antigens or modulating the effects of antibodies (Figure 1B).

Universal HLA-I platelets

Platelet refractoriness could be overcome by transfusing platelets devoid of any HLA-I molecules. The first attempt to remove, or at least decrease, HLA antigens platelet expression was based on chemical modification. Acid treatment of human cells has been reported to eliminate the antigenicity of class I MHC molecules without significant cell death (40). Based on this discovery, several methods for preparing HLA-I depleted platelets have been reported. Acid treatment has been proven to reduce HLA-I molecules expression (41) and the subsequent HLA-antibody-mediated phagocytosis (42). Interestingly, proteomic analyses showed that the changes of platelet proteins after treatment with citric acid were functionally safe (43). However, despite the description of the absence of negative effects on proteins involved in coagulation and haemostasis, these results still need to be confirmed by functional tests. This approach is therefore attractive because it could theoretically be suitable for mass production at a reasonable cost. However, no method has yet been approved for clinical use and research is still ongoing in this field.

A promising but challenging alternative to the chemical treatment could be the use of HLA-I-deficient platelets generated *in vitro*. Different methods of *in vitro* platelet production have been reported, which differ in the source of the stem cells: induced pluripotent stem cells (iPSCs) or hematopoietic progenitors (CD34⁺ cells). Each of these offers advantages and disadvantages for the development of a transfusion product (44). To be expressed on the surface of cells, HLA-I molecules must form a heterodimer between a heavy chain and a light chain, the β 2-microglobulin. The strategy used so far to suppress the expression of HLA-I molecules relies on the deletion of the β 2-microglobulin gene, consequently leading to the absence of HLA-I molecules on the cell surface. HLA-I deficient

platelets produced from iPSCs have been reported to successfully circulate in an alloimmune PTR model of mice reconstituted with human NK cells (45). More recently, results from the first clinical trial of *ex vivo*-generated platelets show that it is a safe product, however, it remains restricted to autologous and therefore individualized *ex vivo* platelet production (46). Thus, optimization is necessary before cultured platelets can become a plausible alternative to the HLA-compatible blood product.

Targeting the complement pathway

Based on the data suggesting the involvement of complement in platelet HLA-I antibodies-related activation, a pilot study has been designed to assess the efficiency of eculizumab, a monoclonal antibody that inhibits C5 complement component, in platelet transfusion refractoriness (47). In this preliminary study, administration of eculizumab allows some patients to overcome PTR despite their transfusion with HLA-incompatible platelet concentrates. A clinical trial with a larger cohort should provide definitive conclusions concerning this strategy. However, it is important to keep in mind the high cost of such a treatment, which, even if it proves to be effective, will be restricted to real transfusion deadlocks but will not allow the handling of all PTR.

Repurpose of antineoplastic drugs

Drugs against underlying pathologies common in PTR patients may help in their management when transfusion with HLA-compatible products is not feasible. Rituximab, a monoclonal antibody directed against CD20 expressed on B cells, has been reported to increment platelet count in refractory patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome (48, 49). Daratumumab, an anti-CD38 monoclonal antibody common in myeloma treatment, has also proven to increase platelet transfusion efficiency in refractory patients (50). However, at least for rituximab, two response profiles were identified: an early and transient response, or a late and continuous response (48). Interestingly, Bortezomib, a specific inhibitor of 26S proteasome, induced a drastic decrease in the amount of anti-HLA-I antibodies in the serum of a patient treated for multiple myeloma, resulting in clinical response to transfusion from random donors (51). In addition, several studies describe an impact of these drugs on platelet count which means that these considerations should be taken into account in the design of future pharmacological strategies to manage refractoriness to platelet transfusions (52, 53). These different approaches seem promising but should be validated with a larger cohort of patients.

Intravenous immunoglobulin and plasma exchange

One strategy used in antibody-related disease lies on the modulation of antibodies themselves. Intravenous immunoglobulin (IvIg) therapy, defined as the use of a combination of antibodies obtained from healthy

human donors, or plasma exchange (PE) have been reported as a successful treatment for PTR patients (54, 55). The clinical benefit of IvIg treatment could be due to blockage of FcγR expressed by the reticuloendothelial system, where opsonized platelets would not be cleared anymore by these cells, and also due to modulation of antibodies' effects, i.e. interference with the complement or regulation of different FcR (56). Samuelsson *et al.* proposed that the IvIg anti-inflammatory activity is mediated by upregulation of the inhibitory Fc receptor, FcγRIIb, as IvIg has no protective effects on a mouse model of immune thrombocytopenia lacking this receptor (57). Another interesting role for saturation of FcRn could be the increased elimination of circulating pathogenic antibodies. FcRn are MHC-class I like molecules expressed by leukocytes and endothelial cells, which control the half-life of IgG and albumin. FcRn can form a ternary complex on an IgG Fc scaffold under acidic condition, which protects IgGs from endothelial catabolism. However, Crow *et al.* have suggested that the mechanism of IvIg action is FcRn-independent, as IvIg improved platelet count in a murine model of ITP in FcRn-deficient mice comparable to WT mice (58).

Furthermore, evidence of its benefit in immune-mediated PTR is still lacking and a large clinical study should be conducted to draw firm conclusions about its potential efficiency in this particular context.

IdeS

IgG-degrading enzyme from *S. pyogenes* (IdeS) is a cysteine protease that cleaves the heavy chain of IgG, generating one F(ab')₂ fragment and two Fc fragments (59). Since IdeS can selectively and rapidly neutralize the Fc-mediated effector function of human IgG, it is a promising new therapy for treating IgG-driven disorders. Recently, an elegant study describing the use of IdeS in a platelet immune disorder has been reported. A recombinant protein with the N-terminus of IdeS and the C-terminus of a single-chain variable fragment from a CD32a antibody was generated. This protein can bind specifically to all cells expressing CD32a, including platelets, and it can neutralize anti-platelet antibodies. Interestingly, platelets with surface-bound IgG-degrading enzymes are protected from clearance in murine models of immune thrombocytopenia (60). This technology could represent a very promising strategy to avoid or alleviate PTR in the future.

Conclusion

Refractoriness to platelet transfusions remains a major complication, especially for patients requiring chronic transfusion support. Alloantibodies directed towards HLA-I rapidly recognize and eliminate transfused platelets from the recipient's circulation. Some of these antibodies do not affect transfusion yield, raising questions about the determinants of anti-HLA-I pathogenicity. Further studies are necessary to shed light upon the anti-HLA-I antibodies' capacity to eliminate transfused platelets and the link to their intrinsic properties, in order to potentially develop new therapeutic approaches to prevent, or at least manage, PTR.

Author contributions

AC and GR-J wrote the first draft of the manuscript. BM, AC and GR-J wrote sections of the manuscript. AD contributed to the diagnosis/definition criteria and the future direction sections. BM coordinated the work and finalized the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

G. Rojas-Jiménez is funded by the EU-H2020-MSCA-COFUND EURIdoc programme (No. 101034170).

Acknowledgments

We thank Dr Catherine Humbrecht for critical reading of the manuscript.

References

- Forest SK, Hod EA. Management of the platelet refractory patient. *Hematol Oncol Clin North Am* (2016) 30:665–77. doi: 10.1016/j.hoc.2016.01.008
- Meehan KR, Matias CO, Rathore SS, Sandler SG, Kallich J, LaBrecque J, et al. Platelet transfusions: Utilization and associated costs in a tertiary care hospital. *Am J Hematol* (2000) 64:251–6. doi: 10.1002/1096-8652(200008)64:4<251::AID-AJH3>3.0.CO;2-N
- Toor AA, Choo SY, Little JA. Bleeding risk and platelet transfusion refractoriness in patients with acute myelogenous leukemia who undergo autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2000) 26:315–20. doi: 10.1038/sj.bmt.1702490
- Comont T, Tavittian S, Bardiaux L, Fort M, Debiol B, Morere D, et al. Platelet transfusion refractoriness in patients with acute myeloid leukemia treated by intensive chemotherapy. *Leuk Res* (2017) 61:62–7. doi: 10.1016/j.leukres.2017.08.015
- Karlstrom C, Linjama T, Edgren G, Lauronen J, Wikman A, Hoglund P. HLA-selected platelets for platelet refractory patients with HLA antibodies: A single-center experience. *Transfusion* (2019) 59:945–52. doi: 10.1111/trf.15108
- Cohn CS. Platelet transfusion refractoriness: how do I diagnose and manage? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* (2020) 2020:527–32. doi: 10.1182/hematology.2020000137
- Elhence P, Chaudhary RK, Nityanand S. Cross-match-compatible platelets improve corrected count increments in patients who are refractory to randomly selected platelets. *Blood Transfus* (2014) 12:180–6. doi: 10.2450/2013.0064-13
- Slichter SJ. Evidence-based platelet transfusion guidelines. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* (2007), 172–8. doi: 10.1182/asheducation-2007.1.172
- Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study, G. Leukocyte reduction and ultraviolet b irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *N Engl J Med* (1997) 337: 1861–9. doi: 10.1056/NEJM199712253372601
- Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfus Med Rev* (2000) 14:180–96. doi: 10.1016/S0887-7963(00)80007-3
- Vecchione G, Margaglione M, Grandone E, Colaizzo D, Cappucci G, Giuliani N, et al. Identifying human platelet glycoproteins IIb and IIIa by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* (1998) 19:1468–74. doi: 10.1002/elps.1150190842
- O'Connell B, Lee EJ, Schiffer CA. The value of 10-minute posttransfusion platelet counts. *Transfusion* (1988) 28:66–7. doi: 10.1046/j.1537-2995.1988.28188127957.x
- Daly PA, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Platelet transfusion therapy. one-hour posttransfusion increments are valuable in predicting the need for HLA-matched preparations. *JAMA* (1980) 243:435–8. doi: 10.1001/jama.1980.03300310023016
- Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* (2005) 105:4106–14. doi: 10.1182/blood-2003-08-2724
- Doughty HA, Murphy MF, Metcalfe P, Rohatiner AZ, Lister TA, Waters AH. Relative importance of immune and non-immune causes of platelet refractoriness. *Vox Sang* (1994) 66:200–5. doi: 10.1111/j.1423-0410.1994.tb00310.x
- Davis KB, Slichter SJ, Corash L. Corrected count increment and percent platelet recovery as measures of posttransfusion platelet response: Problems and a solution. *Transfusion* (1999) 39:586–92. doi: 10.1046/j.1537-2995.1999.39060586.x
- Stanworth SJ, Navarrete C, Estcourt L, Marsh J. Platelet refractoriness—practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. *Br J Haematol* (2015) 171:297–305. doi: 10.1111/bjh.13597
- Arabi S, Almahayni AO, Alomair AA, Masuadi EM, Damla M, Al-Dorzi HM. Prevalence, risk factors, and outcomes of platelet transfusion refractoriness in critically ill patients: A retrospective cohort study. *Crit Care Res Pract* (2021) 2021:5589768. doi: 10.1155/2021/5589768
- Handin RI, Stossel TP. Phagocytosis of antibody-coated platelets by human granulocytes. *N Engl J Med* (1974) 290:989–93. doi: 10.1056/NEJM197405022901803
- Aslam R, Kapur R, Segel GB, Guo L, Zufferey A, Ni H, et al. The spleen dictates platelet destruction, anti-platelet antibody production, and lymphocyte distribution patterns in a murine model of immune thrombocytopenia. *Exp Hematol* (2016) 44:924–930 e921. doi: 10.1016/j.exphem.2016.07.004
- Saris A, Tomson B, Brand A, Mulder A, Claas FH, Lorinser J, et al. Platelets from donors with consistently low HLA-B8, -B12, or -B35 expression do not undergo antibody-mediated internalization. *Blood* (2018) 131:144–52. doi: 10.1182/blood-2017-07-799270
- Rijkers M, Saris A, Heidt S, Mulder A, Porcelijn L, Claas FJH, et al. A subset of anti-HLA antibodies induces FcγRIIa-dependent platelet activation. *Haematologica* (2018) 103:1741–52. doi: 10.3324/haematol.2018.189365
- Rijkers M, Schmidt D, Lu N, Kramer CSM, Heidt S, Mulder A, et al. Anti-HLA antibodies with complementary and synergistic interaction geometries promote classical complement activation on platelets. *Haematologica* (2019) 104:403–16. doi: 10.3324/haematol.2018.201665
- Daaron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* (1997) 15:203–34. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.203
- Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Youghare I, Ma L, et al. Desialylation is a mechanism of fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun* (2015) 6:7737. doi: 10.1038/ncomms8737
- Deppermann C, Kratochil RM, Peiseler M, David BA, Zindel J, Castanheira F, et al. Macrophage galactose lectin is critical for kupffer cells to clear aged platelets. *J Exp Med* (2020) 217. doi: 10.1084/jem.20190723
- Jiang Y, Tang Y, Hoover C, Kondo Y, Huang D, Restagno D, et al. Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice. *Cell Death Differ* (2021) 28:3009–21. doi: 10.1038/s41418-021-00797-w
- Laundy GJ, Bradley BA, Rees BM, Youniss M, Hows JM. Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia. *Transfusion* (2004) 44:814–25. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.03387.x
- Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol* (2014) 5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520
- Coetzee LM, Pieters H, van Wyk V, Cooper S, Roodt J, De Reys S, et al. The effect of monoclonal anti-human-platelet antibodies on platelet kinetics in a baboon model: IgG subclass dependency. *Thromb Haemost* (2000) 83:148–56. doi: 10.1055/s-0037-1613771

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The handling editor CP declared a shared affiliation with the authors at the time of the review

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

31. Valenzuela NM, Schaub S. The biology of IgG subclasses and their clinical relevance to transplantation. *Transplantation* (2018) 102:S7–S13. doi: 10.1097/TP.0000000000001816
32. Anthony RM, Nimmerjahn F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with Fcγ receptors *in vivo*. *Curr Opin Organ Transplant* (2011) 16:7–14. doi: 10.1097/MOT.0b013e328342538f
33. Van Osch TLJ, Oosterhoff JJ, Bentlage AEH, Nouta J, Koeleman CAM, Geerdes DM, et al. Fc galactosylation of anti-platelet hIgG1 alloantibodies enhance complement activation on platelets. *Haematologica* (2022) 107. doi: 10.3324/haematol.2021.280493
34. Kapur R, Kustiawan I, Vestreheim A, Koeleman CA, Visser R, Einarsdottir HK, et al. A prominent lack of IgG1-fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood* (2014) 123:471–80. doi: 10.1182/blood-2013-09-527978
35. Bharadwaj P, Shrestha S, Pongracz T, Concetta C, Sharma S, Le Moine A, et al. Afucosylation of HLA-specific IgG1 as a potential predictor of antibody pathogenicity in kidney transplantation. *Cell Rep Med* (2022) 3:100818. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100818
36. Wang J, Xia W, Deng J, Xu X, Shao Y, Ding H, et al. Analysis of platelet-reactive alloantibodies and evaluation of cross-match-compatible platelets for the management of patients with transfusion refractoriness. *Transfus Med* (2018) 28:40–6. doi: 10.1111/tme.12423
37. Carrick DM, Norris PJ, Endres RO, Pandey S, Kleinman SH, Wright D, et al. Establishing assay cutoffs for HLA antibody screening of apheresis donors. *Transfusion* (2011) 51:2092–101. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.03048.x
38. Jackman RP, Lee JH, Pei R, Bolgiano D, Lebedeva M, Slichter SJ, et al. C1q-binding anti-HLA antibodies do not predict platelet transfusion failure in trial to reduce alloimmunization to platelets study participants. *Transfusion* (2016) 56:1442–50. doi: 10.1111/trf.13598
39. Atlas E, Freedman J, Blanchette V, Kazatchkine MD, Semple JW. Downregulation of the anti-HLA alloimmune response by variable region-reactive (anti-idiotypic) antibodies in leukemic patients transfused with platelet concentrates. *Blood* (1993) 81:538–42. doi: 10.1182/blood.V81.2.538.538
40. Sugawara S, Abo T, Kumagai K. A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J Immunol Methods* (1987) 100:83–90. doi: 10.1016/0022-1759(87)90175-X
41. Mirlashari MR, Vetlesen A, Nissen-Meyer LSH, Naper C, Tjonnfjord GE, Njerve IU, et al. HLA class I depletion by citric acid, and irradiation of apheresis platelets for transfusion of refractory patients. *Transfusion* (2021) 61:1222–34. doi: 10.1111/trf.16282
42. Meinke S, Sandgren P, Mortberg A, Karlstrom C, Kadri N, Wikman A, et al. Platelets made HLA deficient by acid treatment aggregate normally and escape destruction by complement and phagocytes in the presence of HLA antibodies. *Transfusion* (2016) 56:370–82. quiz 369. doi: 10.1111/trf.13350
43. Mirlashari MR, Vetlesen A, Nissen-Meyer LSH, Stensland ME, Singh SK, Nyman TA, et al. Proteomic study of apheresis platelets made HLA class I deficient for transfusion of refractory patients. *Proteomics Clin Appl* (2021) 15:e2100022. doi: 10.1002/prca.202100022
44. Strassel C, Gachet C, Lanza F. On the way to *in vitro* platelet production. *Front Med (Lausanne)* (2018) 5:239. doi: 10.3389/fmed.2018.00239
45. Suzuki D, Flahou C, Yoshikawa N, Stirblyte I, Hayashi Y, Sawaguchi A, et al. iPSC-derived platelets depleted of HLA class I are inert to anti-HLA class I and natural killer cell immunity. *Stem Cell Rep* (2020) 14:49–59. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.11.011
46. Sugimoto N, Kanda J, Nakamura S, Kitano T, Hishizawa M, Kondo T, et al. iPLAT1: The first-in-human clinical trial of iPSC-derived platelets as a phase 1 autologous transfusion study. *Blood* (2022) 140(22):2398–402. doi: 10.1182/blood.2022017296
47. Vo P, Purev E, West KA, McDuffee E, Worthy T, Cook L, et al. A pilot trial of complement inhibition using eculizumab to overcome platelet transfusion refractoriness in human leukocyte antigen allo-immunized patients. *Br J Haematol* (2020) 189:551–8. doi: 10.1111/bjh.16385
48. Liu W, Wu D, Hu T, Ye B. Efficiency of treatment with rituximab in platelet transfusion refractoriness: A study of 7 cases. *Int J Clin Exp Med* (2015) 8:14080–4.
49. Yu QH, Shen YP, Ye BD, Zhou YH. Successful use of rituximab in platelet transfusion refractoriness in a multi-transfused patient with myelodysplastic syndrome. *Platelets* (2015) 26:195–6. doi: 10.3109/09537104.2013.789842
50. Migdady Y, Ediriwickrema A, Jackson RP, Kadi W, Gupta R, Socola F, et al. Successful treatment of thrombocytopenia with daratumumab after allogeneic transplant: A case report and literature review. *Blood Adv* (2020) 4:815–8. doi: 10.1182/bloodadvances.2019001215
51. Miki H, Ozaki S, Tanaka O, Lee E, Takimoto T, Watanabe H, et al. Marked improvement of platelet transfusion refractoriness after bortezomib therapy in multiple myeloma. *Int J Hematol* (2009) 89:223–6. doi: 10.1007/s12185-009-0255-z
52. Giezen TJ, Mantel-Teeuwisse AK, ten Berg MJ, Straus SM, Leufkens HG, van Solinge WW, et al. Rituximab-induced thrombocytopenia: A cohort study. *Eur J Haematol* (2012) 89:256–66. doi: 10.1111/j.1600-0609.2012.01808.x
53. Lonial S, Waller EK, Richardson PG, Jagannath S, Orlowski RZ, Giver CR, et al. Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood* (2005) 106:3777–84. doi: 10.1182/blood-2005-03-1173
54. Kurtzberg J, Friedman HS, Kinney TR, Chaffee S, Falletta JM. Treatment of platelet alloimmunization with intravenous immunoglobulin. Two case reports and review of the literature. *Am J Med* (1987) 83:30–3. doi: 10.1016/0002-9343(87)90548-1
55. Cid J, Magnano L, Acosta M, Alba C, Esteve J, Lozano M. Rituximab, plasma exchange and intravenous immunoglobulins as a new treatment strategy for severe HLA alloimmune platelet refractoriness. *Platelets* (2015) 26:190–4. doi: 10.3109/09537104.2014.895922
56. Ballou M. Mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* (1997) 100:151–7. doi: 10.1016/S0091-6749(97)70217-3
57. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fcγ receptor. *Science* (2001) 291:484–6. doi: 10.1126/science.291.5503.484
58. Crow AR, Suppa SJ, Chen X, Mott PJ, Lazarus AH. The neonatal Fc receptor (FcRn) is not required for IVIg or anti-CD44 monoclonal antibody-mediated amelioration of murine immune thrombocytopenia. *Blood* (2011) 118:6403–6. doi: 10.1182/blood-2011-08-374223
59. von Pawel-Rammingen U, Johansson BP, Björck L, Ide S, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. *EMBO J* (2002) 21:1607–15. doi: 10.1093/emboj/21.7.1607
60. Lynch DR, Stringham EN, Zhang B, Balbin-Cuesta G, Curtis BR, Palumbo JS, et al. Anchoring IgG-degrading enzymes to the surface of platelets selectively neutralizes antiplatelet antibodies. *Blood Adv* (2022) 6:4645–56. doi: 10.1182/bloodadvances.2022007195

B)INTRODUCTION

L'état réfractaire aux transfusions de plaquettes d'origine immune complique la prise en charge transfusionnelle des patients alloimmunisés. Aujourd'hui, le seul moyen d'améliorer significativement le rendement transfusionnel chez ces patients est la transfusion de produits sanguins dit HLA compatible. Ce terme désigne la transfusion de concentrés plaquettaires dont le phénotype HLA est identique à celui du receveur, ou non reconnu par les anticorps présents chez ce dernier. Cependant, cette stratégie représente une logistique extrêmement lourde pour l'Etablissement français du sang et non applicable en cas d'urgence.

Comprendre comment les anticorps anti-HLA-I entraînent l'élimination des plaquettes permettrait de développer des axes thérapeutiques pour prévenir l'état réfractaire associé à la présence d'alloanticorps. Une des hypothèses serait une corrélation entre l'élimination des plaquettes transfusées et leur activation par les anti-HLA-I. Dans la littérature, même si l'activation des plaquettes transfusées par les alloanticorps a été rapportée, les mécanismes précis n'ont pas été pleinement élucidés et pourraient dépendre des anticorps impliqués. En effet, tous les patients alloimmunisés ne développent pas d'état réfractaire, suggérant une pathogénicité de certains anticorps seulement (Etude TRAP, 1999). Plusieurs facteurs impactent les fonctions des anticorps : la glycosylation, l'épitope reconnu ainsi que la sous-classe de ces derniers. Parmi ces caractéristiques des anticorps, nous avons étudié l'importance des sous-classe d'IgG sur l'activation plaquettaire médiée par les anticorps anti-HLA-I et sur le mécanisme impliqué.

De plus, selon les chiffres des rapports d'hémovigilance français, l'incidence de l'état réfractaire d'origine immune est rare (51 EIR pour 100 000 CPA cédés et 33,7 pour 100 000 MCPS cédés, Rapport d'hémovigilance décembre 2022 – ANSM). Cependant, les critères permettant de conclure à un état réfractaire immun, i.e. une inefficacité transfusionnelle constatée après 2 transfusions successives, utilisant un concentré plaquettaire à posologie adéquate, ABO compatible et frais, une présence d'alloanticorps dans le sérum du receveur sans aucun autre facteur de consommations plaquettaires associés, sont très stringents et incompatibles avec la logistique de préparation des PSL. En effet, deux jours sont nécessaires à l'inactivation des pathogènes à l'intérieur de la poche. Ces critères de diagnostic stricts participent indéniablement à une sous-estimation de cette complication post-transfusionnelle grave. Nos différentes discussions avec le personnel soignant de l'Institut de Cancérologie de Strasbourg confirment cette hypothèse puisqu'ils sont continuellement confrontés à des impasses thérapeutiques pour des patients devenus réfractaires à toutes transfusions. Ainsi, nous avons développé une étude clinique dans le but de documenter la survenue des ERT. Cette étude

participera également à la caractérisation des propriétés pathogéniques des anticorps impliqués dans cet EIR par comparaison des anticorps retrouvés chez les patients qui développent un état réfractaire comparés à ceux qui n'en développent pas.

Les résultats des données expérimentales et de l'étude clinique sont présentés dans un manuscrit sous la forme la plus avancée, pour lequel je serai première auteure.

Distinct role of anti-HLA-I IgG subclasses in platelet transfusion refractoriness

Couvidou A.^{1, 2, 3, 5}, Wald M.^{4, 5}, Angénieux C.^{1, 2}, Gabriel R-J^{1, 2, 3, 5}, Apithy-Emboulas M.², Humbrecht C.², Fornecker L-M.^{4, 5}, Dupuis A.², Maître B.^{1, 2, 3, 5}

¹UMR_S1255, INSERM, Strasbourg, F-67065, France.

²Etablissement Français du Sang-Grand Est, Strasbourg, F-67065, France.

³Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, F-67065, France.

⁴Institut de Cancérologie de Strasbourg (ICANS), Strasbourg, F-67065, France.

⁵Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67000, France.

INSERM UMR_S1255, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Grand Est (EFS-Alsace), Strasbourg, F-67065, France;

Address for correspondence:

UMR_S1255 INSERM, Université de Strasbourg

Etablissement Français du Sang-Grand Est

10 rue Spielmann, BP 36

F-67065 Strasbourg Cedex, France

Tel. +33 3 88 21 25 25

Fax. +33 3 88 21 25 21

email: blandine.maitre@efs.sante.fr

ABSTRACT

Patients requiring massive platelet transfusion are subject to platelet transfusion refractoriness (PTR), a therapeutic failure of platelet transfusion due to the rapid clearance of transfused platelets from the circulation. PTR may be due to non-immune factors or to the existence of IgG antibodies directed against allogeneic HLA Class I (HLA-I) molecules. Interestingly, not all alloimmunized patients develop PTR following platelet transfusion, raising the question of which factors are relevant for the pathogenicity of HLA-I-reactive alloantibodies. To assess the incidence of immune PTR and to identify factors associated with alloantibody pathogenicity, we initiated a clinical trial to monitor transfusion yield in onco-haematological patients requiring heavy platelet transfusion support. We found that 70% of transfusions did not reach a satisfactory transfusion yield. Moreover antibodies were detected in half of refractory and non refractory patients. A closer analysis of these sera revealed the presence of IgG1 only in non refractory patients whereas patients developing a PTR had anti-HLA-I IgG2 and IgG3. Using human chimeric IgG1, IgG2 or IgG3 pan-HLA-I mAbs we further investigated the potential of different IgG subclasses to activate platelets. Both the platelet activation level and the responsible mechanisms mediated by pan anti-HLA-I antibodies were impacted by the IgG subclass. IgG2 activated platelets to a greater extent than IgG1 and IgG3, via a CD32a-dependent mechanism, whereas IgG1 and IgG3 activated platelets via complement recruitment. Overall, this study may have direct implications for hierarchizing pathogenic anti-HLA-I alloantibodies in highly polyimmunized patients. This could aid in selecting suitable treatments, particularly by streamlining the search for functionally compatible platelet components.

INTRODUCTION

Onco-haematological disorders are often associated with treatment-induced or disease-related severe thrombocytopenia. As a result, these patients require massive platelet transfusion support to stop or prevent haemorrhagic bleeding. Despite continuous improvements in transfusion practices, platelet transfusion refractoriness (PTR), characterized by a therapeutic transfusion failure, remains a serious complication in polytransfused patients. PTR is associated with an elevated risk of patient mortality, and it also has a significant impact on treatment costs due to prolonged hospital stays and higher consumption of labile blood units¹. PTR may occur

due to non-immune factors that result in peripheral platelet consumption, such as inflammatory conditions, drug interference, or disseminated intravascular coagulation. However, approximately 20% of platelet rejections are attributed to the existence of IgG directed against HLA Class I (HLA-I) molecules, resulting in the classification of immune PTR². Immune PTR can potentially be circumvented by using HLA-I-compatible platelets, i.e. perfectly HLA-I-matched platelets between donor and recipient, platelets carrying only antigens to which the recipient has not developed antibodies (permissive antigens) or cross-matched platelets. However, finding a suitable donor is extremely challenging, especially for highly immunized patients³.

Interestingly, not all alloimmunised patients develop PTR following platelet transfusion, raising the question of which factors are relevant for the pathogenicity of HLA-I reactive antibodies. The TRAP (Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets) study showed a correlation between high levels of circulating alloantibodies and the occurrence of PTR⁴. Moreover, the density of HLA-I antigens expressed on donor platelets could also be taken into account, as a study showed that platelets from donors with consistently low HLA-I antigen expression exhibited significantly reduced antibody-mediated internalization by macrophages *in vitro*⁵. In addition to these quantitative elements, the antibodies' intrinsic characteristics have been correlated with their effect on platelets. Several studies have suggested that platelet activation by anti-HLA-I antibodies leads to their rapid clearance from the bloodstream in alloimmunised patients who develop refractoriness. Furthermore, this activation could depend on the type of antibody involved. Rijkers et al. reported that anti-HLA-I antibodies can activate platelets either through CD32a mobilization or through plasmatic complement recruitment^{6,7}.

