

**Dominique Lasne**, AP-HP, département d'hématologie biologique, hôpital Necker, Paris, France; HlTh, UMR\_S 1176, Inserm, université Paris-Saclay, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

**Delphine Borgel**, AP-HP, département d'hématologie biologique, hôpital Necker, Paris, France; HlTh, UMR\_S 1176, Inserm, université Paris-Saclay, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

**Alexandre Kauskot**, HlTh, UMR\_S 1176, Inserm, université Paris-Saclay, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

Tirés à part : A. Kauskot  
alexandre.kauskot@inserm.fr

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Sialylation and thrombocytopenia

Glycosylation, plaquette, thrombopénie, sialylation  
Glycosylation, platelet, thrombocytopenia, sialylation

### Résumé

Le contenu en acide sialique à la surface des plaquettes décroît au cours de la vie de la plaquette. Cette élimination correspond au mécanisme de désialylation qui implique des enzymes, les sialidases. Cette évolution se traduit par l'exposition de résidus de  $\beta$ -galactose, un sucre greffé sur les chaînes glycanes avant l'acide sialique. Ces résidus ainsi exposés suite à la désialylation, forment des antigènes de sénescence qui entraînent la clairance des plaquettes et sont des régulateurs de leur durée de vie dans la circulation. Certaines thrombopénies peuvent être causées par des altérations des gènes régulant la synthèse et le transfert de l'acide sialique, ou par des mécanismes physiopathologiques acquis qui exacerbent la désialylation. Dans cette revue, nous exposerons les données de la littérature aussi bien fondamentales que cliniques mettant en lumière le rôle important de la sialylation plaquettaire dans la régulation du compte plaquettaire. Nous aborderons également la possibilité de mesurer l'exposition du  $\beta$ -galactose à la surface des plaquettes et son intérêt en clinique afin d'identifier les patients thrombopéniques qui pourraient bénéficier d'un traitement – encore expérimental – inhibant les sialidases.

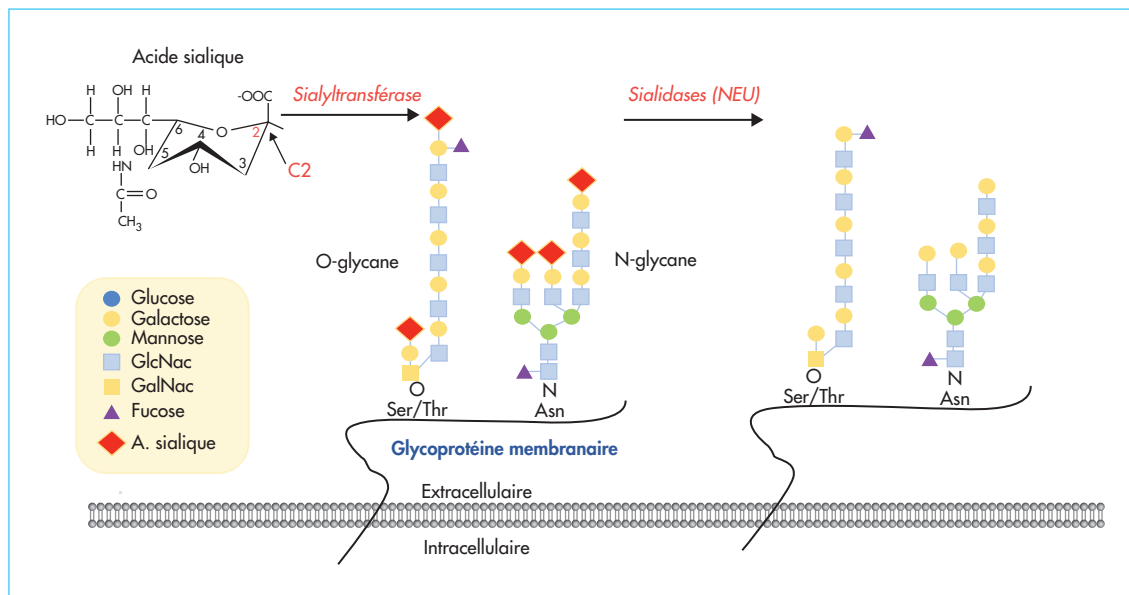
### Abstract

The sialic acid content on the platelet surface decreases during their life. This elimination corresponds to the mechanism of desialylation, which involves sialidases. The absence of sialic acid exposes  $\beta$ -galactose residues, which are considered to be senescence antigens. Genes regulating the synthesis and the transfer of sialic acid and also mechanisms that exacerbate desialylation are responsible of thrombocytopenia. In this review, we will present both basic and clinical data from the literature highlighting the important role of platelet sialylation. We will also discuss the possibility of measuring platelet  $\beta$ -galactose exposure from a clinical point of view in order to identify patients with certain form of thrombocytopenias which could benefit from a still experimental treatment inhibiting sialidases.

## La sialylation : l'étape terminale de la glycosylation

La glycosylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui intervient dans leur maturation par l'ajout de glucides sur la chaîne protéique. Ces chaînes glucidiques deviennent de plus en plus complexes, se ramifient : on parle alors de chaînes branchées. La glycosylation a lieu dans le réticulum endoplasmique et la terminaison des chaînes de glycanes (branchements, allongement des chaînes) est opérée dans l'appareil de Golgi. Les chaînes de glucides sont liées aux protéines par des liaisons O-glycosidiques (sur sérine ou thréonine) et N-glycosidiques (sur asparagine). Les principaux glucides ajoutés dans les chaînes branchées sont le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le xylose, le mannose, le fucose, le galactose, le glucose, le N-acétylgalactosamine et l'acide sialique (N-acétylneuraminique, Neu5Ac) qui est toujours en position terminale de la chaîne glucidique. La sialylation est donc la dernière étape de glycosylation (*figure 1*). Le terme « acide sialique » est apparu en 1952 pour décrire l'acide N-acétylneuraminique, un produit majeur libéré par l'hydrolyse des glycolipides dans le cerveau ou les mucines salivaires. Les acides sialiques sont des sucres, avec un squelette de neuf atomes de carbone et les plus courants chez les mammifères sont l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) – ce dernier étant absent chez l'homme. L'acide sialique (Neu5Ac) est synthétisé dans le cytoplasme des cellules (dans le cas des plaquettes, dans la cellule mère : le mégacaryocyte) à l'issue d'un ensemble de réactions biochimiques (*figure 2*) [1]. La biosynthèse de l'acide sialique commence avec l'uridine diphosphate (UDP)-GlcNAc dans le cytosol. La synthèse d'acide sialique est catalysée par la glucosamine (UDP-N-acétyl)-2-épimérase/N-acétylmannosamine (GNE appelée également l'UDP-GlcNAc 2-épimérase/ManNAc-6-kinase), une enzyme bifonctionnelle, convertissant l'UDP-GlcNAc en ManNAc-6-P (N-acétyl-

FIGURE 1



**Représentation schématique du processus de sialylation et de désialylation sur une glycoprotéine.** L'acide sialique est en position terminale des N ou O-glycanes d'une glycoprotéine. L'acide sialique est associé par une liaison osidique en position  $\alpha 2,3$  ou  $\alpha 2,6$  à un  $\beta$ -galactose (correspondant à la position des carbones, le C2 est représenté en rouge). Le transfert sur la chaîne glycosidique se fait par des sialyltransférases. L'élimination se fait par des sialidases (NEU) exposant le sucre sous-jacent : le  $\beta$ -galactose. GalNAc : N-acétylgalactosamine ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; Ser : sérine ; Thr : thréonine ; Asn : asparagine.