Since IgG subclasses have different functional properties, it is the first parameter to examine in pathogenic antibodies. IgGs are classified into four subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4) based on the amino acid sequence of their heavy chains, particularly in the hinge and CH2 domains. The subclass influences the ability of IgGs to recruit complement and the affinity for the different Fc receptors (FcR). For instance, IgG1 and IgG3 are more effective than IgG2⁸. Distinct IgG subclasses targeting HLA-I molecules could therefore potentially affect platelets in varying ways. In addition, a study in baboons suggested that the IgG subclasses may influence the site of platelet sequestration during refractoriness: IgG1 led to platelet sequestration in the spleen while IgG2 resulted in platelets being eliminated in the liver⁹.

Full understanding of how anti-HLA-I antibodies affect platelets is important for developing strategies to safely transfuse platelets in spite of limitations dictated by alloantibodies. As several observations suggest that anti-HLA-I antibody subclasses may affect platelet elimination, we investigated in a prospective clinical study how the anti-HLA-I IgG subclasses could impact PTR. We monitored transfusion yields in onco-haematology patients and classified them according to the presence or absence of a refractory state. For each patient, we determined the origin of platelet consumption: non-immune factors and/or presence of anti-HLA-I antibodies. By comparing the anti-HLA-I antibodies profiles found in the refractory and non-refractory groups, we observed that immunized patients developing PTR had IgG2 and IgG3 whereas only IgG1 could be detected in non-PTR patients. Using chimeric pan-HLA-I antibodies of identical specificity, we showed that IgG2 and IgG3 were the most effective subclasses for activating platelets compared with IgG1. Furthermore, IgG-mediated platelet activation relied on different mechanisms depending on the IgG subclass. IgG2 led to platelet activation by mobilizing CD32a, while IgG3 activated platelets by recruiting the complement.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

The murine IgG2a pan anti-human HLA-I (clone W6/32) and the isotype control were respectively purchased from InVivoMab and BioXcell. Recombinant chimeric antibodies hIgG1- and hIgG3-W6/32 were purchased from Invivogen. Recombinant chimeric antibody hIgG2-W6/32 was generated by Proteogenix.

APC anti-human CD62P (Clone AK4) and APC anti-C3b antibody (clone 3E7) antibodies were purchased from Biolegend. FITC-coupled Annexin-V was purchased from Roche. As previously reported, CD9 antibody (ALMA-12) and Tyrode's albumin (TA) buffer (5mM Hepes, pH 7.35, 0.35% human serum albumin) were prepared in our laboratory¹⁰. Anti-CD32a antibody (clone IV.3) was purchased from StemCell. Subclass-specific secondary antibodies were purchased from LifeSpan Biosciences: murine anti-hIgG1 (clone HP6001), murine anti-hIgG2 (clone 31-7-4), murine anti-hIgG3 (clone HP6050) and murine anti-hIgG4 (clone HP6025).

Ethics statement

The human studies were performed according to the Helsinki Declaration. Human whole blood was collected from volunteer blood donors who gave written informed consent and were recruited by the blood transfusion center where the research was carried out (Établissement Français du Sang-Grand Est).

Clinical study

A prospective clinical study within the Hematology Department of the “Institut de cancérologie Strasbourg Europe (ICANS)” was conducted where 50 patients were enrolled. Patients included in this study received chemotherapy in an hematopoietic stem cell transplant context (allogenic or autologous) or acute leukaemia treatment (induction or consolidation). Patients underwent sampling before transfusion to check for the presence of anti-HLA-I antibodies using Luminex® technology. Platelet counts were examined at 1 hour and 24 hours post transfusion to determine the corrected count increment (CCI). The yield was considered as poor when the CCI was <7. Non-immune factors explaining potential platelet consumption (Table 1), patients weight/height, and platelet concentrate characteristics (platelet quantity, storage duration, ABO phenotype) were collected online by completing a secured structured database.

Anti-HLA-I IgG subclass assay

A high-definition LABScreen single-antigen Class I (One Lambda, Canoga Park, CA) was performed on the LABScan100 flow cytometer (Luminex® Corporation, Austin, TX) to determine the specificity of anti-HLA-I IgG antibodies. A positive result was defined as a mean fluorescence intensity (MFI) greater than 1,000 for total IgG Luminex®, a positivity threshold determined by the HLA-I laboratory based on negative controls. IgG subclasses detection was performed using the same protocol, except for the use of a secondary antibody specific for each subclass. The subclass of an anti-HLA-I antibody, already detected in total IgG Luminex®, was determined to be positive when the MFI was higher than the corresponding negative control in subclass detection.

Platelet activation measurement

Hirudinated platelet-rich plasma (PRP) from healthy voluntary donors was incubated for 30 minutes at 37°C with commercial antibodies at 10µg/mL diluted in TA buffer with hirudine 10 U/mL. Incubated platelets were labelled for 20 min at 37°C using APC anti-CD62P (2µg/mL), Alexa-488-coupled fibrinogen (20 µg/mL), FITC-coupled Annexin V (1:20) and APC anti-C3b

<i>Demographic data</i> - Age - Gender - Weight and size - length of hospital stay - Nature of haemopathy	<i>Platelet concentrate characteristics</i> - Date of preparation - Date of peremption - Donors ABO group - Quantity of active ingredients
<i>Clinical and biological data</i> - Temperature - Bleeding - Presence of splenomegaly - Presence of DIC - Presence of sepsis - Antibiotherapy treatment - CRP (mg/ml) - TP (%) - Ddimers - Fibrinogen (g/L) - Haemoglobin	<i>Transfusional data</i> - ABO group - Rhesus - Number of red blood cells units received - Number of platelet buffy coat units received - Number of platelet apheresis units received - Platelet count before transfusion - Platelet count 1hour after transfusion - Platelet count 24 hours after transfusion
<i>Anti-HLA class I antibodies</i> - Presence - Antibody specificity - MFI of each specificity - Ig subclass	

Table 1: Data collected during clinical study

antibodies (2µg/mL). The samples were then diluted in TA buffer with hirudine 10 U/mL and analyzed using flow cytometry.

In some experiments, before incubation of PRP with chimeric antibodies, platelets were treated either with Eculizumab (100µg/mL) or with IV.3 (10µg/mL) during 5 min at room temperature. Collagen-related peptide (CRP) at 5 µg/mL was used as a positive control.

Aggregation test

Blood was drawn into a hirudinated tube and PRP was obtained by centrifugation as previously described¹⁰. Platelet aggregation was measured turbidimetrically as described previously¹¹.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Prism 5.02 software (GraphPad). All data are reported as the mean ± SEM and were analyzed using 1-way Anova test, followed by Tukey post hoc analysis, as appropriate.

RESULTS

A prospective clinical study reveals high incidence of refractory state associated with HLA-I alloimmunization

To identify the parameters associated with PTR and the anti-HLA-I antibodies characteristics involved in peripheral platelet consumption, we set up a prospective clinical study. Fifty patients requiring platelet transfusion during their chemotherapy were enrolled and 61 transfusions were performed. Among them, we analyzed the transfusion only if the platelet concentrate was ABO compatible with the recipient, which led to the exclusion of 11 transfusions from our analyses. All factors relevant for platelet transfusion follow-up, including patient data (demographic, clinical and biological data), platelet concentrate characteristics (quantity of active component ABO phenotype, preparation and expiry dates) and transfusional data were collected (Table 1).

Before each transfusion, platelet count was taken and serum was sampled to evaluate the presence of anti-HLA-I antibodies by Luminex[®] technology. Platelet counts were further taken at 1 hour and 24 hours post-transfusion as it has been described to be a good indicator of the immune or non-immune etiology of platelet refractoriness (Daly et al., 1980). A low transfusion yield at 24 hours should indicate non-immune causes, whereas immune causes

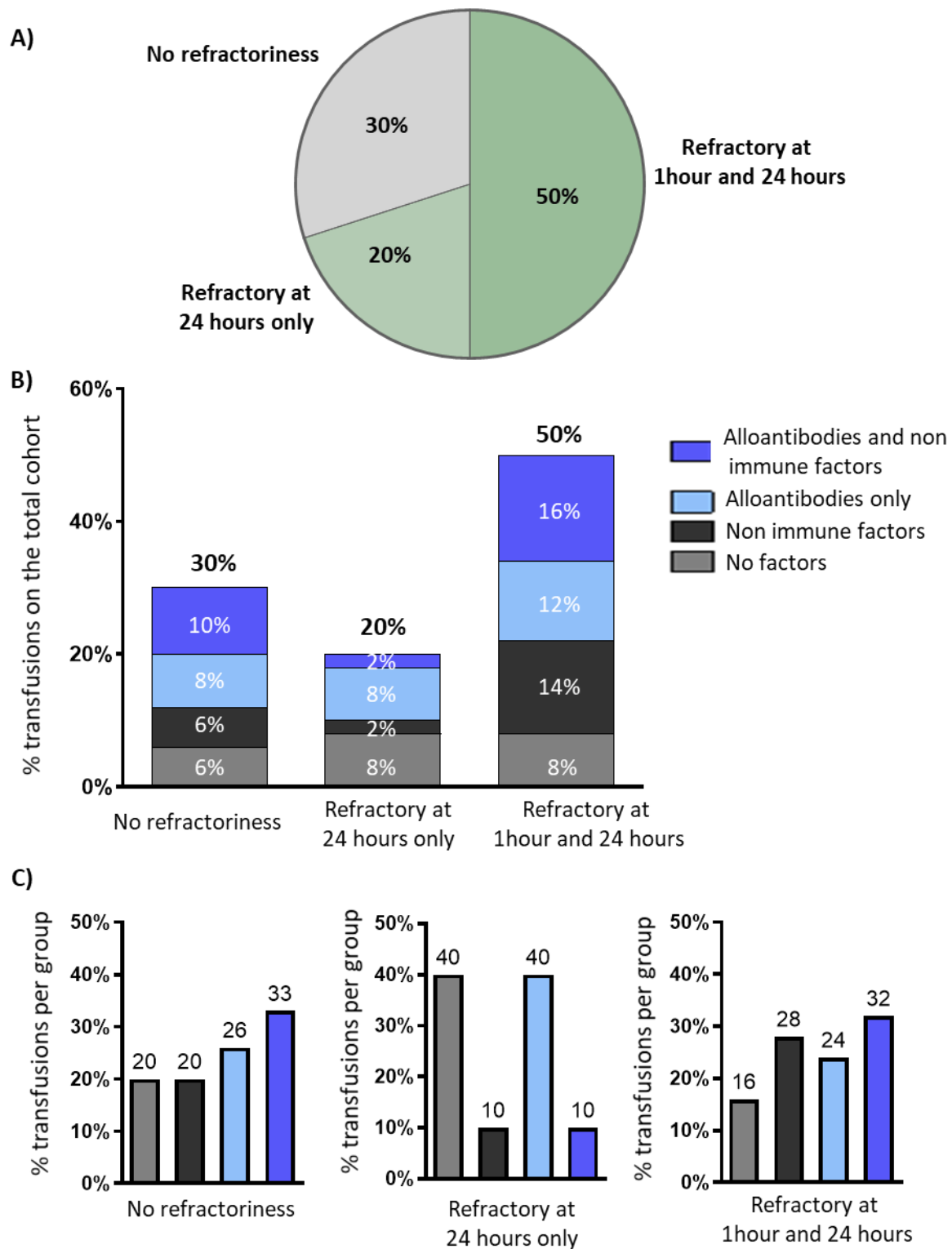


Figure 1: Analysis of the clinical study results

(A) Results of the clinical study are represented by an initial diagram showing the proportion of refractory state at 1 hour and 24 hours, 24 hours only, or the absence of refractory state. **(B, C)** Bar chart representing the percentage of transfusions classified as no refractoriness, refractoriness at 24 hours only or at 1 hour and 24 hours with the associated platelet consumption factors: no causes, non-immune factors, alloantibodies only or alloantibodies and associated non-immune factors. Results are presented **(B)** in percentage on all transfusions or **(C)** in percentage per categories. n=50 patients enrolled and 50 transfusions analyzed

should induce rapid platelet consumption within the first hour post-transfusion. CCI was therefore calculated at each time point with a CCI value ≤ 7 indicating a PTR.

Based on the CCI, we classified transfusions into three categories: non-refractory, refractory at 24 hours only and refractory at 1 hour and at 24 hours post-transfusion. First we observed that strikingly, among the 50 transfusions analyzed, the CCI was below 7 for 35 of them meaning that 70% of transfusions did not achieve a satisfactory yield. As shown in Figure 1A, for 30% of transfusions, patients were not refractory, while for respectively 50% and 20% of transfusions, patients developed refractoriness at 1h and 24h or only at 24 hours (Figure 1A).

We then looked at immune or non-immune factors associated with those transfusions. Interestingly, we detected anti-HLA-I alloantibodies in patients sera for 38% of transfusions (pale and dark blue boxes) (Figure 1B). Moreover, 20% of transfusions were associated with an immune PTR (8% for refractory at 24h, 12% for refractory at 1h/24h) (pale blue boxes) and 16% of transfusions without any factor of platelet consumption were associated with a PTR (8% for refractory at 24h and 1h/24h) (grey boxes) (Figure 1B). Finally, in 18% of transfusions, both immune and non-immune factors were detected in patients sera (12% and 16% for refractory at 24h, and 1h/24h respectively) (dark blue boxes), which impedes the discrimination of the origin of the refractory state. These results highlights the complexity of the etiology of PTR, since immune and non-immune causes are non-exclusive (Figure 1B).

We then looked closely of the factors explaining the platelet transfusion yield in each categories. In the non-refractory group, we detected anti-HLA-I alloantibodies in 59% of transfusions (26% alloantibodies only + 33% immune and non-immune factors) confirming that not all anti-HLA-I alloantibodies induce PTR (Figure 1C). In both refractory groups, we also detected anti-HLA-I antibodies for at least half of the transfusions (50% at 24h, 56% at 1h/24h) (Figure 1C, blue boxes). In the 24 hours post-transfusion refractory group, we found alloantibodies without any other factors explaining the platelet consumption in 40% of transfusions (pale blue box) whereas only 10% of transfusions were associated with non-immune factors only (black box). By contrast, in the 1 hour and 24 hours refractory group, only 24% of transfusions were associated with only alloantibodies against 28% associated with non-immune factors without any antibody detected (black box) (Figure 1C). These data suggest that transfusion yield calculated at 1hour and 24 hours post-transfusion was not discriminatory enough to determine the immune or non-immune etiology of refractoriness.

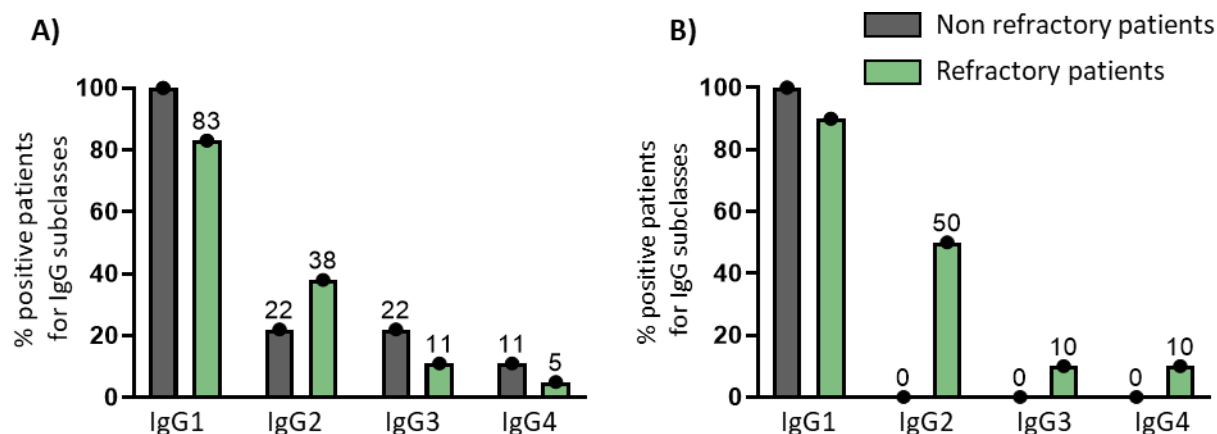


Figure 2: IgG subclass distribution profiles differ between refractory and non-refractory patients

Representation of IgG distribution profiles in refractory patients (green) and non-refractory patients (grey) (A) with and without non immune factors associated or (B) with only alloantibodies as platelet consumption factors. Results are presented in percentage of patients that had the corresponding IgG subclasses. IgG subclasses were determined using Luminex technology.

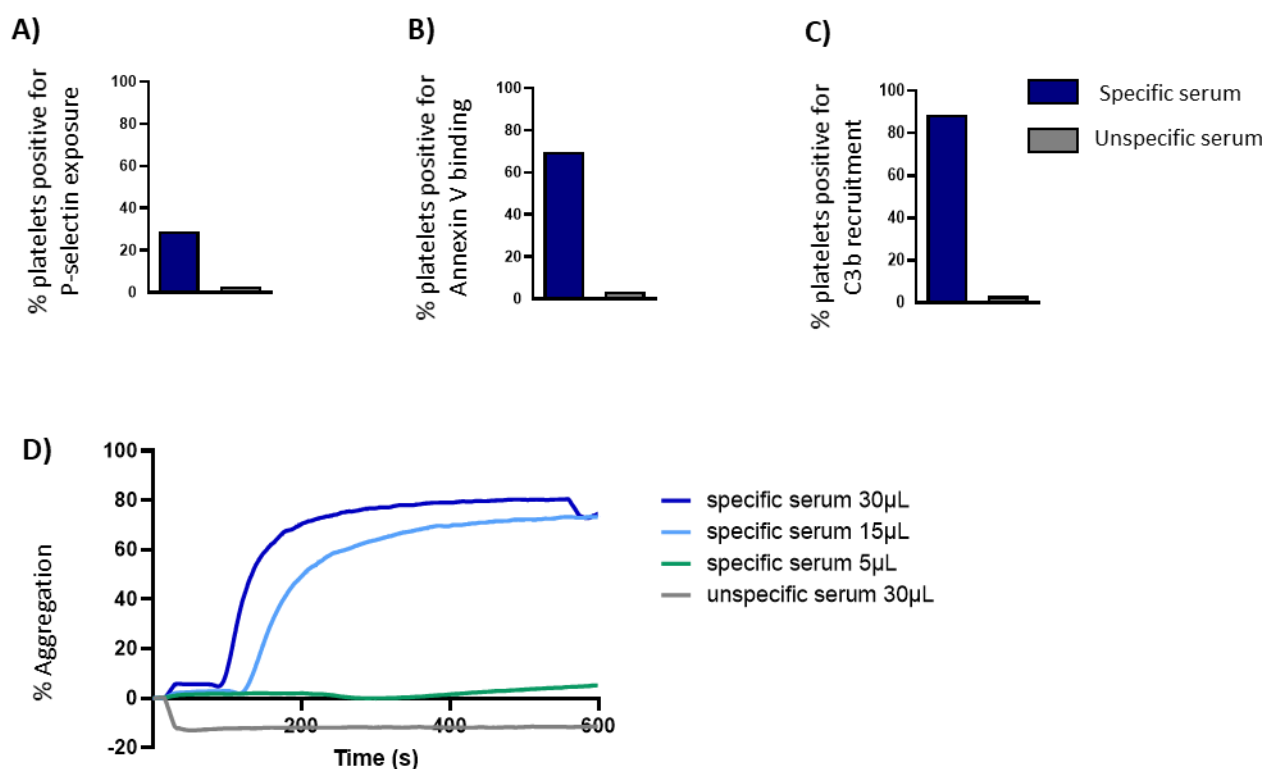


Figure 3: Platelet activation induced by immunized patient serum

Hirudinized PRP was incubated with alloimmunized patients sera with antibodies directed against the platelet HLA phenotype (specific serum) or not (unspecific serum). After 30min of incubation, platelet activation was analyzed by flow cytometry using activation markers such as (A) P-selectin exposure (P-sel), (B) Annexin-V binding and (C) C3b recruitment (n=1). (D) The capacity of sera at different concentration to induce platelet activation was also evaluated by aggregation test (n=1).

IgG subclass distribution differs between refractory and non-refractory patients.

HLA-I alloimmunized patients did not systematically develop platelet transfusion refractoriness, suggesting that refractoriness may depend on IgG intrinsic properties such as the subclass. We therefore analyzed the sera from unrefractory and refractory patients for the different subclasses of anti-HLA-I IgG by using the Luminex[®] technology. However, it should be pointed out that the immunization level was not as wide and large as we might have expected (mean of 3225 MFI value for the highest specificity/patient) and wide (mean of 3,3 antibodies/patient) except for one highly immunized patient (82 targeted epitopes with 3000 <MFI <21000).

We first looked at which IgG subclasses were detectable in non-refractory and refractory immunized patients (associated or not with non-immune factors). All the subclasses were found in both categories following the expected distribution found in the plasma (IgG1> IgG2 >IgG3> IgG4) (Figure 2A). Since the presence of non-immune factors could be a bias in the analysis, we then narrowed our analysis on patients presenting only antibodies without any other non-immune factors. Interestingly, we could only detect IgG1 in the non-refractory patients whereas all four IgG subclasses were found in refractory patients (Figure 2B).

Altogether, these data indicate that the distribution of IgG subclasses is distinct between refractory and non-refractory patients.

Anti-HLA-I antibodies activate platelets *in vitro*

In addition to their role as opsonins, anti-platelet antibodies can induce platelet activation and facilitate platelet clearance. We first assessed the ability of a refractory patient serum to activate platelets *in vitro* by incubating the serum of a highly alloimmunized patient, recognizing a wide range of HLA-I antigens, with HLA-phenotyped platelets carrying HLA-I epitopes recognized by the serum. Serum from an alloimmunized patient that did not have antibodies directed against these platelets was used as control. As measured by flow cytometry, highly specific alloimmunized patient's serum induced significant platelet activation compared to unspecific serum as measured by P-selectin (Figure 3A), Annexin V exposure (Figure 3B) and the binding of fluorescent C3b (Figure 3C). In addition, highly alloimmunized serum induced platelet aggregation in a dose dependent manner whereas the unspecific serum did not induce any aggregation (Figure 3D).

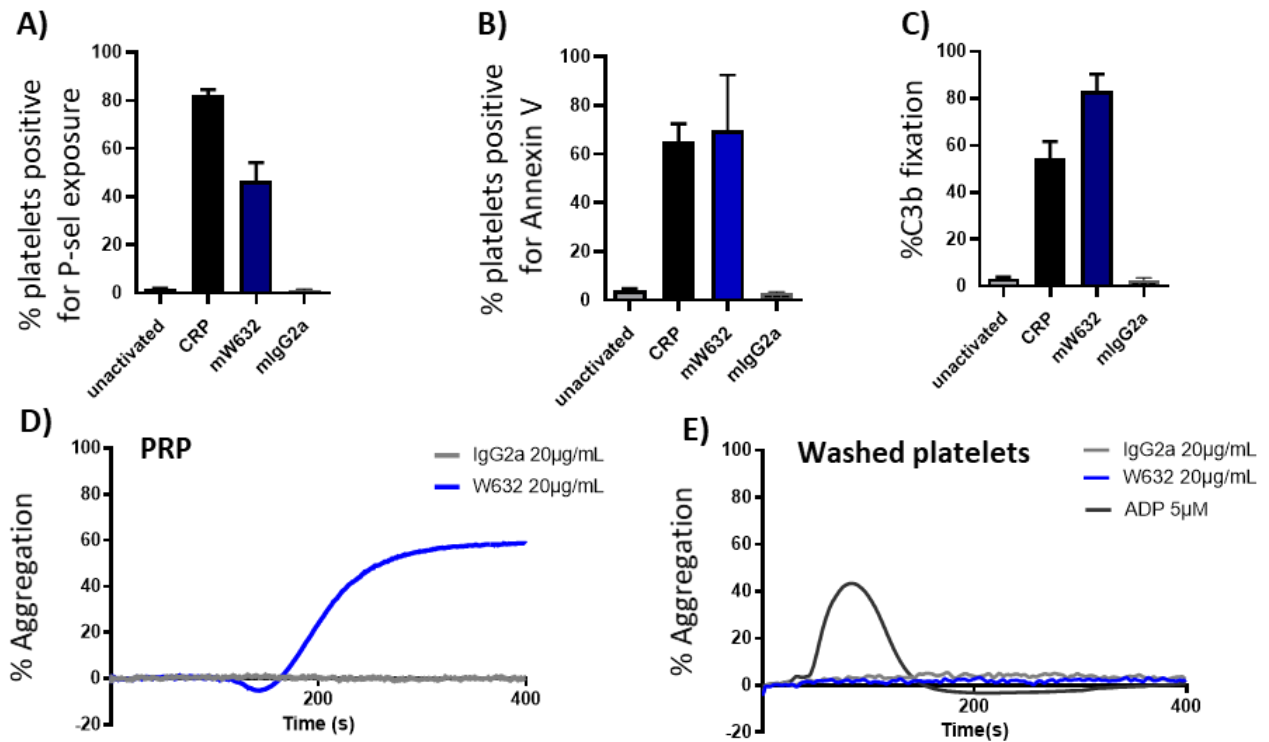


Figure 4: mW632 antibodies induce platelet activation in presence of plasma only

Hirudinated PRP was incubated with murine W6/32 (20 µg/mL) or the corresponding isotype (IgG2a). After 30min of incubation, platelet activation was analyzed by flow cytometry using activation markers such as (A) P-selectin exposure (P-sel), (B) Annexin-V binding and (C) C3b recruitment (n=3). The capacity of mW6/32 to induce platelet activation was also evaluated by aggregation test (D) with PRP (n=3) or (E) with washed platelets (n=2). ADP 5 µM was used as a positive control for washed platelets.

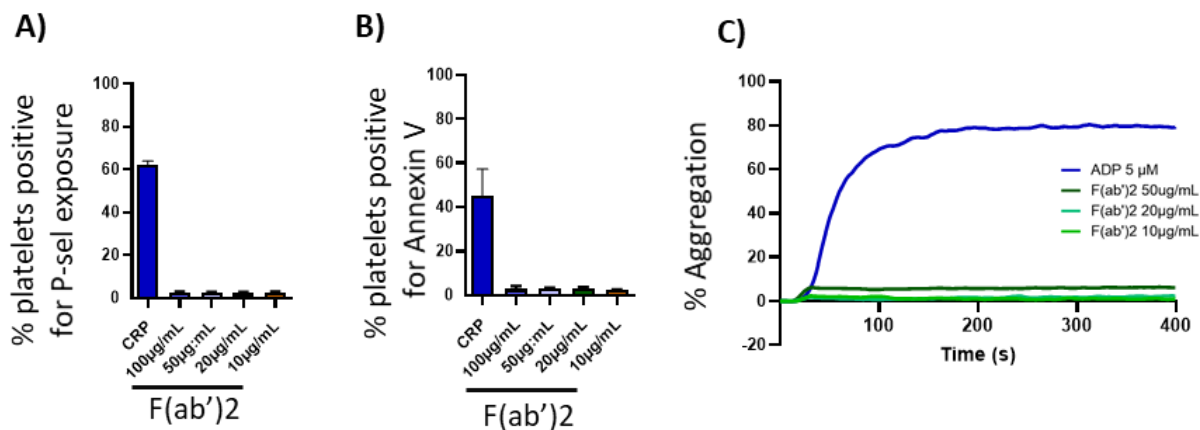


Figure 5: Fc part are necessary for platelet activation

Hirudinated PRP was incubated with W6/32-F(ab')₂ at different concentrations. After 30min of incubation, platelet activation was analyzed by flow cytometry using activation markers such as (A) P-selectin exposure (P-sel) and (B) Annexin-V binding (n=2). (C) The capacity of F(ab')₂ W6/32 to induce platelet activation was also evaluated by aggregation test in PRP (n=2).

In order to break down the polyclonal immune response and fully investigate the effects of anti-HLA-I antibodies, we then examined the impact of a murine IgG2a pan anti-human HLA-I monoclonal antibody (mW6/32) on platelet activation. mW6/32 mAb was incubated with hirudinized platelet-rich plasma (hPRP) and platelet activation was assessed by flow cytometry and aggregation assay. At 20 $\mu\text{g/mL}$, mW6/32 induced α -granule secretion as measured by P-sel exposure (Figure 4A) and phosphatidylserine exposure as revealed by fluorescent Annexin-V binding (Figure 4B). Under these conditions, 83% of platelets incubated with mW6/32 were positive for the C3b fragment, indicating complement recruitment to the cell surface (Figure 4C). Furthermore, while incubation of mW6/32 with PRP resulted in complete and irreversible platelet aggregation, consistent with the flow cytometry data (Figure 4D), no sign of activation was detected when washed platelets were used (Figure 4E), highlighting the importance of plasma components in mW6/32-mediated platelet activation.

To assess the importance of the Fc part in mW6/32-mediated platelet activation, we generated F(ab')_2 fragments from the trypsin digestion of mW6/32, and we checked their fixation on platelets by flow cytometry (SD1). Incubation of hPRP with F(ab')_2 -W6/32 (from 10 $\mu\text{g/mL}$ to 100 $\mu\text{g/mL}$) did not lead to platelet activation as shown by flow cytometry analysis (Figure 5A, 5B) and platelet aggregation (Figure 5C) indicating that the mW6/32-Fc part was required to induce platelet activation.

Taken together, these results showed that platelet activation mediated by the murine IgG2a pan anti-human HLA-I monoclonal antibody is Fc-dependent and requires the presence of plasma components.