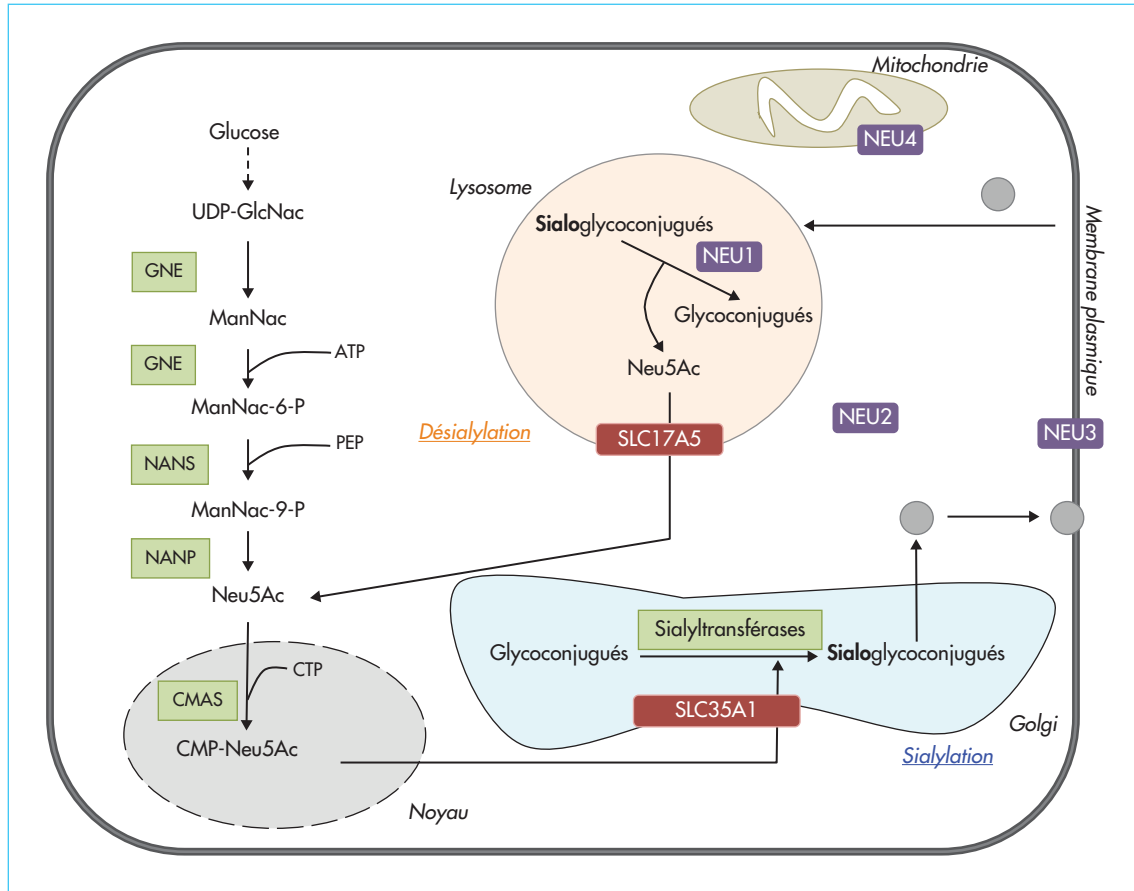


mannosamine 6-phosphate). Le ManNAc-6-P est ensuite transformé en Neu5Ac par la Neu5Ac 9-phosphate synthase (NANS) en présence de phosphoénolpyruvate (PEP) et de la Neu5Ac-9-phosphate phosphatase (NANP). Enfin, le Neu5Ac synthétisé dans le cytosol est transféré dans le noyau et activé par la cytosine 5'-monophosphate N-acétylneuraminique synthétase (CMAS) pour former le cytosine 5'-monophosphate-acide N-acétylneuraminique (CMP-Neu5Ac). Ce composé est transporté dans l'appareil de Golgi par le transporteur SLC35A1, où il est transféré sur les glycoconjugués par diverses sialyltransférases (notamment la ST3  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,3-sialyltransférase 4 [ST3GAL4], la ST3GAL1 et la ST6GAL1), en liant le carbone C2 de l'acide sialique avec les carbones C3 (ST3GAL4, ST3GAL1) et C6 (ST6GAL1) du  $\beta$ -galactose formant ainsi des liaisons  $\alpha$ 2,3 et  $\alpha$ 2,6. L'acide sialique est toujours en position terminale sur un  $\beta$ -galactose dans les glycoprotéines. Enfin, les sialoglycoconjugués formés sont soit transportés vers la membrane plasmique, soit stockés dans des vésicules/granules de stockage et de sécrétion (*figure 2*). L'acide sialique des conjugués peut également revenir dans ce cycle par libération de l'acide sialique par des sialidases, appelés des neuraminidases (NEU). À ce jour, on connaît l'existence de quatre NEU chez l'Homme : NEU1, 2, 3 et 4. La sialidase lysosomale NEU1 initie la dégradation des sialoglycoconjugués. L'acide sialique libéré est ensuite transféré dans le cytoplasme par un transporteur, SCL17A5, pour rejoindre un nouveau cycle de biosynthèse. La sialidase cytosolique, NEU2, et la sialidase associée à la membrane plasmique, NEU3, présentent une activité maximale avec les gangliosides ; la sialidase NEU4, qui est liée aux membranes mitochondriales externes, a une large spécificité de substrat, des glycoprotéines aux gangliosides et oligosaccharides. L'élimination de l'acide sialique expose ainsi les résidus de  $\beta$ -galactose et de GlcNAc liés à la structure glycosidique (*figure 1*).

### La sialylation comme déterminant de la durée de vie des plaquettes

Les plaquettes, cellules anucléées chez les mammifères, sont des acteurs majeurs de l'hémostase. Dans l'espèce humaine, les valeurs de référence du nombre de plaquettes dans le sang sont comprises entre 150 et 400 G/L. En dessous de la valeur minimale, on parle de thrombopénie. Un nombre insuffisant de plaquettes ou la présence de plaquettes non fonctionnelles peuvent être responsables de saignements. La durée de vie des plaquettes est d'environ huit à dix jours chez l'homme, et leur quantité dans le sang est régulée par leur production et leur élimination. Cette élimination physiologique des plaquettes (hors contexte d'une activation hémostatique) se produit via un mécanisme de perte de l'acide sialique, appelé phénomène de désialylation. Le résultat net du compte plaquettaire est alors la résultante de la production des plaquettes et de leur élimination. L'importance du rôle de l'acide sialique dans l'élimination des plaquettes a tout d'abord été suggérée dans le contexte de la transfusion plaquettaire. En effet, la durée de vie des plaquettes transfusées est raccourcie lors de la transfusion, puisqu'elle n'est que de quatre à cinq jours [2]. La clairance initiale d'une partie des plaquettes transfusées se produit dans les 24 premières heures, principalement dans la rate et le foie, et détermine le rendement transfusionnel (ou récupération des plaquettes). La clairance initiale de 40 % des plaquettes est attribuée aux lésions de stockage des plaquettes mesurées par les changements de morphologie, de fonction et d'exposition de la phosphatidylsérine, mais ces lésions sont indépendantes de l'apoptose [2]. En 1969, Murphy et Gardner ont démontré que les plaquettes humaines transfusées stockées à 4 °C sont rapidement éliminées, avec une durée de vie de deux à quatre jours dans la circulation [3]. Depuis cette découverte, les plaquettes sont stockées à température ambiante sous agitation constante. Des études récentes montrent que les plaquettes stockées dans le froid peuvent être partiellement activées après la transfusion, ce qui pourrait entraîner

FIGURE 2



**Métabolisme de l'acide sialique chez l'Homme.** La biosynthèse de l'acide sialique commence avec l'UDP-GlcNAc (dérivé du glucose) dans le cytosol. L'acide sialique (Neu5Ac) est synthétisé dans le cytoplasme suite à l'action de différentes enzymes. L'enzyme GNE, le transporteur SLC35A1 et les sialyltransférases sont impliqués dans des thrombopénies. Neu5Ac est sous forme libre puis est transformé en CMP-Neu5Ac dans le noyau, et ensuite transporté dans l'appareil de Golgi par un transporteur spécifique, SLC35A1, où il sera transféré sur les glycoconjugés par diverses sialyltransférases. Les glycoconjugés sialylés peuvent être désialylés dans le lysosome par des sialidases (NEU). Neu5Ac libéré est ensuite transféré dans le cytoplasme par un transporteur spécifique, SLC17A5, pour rejoindre un nouveau cycle de biosynthèse. La localisation des NEU dans les cellules humaines est la suivante : NEU1 = lysosome, NEU2 = cytoplasme, NEU3 = membrane plasmique et NEU4 = mitochondrie. Dans la plaquette, seules NEU1 et NEU2 sont décrites. Les localisations semblent différentes avec NEU1 dans les granules  $\alpha$  et la membrane plasmique et NEU2 dans la mitochondrie et la membrane plasmique. ATP : adénosine triphosphate. CMAS : cytosine 5'-monophosphate N-acétylneuraminique synthétase. CMP-Neu5Ac : cytosine 5'-monophosphate-acide N-acétylneuraminique. PEP : phosphoénolpyruvate. GNE : glucosamine (UDP-N-acétyl)-2-épipimérase/ N-acétylmannosamine. ManNAc : N-acétylmannosamine. ManNAc-6-P : N-acétylmannosamine-6-phosphate. ManNAc-9-P : N-acétylmannosamine-9-phosphate. NNP : Neu5Ac-9-phosphate phosphatase. NANS : Neu5Ac 9-phosphate synthase. Neu5Ac : acide N-acétylneuraminique (acide sialique). UDP-GlcNAc : uridine diphosphate N-acétylglucosamine.