IgG subclasses impact platelet activation

Given that different IgG subclasses have been found in the sera of the refractory and non-refractory patients, we wondered whether the type of IgG subclasses could influence platelet activation. We used recombinant chimeric antibodies composed of the VH/VL part of the murine pan anti-human HLA-I (W6/32) antibody and the human Fc part of IgG1, IgG2 or IgG3. hPRP was incubated with 10 $\mu\text{g/mL}$ of each recombinant chimeric antibody. All recombinant chimeric antibodies induced platelet activation as evidenced by P-selectin exposure and AnnV binding (Figure 6A, 6B) in a dose-dependent manner (SD2). Interestingly, we observed different activation level depending on the IgG subclasses. At the same

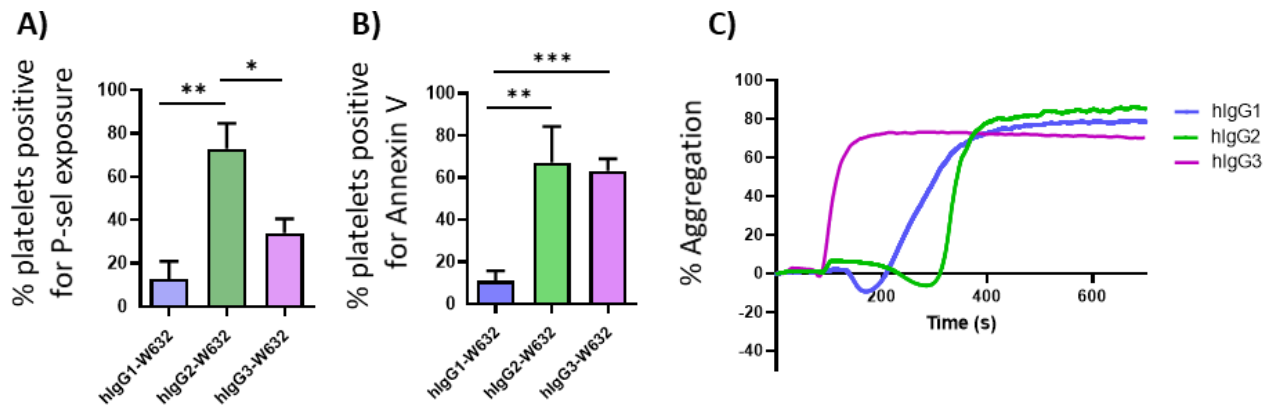


Figure 6: IgG subclasses impact platelet activation

(A, B) Hirudinized PRP was incubated with recombinant chimeric antibodies (hlgG1, hlgG2 and hlgG3, 10 μ g/mL). After 30min of incubation, platelet activation was analyzed by flow cytometry using activation markers such as (A) P-selectine exposure (P-sel) and (B) phosphatidylserine exposure using Annexin V. CRP (5 μ g/mL) was used as a positive control. (% $\pm$ SEM; **P<.01; *P<.05; 1-way ANOVA; n = 3) (C) The capacity of recombinant chimeric antibodies to induce platelet activation was also evaluated by aggregation test (n=2).

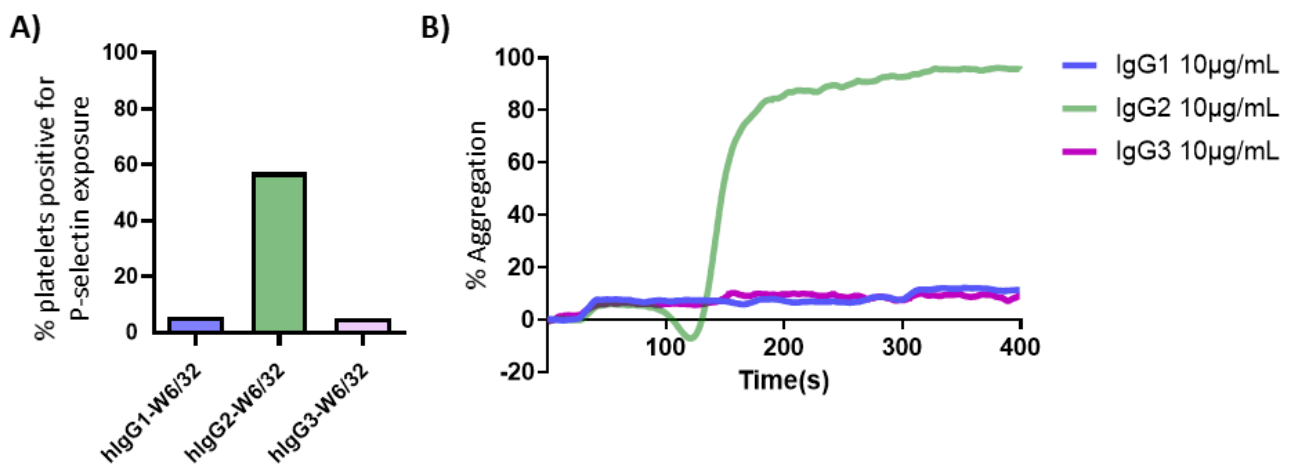


Figure 8: hlgG2 antibodies induce platelet activation in washed platelets

Washed platelets were incubated with recombinant chimeric antibodies (10 μ g/mL). (A) After 30min of incubation, platelet activation was analyzed by flow cytometry for P-selectine exposure (P-sel) (n=1). (B) The capacity of chimeric antibodies to induce washed platelet activation was also evaluated by aggregation test (n=1).

concentration, hIgG2-W6/32 induced a higher secretion of P-selectin than hIgG3-W6/32, while hIgG1-W6/32 was much less efficient to induce platelet activation, as measured by the different activation markers detected by flow cytometry (Figure 6A, 6B).

Consistently with the flow cytometry results, we observed that all subclasses induced a full aggregation of platelets at the same concentration (10µg/mL) (Figure 6C). However, the time lag between the addition of the agonist and the onset of aggregation was markedly longer for hIgG2 and hIgG1 than for hIgG3 (Figure 6C, SD3), suggesting that IgG subclasses may lead to platelet activation through different mechanisms.

hIgG1-/hIgG3-W6/32 and hIgG2- W6/32 activate platelets through different mechanisms

Depending on the antibody, CD32a mobilization or plasma complement recruitment have been reported as major players in HLA-I antibody-mediated platelet activation. Thus, we wondered if the difference in platelet activation between the subclasses could be due to different mechanisms of activation. We therefore assessed for each subclass the importance of both pathways by inhibiting either the CD32a or the complement pathway. CD32a mobilization was assessed by using IV.3, a monoclonal antibody directed against CD32a and, complement recruitment was evaluated by adding eculizumab, an antibody directed against C5 complement protein. As a positive control of IV.3 efficacy, platelets were stimulated with anti-CD9 antibodies, reported to strongly activate platelets in a CD32a-dependent pathway¹². As expected, anti-CD9 induced platelet activation was totally prevented in presence of IV.3 as shown by the levels of activation markers measured at platelet cell surface (SD4) and aggregation test (SD4).

Interestingly, as shown by activation markers as P-sel exposure (Figure 7A) and AnnV- binding (Figure 7B) analyzed by flow cytometry, platelet activation mediated by hIgG1 or hIgG3-W6/32 was not affected by the addition of IV.3 but totally prevented by Eculizumab. In contrast, activation induced by hIgG2-W6/32 was prevented by IV.3 but not affected by Eculizumab. Consistently, platelet aggregation induced by hIgG2-W6/32 was prevented by IV.3 but not by Eculizumab, which nevertheless induced a time lag between the addition of the agonist and the onset of aggregation. Also consistent with flow cytometry results, hIgG1- or hIgG3-W6/32-induced aggregation was prevented by Eculizumab but was not affected by IV.3 treatment (Figure 7C) suggesting that both IgG1 and IgG3 subclasses mediated activation is complement-dependent. To confirm the involvement of plasma component in the platelet activation mediated by IgG1 and IgG3 subclasses, we repeated the same experiments with washed platelets.

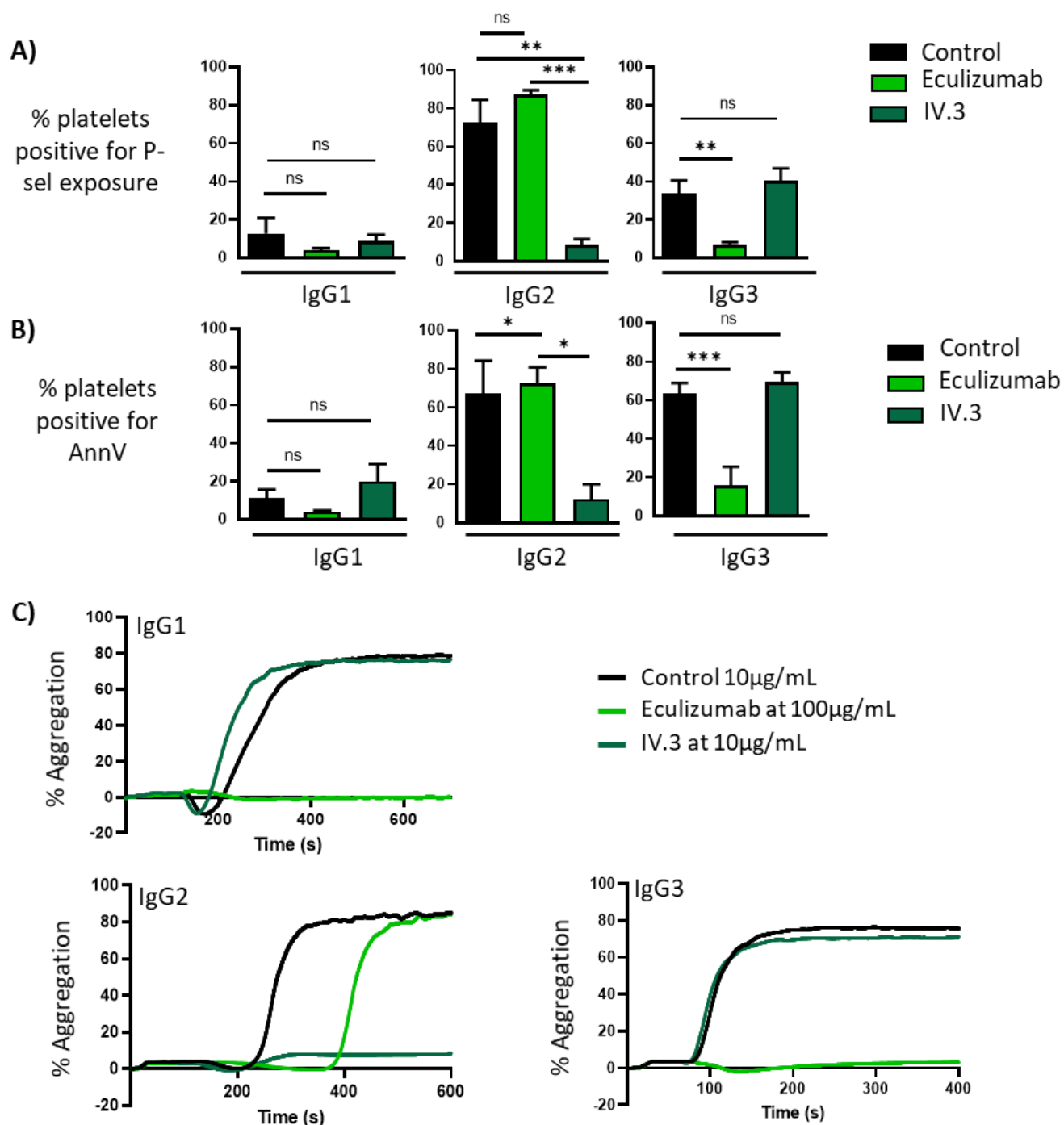


Figure 7: IgG subclasses impact platelet activation mechanism

Hirudinated PRP treated with eculizumab (100µg/mL, purple) or IV.3 (10µg/mL, green), or untreated (black) were incubated with recombinant chimeric antibodies hIgG1, hIgG2 and hIgG3 at 10 µg/mL. After 30min of incubation, platelet activation was analyzed for each subclass by flow cytometry using activation markers such as **(A)** P-selectine exposure and **(B)** phosphatidylserine exposure (Annexin V, AnnV). CRP (5µg/mL) was used as a positive control of platelet activation. (% $\pm$ SEM; ***P<.01 **P<.001; *P<.05; 1-way ANOVA; n=3)**(C)** The capacity of recombinant chimeric antibodies to induce platelet activation was also evaluated by aggregation test in untreated PRP, IV.3 treated PRP or Eculizumab treated PRP (n=2).

As shown in Figure 8, hIgG2-W6/32 but neither hIgG1- or hIgG3-W6/32 induced P-sel exposure and a complete aggregation of washed platelet. These results confirmed that IgG2-mediated platelet activation was due to CD32a mobilization and did not require complement recruitment, and highlighted the importance of complement to induce hIgG1- or hIgG3-W6/32 platelet activation.

Altogether, these results showed that IgG subclasses mediated platelet activation by different mechanisms: IgG1 and IgG3 via complement recruitment, IgG2 via CD32a mobilization.

DISCUSSION

Platelet transfusion refractoriness remains a major complication for patients with onco-hematological disorders. As such, there is currently no satisfactory solution for managing the multiple transfusions required to care for these patients. Understanding the mechanisms leading to the elimination of transfused platelets from the bloodstream is the first essential step to design future therapeutic strategies. In the present work, we reported a difference in the distribution of anti-HLA-I IgG subclasses in patients who developed PTR and those who did not. By further investigating the mechanisms of action of IgGs on platelets, we showed that anti-HLA-I antibodies were able to induce platelet activation and that the Fc region of the antibody was essential. Interestingly, different mechanism of platelet activation were involved according to the IgG subclass, with CD32a-dependent activation for IgG2a and with complement-dependent activation for both IgG1 and IgG3.

The data from the clinical study presented here highlighted the difficulty in diagnosing immune PTR and provide partial explanation for its underestimation. Among the 50 patients enrolled in our study and the 50 transfusions analyzed, transfusion failure was observed in 70 % of cases, underscoring the graveness of this complication. In addition, in this study, the immunization lever (antibody titer and number of specificity) appears to be quite low if we consider the MFI values obtained for IgG detection (mean number of specificities=3,3; mean MFI for the highest specificity: 3225), except for one highly immunized patient (82 specificities with MFI> 20000). Despite this observation, anti-HLA-I antibodies were considered as the only source of platelet consumption factors for 20% of transfusions. These data indicate that even with a low immunization, the anti-HLA-I antibodies should be detected and considered in the

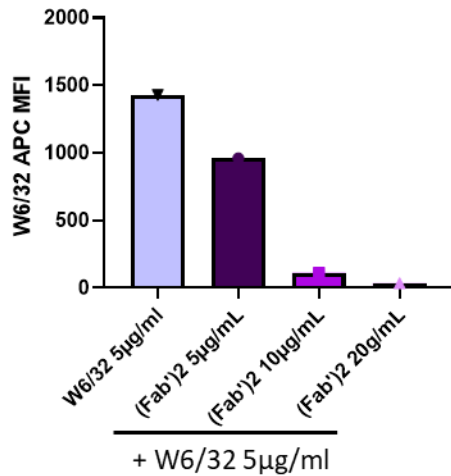
frame of patient transfusion support. Our results point to a different distribution of anti HLA-I-IgG subclasses among patients. However, the number of analyzed multi-transfused patients deserves to be increased to reach a more robust statistical significance. Increasing this number of patients should allow us to find a correlation between the IgG subclasses distribution and the probability of developing or not an immune PTR.

The distinct subclasses of anti-HLA-I IgG found in patients could differentially modulate platelet activation. Precisely, using chimeric antibodies, we found that each IgG subclass activated platelets to different extents, with IgG2 and IgG3 being more effective than IgG1. In addition, the activation mechanisms seem to differ since IgG1- and IgG3-induced activation depend on complement recruitment, whereas IgG2 activated platelets by mobilizing CD32a. It is well reported that alloimmunized patients have a polyclonal immune response toward various recognized epitopes, therefore these results need to be completed by chimeric antibodies directed against different epitopes to confirm the specificity of IgG2 action, as compared to IgG1 and IgG3. In a previous study, Rijkers et al. described that anti-HLA-I antibodies act synergistically to recruit the plasmatic complement factors which lead to platelet activation⁶. Here we showed that complement-dependent platelet activation is possible with only one epitope recognized. Our results do not exclude the fact that a polyclonal response favors a synergistic effect on platelet activation, but they do highlight the importance of considering the IgG subclasses, since depending on their affinities, complement-mediated activation would be possible without any synergistic effect.

All these data emphasize on the interest of knowing the characteristics of the antibodies found in multi-transfused patients sera. Determining the hierarchy of all antibodies' features which lead to a PTR would allow the transfusion impact of alloantibodies to be ranked. Thus, it could dictate which should be considered in the selection of platelet concentrates, and it become an essential resource in the design of future therapeutic strategies. Furthermore, a full understanding of the mechanisms of action of anti-HLA-I IgGs is essential to develop novel approaches to prevent or better manage PTR. We could envisage targeting the complement pathway or Fc receptors, depending on the predominant subclass found. A pilot study has already been carried out to assess the efficacy of Eculizumab in this context and 4 of the 10 patients had an improvement in their transfusion yield following this treatment. The results suggest it may help some patients to overcome PT¹³. Investigating the IgG subclasses found in these patients would help to explain the response, or the lack thereof, to this treatment. On the other hand, targeting the FcR could be the appropriate strategy when IgG2 are the most

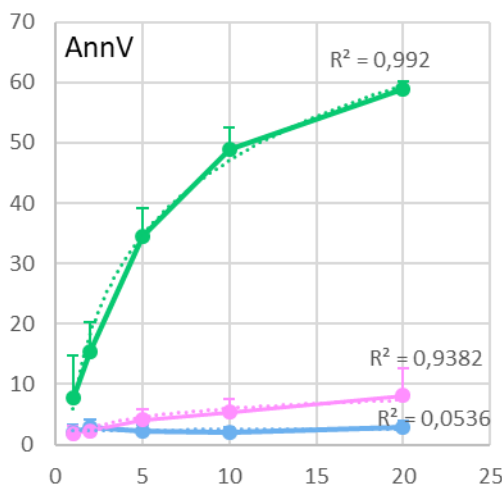
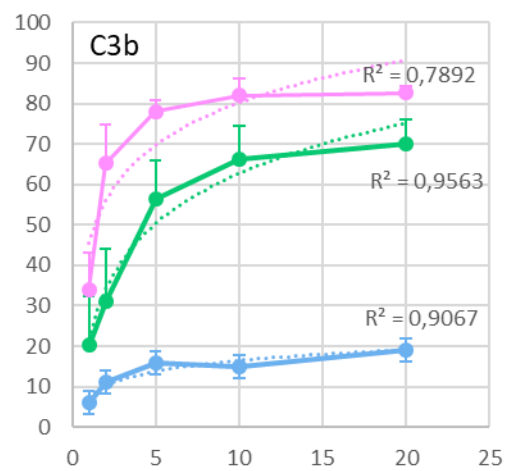
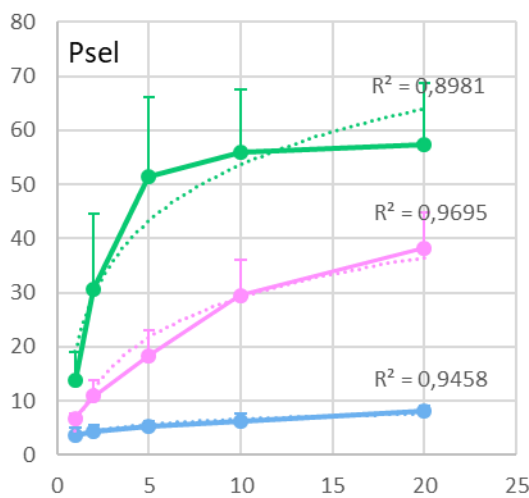
abundant IgG found in the patients. A clinical trial with a larger cohort should provide definitive conclusions concerning these different approaches. However, it is important to consider the high cost of these treatments today. They will not allow to treat all PTR, even if they prove to be effective, but only a handful of transfusion deadlocks.

In summary, this work identified IgG subclasses as a key factor to consider in the management of PTR patients. The distribution profile showed a presence of all IgG subclasses in refractory patients compared to only IgG1 found in non-refractory patients. In addition, chimeric antibodies directed against the same epitope suggest that the mechanism leading to platelet activation may be different depending on to the IgG subclasses. These observations may pave the way for new pharmacological tactics to alleviate PTR and may lead to innovation in the practice of personalized transfusion medicine.



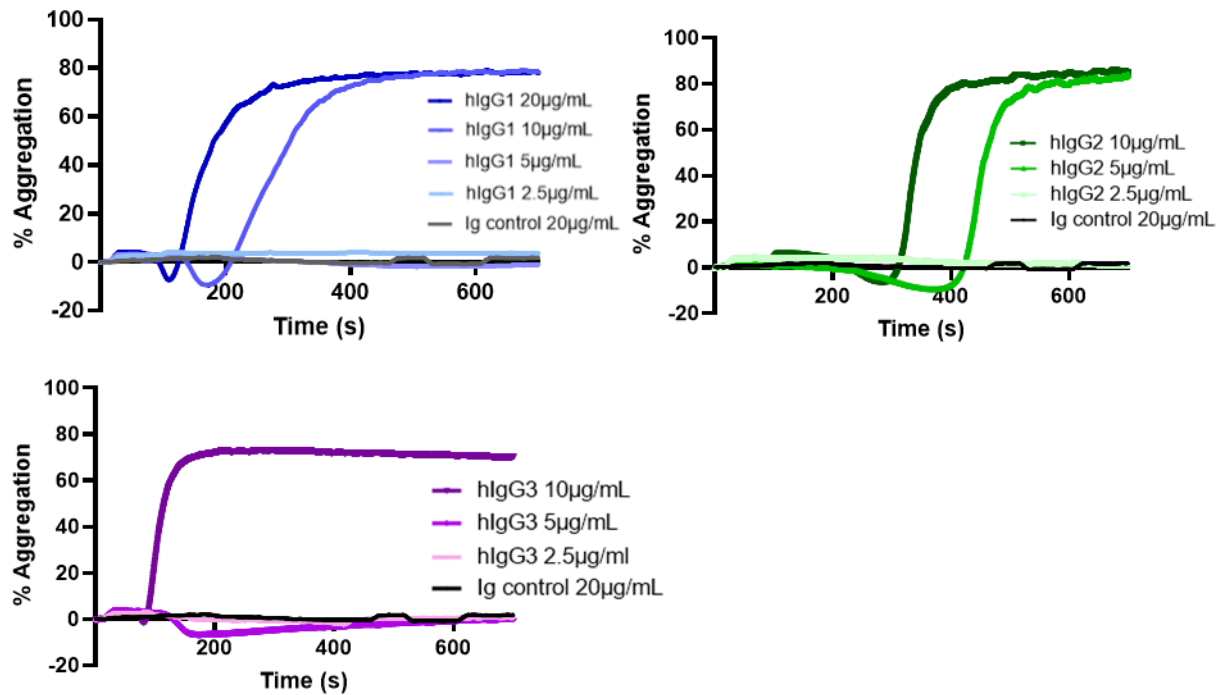
Supplemental data 1: (Fab')₂ fixation on platelets analyzed by flow cytometry

Hirudinated PRP was incubated with (Fab')₂ at different concentrations, washed and incubated with APC coupled W6/32 antibodies at 5µg/mL. MFI of W6/32-APC fixed on platelets (Ram 1+) was obtained by flow cytometry (n=1).



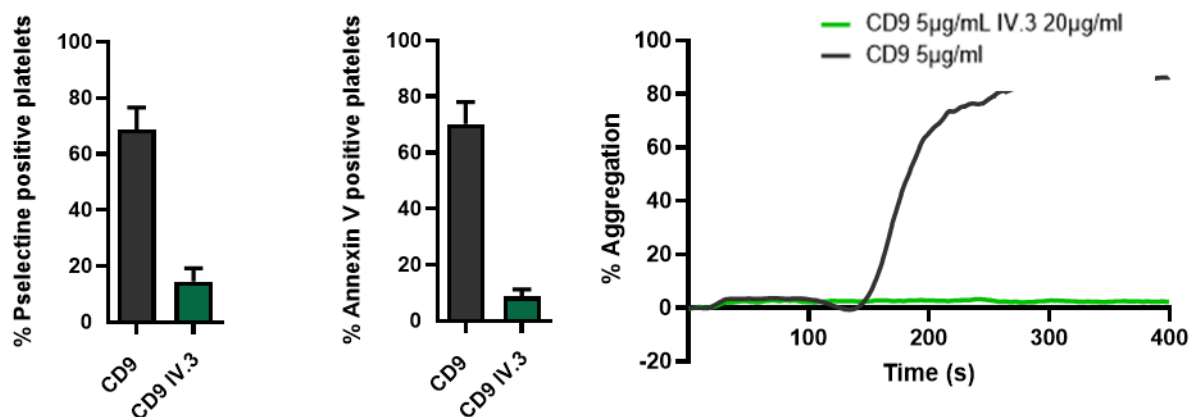
Supplemental data 2: Recombinant chimeric antibodies induce platelet activation in a dose dependent manner

Hirudinated PRP was incubated with recombinant chimeric antibodies at different concentrations. After 30 min of incubation, platelet activation was analyzed by flow cytometry using activation markers such as Pselectine exposure (Psel) (n=3), Annexin V (n=3-4) and C3b recruitment (n=2).



Supplemental data 3: Recombinant chimeric antibodies induce platelet aggregation in a dose dependent manner

The capacity of recombinant chimeric antibodies at different concentrations to induce platelet activation was evaluated by aggregation test (n=1-3).



Supplemental data 4: Effect on IV.3 on platelet activation mediated by anti-CD9 antibodies

Hirudinized PRP was incubated with anti-CD9 antibodies +/- IV.3, a CD32a inhibitor at 20 µg/mL. Effect of IV.3 was evaluated by flow cytometry using activation markers such as P-selectin exposure (P-sel) and Annexin V or by aggregation test (n=3).

Bibliography

1. Humbrecht C, Kientz D, Gachet C. Platelet transfusion: Current challenges. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2018;25(3):151–164.
2. Saris A, Pavenski K. Human Leukocyte Antigen Alloimmunization and Alloimmune Platelet Refractoriness. *Transfusion Medicine Reviews*. 2020;34(4):250–257.
3. Couvidou A, Rojas-Jiménez G, Dupuis A, Maître B. Anti-HLA Class I alloantibodies in platelet transfusion refractoriness: From mechanisms and determinants to therapeutic prospects. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:.
4. Jackman RP, Deng X, Bolgiano D, et al. Low-level HLA antibodies do not predict platelet transfusion failure in TRAP study participants. *Blood*. 2013;121(16):3261–3266; quiz 3299.
5. Saris A, Tomson B, Brand A, et al. Platelets from donors with consistently low HLA-B8, -B12, or -B35 expression do not undergo antibody-mediated internalization. *Blood*. 2018;131(1):144–152.
6. Rijkers M, Schmidt D, Lu N, et al. Anti-HLA antibodies with complementary and synergistic interaction geometries promote classical complement activation on platelets. *Haematologica*. 2019;104(2):403–416.
7. Rijkers M, Saris A, Heidt S, et al. A subset of anti-HLA antibodies induces FcγRIIa-dependent platelet activation. *Haematologica*. 2018;103(10):1741–1752.
8. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:.
9. Coetzee L-M, Pieters H, Wyk V van, et al. The Effect of Monoclonal Anti-human-platelet Antibodies on Platelet Kinetics in a Baboon Model: IgG Subclass Dependency. *Thromb Haemost*. 2000;83(1):148–156.
10. Cazenave J-P, Ohlmann P, Cassel D, et al. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*. 2004;272:13–28.
11. Hechler B, Dupuis A, Mangin PH, Gachet C. Platelet preparation for function testing in the laboratory and clinic: Historical and practical aspects. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2019;3(4):615–625.
12. Worthington RE, Carroll RC, Boucheix C. Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the FCγII receptor. *British Journal of Haematology*. 1990;74(2):216–222.
13. Vo P, Purev E, West KA, et al. A pilot trial of complement inhibition using eculizumab to overcome platelet transfusion refractoriness in human leukocyte antigen allo-immunized patients. *British Journal of Haematology*. 2020;189(3):551–558.

D) CONCLUSION

L'étude clinique sur des patients nécessitant un soutien transfusionnel important en lien avec l'institut de cancérologie de Strasbourg a permis de démontrer une sous-estimation importante de l'état réfractaire immunologique : Parmi les 50 patients enrôlés et les 50 transfusions analysées, un état réfractaire d'origine immunitaire a été observé dans 20% des cas alors que l'incidence des ERTF rapportée par le système national de santé français varie de 0,51 à 0,33% en fonction des concentrés plaquettaires transfusés (rapport d'hémovigilance 2022). Cette sous-estimation s'explique principalement par deux critères de diagnostic présents dans la définition officielle de l'état réfractaire en France, qui semblent totalement incompatibles avec les pratiques cliniques actuelles :

- En France uniquement, les critères de diagnostic d'un état réfractaire indiquent que le CP doit dater de moins de 3 jours, être compatible sur le système ABO avec le receveur et ayant une QPA adaptée au poids du patient. Cependant, les contraintes de logistique empêchent la délivrance de concentrés plaquettaires frais notamment la préparation des MCP et l'inactivation des pathogènes. Chaque MCP est centrifugé et les couches leucoplaquettaires sont mélangées le lendemain du prélèvement puis les poches sont inactivées par traitement amotosalène. Ce procédé est constitué de 3 étapes: l'ajout de l'amotosalène et l'illumination aux UV-A qui ne prennent qu'une dizaine de minutes puis l'élimination de l'agent intercalant qui nécessite à minima 6 heures mais qui est généralement réalisée durant une nuit complète. Ce traitement des poches empêche donc la délivrance des CP avant la fin du 2^{ème} jour de conservation. Ce critère de diagnostic est trop stringant et entraîne une sous-estimation importante de l'incidence des états réfractaires d'origine immunologique.
- Une autre condition pour diagnostiquer un état réfractaire d'origine immunologique est la détection chez le patient d'anticorps anti-HLA or les tests de détection de ces anticorps ne sont que très peu réalisés en routine. Cela se justifie par le fait que la présence d'alloanticorps n'est pas forcément liée au développement d'un état réfractaire, la pertinence de détecter les anticorps anti-HLA-I chez un patient n'est donc pas avérée pour les onco-hématologues.