un résultat hémostatique plus favorable, en particulier chez les patients qui saignent activement [4]. De ce fait, la Food and Drug Administration a réapprouvé le stockage à froid des plaquettes de 1 à 6 °C sans agitation jusqu'à trois jours pour les patients traumatisés. Cependant, de nombreuses études ont révélé que les plaquettes stockées à froid perdent séquentiellement leur acide sialique et leur galactose, exposant des résidus sous-jacents de galactose et de N-acétylglucosamine, respectivement [5] (figure 1). Le refroidissement des plaquettes favorise également le regroupement, à leur surface, du récepteur du Willebrand (VWF), la glycoprotéine Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ). En effet, le refroidissement associé aux forces de



cisaillement physiologiques provoque le dépliage de la GPIb $\alpha$ , et la liaison du VWF aux plaquettes réfrigérées. Cette liaison entraîne une désialylation des plaquettes stockées au froid et conduit à une clairance accélérée [5].

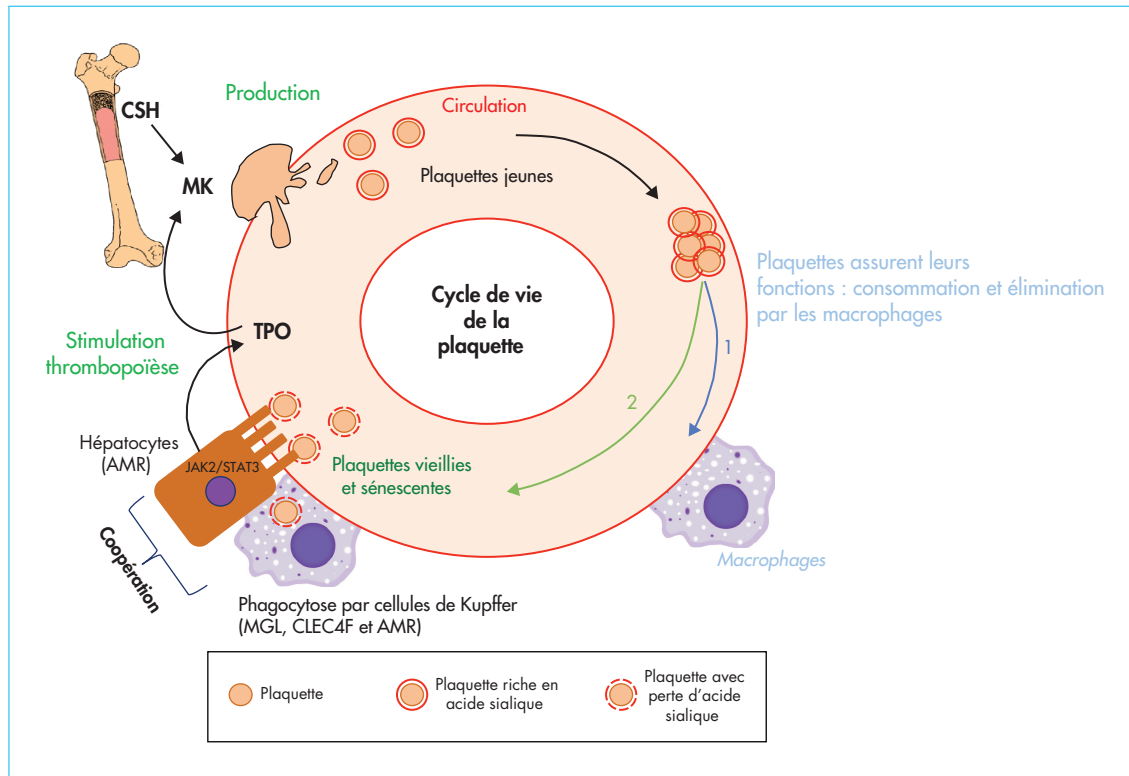
Cette désialylation plaquettaire est réalisée par les neuraminidases ; seules les NEU1 et NEU2 sont décrites dans la plaquette. NEU1 et NEU2 sont respectivement localisées au niveau des mitochondries et des  $\alpha$ -granules [6], mais pas dans le lysosome, contrairement à d'autres types cellulaires. Cette désialylation s'effectuerait à la surface de la membrane plasmique plaquettaire, où les NEU1/2 peuvent être transloquées [6-8]. L'activité sialidase de la NEU1 est régulée par son homodimérisation via le domaine transmembranaire 2 ; ce mécanisme n'est cependant pas démontré dans la plaquette [9]. L'acide sialique libéré par désialylation dans la plaquette ne peut en revanche pas être remis dans le cycle de glycosylation, étant donné l'absence de noyau dans la plaquette, puisque l'étape nucléaire de transformation en CMP-acide sialique est nécessaire pour son transfert dans l'appareil de Golgi. Le mécanisme de désialylation, se traduit alors par l'exposition de résidus de  $\beta$ -galactose [10]. Ces résidus exposés forment des antigènes de sénescence qui entraînent la clairance des plaquettes par leur interaction avec le récepteur Ashwell-Morell (AMR) [11, 12] présent sur les hépatocytes et les récepteurs CLEC4F, MGL et AMR, présents sur les cellules de Kupffer qui sont des macrophages spécifiques du foie doués de propriétés de phagocytose [12, 13]. De façon originale, l'interaction des plaquettes avec l'AMR des hépatocytes (notamment au niveau des villosités des hépatocytes) permet de stimuler la production de la thrombopoïétine (TPO), qui en retour va stimuler la thrombopoïèse. En effet, l'interaction avec l'AMR entraîne une expression de l'ARNm de la TPO via la Janus kinase 2 (JAK2) et le *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), créant un mécanisme de rétroactivation pour stimuler la production de plaquettes dans la moelle osseuse [11,12]. L'élimination des plaquettes par désialylation est alors intimement liée à la naissance des nouvelles plaquettes (figure 3).

L'AMR est un récepteur d'endocytose initialement décrit dans les hépatocytes mais également présent sur les cellules de Kupffer [13]. Ce récepteur s'oligomérisé à partir de deux sous-unités, l'asialoglycoprotéine 1 (ASGR1) et ASGR2. Il existe de nombreux ligands pour ce récepteur, dont des glycoprotéines plaquettaires et plasmatiques comme le VWF, l'haptoglobine, la protéine amyloïde et la phosphatase alcaline. La clé de la reconnaissance par l'AMR, à l'origine appelé récepteur hépatique de l'asialoglycoprotéine (*asialo* = absence d'acide sialique), est l'exposition de  $\beta$ -galactose et de GalNAc (figure 1) suite au clivage de l'acide sialique terminal. Les souris dépourvues d'AMR fonctionnel ont une numération plaquettaire augmentée avec une demi-vie dans la circulation prolongée [11, 12]. Cela indique que l'AMR joue un rôle dans l'élimination des plaquettes circulantes. Certaines thrombopénies peuvent être causées d'une part par des déficits congénitaux d'enzymes du cycle de biosynthèse ou des transporteurs de l'acide sialique, et, d'autre part, par des mécanismes physiopathologiques acquis qui exacerbent la désialylation des plaquettes, produisant des plaquettes désialylées. Ces deux processus ont pour conséquence l'accélération de leur clairance et l'observation d'une thrombopénie.