Cette étude clinique nous a également permis d'analyser les alloanticorps présents chez les patients alloimmunisés. Nous avons ainsi pu comparer les anticorps retrouvés chez les patients alloimmunisés en état réfractaire par rapport à ceux retrouvés chez les patients alloimmunisés qui ne développent pas d'état réfractaire. Ayant pour objectif d'identifier les caractéristiques des anticorps importantes pour leur pathogénicité, nous avons comparé les sous classe des anticorps anti-HLA-I entre ces deux

groupes de patients. Les résultats montrent une distribution des sous classes d'IgG différente entre les deux groupes avec des IgG2 et des IgG3 surreprésentés chez les patients en état réfractaire.

Afin d'identifier comment les anticorps anti-HLA-I entraînent l'élimination des plaquettes et quelle était l'importance relative des sous-classes dans ce mécanisme, nous avons étudié l'effet d'anticorps monoclonaux pan HLA-I incubés *in vitro* avec des plaquettes. Les différents anticorps utilisés possèdent le même épitope mais diffèrent au niveau de la sous classe. Dans la littérature, il est décrit que certains anticorps anti-HLA-I sont capables d'activer les plaquettes or les mécanismes précis n'ont pas été élucidés. Nos résultats montrent que les anticorps anti-HLA-I entraînent une activation des plaquettes médiée par la partie Fc. De manière intéressante, la sous classe de l'anticorps anti-HLA-I impacte l'activation des plaquettes. A la même concentration, l'IgG2 active plus fortement les plaquettes que l'IgG3 et que l'IgG1. Grâce à l'utilisation d'inhibiteur spécifique du complément, l'Eculizumab et du récepteur FcγRIIA, le IV.3, nous avons identifié que le mécanisme d'action diffère en fonction de la sous classe impliquée. L'IgG2 entraîne une activation CD32a dépendante alors que l'IgG1 et l'IgG3 entraîne une activation dépendante du complément.

De manière surprenante, l'inhibition du complément durant l'incubation de l'IgG3 et de l'IgG1 avec les plaquettes entraîne une absence totale d'activation de ces dernières or ces sous classes ont une grande affinité pour le récepteur FcγRIIA. Nous pourrions ainsi penser que si ces anticorps ne recrutent pas le complément, ils activent les plaquettes de manière Fc dépendante. En effet, les mécanismes d'activation Fc dépendant et complément dépendant ont été décrits par Rijkers comme synergiques. Nos résultats montrent plutôt un mécanisme unique en fonction de la sous classe impliquée. La raison réside peut-être dans d'autres paramètres, tels que l'épitope reconnu par les anticorps ou la glycosylation de la chaîne glycanique qui induit des changements d'affinité pour les récepteurs Fc. D'autres expériences seront nécessaires afin d'étudier l'importance de ces paramètres pour la pathogénicité des anticorps anti-HLA-I.

L'intérêt de notre étude est de faire la distinction entre les anticorps anti-HLA-I délétères et permissifs pour les transfusions afin de permettre le choix d'un produit transfusionnel adapté tout en élargissant le nombre de donneurs compatibles. Le nombre de patients HLA compatibles, facteur souvent limitant dans un contexte clinique, serait en effet plus élevé lorsque toutes les spécificités des anticorps ne sont pas prises en compte pour le phénotype du donneur compatible. Il est donc nécessaire d'identifier les anticorps délétères pour les transfusions, rendant ainsi la détection des anticorps plus pertinente.

DISCUSSION GENERALE

La transfusion est un élément central de la prise en charge des patients comme l'illustre les 2 750 517 transfusions de PSL réalisés dans l'année 2021 (Rapport d'hémovigilance décembre 2022 – ANSM). Mes travaux de thèse portent sur la transfusion plaquettaire et ses complications post-transfusionnelles.

Apports et limites des travaux de recherche

Limites du modèle murin d'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle

- La thrombopénie

Dans notre étude, le modèle murin utilisé reproduit la différence de compatibilité que l'on retrouve entre un donneur et un receveur au niveau des molécules du CMH de classe I. Cependant, ce modèle pourrait être amélioré en mimant le contexte de thrombopénie dans lequel les patients reçoivent une transfusion. En effet, une transfusion, qu'elle soit curative ou prophylactique, est réalisée dans le but de restaurer ou de maintenir une numération plaquettaire suffisante pour assurer l'hémostase. Dans le modèle murin actuellement utilisé au laboratoire, les souris receveuses ont une numération plaquettaire normale contrairement aux patients dont la thrombopénie sévère justifie la transfusion. Ainsi, notre modèle murin pourrait être amélioré en transfusant une souris receveuse thrombopénique. Nous avons au laboratoire des souris transgéniques exprimant le récepteur à la toxine diphtérique (DT) sous le promoteur PF4 (modèle iDTR). Des injections journalières de toxine diphtérique dans ces souris pendant 4 jours provoquent une élimination des mégacaryocytes avec pour conséquence une thrombopénie sévère (Figure 1, Angénieux et al. 2016). Nous pourrions ainsi transfuser ces souris rendues thrombopéniques et calculer un rendement post-transfusionnel équivalent au calcul fait chez un patient. Ce modèle mériterait d'être développé afin de savoir si la prise en charge et l'élimination des plaquettes dans un tel contexte pourrait être différente du modèle actuel. En effet, nous pouvons par exemple penser que la détection des plaquettes transfusées survient de manière plus régulière lorsqu'elles ne sont pas diluées dans le flux sanguin parmi les plaquettes endogènes. Ce modèle pourrait être intéressant pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- Les pathologies sous-jacentes

Outre la thrombopénie qui est à l'origine de la décision de réaliser une transfusion, les différentes causes de ces thrombopénies sont des facteurs à prendre en compte dans la réponse immune du receveur suite à une transfusion plaquettaire. Les chimiothérapies aplasiantes sont, par exemple, à l'origine de thrombopénies centrales mais également de leucopénies sévères. Malgré cette immunodéficience transitoire pendant laquelle les patients sont transfusés, on observe tout de même

une réponse immune telle que l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. Une hypothèse est que le taux de lymphocytes circulants diminue progressivement au cours du protocole aplasiant mais pourrait être suffisant durant une partie du traitement pour induire une réponse alloimmune.

Hormis la leucopénie, la pathologie initiale notamment les cancers et/ou les chimiothérapies impactent également les fonctions des cellules immunitaires. Les effets secondaires des chimiothérapies sur les cellules immunitaires dépendent des molécules utilisées. Ces molécules cytotoxiques peuvent impactées le système immunitaire en augmentant par exemple la cross présentation (Gemcitabine) ou l'activation des lymphocytes T (anthracyclines) (Zitvogel et al., 2008). Afin de mimer ce qui se passe chez l'Homme, il serait intéressant de développer un modèle de souris traitées par chimiothérapie aplasiant. Ce modèle permettrait de reproduire la nécessité d'un support transfusionnel important chez des souris thrombopéniques, tout en intégrant l'impact des molécules de chimiothérapies sur le système immunitaire du receveur.

Le FTY720 pourrait-il être utilisé en clinique pour prévenir les alloimmunisations ?

Mes travaux suggèrent d'utiliser le FTY720 (Fingolimod) pour diminuer la réponse allo-immune anti-plaquettaire et l'état réfractaire associé. Nous nous posons donc légitimement la question de savoir si ces observations pourraient être transposées chez l'Homme. Le Fingolimod est un médicament approuvé par l'ANSM et est utilisé dans le traitement des scléroses en plaques récurrentes car il permet de bloquer les lymphocytes à l'intérieur des ganglions lymphatiques évitant ainsi leur infiltration à travers la barrière hémato-encéphalique et la moelle épinière. Maintenir les lymphocytes notamment les LT CD8⁺ dans les ganglions permet ainsi de limiter les lésions induites par ces derniers (Chun and Hartung, 2010). Cette propriété lymphopénisante transitoire pourrait être détournée pour limiter l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle. En effet, dans le cas où le traitement d'un patient nécessite un support transfusionnel important, une injection la veille de la transfusion permettrait le maintien de tous les lymphocytes dans les ganglions lymphatiques, limitant ainsi la détection des alloantigènes et l'alloimmunisation associée. L'immunodéficience induite par le FTY720 est transitoire avec un retour des leucocytes dans la circulation attendu 2 mois après la fin du traitement. Ce délai est largement suffisant pour transfuser un patient à plusieurs reprises sans engendrer d'alloimmunisation.

Dans le modèle murin d'alloimmunisation, le FTY720 a entraîné une relocalisation des MZB de la zone marginale au follicule B. Si on ne peut pas exclure un rôle des autres lymphocytes, supposément retenus dans les ganglions après traitement FTY720, la relocalisation des MZB permet qu'elles ne

soient plus idéalement situées pour capter les antigènes sanguins et pour initier une réponse alloimmune. Comme précisé dans l'introduction, une des différences majeures entre les MZB humaines et murines sont leurs localisations. Les MZB humaines sont situées dans la rate et sont circulantes alors que les murines sont localisées uniquement dans la zone marginale. L'avantage du FTY720 est qu'il agit en systémique, empêchant la sortie des ganglions de tous les lymphocytes y compris les MZB humaines circulantes, limitant ainsi la détection des alloantigènes par ces cellules. Ainsi, le traitement FTY720 permettrait de limiter les risques d'alloimmunisation et les complications liées à l'état réfractaire associé si les lymphocytes sont les cellules à l'origine de cette réponse immune. Ce traitement présente néanmoins des effets secondaires importants. Si ce traitement affecte principalement la circulation des lymphocytes, il peut également interférer avec leurs fonctions : il entraîne par exemple une modification des capacités immunostimulatoires des DC *in vitro* (Müller et al., 2005). Cette altération du système immunitaire peut être incompatible avec les traitements déjà mis en place chez le patient, empêchant son administration en fonction du contexte clinique. De plus, parmi les effets secondaires fréquents, on retrouve l'apparition de cancer cutanés de type carcinome basocellulaire, une bradycardie, ainsi que la dépression et l'anxiété (ANSM – Fingolimod Biogaran Notice).

Ainsi, l'utilisation de FTY720 pourrait dépendre de certaines caractéristiques du patient et du contexte physiopathologique. Pour les patients sous chimiothérapie aplasante, le taux de lymphocytes circulants diminue au cours du traitement. Le traitement FTY720 serait donc pertinent uniquement pour les patients ayant encore des leucocytes en circulation soit en début de traitement aplasiant. Un seuil d'indication de traitement FTY720 en fonction des leucocytes pourrait être défini avec les médecins.

Selon la littérature et nos résultats, les anticorps anti-HLA-I entraînent l'activation des plaquettes. Quel est le lien entre activation et élimination ?

Nos derniers résultats indiquent que les anticorps anti-HLA-I activent les plaquettes, cependant le lien entre élimination et activation n'est pas encore établi. Une hypothèse est que les plaquettes activées recruteraient le complément, ce qui faciliterait la reconnaissance des plaquettes ciblées par les macrophages du système réticulo-endothélial et leur élimination, potentiellement par phagocytose. L'activation des plaquettes par les anticorps anti-HLA-I pourrait également entraîner la désialylation des plaquettes puisque lors du processus de sécrétion, les plaquettes activées relarguent des neuraminidases, à l'origine de l'élimination de l'acide sialique (Li et al., 2015). L'élimination de l'acide sialique, également médiée par les anticorps anti-GPIIb, entraîne la reconnaissance des plaquettes désialylées dans le foie par les récepteurs Ashwell-Morell. Pour étudier ce lien, nous avons mis en

place un modèle murin d'état réfractaire (Couvidou et al., 2022). Ce dernier nous permet de suivre l'élimination des plaquettes transfusées de la circulation d'une souris alloimmunisée. Grâce à un marquage des plaquettes avant la transfusion, nous pouvons également identifier l'organe d'élimination des plaquettes dans la souris receveuse. Identifier l'organe nous apportera des pistes quant aux mécanismes d'élimination impliqués : Une élimination des plaquettes transfusées dans la rate oriente vers un rôle des macrophages après opsonisation des plaquettes par les anticorps ou possiblement après activation par les anticorps et fixation du complément alors que la présence des plaquettes transfusées dans le foie indiquerait un processus lié à une désialylation (Deppermann et al., 2020). L'importance relative de la désialylation dans l'élimination des plaquettes sera déterminée par traitement des souris receveuses avec un inhibiteur de sialidase, le DANA (Li et al., 2015). Ce traitement empêchera donc la désialylation des plaquettes et par conséquent leur reconnaissance par les cellules de Kupffer. Pour étudier l'impact du complément dans l'élimination des plaquettes, plusieurs inhibiteurs peuvent être utilisés avec chacun leur spécificité. Le Sutimlimab, ou son correspondant chez la souris le TNT003, est un inhibiteur sélectif de la voie classique du complément. Cet anticorps, qui n'a été décrit qu'*in vitro*, cible les protéines C1s et n'impacte donc pas les voies des lectines et alterne du complément (Shi et al., 2014). Le Narsoplimab (anticorps HG4 pour la souris), cible lui la sérine protéase-2 associée aux lectines de liaison aux mannanes (MASP-2), spécifique à la voie des lectines du complément (Ali et al., 2023). Le Vemircopan inhibe les facteurs D du complément, impliqué uniquement dans la voie alterne du complément. Les trois voies du complément peuvent cependant agir en synergie, par conséquent, l'utilisation d'inhibiteurs qui ciblent des éléments communs aux trois voies pourrait être utile. C'est le cas pour l'Eculizumab, un anticorps anti-C5 ou le Pegcetacoplan, un anticorps anti-C3, des inhibiteurs qui empêchent la formation du complexe d'attaque membranaire (Pogossian et al., 2022). Utiliser cette palette d'inhibiteurs permettrait donc d'étudier le rôle du complément dans l'élimination des plaquettes et plus précisément l'importance relative des 3 voies d'activation.

Bien que le lien entre élimination des plaquettes et activation par les anticorps anti-HLA-I n'est pas documenté, le phénomène d'activation observé *in vitro* pourrait laisser penser qu'*in vivo*, les anticorps anti-HLA-I entraînent des thromboses comme pour d'autres pathologies telles que la thrombopénie induite par l'héparine (Rollin et al., 2022). Dans cette pathologie, les anticorps anti-héparine entraînent une activation *in vitro* des plaquettes en cohérence avec un des symptômes du HIT : la survenue de thrombose. Les CIVD ou les thromboses ne sont pas rapportés chez les patients en état réfractaire, ce qui s'explique peut-être par un nombre de plaquettes circulantes extrêmement bas, trop faible pour initier des thromboses malgré l'activation. Ainsi, des expériences complémentaires seront nécessaires pour identifier précisément le lien entre activation et élimination des plaquettes transfusées.

Discussion sur les pratiques transfusionnelles en France

La transfusion de CP HLA compatibles en prévention peut-elle être une solution optimale pour diminuer l’alloimmunisation et l’ERTP associé ?

Selon notre étude clinique, l’incidence de l’état réfractaire (toutes origines confondues) suite à la transfusion de CP semble largement sous-estimée : l’ERTP concerne 75% des épisodes transfusionnels selon l’étude ACERTP, alors que les ERTP ne sont déclarés via le réseau d’hémovigilance que pour 51 EIR pour 100 000 CPA cédés et 33,7 pour 100 000 MCPS cédés, Rapport d’hémovigilance décembre 2022 - ANSM. Ces effets secondaires de la transfusion sont principalement dus à l’incompatibilité HLA entre le donneur et le receveur (73% des ERTP décrits en 2022 – Rapport d’hémovigilance 2022). Il est cependant important de faire la distinction entre état réfractaire et complications hémorragiques : dans l’étude ACERTP, les complications hémorragiques surviennent de manière égale entre les patients en état réfractaire et ceux qui ne le sont pas.

Diminuer la survenue de l’alloimmunisation et l’état réfractaire associé pourrait reposer sur la transfusion de concentrés plaquettaires HLA compatibles en première intention, lorsque le patient commence un traitement vierge de toute immunisation, ou en seconde intention, chez les patients déjà immunisés, pour éviter d’élargir le répertoire de l’immunisation. Plusieurs éléments sont en défaveur de cette proposition. Premièrement, transfuser en HLA compatible signifie la transfusion de CPA uniquement : or le nombre de CPA produits est largement inférieur à celui des MCPs (ratio 30%/70% au niveau national). Les raisons de la baisse continue de la proportion de CPA dans la production française de CP sont multiples. La première concerne l’augmentation d’un facteur 2 du besoin en transfusion de CP, liée au vieillissement de la population et à l’allongement de l’espérance de vie sous chimiothérapie des patients cancéreux. Il aurait été impossible d’accompagner de doublement des besoins entre 2000 et 2020 sans l’augmentation de la part de MCP dans la production. Par ailleurs depuis 2011, dans l’objectif de réduire le risque de TRALI immunologique, les CPA proviennent exclusivement de donneurs masculins, de femmes nullipares ou enfin de femmes ayant eu des enfants, mais dont le test de recherche d’anticorps anti-HLA de classe I et II est négatif, limitant ainsi les candidats éligibles aux dons de CPA (recommandations HAS 2022). Il est également plus difficile de recruter des donneurs pour des dons d’aphérèse puisque ces derniers durent en moyenne 90 minutes contre une quinzaine de minute pour le don de sang total, et qu’ils ne sont accessibles que dans des maisons du don, là où le don de sang total est possible en collecte mobile. De plus, les contraintes de production des MCP sont moindres par rapport aux CPA et sont surtout moins

coûteuses (coût de fabrication inférieur de 100 euros en moyenne pour un MCP par rapport à un CPA). Les cas de TRALI et d'allergies surviennent également un peu plus fréquemment après la transfusion de CPA (8.9 pour 100 000) par rapport aux MCPs (5 pour 100 000) (données 2016 à 2021, Rapport hémovigilance ANSM 2022). Ceci s'expliquerait par une concentration plus élevée de certains allergènes plasmatiques, souvent non identifiés, dans un CPA alors que ces derniers seraient dilués dans les MCP. De plus, seuls 10% des donneurs sont phénotypés HLA, limitant mécaniquement le stock de CPA phénotypés. Ceci s'explique par le fait que certains établissements régionaux de transfusion ne disposent pas de laboratoire d'histocompatibilité en mesure de phénotyper des donneurs, et l'absence de financement de la filière par la biais d'une majoration du tarif réglementé de cession des plaquettes, inexistante en 2023. Enfin, trouver une compatibilité entre un donneur et un receveur, organiser le prélèvement ainsi que le traitement et l'acheminement des poches représente une logistique lourde, avec un besoin humain et matériel important, non applicable en cas d'urgence transfusionnelle.

Faut-il réaliser une détection d'anticorps anti-HLA de classe I de façon systématique?

Ces derniers éléments de discussions amènent à d'autres questionnements sur le système transfusionnel en France notamment sur la rareté de la recherche d'anticorps anti-HLA-I chez les patients. Malgré les recommandations officielles de l'HAS et de l'ANSM conseillant une recherche d'anticorps anti-HLA-I en cas d'aplasie longue nécessitant un support transfusionnel répété en plaquettes ou les greffes de CSH chez les patients à risque d'alloimmunisation préalable (femmes ayant des antécédents obstétricaux), chez les sujets préalablement transfusés et en cas de mauvais rendement transfusionnel (HAS – recommandation de bonne pratique / transfusions de plaquettes 2015), les recherches d'anticorps anti-HLA-I dans un contexte transfusionnel sont anecdotiques dans certaines équipes d'hématologie.

En théorie, détecter les alloanticorps permettrait d'adapter le choix du produit transfusionnel et ainsi d'éviter les risques d'état réfractaire secondaire malgré une alloimmunisation. En pratique, ces tests sont difficiles à inscrire dans les protocoles de soins routiniers car ils nécessitent l'analyse d'échantillons sanguins par un laboratoire d'histocompatibilité et non par l'établissement hospitalier. Ces procédures alourdissent donc la logistique de la prise en charge du patient. De plus, certains laboratoires d'histocompatibilité sont au sein de l'EFS, d'autres dans des CHU. Lorsque les résultats d'anticorps anti-HLA proviennent de laboratoires hospitaliers, ils ne sont pas disponibles informatiquement dans les bases de données transfusionnelles de l'EFS. La communication pour la recherche de CPA HLA compatibles en stock, ou la recherche de donneurs compatibles, est particulièrement laborieuse dans ce cas.

A cela s'ajoute la question de la pertinence même de la recherche d'anticorps anti-HLA-I au diagnostic. Premièrement, il n'y a pas de standardisation inter-laboratoire des seuils de positivité des anticorps anti-HLA : chaque établissement réalisant des tests de détection anti-HLA de classe I possède ses propres seuils de positivité et donc une interprétation propre du profil d'anticorps obtenu par Luminex. Ainsi, un anticorps sera considéré comme délétère dans le choix du produit transfusionnel dans un établissement alors qu'il ne sera pas dans un autre. De plus, il n'y a pas de corrélation entre la présence des alloanticorps et l'état réfractaire puisque de nombreux patients alloimmunisés ne développent pas d'état réfractaire (Etude TRAP, 1999). Aussi, dans l'état actuel de nos connaissances, il nous est impossible d'identifier les anticorps pathogéniques chez un patient alloimmunisé. Le choix du produit transfusionnel se fait donc de manière la plus restrictive possible, limitant ainsi la disponibilité de donneurs compatibles. D'autres facteurs que la présence d'alloanticorps peuvent être déterminants dans le développement d'un état réfractaire. Selon l'anticorps anti-HLA-I impliqué dans l'état réfractaire, le mécanisme d'élimination des plaquettes peut varier mobilisant soit le complément, soit les récepteurs CD32a. Dans ces situations, la capacité d'un anticorps à activer les plaquettes pourrait également dépendre de la dose de complément circulante chez le patient ou encore du nombre de site HLA-I exprimé à la surface des plaquettes transfusées. Ces paramètres sont, pour l'heure, non pris en compte, ce qui empêche de définir des caractéristiques universelles permettant de confirmer la pathogénicité d'un anticorps.

Ainsi, la détection des anticorps ne peut, à l'heure actuelle, être considérée comme médicalement pertinente que lorsque des mauvais rendements transfusionnels répétés sont constatés. Dans cette dynamique, identifier des facteurs clefs d'immunogénicité tels que les sous classes d'IgG permettrait d'améliorer les stratégies transfusionnelles pour ces patients alloimmunisés.

Faut-il cibler l'antigène ou l'anticorps en cas d'état réfractaire immunologique ?

L'état réfractaire résulte de différentes étapes : de l'entrée de l'alloantigène dans la circulation, à la détection et l'élimination des plaquettes par les alloanticorps et la réponse cellulaire associée. Ces différentes étapes constituent des pistes distinctes pour le développement d'axe thérapeutique afin de prévenir l'état réfractaire immunologique mais quelle étape constitue la cible la plus pertinente ? Faut-il cibler les antigènes plaquettaires, les anticorps ou les mécanismes d'actions de ces derniers ?

Détaillées dans la partie III. 4) de l'introduction, plusieurs pistes thérapeutiques sont actuellement en développement pour cibler les antigènes à la surface des plaquettes, telles que les plaquettes produites *in vitro*, dites plaquettes de cultures, génétiquement modifiées pour qu'elles n'expriment

plus les molécules HLA-I et/ou HPA. A ce jour, un unique essai clinique a été réalisé à partir de plaquettes produites *in vitro* dérivées de cellules souches pluripotentes induites. La patiente transfusée avec des plaquettes de cultures était réfractaire aux transfusions de plaquettes suite à la présence d'un anticorps anti-HPA-1a mais aucun donneur compatible n'a été trouvé (Sugimoto et al., 2022). Les transfusions des plaquettes de culture n'ont pas significativement amélioré les CCI de la patiente à 1h et à 24h post-transfusion pour deux des trois transfusions réalisées. Bien qu'il soit possible que les plaquettes de cultures n'aient pas été détectées par le compteur cellulaire dû à une taille plus importante que les plaquettes natives, une augmentation de la numération leucocytaire indiquent une potentielle inflammation et l'augmentation des D-dimères une activation de la cascade de coagulation. Toujours selon les auteurs, ceci pourrait s'expliquer par une activation des plaquettes de culture suite à l'irradiation ou à une glycosylation/sialylation aberrante. Si théoriquement les plaquettes de culture représentent une stratégie prometteuse pour les ERT, cette technologie n'est pas encore pleinement contrôlée. A cela s'ajoute une logistique de production très coûteuse et difficilement applicable pour une mise en service à grande échelle. Ainsi, cibler l'antigène est une option thérapeutique innovante et prometteuse mais qui nécessite encore beaucoup de recherche et développement.

La diminution de la production d'anticorps est une autre cible pour prévenir l'état réfractaire d'origine immunologique. A ce jour, plusieurs essais cliniques ont été réalisés pour limiter la production d'alloanticorps dans un contexte d'état réfractaire en ciblant les lymphocytes B et les plasmocytes. Pour cela, deux principaux médicaments ont été utilisés : le rituximab est un anti-CD20 qui entraîne la déplétion des lymphocytes B durant 6 à 9 mois et le daratumumab, un anti-CD38 qui cible les plasmocytes pour une durée comprise entre 1 et 3 mois. Si le rituximab a permis d'augmenter la numération plaquettaire chez 7 patients (Liu et al., 2015), de nombreuses autres études indiquent que ce traitement n'a pas permis l'amélioration de numération plaquettaire chez des patients immunisés (Migdady et al., 2020). Le daratumumab a également permis l'amélioration de la numération plaquettaire après transfusions chez des patients en état réfractaire (Migdady et al., 2020). Ces stratégies sont également prometteuses mais présentent malgré tout l'inconvénient de ne pas être applicable en cas d'urgence.

Le développement d'axe thérapeutique visant à inhiber l'effet des anticorps anti-HLA est prometteur mais complexe de par la multitude d'action synergique de ces derniers et la diversité de facteurs potentiellement importants tels que le nombre de site HLA à la surface ou la quantité de complément chez un individu. Une piste thérapeutique réside dans l'utilisation d'IdaS, enzyme dérivé de *Streptococcus*, qui clive de manière aspécifique toutes les immunoglobulines dans un délai rapide avec

un effet maximal entre 6h et 24h après l'injection. Cette piste est cependant difficilement applicable de manière généralisée car ce traitement n'est utilisable qu'une seule fois. En effet, une proportion significative de la population a des anticorps anti-IdeS dû à une infection antérieure à *S. Pyogenes*. Une injection d'IdeS entraîne un rappel de l'immunité dirigée contre cette bactérie, entraînant un pic d'immunisation dirigée contre cette enzyme et potentiellement la neutralisation de cette dernière avant le clivage des IgG (Winstedt et al., 2015). Le test IdeS-immunoCAP permet cependant de mesurer les anticorps anti-IdeS chez un patient, permettant ainsi d'identifier les patients éligibles à ce traitement d'appoint.

Si à la réponse humorale s'ajoute une composante cellulaire, le délai d'action de la réponse humorale n'est pas immédiat, 24h dans un modèle murin d'alloimmunisation selon Arthur et al, et permet donc un intervalle d'efficacité de la transfusion, non négligeable en contexte clinique. Ainsi, la réponse cellulaire constitue selon moins la cible thérapeutique la moins pertinente, puisqu'elle n'est pas immédiatement délétère pour les transfusions.

Selon moi, cibler les réponses immunes humorales anti-plaquettaires sont des pistes prometteuses mais actuellement trop généralisées, elles devraient être appliquées au cas par cas pour optimiser leur efficacité. Pour cela, il nous sera nécessaire de lever certains verrous notamment l'identification des facteurs importants pour la pathogénicité des anticorps et les mécanismes d'élimination associés à ces facteurs. L'impact clinique d'un anticorps pourrait alors être déterminé et le traitement pourrait ainsi être adapté en fonction des anticorps retrouvés chez le patient. Ces prises en charge au cas par cas permettraient l'administration de traitements les plus adaptés tels que l'Eculizumab si le patient présente majoritairement des anticorps dont les sous-classes entraînent une activation du complément.

CONCLUSION

Les travaux réalisés pendant ma thèse ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle et l'état réfractaire associé. Ces deux événements indésirables receveur ont constitué les deux axes de recherche de ce travail.