### Thrombopénies et défaut de sialylation

Des déficits congénitaux d'enzymes du cycle de biosynthèse de l'acide sialique peuvent aboutir à des thrombopénies, notamment des mutations sur l'UDP-N-acetylglucosamine 2-épimérase/N-acétylmannosamine kinase (GNE) (figure 2) [14-16]. Les premières études sur ce gène, montrent que les mutations de GNE sont associées à une myopathie progressive avec une thrombopénie [15, 17]. Dans des études plus récentes focalisées sur le rôle de la sialylation plaquettaire, les patients ne présentaient pas de signes de myopathie [14, 15].

FIGURE 3



**Cycle de vie de la plaquette.** Les plaquettes sont produites dans la moelle osseuse par différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les mégacaryocytes (MK) libèrent les plaquettes dans la circulation. Ces plaquettes jeunes sont très riches en acide sialique. (1) Soit elles seront consommées puis éliminées par des macrophages, (2) soit elles perdront leur acide sialique, exposant ainsi le  $\beta$ -galactose et deviendront des plaquettes sénescents. La reconnaissance du  $\beta$ -galactose par les récepteurs AMR (exprimés par les hépatocytes) stimule la production hépatique de TPO, permettant la formation de nouvelles plaquettes, et l'interaction des plaquettes avec CLEC4F, MGL et l'AMR permet leur phagocytose par les cellules de Kupffer, des macrophages présents dans le foie. AMR : Ashwell-Morel receptor ; CLEC4F : C-type lectin domain family 4 member F ; MGL : macrophage galactose type C-lectin receptor.

L'acide sialique produit dans les cellules est transporté dans le Golgi par un transporteur spécifique, SLC35A1. Le mécanisme de transport est antiport, c'est-à-dire qu'une molécule de CMP-acide sialique entre et qu'une molécule de CMP libre sort par le transporteur. Les patients ayant un défaut pour ce transporteur sont répertoriés dans les maladies congénitales de glycosylation (CDG, pour *congenital disease of glycosylation*), et sont plus spécifiquement nommés SLC35A1-CDG (CDGII dans l'ancienne nomenclature). Ces patients peuvent alors présenter des retards de développement psychomoteur, de l'épilepsie, une malformation cérébrale, des problèmes de coordination musculaire ainsi que des atteintes hématologiques, avec notamment des déficits en facteurs de la coagulation et une thrombopénie [18, 19]. Le rôle du transporteur SLC35A1 a été évoqué dans les plaquettes, mais la démonstration de son importance dans la sialylation plaquettaire et son rôle dans la survie des plaquettes n'avaient pas été étudiés jusqu'en 2018. L'étude de deux patients d'une même fratrie ayant une mutation sur *Slc35a1* [18], ainsi qu'un modèle de souris déficient pour ce gène [20] ont permis de montrer son rôle dans la régulation de la quantité de plaquettes. Notre équipe a montré, chez ces deux patients dont l'analyse génétique a mis en évidence une mutation sur *Slc35a1* (p.Ser147Pro), que la thrombopénie observée était la résultante d'une accélération de l'élimination des plaquettes de la circulation. Une thrombopénie persistante a été observée chez les deux patients, avec une





numération plaquettaire de  $95 \pm 10$  G/L chez l'un et de  $60 \pm 6$  G/L chez l'autre. L'analyse de la sialylation de la transferrine (technique permettant de mettre en évidence des défauts de N-glycosylations) montre une hyposialylation de cette protéine, suggérant un défaut de maturation des N-glycosylations dans l'appareil de Golgi. L'analyse de la sialylation plaquettaire, et plus particulièrement de l'exposition du  $\beta$ -galactose, a été faite chez l'un des deux patients. Une élévation de l'exposition du  $\beta$ -galactose a été mise en évidence, suggérant que les plaquettes de la patiente sont hyposialylées. L'origine périphérique de la thrombopénie a été explorée. Pour cela, des plaquettes de la patiente, ainsi que des plaquettes contrôles, ont été isolées, lavées puis marquées avec un traceur fluorescent et enfin injectées dans des souris immunodéficientes afin d'étudier leur vitesse d'élimination. Après 90 min, environ 50 % des plaquettes contrôles étaient encore présentes dans la circulation alors qu'aucune de celles de la patiente n'a été identifiée. Ce travail montre que les plaquettes de ces patients avec anomalies de SLC35A1 ont une durée de vie extrêmement réduite et une très franche hyposialylation. Le modèle murin a également permis de mettre en évidence des anomalies centrales de la mégacaryopoïèse. En effet, le nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse chez les souris *Slc35a1*<sup>-/-</sup> est réduit, et est associé à une altération de la maturation de ces cellules.