Le premier axe a porté sur la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine de la réponse alloimmune antiplaquettaire. Quand j'ai commencé ces travaux, de nombreux acteurs de la réponse alloimmune anti-globule rouge avaient déjà été décrits dans la littérature mais aucun dans la réponse alloimmune anti-plaquettaire. Dans l'objectif d'identifier les cellules immunes à l'origine de l'alloimmunisation plaquettaire, nous avons développé un modèle murin d'alloimmunisation plaquettaire transfusionnelle qui reproduit la différence de compatibilité entre les plaquettes d'un donneur et celles d'un receveur au niveau des molécules CMH-I. Ce modèle murin nous a permis d'identifier une sous population splénique de lymphocytes B, les lymphocytes B de la zone marginale comme élément central de la réponse alloimmune post-transfusionnelle. Cibler ces cellules, grâce à une immunodéplétion ou un traitement pharmacologique, prévient la production d'alloanticorps chez les souris receveuses immunisées. Ces résultats ont permis non seulement d'améliorer nos connaissances sur la réponse immune spécifique à la réponse anti-plaquettaire mais surtout d'envisager le développement d'axe thérapeutique à partir du traitement pharmacologique utilisé : le fingolimod (FTY720).

Le deuxième axe de cette thèse a porté sur l'état réfractaire aux transfusions de plaquettaires. Cet effet secondaire de l'alloimmunisation complique grandement la prise en charge des patients, notamment ceux d'oncohématologie nécessitant un support transfusionnel plaquettaire important. Les mécanismes cellulaires mis en jeu dans l'élimination des plaquettes transfusées par les anticorps anti-HLA-I ne sont pas pleinement élucidés. De plus, la présence d'alloanticorps n'est pas systématiquement liée au développement d'un état réfractaire, indiquant que les anticorps possèdent des caractéristiques qui leur confèrent ou non une pathogénicité. Dans l'objectif d'identifier ces facteurs clés, nous avons réalisé une étude clinique en collaboration avec l'ICANS. Cette étude clinique indique une sous-estimation importante de l'état réfractaire due à des critères de diagnostics trop stringents. Elle nous a également permis d'identifier une caractéristique des anticorps potentiellement liée à leur capacité à induire un état réfractaire : la sous-classe d'IgG. Des données expérimentales confirment par la suite un impact de la sous-classe des anticorps sur l'activation des plaquettes ciblées et identifient un mécanisme différent d'activation en fonction de la sous classe impliquée. L'activation médiée par l'IgG1 et l'IgG3 repose sur le complément alors qu'il dépend du récepteur CD32a pour les

IgG2. Les résultats obtenus sont un pas de plus vers la hiérarchisation des anticorps à définir comme délétères pour les transfusions même si le lien entre élimination et activation reste à être élucidé.

Cette question fera l'objet de travaux dédiés. La mise en place d'une étude clinique multi-centrique sur une cohorte de patients plus importante permettra de confirmer ces résultats. De plus, comprendre comment les anticorps anti-HLA-I entraînent l'élimination des plaquettes permettra également le développement d'axe thérapeutique adapté en fonction des anticorps retrouvés chez un patient.

En conclusion, ce travail de thèse constitue une progression directe vers le développement d'axe thérapeutique pour diminuer l'alloimmunisation post-transfusionnelle et prendre en charge les patients en état réfractaire. Par extrapolation, ces résultats pourront également être utiles dans d'autres pathologies à médiation humorale à l'origine de thrombopénie telles que le lupus ou encore les thrombopénies induites par l'héparine.

ANNEXE

ORIGINAL ARTICLE

Discriminating young platelets on human leukocyte antigen-I expression highlights their extremely high reactivity potential

Catherine Ange-nieux^{1,2,3,4} | Adele Couvidou^{1,2,3,4} | Nathalie Brouard^{1,2,3,4} |
 Anita Eckly^{1,2,3,4} | Arnaud Dupuis^{1,2,3,4} | Pierre H. Mangin^{1,2,3,4} | Blandine Maître^{1,2,3,4}

¹UMR_S1255, INSERM, Strasbourg, France

²Etablissement Français du Sang-Grand Est, Strasbourg, France

³Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France

⁴Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Correspondence

Blandine Maître, UMR_S1255 INSERM, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Grand Est, 10 rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France.

Email: blandise.maitre@efs.sante.fr

Funding information

This study was funded by the INSERM and EFS (no grant number associated with this work).

Handling Editor: H Spronk

Abstract

Background: The platelet population is heterogeneous, with different subsets that differ on the basis of their function and reactivity. An intrinsic factor participating in this difference of reactivity could be the platelet age. The lack of relevant tools allowing a formal identification of young platelets prevents so far to draw solid conclusions regarding platelet reactivity. We recently reported that human leukocyte antigen-I (HLA-I) molecules are more expressed on human young platelets.

Objectives: The aim of this study was to assess platelet reactivity according to their age based on HLA-I expression level.

Methods: Platelet activation was assessed by flow cytometry (FC) for different platelet subsets based on their HLA-I expression. These populations were further cell sorted and their intrinsic properties were determined by FC and electron microscopy (EM). Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.02 software using two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test.

Results: HLA-I expression level allowed the identification of 3 platelet subpopulations regarding to their age (HLA low, dim, and high). HLA-I was reliable to guide platelet cell sorting and highlighted the features of young platelets in the HLA-I^{high} population. In response to different soluble agonists, HLA-I^{high} platelets were the most reactive subset as shown by the level of P-selectin secretion and fibrinogen binding assessed by flow cytometry. Moreover, the highest capacity of HLA-I^{high} platelets to simultaneously express annexin-V and von Willebrand factor or activated α IIb β 3 after coactivation with TRAP and CRP indicated that the procoagulant feature of platelets was age-related.

Conclusion: The young HLA-I^{high} population is the most reactive and prone to become procoagulant. These results open up new perspectives to investigate deeply the role of young and old platelets.

KEYWORDS

electron microscopy; fluorescence-activated cell sorting; human class I antigens; platelets; procoagulant

ABBREVIATIONS

HLA-I, Human Leukocyte Antigen-I; FC, Flow Cytometry; COAT, Collagen And Thrombin activated; vWF, Von Willebrand factor; TO, Thiazole orange; P ribo prot, Anti-ribosomal P protein; CRP, Collagen Related Peptide; TRAP, Thrombin receptor activating peptide; Conv, Convulxin

Essentials

- Platelet age could explain the heterogeneity of reactivity within an entire platelet population.
- Platelet reactivity was assessed according to platelet age based on human leukocyte antigen-I (HLA-I) expression level.
- Platelet cell sorting based on HLA-I expression level reveals young platelets features.
- The young HLA-I^{high} population is the most reactive and prone to become procoagulant.

1 | INTRODUCTION

The platelet population is heterogeneous, with different subsets that differ notably in size and receptor density [1]. In addition to these parameters, platelet subpopulations are also characterized on the basis of their function and reactivity. One of the most striking example of this diversity is the ability of some platelets to become procoagulant after a strong stimulation. Procoagulant or COAT (COLlagen And Thrombin activated) platelets are activated platelets exposing negatively charged aminophospholipids and binding several α -granular proteins including factor V and von Willebrand factor (vWF), which cluster together to form a coat [2]. Approximately one-third of platelets become procoagulant after stimulation, but this predisposition is still under debate [3].

An intrinsic factor participating in this difference of reactivity could be the platelet age.

Several groups highlighted a different reactivity between young and old platelets. In dogs, platelet response to thrombin has been reported to decline progressively with platelet circulatory age [4], whereas younger platelets in rabbits do not have an enhanced capacity to expose phosphatidylserine in response to thrombin as compared with older platelets [5]. In humans, young platelets have been reported to represent a high proportion of the procoagulant platelet population. In addition, epidemiological studies found an association between an increased young platelet proportion and thrombotic outcomes in patients with cardiovascular disease supporting the hypothesis of an association between platelet age and reactivity [6].

The lack of relevant tools allowing a formal identification of young platelets prevents so far to draw solid conclusions regarding platelet reactivity. Young platelets, ie, newly released platelets in the circulation from the megakaryocytes in the bone marrow, were proposed to be larger in size than older ones, and characterized by the presence of a small but functional amount of mRNA derived from megakaryocytes [7,8]. The difficulty in accurately identifying this population lies mostly in the strategy for detecting them. In humans, young platelets are usually identified by flow cytometry using nucleic acid-binding fluorescent reagents such as thiazole orange (TO), or analogs like acridine

orange or SYTO13. This approach is questionable given some intrinsic drawbacks of these RNA-binding dyes. On one hand, the dyes bind not only to RNA but also to nucleotides present in the alpha granules, resulting in nonspecific staining, and on the other hand, this strategy overestimates the proportion of young platelets in cases of macrothrombocytopenia or in the presence of aggregates [8]. Indeed, in patients with inherited macrothrombocytopenia, the immature platelet fraction, calculated with an algorithm based on the RNA-binding properties of an acridine orange derivate, is overestimated because of the size of the platelets ($>8 \mu\text{m}^2$) [9]. To overcome this issue, we recently reported that human leukocyte antigen-I (HLA-I) molecules are more expressed on young platelets compared with older ones and can therefore be used to accurately identify young platelets without the bias of size or of unspecific labeling of platelet granules [10]. Consistently, a recent study describes the preferential expression of HLA-I on immature platelets intermediate structures, as compared with mature platelets [11].

In the present manuscript, we demonstrate by flow cytometry, cell sorting, and electron microscopy the reliability of HLA-I cell surface expression as an indicator of platelet age. This marker allowed the identification of 3 subsets of platelets related to their age and highlighted an extremely high reactivity potential of young platelets in response to soluble agonists. Interestingly, we identified young platelets as being the platelets most likely to become procoagulant compared with old platelets in response to strong agonists.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Ethics statement

Human studies were performed according to the Helsinki Declaration. Whole human blood was obtained from volunteer blood donors who gave written informed consent recruited by the blood transfusion center where the research was performed (Etablissement Français du Sang-Grand Est).

2.2 | Reagents

Mouse antihuman CD41/CD61 (GPIIb/IIIa), CD42a (GPIX), CD42b (GPIb), and CD42d (GPV) and rat antimouse and human CD42c (GPIb β) antibodies were produced and coupled to Alexa-647 or Alexa-568 in our laboratory. Monoclonal anti-GPVI antibodies coupled to PE (clone 1G5) or to Alexa-647 (clone HY101) were, respectively, purchased from Biocytex and BD Biosciences. Thiazole orange (TO) was from Sigma. The allophycocyanin (APC) or APC-cy7 pan antihuman HLA class I (clone W6/32), PE-Cy7 antihuman β 2-microglobulin (clone B2M), APC-cy7 or PE antihuman CD45, PE antihuman GPIIb/IIIa, and the APC antihuman CD62P antibodies were purchased from Biolegend. Antihuman ribosomal P-antigen was kindly provided by Prof. Sun, National Yang-Ming University, Taiwan [12]. Annexin-V-allophycocyanin or Fluos were, respectively, purchased from Invitrogen and Roche diagnostics. The FITC-conjugated mouse antiactivated human GPIIb/IIIa (clone Pac-1) was ordered from BD Biosciences. Fibrinogen coupled to Alexa-647 was from Invitrogen. The A488-conjugated rabbit anti-vWF was from Agilent Dako. Tyrode albumin (TA) buffer (5mM Hepes, pH 7.35, 0.35% human serum albumin).

2.3 | Quantification of platelet cell surface glycoproteins

Whole human hirudinized blood from healthy volunteer blood donors was incubated for 15 minutes at RT with 2- μ g/mL alexa-568 or 647 anti-GPIb μ g/mL APC-cy7 anti-HLA class I and PE-cy7 anti- β 2-microglobulin, and 2- μ g/mL alexa-647 anti-GPIb alexa-647 anti-GPIIb/IIIa, alexa-647 anti-GPV, PE anti-GPVI, or alexa-568 anti-GP-IX in 10 volumes of phosphate-buffered saline containing 1% BSA and 6mM EDTA. After washing, the cells were counterstained with TO (1 μ g/mL in phosphate-buffered saline) for 15 minutes, diluted in 20 volumes of 1% paraformaldehyde, and analyzed using flow cytometry within 45 minutes.

Flow cytometry was performed on the LSRFortessa cell analyzer (BD Biosciences), and data were analyzed using the BD FACSDiva software. The immature platelet fraction was measured on a XN-1000 blood counter (Sysmex).

2.4 | Ribosomal P-antigen expression

Washed platelets suspension in TA buffer were prepared from healthy human blood donors as previously described [13]. Platelets (3×10^8 /mL) were fixed, permeabilized, and costained with an antiribosomal P-protein revealed with a secondary A647-conjugated goat antimouse antibody, a phycoerythrin (PE)-conjugated anti-GPIIb/IIIa a PE-Cy7-conjugated anti-2m mAb, and an APC-Cy7-conjugated pan anti-HLA class I mAb before analysis by flow cytometry.

2.5 | Measurement of platelet activation

CD62P exposure and fibrinogen binding to the activated state of GPIIb/IIIa, were evaluated by flow cytometry. Hirudinized whole blood from healthy volunteer blood donors was incubated for 10 minutes at

37 °C with 1- μ g/mL anti-GPIb μ g/mL anti-HLA class I, and anti- β 2-microglobulin, 0.5- μ g/mL anti-CD45 and either 20- μ g/mL fibrinogen A-647 or 1- μ g/mL P-selectin-APC in 10 volumes of hirudinized TA buffer in the presence or not of different concentrations of soluble agonists adenosine di-phosphate (ADP) (1, 5, or 10 μ M, MastDiag-nostic), collagen-related peptide (CRP) (1, 2.5, or 5 μ g/mL, CAMBCOL Laboratories), thrombin receptor-activating peptide (TRAP) (50, 100, or 200 μ M, Polypeptide), Convulxin (6 nM, Cryopep), or U46619 (1 or 5 μ M, Calbiochem). The samples were then diluted in 20 volumes of the TA buffer and analyzed using flow cytometry.

2.6 | COAT-platelet generation

Procaspase-activating compound 1 (Pac-1, 5 μ g/mL) or vWF binding (5 μ g/mL), and phosphatidylserine exposure via annexin-V binding (1:20e) were evaluated using flow cytometry on hirudinized whole blood simultaneously incubated for 10 minutes at 37 °C with 100 μ M TRAP + 10- μ g/mL CRP in the presence of 1- μ g/mL anti-GPIb and μ g/mL anti-HLA class I.

2.7 | Human platelet cell sorting

Blood was collected on anticoagulant citrate dextrose from healthy volunteers who had not taken any antiplatelet medication in the preceding 2 weeks. Washed platelets were prepared as previously described [14]. After labeling for 20 minutes with 5- μ g/mL APC-cy7 pan antihuman HLA class I (clone W6/32) in 4 volumes of TA buffer, platelets were diluted at 15,000 platelets/ μ L in TA buffer + 0.5 μ M PGI2 for cell sorting. Platelets were sorted at 4000 events/s on their APC-cy7 fluorescence (low, dim, or high) and their size (forward scatter [FSC] parameter) using a fluorescence-activated cell sorter (FACS) Aria II flow cytometer (Becton Dickinson). The gating strategy aimed to exclude doublets and to define 3 gates on the singlet platelet population corresponding to different HLA-I expression levels based on the mean fluorescence intensity (MFI) of the anti-HLA-I W6/32 mAb and on the FSC size parameter. Overall, 2106 platelets of each subset HLA low, dim, or high were sorted. Subsequently, sorted platelets were washed and concentrated with the use of centrifugation (1900 g $\times$ 8 minutes) in TA buffer + PGI2 + apyrase. Unsorted platelets are HLA class I labeled platelets submitted to the same procedure except the sorting step.

2.8 | Transmission electron microscopy

Sorted platelets were first fixed overnight in TA buffer containing 2.5% glutaraldehyde. The next day, fixed sorted platelet were pelleted, and embedded in agarose 2% after addition of Accudrop beads from BD Biosciences to visualize the pellet and minimize the loss of platelets in the further steps. Then the samples were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 hour, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Epon (LADD, INLAND) Ultrathin sections were produced using Ultracut UCT (LEICA). The sections were stained with uranyl acetate followed by lead citrate

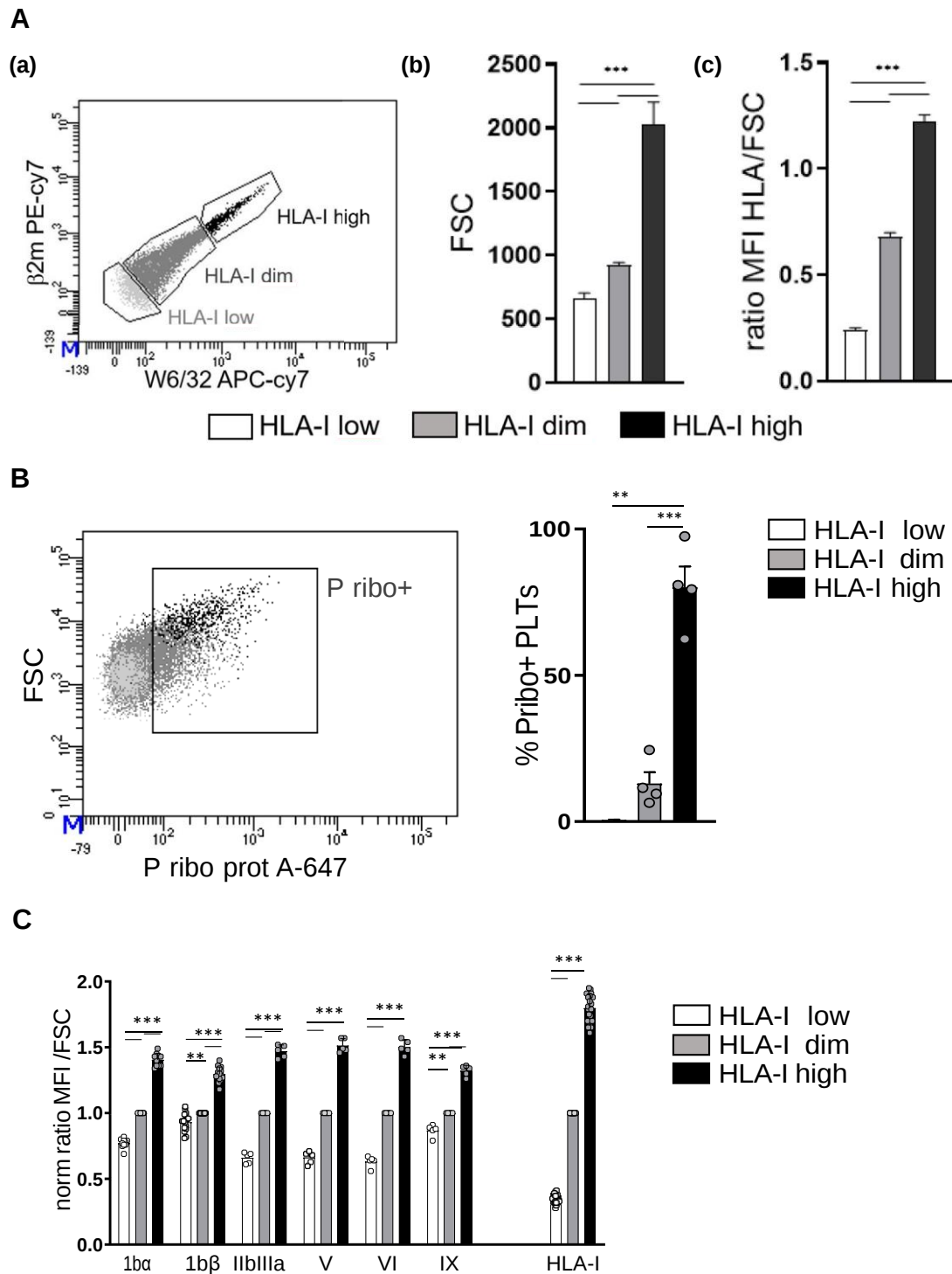


FIGURE 1 Human leukocyte antigen I (HLA-I) expression level is a sensitive marker of platelets according to their age. A, (a), Representative fluorescence-activated cell sorting plots showing the 3 arbitrarily designed subsets of platelets based on their HLA-I surface expression. 10% lowest HLA signal defined as old platelets (HLA-I low), 80% intermediate HLA signal defined as middle-aged platelets (HLA-I dim) and 10% highest HLA signal defined as young platelets (HLA-I high) (b), Representative histograms of the platelet size as measured by the FSC parameter of a LSRFortessa cell analyzer. (c) Representative histograms of the expression level of HLA-I molecules assessed by calculating the ratio mean fluorescence intensity (MFI) HLA-I/forward scatter (FSC) among the 3 platelet subsets ($\pm$ SEM, $n = 25$). B, Left panel, Representative fluorescence-activated cell sorting plots of ribosomal P-protein (Pribot[®]) expression among GPIIb β ⁺ platelets among the 3 platelet subsets. Right panel, Percentage of platelets expressing ribosomal P-protein according to their HLA-I expression level ($\% \pm$ SEM, $n = 4$). C, Expression level of the main glycoproteins was assessed by calculating the ratio GP MFI/FSC (MFI/FSC) in each HLA-I subpopulation and normalised to the respective ratio for HLA-I dim platelets (ratio $\pm$ SEM; ** $P < .01$, *** $P < .001$; 1-way analysis of variance $n = 5-15$).

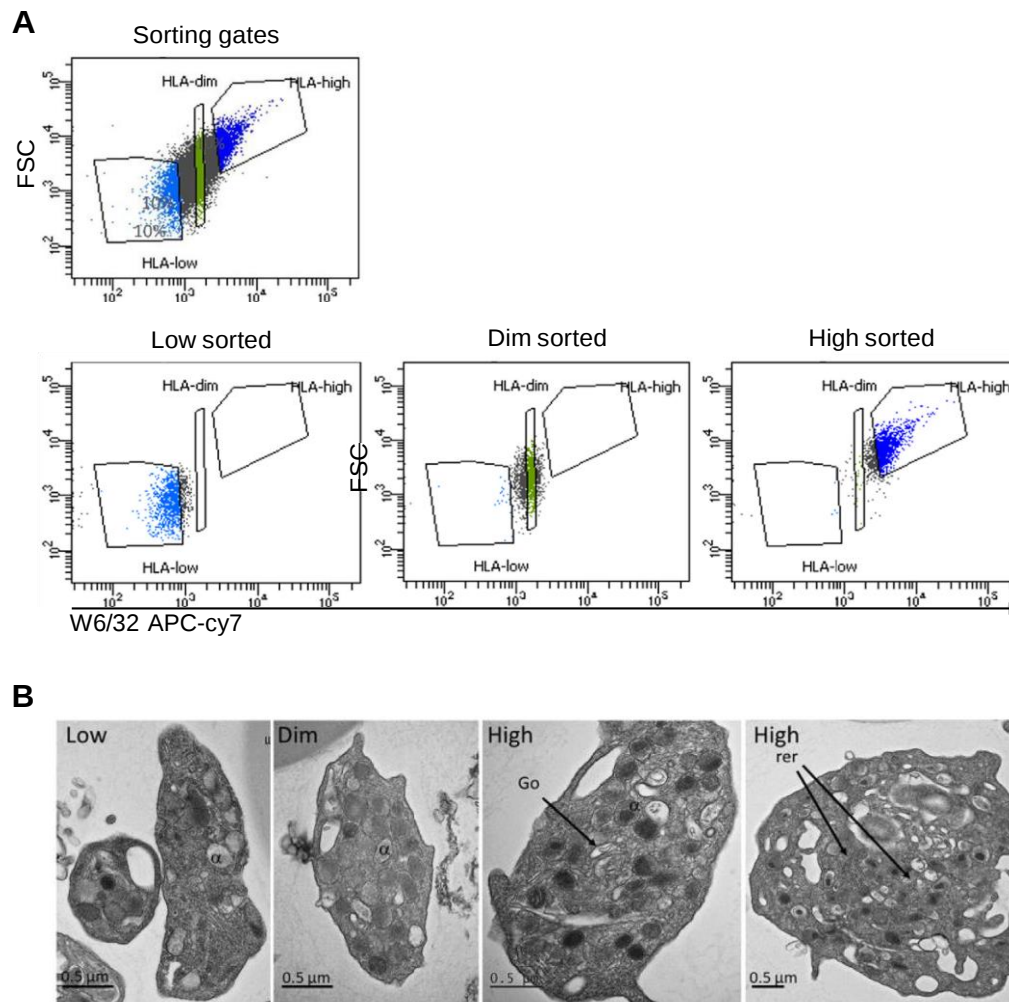


FIGURE 2 Cell-sorted human leukocyte antigen I (HLA-I)^{high} platelets reveal the features of young platelets. A, Gating strategy for the sorting and re-analysis of the HLA-I low, dim and high platelet subpopulations representing, respectively, 10% of the lowest, 20% of the intermediate and 10% of the highest HLA-I signal. B, Transmission electron micrographs of sorted platelets for size and platelet activation-related shape changes.

and observed with the transmission electron microscope JEM-2100+ (JEOL).

2.9 | Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Prism 5.02 software (GraphPad). All data are reported as the mean ± SEM and were analyzed using 1-way or 2-way analysis of variance, followed by Tuckey post hoc analysis as appropriate.

3 | RESULTS

3.1 | HLA-I expression level is a sensitive marker of platelets according to their age

We have previously reported that HLA-I is a sensitive marker of platelet age, with young platelets expressing high levels of this

molecule, which slowly decreased with age [10]. In this study, we aimed to evaluate platelet function based on HLA-I expression levels.

We arbitrarily defined by flow cytometry 3 subsets of platelets based on their HLA-I cell surface expression. We assigned the 10% most positive (HLA-I^{high}) and less positive (HLA-I^{low}) platelets to the youngest and oldest platelet subsets, respectively, whereas the HLA-I^{dim} platelet subset represented 80% of the whole population with an intermediate HLA-I expression level (Figure 1A, a). By evaluating the FSC parameter in each subpopulation, we observed that HLA-I^{high} platelets are significantly larger in size than HLA-I^{dim} and HLA-I^{low} platelets (MFI: 2024 ± 36, 925 ± 18, and 657 ± 9 for the HLA-I^{high}, dim, and low subpopulations, respectively, $n = 25$, *** $P < .001$), which is in agreement with the view that young platelets are bigger than older platelets (Figure 1A, b). To avoid any bias due to the different size of the platelets according to the subpopulations, expression level of HLA-I molecules was assessed throughout the study by calculating the ratio of the MFI of the pan antihuman HLA-I (clone W6/32) staining over the FSC parameter. When this correction

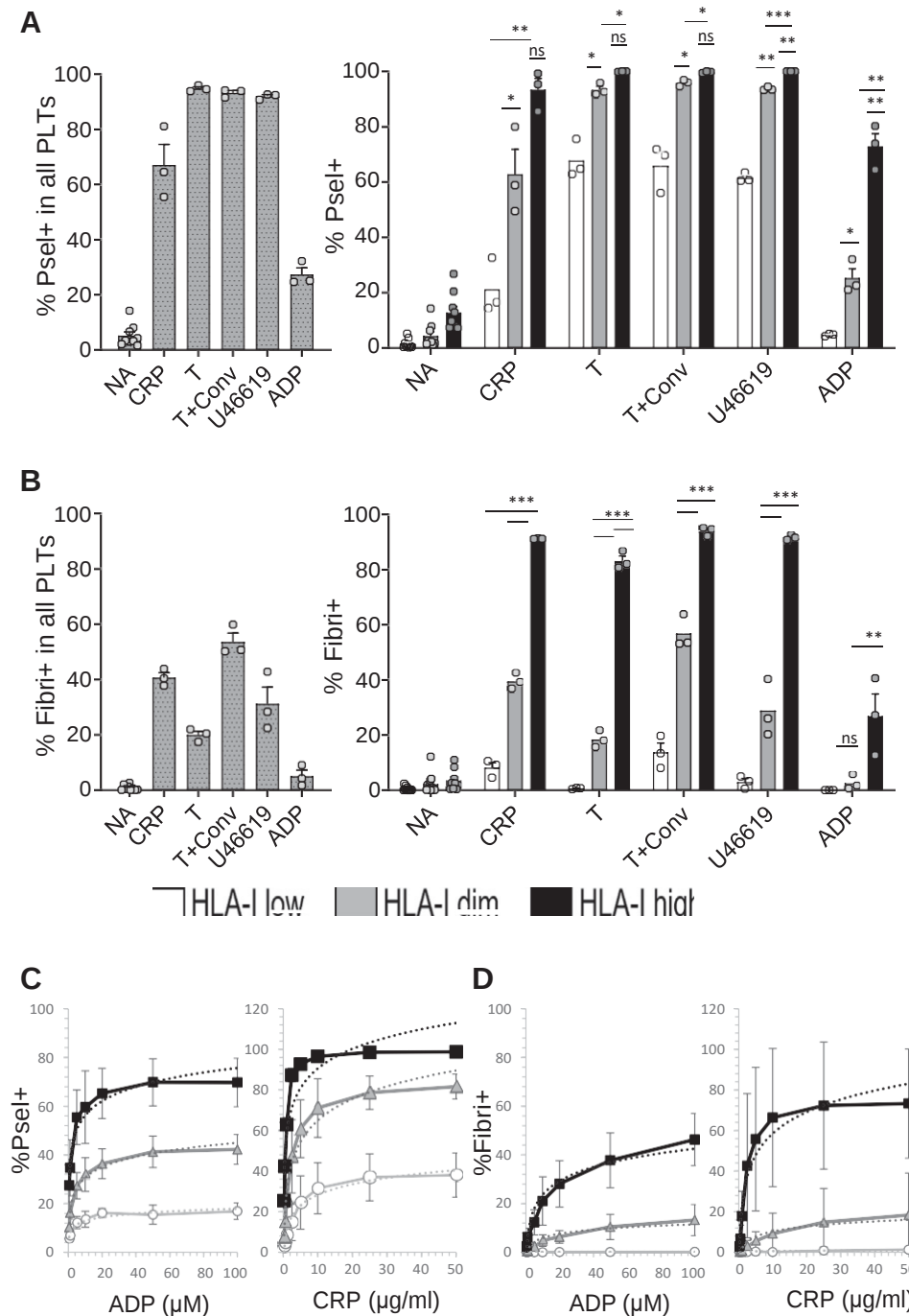


FIGURE 3 The young human leukocyte antigen I (HLA-I)^{high} platelets are more reactive than old ones in response to soluble agonists.

In response to different soluble agonists, the proportion of platelets positive for (A) P-selectin or (B) fibrinogen was evaluated by flow cytometry on the whole platelet population (left panels) and on the 3 platelet subsets according to their HLA-I surface expression (right panels). Graphs are representative of the lowest concentration of each agonist inducing maximal activation without saturation (adenosine diphosphate (ADP), 5 μ M; collagen-related peptide (CRP), 1 μ g/mL; thrombin receptor-activating peptide (TRAP), 100 μ M (T); convulxin, 6 nM; U46619, 1 μ M) (% $\pm$ SEM; not significant; $P > .05$, $^{**}P < .01$, $^{***}P < .001$; 1-way analysis of variance $n = 3-9$). Dose-response to different agonists for (C) P-selectin or (D) fibrinogen was evaluated using flow cytometry on the 3 platelet subsets according to their HLA-I surface expression after ADP (left panels) or CRP (right panels) activation. Exposure of platelet activation markers is indicated as percentage of positive platelets. The dots indicate the mean value ($n = 3$) and SEM and the dotted lines show the logarithmic trend lines. The EC₅₀ value of each agonist was calculated for each platelet subset and activation marker.

was applied, we were still able to discriminate 3 clearly distinct platelet subpopulations based on the expression of HLA-I (Figure 1A, c). To confirm the correlation between the HLA-I expression level and the age of the 3 platelet subsets, we assessed the expression of the ribosomal P-protein (P ribo), a protein necessary for mRNA translation that we have previously shown to be directly linked to platelet age [10]. We observed that $80.03\% \pm 14.3\%$ of the HLA-I^{high} subpopulation expressed this antigen compared with $13.0\% \pm 7.9\%$ in HLA-I^{dim} and $0.53\% \pm 0.3\%$ in HLA-I^{low} (Figure 1B), indicating that HLA-I is a reliable marker to discriminate platelets according to their age.

We next characterized by flow cytometry in the 3 designed subpopulations, the expression level of the main glycoproteins (GPs) relevant for adhesion, activation, and aggregation of platelets (Supplementary Figure 1). As above, to avoid any bias due to the differences in size according to the subpopulations, we calculated the ratio of the MFI staining over the FSC parameter and normalized the levels to one of the HLA-I^{dim} subset. All GP tested, namely GPIb, GPIIb, 2b3, GPV, GPIIb, and GPIIX, were significantly overexpressed on HLA-I^{high} platelets compared with HLA-I^{dim}. HLA-I^{low} platelets had a significantly lower expression of GPIIb, 2b3, GPV, and GPIIb as compared with HLA-I^{dim} platelets; GPIIb and GPIIX expression levels were similar between HLA-I^{low} and ^{dim} platelet populations (Figure 1C).

3.2 | HLA-I cell sorting reveals young platelets features

To further characterize the morphology of these subsets, we aimed to cell sort them and set up a new cell sorting technique allowing the preservation of platelet functions we describe elsewhere (manuscript in preparation). The size, morphology, and intracellular content of cell-sorted platelet populations according to their HLA-I staining were analyzed by electron microscopy. As shown in Figure 2A, the cell sorting gating strategy based on the MFI of the anti-HLA-I mAb and on the FSC size parameter allowed the obtention of 3 nonoverlapping subsets of sorted platelets. Interestingly, electron microscopy showed that all cell-sorted platelets were mostly discoid without obvious signs of activation, ie, no shape change and that granules were still present within the platelets. Cell-sorted HLA-I^{high} platelets still had the features of young platelets, ie, larger size, endoplasmic reticulum, and golgi material, compared with cell-sorted HLA-I^{low} and HLA-I^{dim} platelets (Figure 2B and Supplementary Figure 2).

Altogether, these results show a correlation between the expression of HLA-I molecules and their age.

3.3 | The young HLA-I^{high} platelets are more reactive than old ones in response to soluble agonists

Platelet reactivity in hirudinized whole blood was then evaluated in response to different soluble agonists on the whole platelet population and in the 3 designed subpopulations according to their HLA-I expression level. Agonist concentrations were chosen based on the

concentration that would have the maximum effect on platelet activation (Supplementary Figure 3). Upon activation with ADP or CRP, 73% and 93% of the HLA-I^{high} platelets exposed P-selectin (Psel⁺) on their surface compared with 25% and 63% of HLA-I^{dim}. Only 21% of HLA-I^{low} platelets were Psel⁺ after CRP-induced activation and <5% after ADP (Figure 2A). Stimulation with stronger agonists like U46619, TRAP (T), or TRAP plus Convulxin (T + Conv) led to Psel exposure on almost all HLA-I^{high} and HLA-I^{dim} platelets, whereas to only 60% of HLA-I^{low} platelets (Figure 3A). Moreover, a stimulation with any of the agonists mentioned above induced a 2-fold to 4-fold greater percentage of platelets that bind fibrinogen in the HLA-I^{high} young platelet subpopulation than in HLA-I^{dim}, and almost an undetectable amount in the HLA-I^{low} old platelets (Figure 3B).

We further performed dose-response experiments with 2 agonists, 1 weak (ADP) and 1 strong (CRP), to evaluate the EC50 for P-selectin expression and fibrinogen binding depending on platelet age (Figure 3C, D). We observed an increase in the EC50 value as the platelets aged. For P-selectin, the EC50_{CRP}(μg/mL) for the HLA-I^{high}, ^{dim}, and ^{low} subpopulations was 0.5, 2.1, and 2.9, respectively, and the EC50_{ADP}(μM) was 0.8, 2.2, and 1.3, respectively. For fibrinogen, the EC50_{CRP}(μg/mL) for the HLA-I^{high} and ^{dim} subpopulations was 2.4 and 7.1, respectively, and the EC50_{ADP}(μM) was 9.25 and 19.2, respectively. Of note, as mentioned above, undetectable amount of fibrinogen binding on the HLA-I^{low} old platelets could be detected even at very high agonist concentrations.

Altogether these results reveal a greater ability of young HLA-I^{high} platelets to secrete the contents of their secretory granules, and a significant increased capacity to bind fibrinogen as compared with HLA-I^{dim} platelets, whereas old HLA-I^{low} platelets were the least reactive, strongly suggesting a strict and yet unrecognized correlation between the age of platelet and their reactivity.

3.4 | HLA-I^{high} platelets are more prone to become COAT platelets

Procoagulant platelets have been described upon strong activation as annexin-V ⁺/PAC-1⁺ with a downregulation of activated GPIIb/IIIa over time compared with single positive PAC-1 platelets [15]. Because we observed that young HLA-I^{high} platelets have a higher reactivity potential, we wondered whether they would be more prone to become COAT platelets.

We, therefore, incubated hirudinized whole blood simultaneously with TRAP and CRP. Analysis of the 3 HLA platelet subsets revealed that annexin-V binding was preferentially observed in the HLA-I^{high} subpopulation, 69% $\pm$ 19% of which expressing simultaneously PAC-1 and annexin-V against <10% and 1% in the respective HLA-I^{dim} and HLA-I^{low} subsets (Figure 4A) suggested that young HLA-I^{high} platelets are more likely to form procoagulant platelets.

To confirm these results, we monitored the surface retention of α -granule vWF, another feature of procoagulant COAT platelets. Analysis of the different subsets showed that all HLA-I^{high} platelets expressed vWF on their surface, compared with only 60% of the

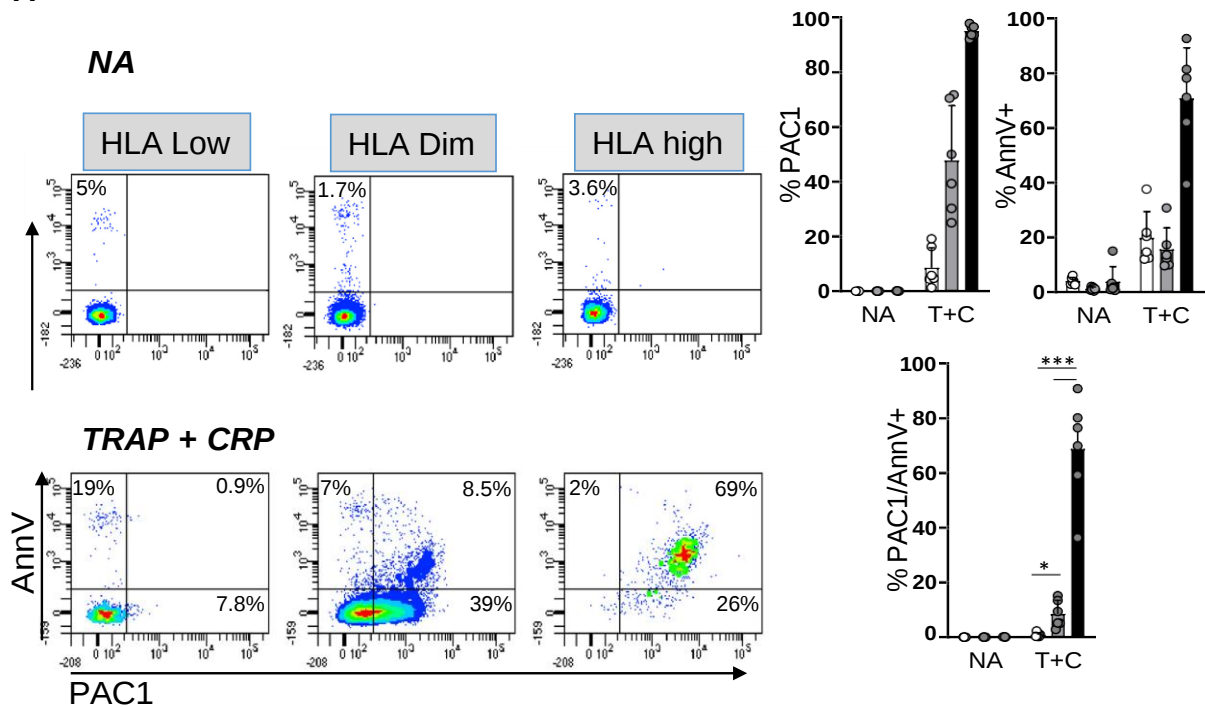
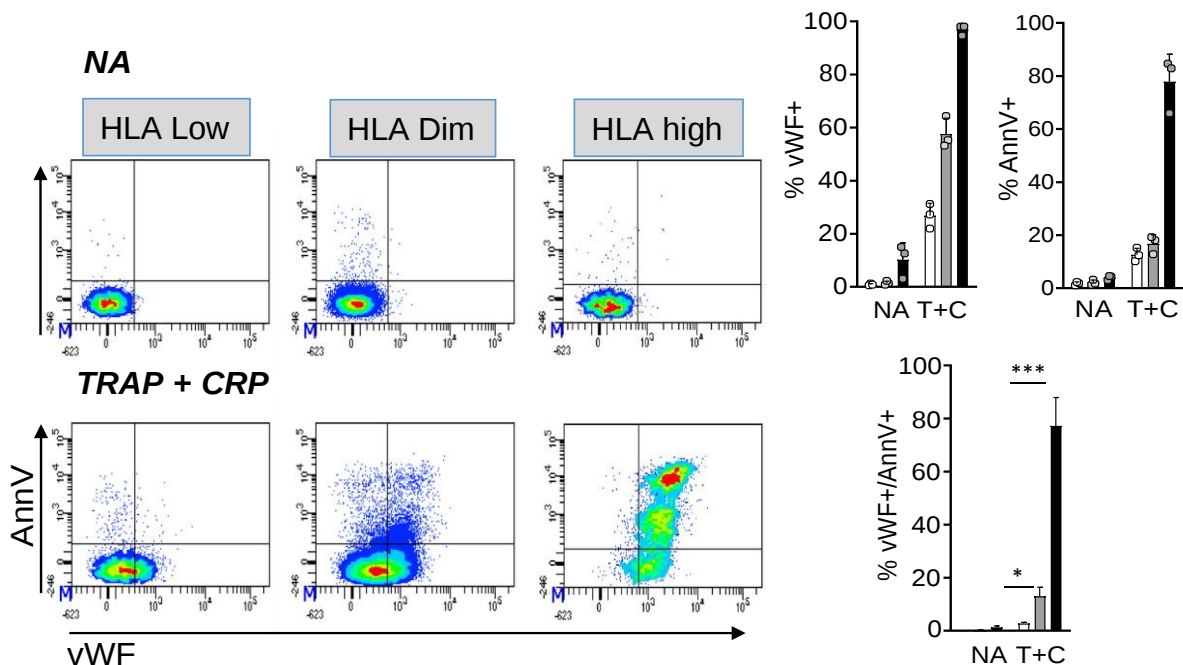
A**B**

FIGURE 4 Human leukocyte antigen-I^{high} platelets are more prone to become COllagen And Thrombin activation platelets. Dual labelling of platelets with annexin-V and procaspase-activating compound 1 (A) or von Willebrand factor (B) after simultaneous incubation with 100μM thrombin receptor-activating peptide (TRAP) and 1-μg/mL collagen-related peptide (CRP) (T + C) was evaluated using flow cytometry on the 3 different platelet subsets according to their human leukocyte antigen-I surface expression (% ± SEM; not significant; $P > .05$, $**P < .01$, $***P < .001$; 2-way analysis of variance $n = 3$).

HLA-I^{dim} subset and ~20% of the HLA-I^{low} subset, and ~80% of HLA-I^{high} platelets expressed simultaneously vWF and annexin-V against <20% in the HLA-I^{dim} subset. None of the HLA-I^{low} platelets are vWF/Ann-V double positive (Figure 4B).

All these data show that young HLA-I^{high} platelets are more prone to become COAT platelets.

4 | DISCUSSION

Platelet population is heterogeneous notably regarding their reactivity. One of the hypothesis explaining this diversity is the platelet age heterogeneity but the lack of reliable tools discriminating precisely young and old platelets has prevented so far to confirm this idea. In this study, we showed that the expression of HLA-I molecules is finely correlated with platelet ribosomal P-protein content, and allows to very finely discriminate between young and old platelets. The use of HLA-I expression level enables an accurate correlation between age and reactivity in response to soluble agonists and highlights the ability of young platelets to become procoagulant in response to strong agonists.

We found that HLA-I^{high} platelets, ie, the youngest platelets, express more of the major surface GPs, notably GPIb, GPIIb/IIIa, and GPVI, and present the most activation signs following stimulation with soluble agonists as compared with HLA-I^{dim}, or HLA-I^{low} platelets, which are the oldest platelets. In a previous study, we reported comparable amounts of GPIIb/IIIa on young TO^{bright} and TO^{dim} human platelets, and a slight but significant decrease on young TO^{bright} murine platelets compared with older TO^{dim} platelets. The difference observed between technical approaches may be related to the better reliability of the HLA-I marker to identify different platelet populations according to their age compared with TO. Therefore, it may be interesting to investigate the expression level of murine platelet GPs to highlight possible species-related differences. Moreover, formation of COAT platelets induced by TRAP and CRP, revealed that the youngest platelets were the ones more prone to become procoagulant. These data are in agreement with a previous report by Alberio's group describing a high proportion of COAT platelets within the TO^{bright} population [16]. To become procoagulant, a high and sustained intracytoplasmic calcium rise is required to externalize PS and bind coagulations factors [3,17]. Because platelet aging has been reported to be linked to a decrease in cytoskeletal protein, mitochondrial number, and calcium dynamics [18], it could represent one of the mechanisms explaining the propensity of young platelets to become procoagulant.

Clinical interest in procoagulant platelets is growing as studies are conducted to better understand their *in vivo* importance [19,20]. The potential to form procoagulant platelets is on average about 30% in healthy donors and remains stable over time [21]. Interestingly, low procoagulant platelet levels are associated with impaired platelet function and an increased tendency to bleed [22,23], whereas high procoagulant platelet levels aggravate thrombotic events [24,25].

Thus, during increased platelet turnover where the proportion of young platelet is expected to be high, eg, peripheral platelet consumption or after chemotherapy, it would be interesting to consider the procoagulant platelet potential to adapt the patient management.

Furthermore, we showed that HLA-I is reliable to guide platelet cell sorting, without any platelet activation as shown by electron microscopy providing new insights to study in depth the biology of young and old platelets.

Platelet cell sorting based on a cell surface marker could also be extended to receptors other than HLA-I molecules and could thus be applied to the study of platelet-related diseases where heterogeneity in platelet phenotype may be observed. Another potential application of platelet cell sorting would be the enrichment of distinct platelet populations. Indeed, it has been suggested that this type of selection could be potentially relevant in transfusion medicine [26]. One can argue that the biological effect of platelet concentrate could be modulated by enrichment of platelet subsets with known biological properties.

In conclusion, HLA-I marker is reliable to identify young and old platelets and as such, can be used to delineate 3 subsets of platelets regarding to their age. This advantage over currently used RNA dyes could also be taken as an opportunity to explore the properties of old platelets in regards to clearance mechanisms. The use of the HLA-I marker allowed to highlight intrinsic features of young and old platelets and open up new perspectives to investigate deeply the mechanism of platelet clearance, the biological properties of young platelets in physiological or pathological conditions, and the physiological significance of procoagulant platelets.

FUNDING

This study was funded by the INSERM and EFS (no grant number associated with this work).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.C., C.A., A.E., and N.B. performed experiments and analyzed data. C.A. and B.M. designed the research. C.A., P.H.M., A.D., and B.M. interpreted the data and wrote the manuscript. All authors critiqued and approved the final version of the manuscript.

RELATIONSHIP DISCLOSURE

There are no competing interests to disclose.

INFORMED PATIENT CONSENT

Whole human blood was obtained from volunteer blood donors who gave written informed consent recruited by the blood transfusion center where the research was performed (Etablissement Français du Sang-Grand Est).

REFERENCES

- [1] Lesyk G, Jurasz P. Advances in platelet subpopulation research. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:138.
- [2] Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V

- in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*. 2000;95:1694–702.
- [3] Veuthey L, Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Pereira Portela C, Alberio L. Mechanisms underlying dichotomous procoagulant COAT platelet generation—a conceptual review summarizing current knowledge. *Int J Mol Sci*. 2022;23:2536.
- [4] Peng J, Friese P, Heilmann E, George JN, Burstein SA, Dale GL. Aged platelets have an impaired response to thrombin as quantitated by P-selectin expression. *Blood*. 1994;83:161–6.
- [5] Reddy EC, Wang H, Bang KW, Packham MA, Rand ML. Young steady-state rabbit platelets do not have an enhanced capacity to expose procoagulant phosphatidylserine. *Platelets*. 2018;29:27–33.
- [6] Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL, Eikelboom JW, Konkle B, et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2010;8:148–56.
- [7] Angenieux C, Maitre B, Eckly A, Lanza F, Gachet C, de la Salle H. Time-dependent decay of mRNA and ribosomal RNA during platelet aging and its correlation with translation activity. *PLoS One*. 2016;11:e0148064.
- [8] Robinson M, MacHin S, Mackie I, Harrison P. In vivo biotinylation studies: specificity of labelling of reticulated platelets by thiazole orange and mepacrine. *Br J Haematol*. 2000;108:859–64.
- [9] Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, et al. Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. *Hematology*. 2015;20:587–92.
- [10] Angenieux C, Dupuis A, Gachet C, de la Salle H, Maitre B. Cell surface expression of HLA I molecules as a marker of young platelets. *J Thromb Haemost*. 2019;17:1511–21.
- [11] Kemble S, Dalby A, Lowe GC, Nicolson PL, Watson SP, Senis YA, et al. Analysis of preplatelets and their barbell platelet derivatives by imaging flow cytometry. *Blood Adv*. 2022;6:2932–46.
- [12] Sun KH, Tang SJ, Lin ML, Wang YS, Sun GH, Liu WT. Monoclonal antibodies against human ribosomal P proteins penetrate into living cells and cause apoptosis of Jurkat T cells in culture. *Rheumatology*. 2001;40:750–6.
- [13] Cazenave JP, Hemmendinger S, Beretz A, Sutter-Bay A, Launay J. Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology. *Ann Biol Clin*. 1983;41:167–79.
- [14] Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*. 2004;272:13–28.
- [15] Alberio L, Ravanat C, Hechler B, Mangin PH, Lanza F, Gachet C. Delayed-onset of procoagulant signalling revealed by kinetic analysis of COAT platelet formation. *Thromb Haemost*. 2017;117:1101–14.
- [16] Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*. 2002;415:175–9.
- [17] Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP, Lindhout T. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca²⁺ responses. *Blood*. 1997;90:2615–25.
- [18] Allan HE, Hayman MA, Marcone S, Chan MV, Edin ML, Maffucci T, et al. Proteome and functional decline as platelets age in the circulation. *J Thromb Haemost*. 2021;19:3095–112.
- [19] Pasalic L, Wing-Lun E, Lau JK, Campbell H, Pennings GJ, Lau E, et al. Novel assay demonstrates that coronary artery disease patients have heightened procoagulant platelet response. *J Thromb Haemost*. 2018;16:1198–210.
- [20] Segot A, Adler M, Aliotta A, Matthey-Guirao E, Nagler M, Bertaggia Calderara D, et al. Low COAT platelets are frequent in patients with bleeding disorders of unknown cause (BDUC) and can be enhanced by DDAVP. *J Thromb Haemost*. 2022;20:1271–4.
- [21] Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, Marchetti M, Alberio L. Thrombocytopathies: not just aggregation defects—the clinical relevance of procoagulant platelets. *J Clin Med*. 2021;10:894.
- [22] Prodan CI, Vincent AS, Dale GL. Coated platelet levels correlate with bleed volume in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2010;41:1301–3.
- [23] Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1636:119–28.
- [24] Prodan CI, Joseph PM, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelets in ischemic stroke: differences between lacunar and cortical stroke. *J Thromb Haemost*. 2008;6:609–14.
- [25] Kirkpatrick AC, Stoner JA, Dale GL, Prodan CI. Elevated coated-platelets in symptomatic large-artery stenosis patients are associated with early stroke recurrence. *Platelets*. 2014;25:93–6.
- [26] Handtke S, Steil L, Greinacher A, Thiele T. Toward the relevance of platelet subpopulations for transfusion medicine. *Frontiers Med*. 2018;5:17.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2022.100006>

BIBLIOGRAPHIE

- Adane, T., Enawgaw, B., 2022. Human leukocyte antigen alloimmunization prevention mechanisms in blood transfusion. *Asian J. Transfus. Sci.* https://doi.org/10.4103/ajts.ajts_144_21
- Al-Huniti, A., Kahr, W.H., 2020. Inherited Platelet Disorders: Diagnosis and Management. *Transfus. Med. Rev.*, Platelets in Transfusion Medicine 34, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2020.09.006>
- Ali, Y.M., Lynch, N.J., Shaaban, A.A., Rizk, D.E., Abdel-Rahman, S.H., Khatri, P., Yabuki, M., Yaseen, S., Dudler, T., Demopoulos, G., Schwaible, W.J., 2023. Inhibition of the lectin pathway of complement activation reduces LPS-induced acute respiratory distress syndrome in mice. *Front. Immunol.* 14, 1192767. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1192767>
- Alioglu, B., Tasar, A., Ozen, C., Selver, B., Dallar, Y., 2010. An experience of oseltamivir phosphate (tamiflu™) in a pediatric patient with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a case report. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 37, 55–58. <https://doi.org/10.1159/000321379>
- Allan, H.E., Vadgama, A., Armstrong, P.C., Warner, T.D., 2022. Platelet ageing: A review. *Thromb. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.12.004>
- Almomani, M.H., Mangla, A., 2022. Bernard Soulier Syndrome, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Aloui, C., Prigent, A., Sut, C., Tariket, S., Hamzeh-Cognasse, H., Pozzetto, B., Richard, Y., Cognasse, F., Laradi, S., Garraud, O., 2014. The Signaling Role of CD40 Ligand in Platelet Biology and in Platelet Component Transfusion. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22342–22364. <https://doi.org/10.3390/ijms151222342>
- Andreu, G., Vasse, J., Hervé, F., Tardivel, R., Semana, G., 2007. [Introduction of platelet additive solutions in transfusion practice. Advantages, disadvantages and benefit for patients]. *Transfus. Clin. Biol.* 14, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2007.03.009>
- Angénieux, C., Couvidou, A., Brouard, N., Eckly, A., Dupuis, A., Mangin, P.H., Maître, B., 2023. Discriminating young platelets on human leukocyte antigen-I expression highlights their extremely high reactivity potential. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 100006. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2022.100006>
- Angénieux, C., Dupuis, A., Gachet, C., de la Salle, H., Maître, B., 2019. Cell surface expression of HLA-I molecules as a marker of young platelets. *J. Thromb. Haemost.* 17, 1511–1521. <https://doi.org/10.1111/jth.14537>
- Angénieux, C., Maître, B., Eckly, A., Lanza, F., Gachet, C., Salle, H. de la, 2016. Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. *PLOS ONE* 11, e0148064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148064>
- Anthony, R.M., Nimmerjahn, F., 2011. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcγRs in vivo. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 16, 7–14. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e328342538f>
- Appelgren, D., Eriksson, P., Ernerudh, J., Segelmark, M., 2018. Marginal-Zone B-Cells Are Main Producers of IgM in Humans, and Are Reduced in Patients With Autoimmune Vasculitis. *Front. Immunol.* 9.

- Arepally, G.M., Padmanabhan, A., 2021. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 41, 141–152. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315445>
- Arthur, C.M., Patel, S.R., Smith, N.H., Bennett, A., Kamili, N.A., Mener, A., Gerner-Smidt, C., Sullivan, H.C., Hale, J.S., Wieland, A., Youngblood, B., Zimring, J.C., Hendrickson, J.E., Stowell, S.R., 2017. Antigen Density Dictates Immune Responsiveness following Red Blood Cell Transfusion. *J. Immunol.* 198, 2671–2680. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601736>
- Aslam, R., Kapur, R., Segel, G.B., Guo, L., Zufferey, A., Ni, H., Semple, J.W., 2016. The spleen dictates platelet destruction, anti-platelet antibody production, and lymphocyte distribution patterns in a murine model of immune thrombocytopenia. *Exp. Hematol.* 44, 924–930.e1. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.07.004>
- Aslam, R., Speck, E.R., Kim, M., Freedman, J., Semple, J.W., 2008. Transfusion-related immunomodulation by platelets is dependent on their expression of MHC Class I molecules and is independent of white cells. *Transfusion (Paris)* 48, 1778–1786. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01791.x>
- Aster, R.H., 1966. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of “hypersplenic” thrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* 45, 645–657.
- Avanzi, M.P., Oluwadara, O.E., Cushing, M.M., Mitchell, M.L., Fischer, S., Mitchell, W.B., 2016. A novel bioreactor and culture method drives high yields of platelets from stem cells. *Transfusion (Paris)* 56, 170–178. <https://doi.org/10.1111/trf.13375>
- B. BONEU, J-P. CAZENAVE, 1997. Introduction à l’étude de l’hémostase et de la thrombose. 2ème édition.
- Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., Kearney, J.F., 2002. Blood Dendritic Cells Interact with Splenic Marginal Zone B Cells to Initiate T-Independent Immune Responses. *Immunity* 17, 341–352. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00389-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00389-8)
- Ballow, M., 1997. Mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100, 151–157. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70217-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70217-3)
- Bang, K.W., Speck, E.R., Blanchette, V.S., Freedman, J., Semple, J.W., 2000. Unique processing pathways within recipient antigen-presenting cells determine IgG immunity against donor platelet MHC antigens. *Blood* 95, 1735–1742.
- Barlev, A.N., Malkiel, S., Dorjée, A.L., Suurmond, J., Diamond, B., 2021. FcγRIIB regulates (auto)antibody responses by limiting marginal zone B cell activation (preprint). *Immunology*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.03.471075>
- Basire, A., Picard, C., 2014. [Platelet allo-antibodies identification strategies for preventing and managing platelet refractoriness]. *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Francaise Transfus. Sang.* 21, 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2014.08.140>
- Benjamin, R.J., Anderson, K.C., 2002. What is the proper threshold for platelet transfusion in patients with chemotherapy-induced thrombocytopenia? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 163–171. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(01\)00182-2](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00182-2)
- Bikoue, A., George, F., Poncelet, P., Mutin, M., Janossy, G., Sampol, J., 1996. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry* 26, 137–147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960615\)26:2<137::AID-CYTO7>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960615)26:2<137::AID-CYTO7>3.0.CO;2-D)

- Blanchette, V.S., Johnson, J., Rand, M., 2000. The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 13, 365–390. <https://doi.org/10.1053/beha.2000.0083>
- Boardman, D.A., Jacob, J., Smyth, L.A., Lombardi, G., Lechler, R.I., 2016. What Is Direct Allorecognition? *Curr. Transplant. Rep.* 3, 275–283. <https://doi.org/10.1007/s40472-016-0115-8>
- Böhm, D., Cooper, N., Wienzek-Lischka, S., Bein, G., Sachs, U.J., 2019. Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia (FNAIT): Evidence that Placental rather than Systemic Inflammation is a Modulator of Disease Severity, in: *Hämostaseologie*. Presented at the 63rd Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research, Georg Thieme Verlag KG, pp. P01-4. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1680169>
- Boneu, B., Cazenave, J.-P., 1997. *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose*, 2e édition. ed. Laboratoire Millot.
- Brandt, J.T., Julius, C.J., Osborne, J.M., Anderson, C.L., 1996. The mechanism of platelet aggregation induced by HLA-related antibodies. *Thromb. Haemost.* 76, 774–779.
- Breukels, M.A., Zandvoort, A., Rijkers, G.T., Lodewijk, M.E., Klok, P.A., Harms, G., Timens, W., 2005. Complement Dependency of Splenic Localization of Pneumococcal Polysaccharide and Conjugate Vaccines. *Scand. J. Immunol.* 61, 322–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01584.x>
- Brubaker, D.B., Marcus, C., Holmes, E., 1998. Intravascular and total body platelet equilibrium in healthy volunteers and in thrombocytopenic patients transfused with single donor platelets. *Am. J. Hematol.* 58, 165–176. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8652\(199807\)58:3<165::aid-ajh2>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8652(199807)58:3<165::aid-ajh2>3.0.co;2-p)
- Butler, C., Doree, C., Estcourt, L.J., Trivella, M., Hopewell, S., Brunskill, S.J., Stanworth, S., Murphy, M.F., 2013. Pathogen-reduced platelets for the prevention of bleeding. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009072.pub2>
- Calabro, S., Gallman, A., Gowthaman, U., Liu, D., Chen, P., Liu, J., Krishnaswamy, J.K., Nascimento, M.S.L., Xu, L., Patel, S.R., Williams, A., Tormey, C.A., Hod, E.A., Spitalnik, S.L., Zimring, J.C., Hendrickson, J.E., Stowell, S.R., Eisenbarth, S.C., 2016a. Bridging channel dendritic cells induce immunity to transfused red blood cells. *J. Exp. Med.* 213, 887–896. <https://doi.org/10.1084/jem.20151720>
- Calabro, S., Gallman, A., Gowthaman, U., Liu, D., Chen, P., Liu, J., Krishnaswamy, J.K., Nascimento, M.S.L., Xu, L., Patel, S.R., Williams, A., Tormey, C.A., Hod, E.A., Spitalnik, S.L., Zimring, J.C., Hendrickson, J.E., Stowell, S.R., Eisenbarth, S.C., 2016b. Bridging channel dendritic cells induce immunity to transfused red blood cells. *J. Exp. Med.* 213, 887–896. <https://doi.org/10.1084/jem.20151720>
- Cerutti, A., Cols, M., Puga, I., 2013. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 118–132. <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- Chapman, L.M., Aggrey, A.A., Field, D.J., Srivastava, K., Ture, S., Yui, K., Topham, D.J., Baldwin, W.M., Morrell, C.N., 2012. Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 916–923. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200580>
- Chappell, C.P., Draves, K.E., Giltiay, N.V., Clark, E.A., 2012. Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell–dependent antibody responses. *J. Exp. Med.* 209, 1825–1840. <https://doi.org/10.1084/jem.20120774>

- Chun, J., Hartung, H.-P., 2010. Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* 33, 91. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e3181cbf825>
- Cid, J., Magnano, L., Acosta, M., Alba, C., Esteve, J., Lozano, M., 2015. Rituximab, plasma exchange and intravenous immunoglobulins as a new treatment strategy for severe HLA alloimmune platelet refractoriness. *Platelets* 26, 190–194. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.895922>
- Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M.J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R.L., Cyster, J.G., 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat. Immunol.* 5, 713–720. <https://doi.org/10.1038/ni1083>
- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., Cyster, J.G., 2008. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat. Immunol.* 9, 54–62. <https://doi.org/10.1038/ni1542>
- Clemetson, K.J., Clemetson, J.M., 1995. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin. Thromb. Hemost.* 21, 130–136. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1000387>
- Cloutier, N., Allaey, I., Marcoux, G., Machlus, K.R., Mailhot, B., Zufferey, A., Levesque, T., Becker, Y., Tessandier, N., Melki, I., Zhi, H., Poirier, G., Rondina, M.T., Italiano, J.E., Flamand, L., McKenzie, S.E., Cote, F., Nieswandt, B., Khan, W.I., Flick, M.J., Newman, P.J., Lacroix, S., Fortin, P.R., Boilard, E., 2018. Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720553115>
- Coetzee, L.-M., Pieters, H., Wyk, V. van, Cooper, S., Roodt, J., Reys, S.D., Badenhorst, P.N., 2000. The Effect of Monoclonal Anti-human-platelet Antibodies on Platelet Kinetics in a Baboon Model: IgG Subclass Dependency. *Thromb. Haemost.* 83, 148–156. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613771>
- Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Laradi, S., Chou, M.-L., Seghatchian, J., Burnouf, T., Boulanger, C., Garraud, O., Amabile, N., 2015. The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfus. Apher. Sci.* 53, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2015.10.013>
- Colberg, L., Cammann, C., Greinacher, A., Seifert, U., 2020. Structure and function of the ubiquitin-proteasome system in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 18, 771–780. <https://doi.org/10.1111/jth.14730>
- Contreras, M., 1998. Final statement from the consensus conference on platelet transfusion. *Transfusion (Paris)* 38, 796–797. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1998.38898375520.x>
- Couvidou, A., Angénieux, C., Ruch, L., Mangin, P.H., Gachet, C., Maître, B., 2022. Marginal zone B cells are responsible for the production of alloantibodies following platelet transfusion in mice. *Blood Adv.* bloodadvances.2022008411. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008411>
- Couvidou, A., Rojas-Jiménez, G., Dupuis, A., Maître, B., 2023. Anti-HLA Class I alloantibodies in platelet transfusion refractoriness: From mechanisms and determinants to therapeutic prospects. *Front. Immunol.* 14.
- Crow, A.R., Suppa, S.J., Chen, X., Mott, P.J., Lazarus, A.H., 2011. The neonatal Fc receptor (FcRn) is not required for IVIg or anti-CD44 monoclonal antibody-mediated amelioration of murine

- immune thrombocytopenia. *Blood* 118, 6403–6406. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374223>
- Curtis, B.R., McFarland, J.G., 2014. Human platelet antigens – 2013. *Vox Sang.* 106, 93–102. <https://doi.org/10.1111/vox.12085>
- Daly, P.A., Schiffer, C.A., Aisner, J., Wiernik, P.H., 1980. Platelet transfusion therapy. One-hour posttransfusion increments are valuable in predicting the need for HLA-matched preparations. *JAMA* 243, 435–438. <https://doi.org/10.1001/jama.243.5.435>
- Datema, G., Stein, S., Eijssink, C., Mulder, A., Claas, F.H.J., Doxiadis, I.I.N., 2000. HLA-C Expression on Platelets: Studies with an HLA-Cw1-Specific Human Monoclonal Antibody. *Vox Sang.* 79, 108–111. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2000.7920108.x>
- Dausset, J., 1958. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* 20, 156–166. <https://doi.org/10.1159/000205478>
- Del Conde, I., Cruz, M.A., Zhang, H., López, J.A., Afshar-Kharghan, V., 2005. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.* 201, 871–879. <https://doi.org/10.1084/jem.20041497>
- Deppermann, C., Kratoch, R.M., Peiseler, M., David, B.A., Zindel, J., Castanheira, F.V.E.S., van der Wal, F., Carestia, A., Jenne, C.N., Marth, J.D., Kubes, P., 2020. Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets. *J. Exp. Med.* 217, e20190723. <https://doi.org/10.1084/jem.20190723>
- Dunstan, R., Simpson, M., Knowles, R., Rosse, W., 1985. The origin of ABH antigens on human platelets. *Blood* 65, 615–619. <https://doi.org/10.1182/blood.V65.3.615.615>
- Dupuis, A., Bordet, J.-C., Eckly, A., Gachet, C., 2020. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *J. Clin. Med.* 9, 2508. <https://doi.org/10.3390/jcm9082508>
- Ebbeling, L., Robertson, C., McNicol, A., Gerrard, J.M., 1992. Rapid ultrastructural changes in the dense tubular system following platelet activation. *Blood* 80, 718–723.
- Engelfriet, C.P., Reesink, H.W., 2003. Detection of platelet-reactive antibodies in patients who are refractory to platelet transfusions, and the selection of compatible donors. *Vox Sang.* 84, 73–88. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2003.00259.x>
- Estcourt, L.J., Birchall, J., Allard, S., Bassey, S.J., Hersey, P., Kerr, J.P., Mumford, A.D., Stanworth, S.J., Tinigat, H., Haematology, the B.C. for S. in, 2017. Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br. J. Haematol.* 176, 365–394. <https://doi.org/10.1111/bjh.14423>
- Febbraio, M., Hajjar, D.P., Silverstein, R.L., 2001. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 108, 785–791. <https://doi.org/10.1172/JCI14006>
- Figueiredo, C., Blasczyk, R., 2021. Generation of HLA Universal Megakaryocytes and Platelets by Genetic Engineering. *Front. Immunol.* 12.
- Fullard, J.F., 2004. The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1567–1576. <https://doi.org/10.2174/1381612043384682>
- Garraud, O., Hamzeh-Cognasse, H., Chalayer, E., Duchez, A.C., Tardy, B., Oriol, P., Haddad, A., Guyotat, D., Cognasse, F., 2023. Platelet transfusion in adults: An update. *Transfus. Clin. Biol.* 30, 147–165. <https://doi.org/10.1016/j.traccli.2022.08.147>

- Gasque, P., 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol. Immunol., Recognition Strategies in the Innate Immune System* 41, 1089–1098.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.011>
- Gatto, D., Wood, K., Caminschi, I., Murphy-Durland, D., Schofield, P., Christ, D., Karupiah, G., Brink, R., 2013. The chemotactic receptor EBI2 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic dendritic cells. *Nat. Immunol.* 14, 446–453.
<https://doi.org/10.1038/ni.2555>
- Gaydos, L.A., Freireich, E.J., Mantel, N., 1962. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 266, 905–909.
<https://doi.org/10.1056/NEJM196205032661802>
- Gelhaus, A., Scheduling, A., Browne, E., Burchard, G.D., Horstmann, R.D., 2001. Variability of the CD36 gene in West Africa. *Hum. Mutat.* 18, 444–450. <https://doi.org/10.1002/humu.1215>
- Ghio, M., Contini, P., Mazzei, C., Brenci, S., Barberis, G., Filaci, G., Indiveri, F., Puppo, F., 1999. Soluble HLA Class I, HLA Class II, and Fas Ligand in Blood Components: A Possible Key to Explain the Immunomodulatory Effects of Allogeneic Blood Transfusions. *Blood* 93, 1770–1777.
<https://doi.org/10.1182/blood.V93.5.1770>
- Giezen, T.J., Mantel-Teeuwisse, A.K., ten Berg, M.J., Straus, S.M.J.M., Leufkens, H.G.M., van Solinge, W.W., Egberts, T.C.G., 2012. Rituximab-induced thrombocytopenia: a cohort study. *Eur. J. Haematol.* 89, 256–266. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2012.01808.x>
- Gilson, C.R., Zimring, J.C., 2012. Alloimmunization to transfused platelets requires priming of CD4+ T cells in the splenic microenvironment in a murine model. *Transfusion (Paris)* 52, 849–859.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03346.x>
- Goldmann, L., Duan, R., Kragh, T., Wittmann, G., Weber, C., Lorenz, R., von Hundelshausen, P., Spannagl, M., Siess, W., 2019. Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors block activation of the platelet Fc receptor CD32a (FcγRIIA): a new option in HIT? *Blood Adv.* 3, 4021–4033.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000617>
- Goswamy, R.V., Wilson, N.R., Tannenbaum, D.J., Aung, F.M., Hernandez, C.M.R., 2021. Practice patterns and clinical outcomes of platelet alloimmunization in a comprehensive cancer center. *Transfus. Apher. Sci.* 60, 103096. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2021.103096>
- Grabowska, J., Lopez-Venegas, M.A., Affandi, A.J., den Haan, J.M.M., 2018. CD169+ Macrophages Capture and Dendritic Cells Instruct: The Interplay of the Gatekeeper and the General of the Immune System. *Front. Immunol.* 9.
- Gray, D., McConnell, I., Kumararatne, D.S., MacLennan, I.C.M., Humphrey, J.H., Bazin, H., 1984. Marginal zone B cells express CR1 and CR2 receptors. *Eur. J. Immunol.* 14, 47–52.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830140109>
- Guo, L., Shen, S., Rowley, J.W., Tolley, N.D., Jia, W., Manne, B.K., McComas, K.N., Bolingbroke, B., Kosaka, Y., Krauel, K., Denorme, F., Jacob, S.P., Eustes, A.S., Campbell, R.A., Middleton, E.A., He, X., Brown, S.M., Morrell, C.N., Weyrich, A.S., Rondina, M.T., 2021. Platelet MHC class I mediates CD8+ T-cell suppression during sepsis. *Blood* 138, 401–416.
<https://doi.org/10.1182/blood.2020008958>
- Habas, E., Rayani, A., Alfitori, G., Eldin Ahmed, G., Elzouki, A.-N.Y., 2022. Gestational Thrombocytopenia: A Review on Recent Updates. *Cureus.*
<https://doi.org/10.7759/cureus.23204>

- Hamad, O.A., Nilsson, P.H., Wouters, D., Lambris, J.D., Ekdahl, K.N., Nilsson, B., 2010. Complement Component C3 Binds to Activated Normal Platelets without Preceding Proteolytic Activation and Promotes Binding to Complement Receptor 1. *J. Immunol.* 184, 2686–2692. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902810>
- Handin, R.I., Stossel, T.P., 1974. Phagocytosis of Antibody-Coated Platelets by Human Granulocytes. *N. Engl. J. Med.* 290, 989–993. <https://doi.org/10.1056/NEJM197405022901803>
- Harper, S.J.F., Ali, J.M., Wlodek, E., Negus, M.C., Harper, I.G., Chhabra, M., Qureshi, M.S., Mallik, M., Bolton, E., Bradley, J.A., Pettigrew, G.J., 2015. CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 12788–12793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513533112>
- Hechler, B., Ohlmann, P., Chafey, P., Ravanat, C., Eckly, A., Maurer, E., Mangin, P., Isola, H., Cazenave, J.-P., Gachet, C., 2013. Preserved functional and biochemical characteristics of platelet components prepared with amotosalen and ultraviolet A for pathogen inactivation. *Transfusion (Paris)* 53, 1187–1200. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03923.x>
- Heddle, N.M., Cook, R.J., Tinmouth, A., Kouroukis, C.T., Hervig, T., Klapper, E., Brandwein, J.M., Szczepiorkowski, Z.M., AuBuchon, J.P., Barty, R.L., Lee, K.-A., SToP Study Investigators of the BEST Collaborative, 2009. A randomized controlled trial comparing standard- and low-dose strategies for transfusion of platelets (SToP) to patients with thrombocytopenia. *Blood* 113, 1564–1573. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-178236>
- Hémorragie massive et transfusion d'urgence [WWW Document], 2021. . Prof. Educ. URL <https://professionaleducation.blood.ca/fr/transfusion/guide-clinique/hemorragie-massive-et-transfusion-durgence> (accessed 3.16.23).
- Hendrickson, J.E., Tormey, C.A., 2016. Understanding red blood cell alloimmunization triggers. *Hematology* 2016, 446–451. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.446>
- Henn, V., Slupsky, J.R., Gräfe, M., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Müller-Berghaus, G., Kroczeck, R.A., 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591–594. <https://doi.org/10.1038/35393>
- Horton, H.M., Chu, S.Y., Ortiz, E.C., Pong, E., Cemurski, S., Leung, I.W.L., Jacob, N., Zalevsky, J., Desjarlais, J.R., Stohl, W., Szymkowski, D.E., 2011. Antibody-Mediated Coengagement of FcγRIIb and B Cell Receptor Complex Suppresses Humoral Immunity in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 186, 4223–4233. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003412>
- Humbrecht, C., Kientz, D., Gachet, C., 2018. Platelet transfusion: Current challenges. *Transfus. Clin. Biol.*, Platelets and Platelet transfusions: Challenges for today and tomorrow / Plaquettes et transfusions plaquettaires : défis d'aujourd'hui et de demain 25, 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.traccli.2018.06.004>
- Ikeda, H., Mitani, T., Ohnuma, M., Haga, H., Ohtzuka, S., Kato, T., Nakase, T., Sekiguchi, S., 1989. A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang.* 57, 213–217. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1989.tb00826.x>
- Isola, H., Ravanat, C., Rudwill, F., Pongerard, A., Haas, D., Eckly, A., Gachet, C., Hechler, B., 2021. Removal of citrate from PAS-III additive solution improves functional and biochemical characteristics of buffy-coat platelet concentrates stored for 7 days, with or without INTERCEPT pathogen reduction. *Transfusion (Paris)* 61, 919–930. <https://doi.org/10.1111/trf.16280>

- Jackman, R.P., Deng, X., Bolgiano, D., Utter, G.H., Schechterly, C., Lebedeva, M., Operskalski, E., Luban, N.L., Alter, H., Busch, M.P., Slichter, S.J., Norris, P.J., 2014. Leukoreduction and UV treatment reduce both the magnitude and duration of the anti-HLA antibody response. *Transfusion (Paris)* 54, 672–680. <https://doi.org/10.1111/trf.12317>
- Janson, M., McFarland, J., Aster, R.H., 1986. Quantitative determination of platelet surface alloantigens using a monoclonal probe. *Hum. Immunol.* 15, 251–262. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(86\)90001-7](https://doi.org/10.1016/0198-8859(86)90001-7)
- Jennewein, M.F., Alter, G., 2017. The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation. *Trends Immunol.* 38, 358–372. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.02.004>
- Jiang, Y., Tang, Y., Hoover, C., Kondo, Y., Huang, D., Restagno, D., Shao, B., Gao, L., Michael McDaniel, J., Zhou, M., Silasi-Mansat, R., McGee, S., Jiang, M., Bai, X., Lupu, F., Ruan, C., Marth, J.D., Wu, D., Han, Y., Xia, L., 2021. Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice. *Cell Death Differ.* 28, 3009–3021. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00797-w>
- Jordan, S.C., Lorant, T., Choi, J., Kjellman, C., Winstedt, L., Bengtsson, M., Zhang, X., Eich, T., Toyoda, M., Eriksson, B.-M., Ge, S., Peng, A., Järnum, S., Wood, K.J., Lundgren, T., Wennberg, L., Bäckman, L., Larsson, E., Villicana, R., Kahwaji, J., Louie, S., Kang, A., Haas, M., Nast, C., Vo, A., Tufveson, G., 2017. IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 377, 442–453. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612567>
- Kaidarova, Z., Di Germanio, C., Custer, B., Norris, P.J., n.d. Risk of HLA antibody generation after receipt of Mirasol versus standard platelets in the MIPLATE randomized trial. *Transfusion (Paris)* n/a. <https://doi.org/10.1111/trf.17286>
- Kaneku, H., O’Leary, J.G., Taniguchi, M., Susskind, B.M., Terasaki, P.I., Klintmalm, G.B., 2012. Donor-specific human leukocyte antigen antibodies of the immunoglobulin G3 subclass are associated with Chronic rejection and graft loss after liver transplantation. *Liver Transpl.* 18, 984–992. <https://doi.org/10.1002/lt.23451>
- Kang, Y., Yamazaki, S., Iyoda, T., Pack, M., Bruening, S.A., Kim, J.Y., Takahara, K., Inaba, K., Steinman, R.M., Park, C.G., 2003. SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *Int. Immunol.* 15, 177–186. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg019>
- Kao, K.J., Cook, D.J., Scornik, J.C., 1986. Quantitative Analysis of Platelet Surface HLA by W6/32 Anti-HLA Monoclonal Antibody. *Blood* 68, 627–632. <https://doi.org/10.1182/blood.V68.3.627.627>
- Kapur, R., Kustiawan, I., Vestrheim, A., Koeleman, C.A.M., Visser, R., Einarsdottir, H.K., Porcelijn, L., Jackson, D., Kumpel, B., Deelder, A.M., Blank, D., Skogen, B., Killie, M.K., Michaelsen, T.E., de Haas, M., Rispens, T., van der Schoot, C.E., Wuhler, M., Vidarsson, G., 2014. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood* 123, 471–480. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-527978>
- Kapur, R., Zufferey, A., Boilard, E., Semple, J.W., 2015. Nouvelle Cuisine: Platelets Served with Inflammation. *J. Immunol.* 194, 5579–5587. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500259>
- Kaufman, R.M., Djulbegovic, B., Gernsheimer, T., Kleinman, S., Tinmouth, A.T., Capocelli, K.E., Cipolle, M.D., Cohn, C.S., Fung, M.K., Grossman, B.J., Mintz, P.D., O’Malley, B.A., Sesok-Pizzini, D.A., Shander, A., Stack, G.E., Webert, K.E., Weinstein, R., Welch, B.G., Whitman, G.J., Wong, E.C., Tobian, A.A.R., 2015. Platelet Transfusion: A Clinical Practice Guideline From the AABB. *Ann. Intern. Med.* 162, 205–213. <https://doi.org/10.7326/M14-1589>

- Kiyokawa, T., Mimura, K., Nagamine, K., Nakayama, K., Horiuchi, M., Morikawa, T., Hosokawa, M., Nakao, M., Endo, M., Kimura, T., Kato, H., Tomiyama, Y., Kashiwagi, H., 2023. FNAIT pathogenesis determined by serial analysis of three subsequent pregnancies of a woman with severe fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) with anti-HPA-4b and anti-HPA-5b alloantibodies in the first sibling. *Int. J. Hematol.* <https://doi.org/10.1007/s12185-023-03559-1>
- Kizlik-Masson, C., Deveuue, Q., Zhou, Y., Vayne, C., Thibault, G., McKenzie, S.E., Pouplard, C., Loyau, S., Gruel, Y., Rollin, J., 2019. Cleavage of anti-PF4/heparin IgG by a bacterial protease and potential benefit in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 133, 2427–2435. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000437>
- Klein, J., Flaherty, L., VandeBerg, J.L., Shreffler, D.C., 1978. H-2 haplotypes, genes, regions, and antigens: First listing. *Immunogenetics* 6, 489–512. <https://doi.org/10.1007/BF01563941>
- Kolakoski, M., n.d. GUIDELINES FOR THE.
- Koppel, E.A., Litjens, M., van den Berg, V.C., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B.H., 2008. Interaction of SIGNR1 expressed by marginal zone macrophages with marginal zone B cells is essential to early IgM responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Immunol.* 45, 2881–2887. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.01.032>
- Kraal, G., Mebius, R., 2006. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* 250, 175–215. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)50005-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)50005-1)
- Kraal, G., van der Laan, L.J.W., Elomaa, O., Tryggvason, K., 2000. The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect.* 2, 313–316. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00296-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00296-3)
- Kreuger, A.L., Caram-Deelder, C., Jacobse, J., Kerkhoffs, J.-L., van der Bom, J.G., Middelburg, R.A., 2017. Effect of storage time of platelet products on clinical outcomes after transfusion: a systematic review and meta-analyses. *Vox Sang.* 112, 291–300. <https://doi.org/10.1111/vox.12494>
- Kristinsson, S.Y., Gridley, G., Hoover, R.N., Check, D., Landgren, O., 2014. Long-term risks after splenectomy among 8,149 cancer-free American veterans: a cohort study with up to 27 years follow-up. *Haematologica* 99, 392–398. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.092460>
- Kurotaki, D., Uede, T., Tamura, T., 2015. Functions and development of red pulp macrophages. *Microbiol. Immunol.* 59, 55–62. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12228>
- Kurtzber, J., Friedman, H.S., Kinney, T.R., Chaffee, S., Falletta, J.M., 1987. Treatment of platelet alloimmunization with intravenous immunoglobulin: Two case reports and review of the literature. *Am. J. Med., Innovative Uses of Intravenous Immunoglobulins in Clinical Hematology* 83, 30–33. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90548-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90548-1)
- Kuter, D.J., 2015. Managing thrombocytopenia associated with cancer chemotherapy. *Oncol. Williston Park N* 29, 282–294.
- Lasne, D., Borgel, D., Kauskot, A., 2200. Sialylation and thrombocytopenia. *Hématologie* 1. <https://doi.org/10.1684/hma.2020.1602>
- Laundy, G. j., Bradley, B. a., Rees, B. m., Younie, M., Hows, J. m., 2004. Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia. *Transfusion (Paris)* 44, 814–825. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.03387.x>
- Learoyd, P., 2012. The history of blood transfusion prior to the 20th century – Part 1. *Transfus. Med.* 22, 308–314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2012.01180.x>

- Lesesve, J.-F., 2021. La découverte des plaquettes sanguines. *Rev. Biol. Médicale* 359, p.53-63.
- Lewis, S.M., Williams, A., Eisenbarth, S.C., 2019. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>
- Li, J., van der Wal, D.E., Zhu, G., Xu, M., Yougbare, I., Ma, L., Vadasz, B., Carrim, N., Grozovsky, R., Ruan, M., Zhu, L., Zeng, Q., Tao, L., Zhai, Z., Peng, J., Hou, M., Leytin, V., Freedman, J., Hoffmeister, K.M., Ni, H., 2015. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat. Commun.* 6, 7737. <https://doi.org/10.1038/ncomms8737>
- Liu, D., Wu, J., An, J., Cyster, J.G., 2020. Requirements for cDC2 positioning in blood-exposed regions of the neonatal and adult spleen. *J. Exp. Med.* 217, e20192300. <https://doi.org/10.1084/jem.20192300>
- Liu, W., Wu, D., Hu, T., Ye, B., 2015. Efficiency of treatment with rituximab in platelet transfusion refractoriness: a study of 7 cases. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 14080–14084.
- Liu, Z., Liu, S., Zhang, Y., Zeng, W., Wang, S., Ji, P., Pan, M., Zhu, C., Wang, Y., 2021. Distinct roles of ICOS and CD40L in human T-B cell adhesion and antibody production. *Cell. Immunol.* 368, 104420. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104420>
- Lonial, S., Waller, E.K., Richardson, P.G., Jagannath, S., Orlowski, R.Z., Giver, C.R., Jaye, D.L., Francis, D., Giusti, S., Torre, C., Barlogie, B., Berenson, J.R., Singhal, S., Schenkein, D.P., Esseltine, D.-L.W., Anderson, J., Xiao, H., Heffner, L.T., Anderson, K.C., SUMMIT/CREST Investigators, 2005. Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood* 106, 3777–3784. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1173>
- Lowe, D., Higgins, R., Zehnder, D., Briggs, D.C., 2013. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: Implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Hum. Immunol.* 74, 666–672. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.01.008>
- Lu, T.T., Cyster, J.G., 2002. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* 297, 409–412. <https://doi.org/10.1126/science.1071632>
- Lynch, D.R., Stringham, E.N., Zhang, B., Balbin-Cuesta, G., Curtis, B.R., Palumbo, J.S., Greineder, C.F., Tourdot, B.E., 2022. Anchoring IgG-degrading enzymes to the surface of platelets selectively neutralizes antiplatelet antibodies. *Blood Adv.* 6, 4645–4656. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007195>
- Marcoux, G., Laroche, A., Espinoza Romero, J., Boilard, E., 2021a. Role of platelets and megakaryocytes in adaptive immunity. *Platelets* 32, 340–351. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1786043>
- Marcoux, G., Laroche, A., Hasse, S., Bellio, M., Mbarik, M., Tamagne, M., Allaey, I., Zufferey, A., Lévesque, T., Rebetz, J., Karakeussian-Rimbaud, A., Turgeon, J., Bourgoin, S.G., Hamzeh-Cognasse, H., Cognasse, F., Kapur, R., Semple, J.W., Hébert, M.-J., Pirenne, F., Overkleeft, H.S., Florea, B.I., Dieude, M., Vingert, B., Boilard, E., 2021b. Platelet EVs contain an active proteasome involved in protein processing for antigen presentation via MHC-I molecules. *Blood* 138, 2607–2620. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009957>
- Marcoux, G., Magron, A., Sut, C., Laroche, A., Laradi, S., Hamzeh-Cognasse, H., Allaey, I., Cabon, O., Julien, A.-S., Garraud, O., Cognasse, F., Boilard, E., 2019. Platelet-derived extracellular vesicles convey mitochondrial DAMPs in platelet concentrates and their levels are associated with adverse reactions. *Transfusion (Paris)* 59, 2403–2414. <https://doi.org/10.1111/trf.15300>

- Marguerie, G.A., Plow, E.F., Edgington, T.S., 1979. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 254, 5357–5363. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50603-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50603-7)
- Martin, F., Kearney, J.F., 2002. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323–335. <https://doi.org/10.1038/nri799>
- Martínez-Riaño, A., Bovolenta, E.R., Mendoza, P., Oeste, C.L., Martín-Bermejo, M.J., Bovolenta, P., Turner, M., Martínez-Martín, N., Alarcón, B., 2018. Antigen phagocytosis by B cells is required for a potent humoral response. *EMBO Rep.* 19, e46016. <https://doi.org/10.15252/embr.201846016>
- Mathai, J., Resmi, K.R., Sulochana, P.V., Sathyabhama, S., Baby saritha, G., Krishnan, L.K., 2006. Suitability of measurement of swirling as a marker of platelet shape change in concentrates stored for transfusion. *Platelets* 17, 393–396. <https://doi.org/10.1080/095371006000757695>
- McFadyen, J.D., Kaplan, Z.S., 2015. Platelets Are Not Just for Clots. *Transfus. Med. Rev., Special Issue (Australian Issue)* 29, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2014.11.006>
- Mebius, R.E., Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 606–616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Meinke, S., Karlström, C., Höglund, P., 2019. Complement as an Immune Barrier in Platelet Transfusion Refractoriness. *Transfus. Med. Rev., Complement in Transfusion Medicine* 33, 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.09.003>
- Meinke, S., Sandgren, P., Mörtberg, A., Karlström, C., Kadri, N., Wikman, A., Höglund, P., 2016. Platelets made HLA deficient by acid treatment aggregate normally and escape destruction by complement and phagocytes in the presence of HLA antibodies. *Transfusion (Paris)* 56, 370–382; quiz 369. <https://doi.org/10.1111/trf.13350>
- Migdady, Y., Ediriwickrema, A., Jackson, R.P., Kadi, W., Gupta, R., Socola, F., Arai, S., Martin, B.A., 2020. Successful treatment of thrombocytopenia with daratumumab after allogeneic transplant: a case report and literature review. *Blood Adv.* 4, 815–818. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001215>
- Miki, H., Ozaki, S., Tanaka, O., Lee, E., Takimoto, T., Watanabe, H., Fujii, S., Nakamura, S., Kagawa, K., Takeuchi, K., Yata, K.-I., Abe, M., Kagami, S., Matsumoto, T., 2009. Marked improvement of platelet transfusion refractoriness after bortezomib therapy in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* 89, 223–226. <https://doi.org/10.1007/s12185-009-0255-z>
- Mirlashari, M.R., Vetlesen, A., Nissen-Meyer, L.S.H., Naper, C., Tjønnfjord, G.E., Njerve, I.U., Ezligini, F., Landmark, B.F., Meinke, S., Sandgren, P., Höglund, P., Hetland, G., 2021a. HLA class I depletion by citric acid, and irradiation of apheresis platelets for transfusion of refractory patients. *Transfusion (Paris)* 61, 1222–1234. <https://doi.org/10.1111/trf.16282>
- Mirlashari, M.R., Vetlesen, A., Nissen-Meyer, L.S.H., Stensland, M.E., Singh, S.K., Nyman, T.A., Hetland, G., 2021b. Proteomic study of apheresis platelets made HLA class I deficient for transfusion of refractory patients. *Proteomics Clin. Appl.* 15, e2100022. <https://doi.org/10.1002/prca.202100022>
- Mittal, K., Kaur, R., 2015. Platelet storage lesion: An update. *Asian J. Transfus. Sci.* 9, 1–3. <https://doi.org/10.4103/0973-6247.150933>
- Mueller-Eckhardt, G., Hauck, M., Kayser, W., Mueller-Eckhardt, C., 1980. HLA-C Antigens on Platelets. *Tissue Antigens* 16, 91–94. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1980.tb00291.x>

- Müller, H., Hofer, S., Kaneider, N., Neuwirt, H., Mosheimer, B., Mayer, G., Konwalinka, G., Heufler, C., Tiefenthaler, M., 2005. The immunomodulator FTY720 interferes with effector functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 35, 533–545. <https://doi.org/10.1002/eji.200425556>
- Natarajan, P., Liu, D., Patel, S.R., Santhanakrishnan, M., Beitler, D., Liu, J., Gibb, D.R., Liepkalns, J.S., Madrid, D.J., Eisenbarth, S.C., Stowell, S.R., Hendrickson, J.E., 2017. CD4 Depletion or CD40L Blockade Results in Antigen-Specific Tolerance in a Red Blood Cell Alloimmunization Model. *Front. Immunol.* 8, 907. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00907>
- NCT00000589, 1999. Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets (TRAP).
- Ng, M.S.Y., Tung, J.-P., Fraser, J.F., 2018. Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? *Transfus. Med. Rev.* 32, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2018.04.001>
- Nolte, M.A., 't Hoen, E.N.M., van Stijn, A., Kraal, G., Mebius, R.E., 2000. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. *Eur. J. Immunol.* 30, 626–634. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200002\)30:2<626::AID-IMMU626>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200002)30:2<626::AID-IMMU626>3.0.CO;2-H)
- Noulsri, E., 2021. Effects of Cell-Derived Microparticles on Immune Cells and Potential Implications in Clinical Medicine. *Lab. Med.* 52, 122–135. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmaa043>
- Nurden, A.T., Fiore, M., Nurden, P., Pillois, X., 2011. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood* 118, 5996–6005. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365635>
- O'Connell, B., Lee, E.J., Schiffer, C.A., 1988. The value of 10-minute posttransfusion platelet counts. *Transfusion (Paris)* 28, 66–67. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1988.28188127957.x>
- Osch, T.L.J. van, Oosterhoff, J.J., Bentlage, A.E.H., Nouta, J., Koeleman, C.A.M., Geerdes, D.M., Mok, J.Y., Heidt, S., Mulder, A., Esch, W.J.E. van, Kapur, R., Porcelijn, L., Schoot, C.E. van der, Haas, M. de, Wuhrer, M., Voorberg, J., Vidarsson, G., 2020. Fc galactosylation of anti-platelet IgG1 alloantibodies enhance complement activation on platelets. *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.280493>
- Patel, S.R., Gibb, D.R., Girard-Pierce, K., Zhou, X., Rodrigues, L.C., Arthur, C.M., Bennett, A.L., Jajosky, R.P., Fuller, M., Maier, C.L., Zerra, P.E., Chonat, S., Smith, N.H., Tormey, C.A., Hendrickson, J.E., Stowell, S.R., 2018. Marginal Zone B Cells Induce Alloantibody Formation Following RBC Transfusion. *Front. Immunol.* 9, 2516. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02516>
- Pavenski, K., Freedman, J., Semple, J.W., 2012. HLA alloimmunization against platelet transfusions: pathophysiology, significance, prevention and management. *Tissue Antigens* 79, 237–245. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2012.01852.x>
- Pedicord, D.L., Dicker, I., O'Neil, K., Breth, L., Wynn, R., Hollis, G.F., Billheimer, J.T., Stern, A.M., Seiffert, D., 2003. CD32-dependent platelet activation by a drug-dependent antibody to glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Thromb. Haemost.* 89, 513–521.
- Peerschke, E.I., Ghebrehiwet, B., 1997. C1q augments platelet activation in response to aggregated Ig. *J. Immunol.* 159, 5594–5598. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.159.11.5594>
- Peerschke, E.I.B., Ghebrehiwet, B., 1998. Platelet Receptors for the Complement Component C1q: Implications for Hemostasis and Thrombosis. *Immunobiology* 199, 239–249. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(98\)80030-2](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(98)80030-2)

- Peerschke, E.I.B., Yin, W., Grigg, S.E., Ghebrehiwet, B., 2006. Blood platelets activate the classical pathway of human complement. *J. Thromb. Haemost. JTH* 4, 2035–2042. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02065.x>
- Pereira, J., Cretney, C., Aster, R.H., 1988. Variation of class I HLA antigen expression among platelet density cohorts: a possible index of platelet age? *Blood* 71, 516–519.
- Pirgova, G., Chauveau, A., MacLean, A.J., Cyster, J.G., Arnon, T.I., 2020. Marginal zone SIGN-R1⁺ macrophages are essential for the maturation of germinal center B cells in the spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 12295–12305. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921673117>
- Pogossian, A., de Moreuil, C., Lemarié, C., Rouvière, B., Delplanque, M., Molina, B., Prophette, L., Le Moigne, E., 2022. Les inhibiteurs du complément : une vue d'ensemble. *Rev. Médecine Interne* 43, 703–712. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2022.09.004>
- Pokrass, M.J., Liu, M.F., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., 2013. Activation of complement by monoclonal antibodies that target cell-associated β 2-microglobulin: Implications for cancer immunotherapy. *Mol. Immunol.* 56, 549–560. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.242>
- Poston, J.N., Jash, A., Hannan, L.M., Hay, A.M., Usaneerungrueng, C., Howie, H.L., Kapp, L.M., Zimring, J.C., 2021. In utero exposure to alloantigens primes alloimmunization to platelet transfusion in mice. *Transfusion (Paris)* 61, 687–691. <https://doi.org/10.1111/trf.16224>
- Rač, M.E., Safranow, K., Poncyljusz, W., 2007. Molecular Basis of Human CD36 Gene Mutations. *Mol. Med.* 13, 288–296. <https://doi.org/10.2119/2006-00088.Rac>
- Reese, J.A., Peck, J.D., Yu, Z., Scordino, T.A., Deschamps, D.R., McIntosh, J.J., Terrell, D.R., Vesely, S.K., George, J.N., 2019. PLATELET SEQUESTRATION AND CONSUMPTION IN THE PLACENTAL INTERVILLOUS SPACE CONTRIBUTE TO LOWER PLATELET COUNTS DURING PREGNANCY. *Am. J. Hematol.* 94, E8–E11. <https://doi.org/10.1002/ajh.25321>
- Reys, S.D., Blom, C., Lepoudre, B., Declerck, P.J., Ley, M.D., Vermynen, J., Deckmyn, H., 1993. Human Platelet Aggregation by Murine Monoclonal Antiplatelet Antibodies Is Subtype-Dependent. *Blood* 81, 1792–1800. <https://doi.org/10.1182/blood.V81.7.1792.1792>
- Rijkers, M., Saris, A., Heidt, S., Mulder, A., Porcelijn, L., Claas, F.H.J., Bierings, R., Leebeek, F.W.G., Jansen, A.J.G., Vidarsson, G., Voorberg, J., de Haas, M., 2018. A subset of anti-HLA antibodies induces Fc γ RIIa-dependent platelet activation. *Haematologica* 103, 1741–1752. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.189365>
- Rijkers, M., Schmidt, D., Lu, N., Kramer, C.S.M., Heidt, S., Mulder, A., Porcelijn, L., Claas, F.H.J., Leebeek, F.W.G., Jansen, A.J.G., Jongerius, I., Zeerleder, S.S., Vidarsson, G., Voorberg, J., de Haas, M., 2019. Anti-HLA antibodies with complementary and synergistic interaction geometries promote classical complement activation on platelets. *Haematologica* 104, 403–416. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.201665>
- Rollin, J., Charuel, N., Gruel, Y., Billy, S., Guéry, E.-A., May, M.-A., Pouplard, C., Vayne, C., 2022. Variable serotonin release assay pattern and specificity of PF4-specific antibodies in HIT, and clinical relevance. *J. Thromb. Haemost.* 20, 2646–2655. <https://doi.org/10.1111/jth.15848>
- Rubinstein, E., Urso, I., Boucheix, C., Carroll, R.C., 1992. Platelet Activation by Cross-Linking HLA Class I Molecules and Fc Receptor. *Blood* 79, 2901–2908. <https://doi.org/10.1182/blood.V79.11.2901.2901>

- Saab, S., Brown, R.S., 2019. Management of Thrombocytopenia in Patients with Chronic Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* 64, 2757–2768. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05615-5>
- Samuelsson, A., Towers, T.L., Ravetch, J.V., 2001. Anti-inflammatory Activity of IVIG Mediated Through the Inhibitory Fc Receptor. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.291.5503.484>
- Saris, A., Pavenski, K., 2020. Human Leukocyte Antigen Alloimmunization and Alloimmune Platelet Refractoriness. *Transfus. Med. Rev.*, Platelets in Transfusion Medicine 34, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2020.09.010>
- Saris, A., Peyron, I., van der Meer, P.F., Stuge, T.B., Zwaginga, J.J., van Ham, S.M., ten Brinke, A., 2018a. Storage-Induced Platelet Apoptosis Is a Potential Risk Factor for Alloimmunization Upon Platelet Transfusion. *Front. Immunol.* 9.
- Saris, A., Tomson, B., Brand, A., Mulder, A., Claas, F.H., Lorinser, J., Scharenberg, J., van Ham, S.M., ten Brinke, A., Zwaginga, J.J., van der Meer, P.F., 2018b. Platelets from donors with consistently low HLA-B8, -B12, or -B35 expression do not undergo antibody-mediated internalization. *Blood* 131, 144–152. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-799270>
- Sarma, J.V., Ward, P.A., 2011. The complement system. *Cell Tissue Res.* 343, 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
- Sasou, S., 2021. The perifollicular zone of the spleen as a distributor and filter of blood components. *J. Clin. Exp. Hematop.* 61, 58–60. <https://doi.org/10.3960/jslrt.20038>
- Sastow, D., Mascarenhas, J., Tremblay, D., 2022. Thrombocytopenia in Patients With Myelofibrosis: Pathogenesis, Prevalence, Prognostic Impact, and Treatment. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 22, e507–e520. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2022.01.016>
- Sayeh, E., Aslam, R., Speck, E.R., Le-Tien, H., Lazarus, A.H., Freedman, J., Semple, J.W., 2004a. Immune responsiveness against allogeneic platelet transfusions is determined by the recipient's major histocompatibility complex class II phenotype. *Transfusion (Paris)* 44, 1572–1578. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.04197.x>
- Sayeh, E., Sterling, K., Speck, E., Freedman, J., Semple, J.W., 2004b. IgG antiplatelet immunity is dependent on an early innate natural killer cell-derived interferon- γ response that is regulated by CD8+ T cells. *Blood* 103, 2705–2709. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3552>
- Schlenke, P., Hervig, T., Isola, H., Wiesel, M.-L., Kientz, D., Pinkoski, L., Singh, Y., Lin, L., Corash, L., Cazenave, J.-P., 2008. Photochemical treatment of plasma with amotosalen and UVA light: process validation in three European blood centers. *Transfusion (Paris)* 48, 697–705. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01594.x>
- Schrezenmeier, H., Seifried, E., 2010. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang.* 99, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01295.x>
- Schriek, P., Ching, A.C., Moily, N.S., Moffat, J., Beattie, L., Steiner, T.M., Hosking, L.M., Thurman, J.M., Holers, V.M., Ishido, S., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Heath, W.R., Mintern, J.D., Villadangos, J.A., 2022. Marginal zone B cells acquire dendritic cell functions by trogocytosis. *Science* 375, eabf7470. <https://doi.org/10.1126/science.abf7470>
- Semple, J.W., Rebetz, J., Kapur, R., 2019. Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury. *Blood* 133, 1840–1853. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-860809>

- Semple, J.W., Speck, E.R., Milev, Y.P., Blancherie, V., Freedman, J., 1995. Indirect Allorecognition of Platelets by T Helper Cells During Platelet Transfusions Correlates With Anti-Major Histocompatibility Complex Antibody and Cytotoxic T Lymphocyte Formation. *Blood* 86, 805–812. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.2.805.bloodjournal862805>
- Shao, L., Wu, Y., Zhou, H., Qin, P., Ni, H., Peng, J., Hou, M., 2015. Successful treatment with oseltamivir phosphate in a patient with chronic immune thrombocytopenia positive for anti-GPIb/IX autoantibody. *Platelets* 26, 495–497. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.948838>
- Shi, J., Rose, E.L., Singh, A., Hussain, S., Stagliano, N.E., Parry, G.C., Panicker, S., 2014. TNT003, an inhibitor of the serine protease C1s, prevents complement activation induced by cold agglutinins. *Blood* 123, 4015–4022. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-556027>
- Sinauridze, E.I., Kireev, D.A., Popenko, N.Y., Pichugin, A.V., Panteleev, M.A., Krymskaya, O.V., Ataulakhanov, F.I., 2007. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 97, 425–434.
- Siu, J.H.Y., Pitcher, M.J., Tull, T.J., Velounias, R.L., Guesdon, W., Montorsi, L., Mahbubani, K.T., Ellis, R., Dhami, P., Todd, K., Kadolsky, U.D., Kleeman, M., D’Cruz, D.P., Saeb-Parsy, K., Bemark, M., Pettigrew, G.J., Spencer, J., 2022. Two subsets of human marginal zone B cells resolved by global analysis of lymphoid tissues and blood. *Sci. Immunol.* 7, eabm9060. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abm9060>
- Slichter, S.J., 2007. Evidence-Based Platelet Transfusion Guidelines. *Hematology* 2007, 172–178. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2007.1.172>
- Slichter, S.J., Harker, L.A., 1978. Thrombocytopenia: Mechanisms and Management of Defects in Platelet Production. *Clin. Haematol.* 7, 523–539. [https://doi.org/10.1016/S0308-2261\(21\)00047-3](https://doi.org/10.1016/S0308-2261(21)00047-3)
- Slichter, S.J., Kaufman, R.M., Assmann, S.F., McCullough, J., Triulzi, D.J., Strauss, R.G., Gernsheimer, T.B., Ness, P.M., Brecher, M.E., Josephson, C.D., Konkle, B.A., Woodson, R.D., Ortel, T.L., Hillyer, C.D., Skerrett, D.L., McCrae, K.R., Sloan, S.R., Uhl, L., George, J.N., Aquino, V.M., Manno, C.S., McFarland, J.G., Hess, J.R., Leissinger, C., Granger, S., 2010. Dose of Prophylactic Platelet Transfusions and Prevention of Hemorrhage. *N. Engl. J. Med.* 362, 600–613. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904084>
- Snapper, C.M., Paul, W.E., 1987. Interferon- γ and B Cell Stimulatory Factor-1 Reciprocally Regulate Ig Isotype Production. *Science* 236, 944–947. <https://doi.org/10.1126/science.3107127>
- Song, H., Cerny, J., 2003. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J. Exp. Med.* 198, 1923–1935. <https://doi.org/10.1084/jem.20031498>
- Stasi, R., 2012. How to approach thrombocytopenia. *Hematology* 2012, 191–197. <https://doi.org/10.1182/asheducation.V2012.1.191.3798260>
- Stasi, R., Newland, A.C., 2011. ITP: a historical perspective. *Br. J. Haematol.* 153, 437–450. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08562.x>
- Steiniger, B., Timphus, E.M., Barth, P.J., 2006. The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants. *Histochem. Cell Biol.* 126, 641–648. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0210-5>

- Strassel, C., Gachet, C., Lanza, F., 2018. On the Way to in vitro Platelet Production. *Front. Med.* 5, 239. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00239>
- Sugawara, S., Abo, T., Kumagai, K., 1987. A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J. Immunol. Methods* 100, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90175-x](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90175-x)
- Sugimoto, N., Kanda, J., Nakamura, S., Kitano, T., Hishizawa, M., Kondo, T., Shimizu, S., Shigemasa, A., Hirai, H., Arai, Y., Minami, M., Tada, H., Momose, D., Koh, K.-R., Nogawa, M., Watanabe, N., Okamoto, S., Handa, M., Sawaguchi, A., Matsuyama, N., Tanaka, M., Hayashi, T., Fuchizaki, A., Tani, Y., Takaori-Kondo, A., Eto, K., 2022. iPLAT1: the first-in-human clinical trial of iPSC-derived platelets as a phase 1 autologous transfusion study. *Blood* 140, 2398–2402. <https://doi.org/10.1182/blood.2022017296>
- Suzuki, D., Flahou, C., Yoshikawa, N., Stirblyte, I., Hayashi, Y., Sawaguchi, A., Akasaka, M., Nakamura, S., Higashi, N., Xu, H., Matsumoto, T., Fujio, K., Manz, M.G., Hotta, A., Takizawa, H., Eto, K., Sugimoto, N., 2020. iPSC-Derived Platelets Depleted of HLA Class I Are Inert to Anti-HLA Class I and Natural Killer Cell Immunity. *Stem Cell Rep.* 14, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.11.011>
- Takahashi, D., Fujihara, M., Miyazaki, T., Matsubayashi, K., Sato, S., Azuma, H., Kato, T., Kino, S., Ikeda, H., Takamoto, S., Sato, N., Torigoe, T., 2017. Flow cytometric quantitation of platelet phagocytosis by monocytes using a pH-sensitive dye, pHrodo-SE. *J. Immunol. Methods* 447, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.04.009>
- Taylor, F., Toh, C.-H., Hoots, K., Wada, H., Levi, M., 2001. Towards Definition, Clinical and Laboratory Criteria, and a Scoring System for Disseminated Intravascular Coagulation: On behalf of the Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). *Thromb. Haemost.* 86, 1327–1330. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1616068>
- Thon, J.N., Italiano, J.E., 2012. Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure, in: Gresele, P., Born, G.V.R., Patrono, C., Page, C.P. (Eds.), *Antiplatelet Agents, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3–22. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_1
- Thorsby, E., 2009. A short history of HLA. *Tissue Antigens* 74, 101–116. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x>
- Tij, van O., J, S., J, N., Cam, K., Aeh, B., S, H., A, M., J, V., Sm, van H., M, W., A, T.B., G, V., 2023. Phagocytosis of platelets opsonized with differently glycosylated anti-HLA hlgG1 by monocyte-derived macrophages. *Platelets* 34. <https://doi.org/10.1080/09537104.2022.2129604>
- Tomiyama, Y., Ikeda, H., Mitani, T., Furubayashi, T., Mizutani, H., Yamamoto, N., Tandon, N.N., Sekiguchi, S., Jamieson, G.A., Kurata, Y., Yonezawa, T., Tarui, S., n.d. Identification of the Platelet-Specific Alloantigen, Nak", on Platelet Membrane Glycoprotein IV 4.
- Tran, J.Q., Muench, M.O., Heitman, J.W., Jackman, R.P., 2019. Allogeneic major histocompatibility complex antigens are necessary and sufficient for partial tolerance induced by transfusion of pathogen reduced platelets in mice. *Vox Sang.* 114, 207–215. <https://doi.org/10.1111/vox.12756>
- Trend, S., Leffler, J., Teige, I., Frendéus, B., Kermode, A.G., French, M.A., Hart, P.H., 2020. FcγRIIb Expression Is Decreased on Naive and Marginal Zone-Like B Cells From Females With Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 11, 614492. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.614492>

- Trivedi, V.B., Dave, A.P., Dave, J.M., Patel, B.C., 2007. Human leukocyte antigen and its role in transplantation biology. *Transplant. Proc.* 39, 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.01.066>
- Trudeau, J.D., n.d. HÉMORRAGIE MASSIVE ET TRANSFUSION D'URGENCE.
- Tull, T.J., Pitcher, M.J., Guesdon, W., Siu, J.H.Y., Lebrero-Fernández, C., Zhao, Y., Petrov, N., Heck, S., Ellis, R., Dhami, P., Kadolsky, U.D., Kleeman, M., Kamra, Y., Fear, D.J., John, S., Jassem, W., Groves, R.W., Sanderson, J.D., Robson, M.G., D'Cruz, D.P., Bemark, M., Spencer, J., 2021. Human marginal zone B cell development from early T2 progenitors. *J. Exp. Med.* 218, e20202001. <https://doi.org/10.1084/jem.20202001>
- Vadhan-Raj, S., 2009. Management of Chemotherapy-Induced Thrombocytopenia: Current Status of Thrombopoietic Agents. *Semin. Hematol.*, The Changing Landscape of Secondary ITP 46, S26–S32. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2008.12.007>
- Versteeg, H.H., Heemskerk, J.W.M., Levi, M., Reitsma, P.H., 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* 93, 327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., 2014. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* 5.
- Vo, P., Purev, E., West, K.A., McDuffee, E., Worthy, T., Cook, L., Hawks, G., Wells, B., Shalabi, R., Flegel, W.A., Adams, S.D., Reger, R., Aue, G., Tian, X., Childs, R., 2020. A pilot trial of complement inhibition using eculizumab to overcome platelet transfusion refractoriness in human leukocyte antigen allo-immunized patients. *Br. J. Haematol.* 189, 551–558. <https://doi.org/10.1111/bjh.16385>
- von Pawel-Rammingen, U., Johansson, B.P., Björck, L., 2002. IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. *EMBO J.* 21, 1607–1615. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1607>
- Waterman, H.R., Kapp, L.M., Munday, A., Odem-Davis, K., Zimring, J.C., 2016. Transfusion-induced alloimmunization and platelet refractoriness in a mouse model: mechanisms and interventions. *Transfusion (Paris)* 56, 91–100. <https://doi.org/10.1111/trf.13270>
- Weill, J.-C., Weller, S., Reynaud, C.-A., 2009. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267–285. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132607>
- Winstedt, L., Järnum, S., Nordahl, E.A., Olsson, A., Runström, A., Bockermann, R., Karlsson, C., Malmström, J., Palmgren, G.S., Malmqvist, U., Björck, L., Kjellman, C., 2015. Complete Removal of Extracellular IgG Antibodies in a Randomized Dose-Escalation Phase I Study with the Bacterial Enzyme IdeS--A Novel Therapeutic Opportunity. *PloS One* 10, e0132011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132011>
- Young, C., Brink, R., 2021. The unique biology of germinal center B cells. *Immunity* 54, 1652–1664. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.015>
- Zavazava, 1998. Soluble HLA class I molecules: biological significance and clinical implications. *Mol. Med. Today* 4. [https://doi.org/10.1016/s1357-4310\(97\)01185-4](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(97)01185-4)
- Zerra, P.E., Patel, S.R., Jajosky, R.P., Arthur, C.M., McCoy, J.W., Allen, J.W.L., Chonat, S., Fasano, R.M., Roback, J.D., Josephson, C.D., Hendrickson, J.E., Stowell, S.R., 2021. Marginal zone B cells mediate a CD4 T-cell-dependent extrafollicular antibody response following RBC transfusion in mice. *Blood* 138, 706–721. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009376>

- Zheng, S.S., Ahmadi, Z., Leung, H.H.L., Wong, R., Yan, F., Perdomo, J.S., Chong, B.H., 2022. Antiplatelet antibody predicts platelet desialylation and apoptosis in immune thrombocytopenia. *Haematologica* 107, 2195–2205. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279751>
- Zheng, S.S., Perdomo, J.S., Leung, H.H.L., Yan, F., Chong, B.H., 2020. Acquired Glanzmann thrombasthenia associated with platelet desialylation. *J. Thromb. Haemost. JTH* 18, 714–721. <https://doi.org/10.1111/jth.14722>
- Zhou, Z., Niu, H., Zheng, Y.-Y., Morel, L., 2011. Autoreactive marginal zone B cells enter the follicles and interact with CD4+ T cells in lupus-prone mice. *BMC Immunol.* 12, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-7>
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Kroemer, G., 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 59–73. <https://doi.org/10.1038/nri2216>
- Zufferey, A., Schvartz, D., Nolli, S., Reny, J.-L., Sanchez, J.-C., Fontana, P., 2014. Characterization of the platelet granule proteome: evidence of the presence of MHC1 in alpha-granules. *J. Proteomics* 101, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.008>

Etude des mécanismes cellulaires liés à l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle et à l'état réfractaire associé

Les plaquettes jouent un rôle vital en assurant l'hémostase. En cas de thrombopénie sévère, des transfusions de concentrés plaquettaires sont nécessaires pour éviter ou stopper des complications hémorragiques. Ces transfusions peuvent être à l'origine d'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle i.e. une production d'alloanticorps par le receveur dirigée contre les molécules HLA-I du donneur. L'alloimmunisation est asymptomatique en tant que telle mais complique significativement la prise en charge transfusionnelle ultérieure de ces patients. En effet, les alloanticorps anti-HLA-I présents chez le receveur peuvent conduire à une élimination rapide des plaquettes nouvellement transfusées entraînant ainsi une inefficacité thérapeutique de la transfusion, définissant un état réfractaire. L'objectif de ce travail de recherche a été d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à l'alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle et l'état réfractaire associé. Ainsi, i) nous avons identifié les lymphocytes B de la zone marginale, une sous populations de lymphocytes B spléniques, comme un élément central de la réponse alloimmune plaquettaire post-transfusionnelle en utilisant un modèle murin; d'autre part ii) nous avons montré que les sous classes d'IgG anti-HLA-I impactent l'effet des anticorps sur les plaquettes par des mécanismes d'activation différents. Ensemble, nos résultats pourraient avoir des applications directes pour la prise en charge des patients alloimmunisés et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir les états réfractaires.

Mots clés : Plaquettes, alloimmunisation plaquettaire post-transfusionnelle, état réfractaire, anticorps anti-HLA de classe I

Platelets play a vital role in hemostasis. In cases of severe and persistent thrombocytopenia, multiple transfusions of platelet concentrates are necessary to prevent or stop hemorrhagic complications. These transfusions may cause post-transfusion platelet alloimmunization, i.e. the production of alloantibodies by the recipient directed against the donor's HLA-I molecules. Alloimmunisation is asymptomatic, but it significantly complicates the subsequent transfusion management of these patients. Indeed, anti-HLA-I alloantibodies present in the recipient can lead to rapid elimination of newly transfused platelets, resulting in ineffectiveness of the transfusion, which defines a refractory state. The aim of this research was to study the cellular and molecular mechanisms leading to post-transfusion platelet alloimmunisation and the associated refractory state. Thus, i) we identified marginal zone B lymphocytes, a subpopulation of splenic B lymphocytes, as a central component of the platelet alloimmune response following transfusion in a murine model; and ii) we showed that IgG subclasses of anti-HLA-I impact the antibody's effect on platelets via different activation mechanisms. Taken together, our results could have direct applications for the management of alloimmunized patients and the development of new therapeutic strategies to

Keywords: Platelets, post-transfusion platelet alloimmunisation, refractory state, anti-HLA class I antibodies