Les sialyltransférases ont également un rôle important sur la durée de vie des plaquettes. Bien qu'à ce jour aucune mutation ou défaut d'expression de la sialyltransférase ST3GAL4 n'ait été rapporté chez l'homme, les souris knock-out *St3gal4*, ont une thrombopénie profonde [2]. Cette enzyme ajoute de l'acide sialique en position  $\alpha 2,3$  sur les N-glycosylations. Le croisement des souris *St3gal4*<sup>-/-</sup> avec les souris déficientes pour l'AMR, entraîne une récupération du nombre de plaquettes, ce qui implique que l'exposition du  $\beta$ -galactose chez ces souris conduit à une clairance par l'AMR. Les modifications de la O-glycosylation peuvent également entraîner une thrombopénie sévère. Plusieurs modèles de souris avec des déficits en O-glycane ont été étudiés, notamment une suppression de la sialyltransférase ST3GAL1, qui est responsable de l'ajout d'acide sialique en  $\alpha 2,3$  sur les O-glycosylations. Les souris *St3gal1*<sup>-/-</sup> ont un nombre de plaquettes inférieur de 50 % à celui des souris sauvages. Cependant, la génération de souris invalidées pour ST3GAL1 spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire et plaquettaire (système flox/PF4-cre) montre que la principale cause de la thrombopénie chez ces souris est due à une thrombopoïèse altérée. Plus précisément, cette désialylation conduit à l'activation des cellules immunitaires sécrétant de l'interféron qui inhibe la thrombopoïèse [2]. Cette découverte associée à celle du modèle de la souris *St3gal1*<sup>-/-</sup> ouvre alors à une nouvelle voie d'étude du rôle de l'acide sialique dans la mégacaryopoïèse, en plus de son rôle dans la régulation périphérique du compte plaquettaire.

### Thrombopénies et désialylation

Certaines thrombopénies peuvent être causées par des mécanismes acquis qui exacerbent la désialylation des plaquettes, comme cela a été observé dans le sepsis [21], l'infection par le virus de la dengue [22], la maladie de Chagas [23], le purpura thrombopénique immun (PTI) [24, 25] et chez des patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques [26]. Il existe actuellement un médicament antiviral, l'oseltamivir phosphate (Tamiflu®), qui agit comme un inhibiteur des neuraminidases du virus de la grippe mais qui possède une activité inhibitrice contre les NEU humaines. Son utilisation dans le contexte des thrombopénies induites par une exacerbation de la désialylation en inhibant les neuraminidases plaquettaires est alors une possibilité thérapeutique intéressante et peu coûteuse.

Ainsi, la physiopathologie du PTI a récemment évolué : d'un modèle impliquant principalement la clairance des plaquettes opsonisées par les macrophages de la

rate via le récepteur FcR $\gamma$ , à un concept dans lequel un mécanisme indépendant de FcR $\gamma$  pourrait participer à l'élimination des plaquettes. Dans le cas du PTI avec des anticorps anti-GPIIb $\alpha$ , ces anticorps fixés sur le récepteur plaquettaire GPIIb $\alpha$ , augmentent la désialylation plaquettaire, aboutissant à une clairance accélérée des plaquettes et à une thrombopénie [8, 24]. Ces patients sont moins susceptibles de répondre aux traitements conventionnels (corticoïdes, immunoglobulines intraveineuses, splénectomie). La clairance des plaquettes désialylées passerait principalement par le foie et beaucoup moins par la rate, ce qui expliquerait l'absence de correction du compte plaquettaire après splénectomie chez certains de ces patients [8]. De ce fait, quelques études montrent une augmentation du compte plaquettaire chez des patients ayant bénéficié du traitement par l'oseltamivir [25, 27]. Cependant, il semble que la combinaison de plusieurs thérapies soit plus efficace qu'une monothérapie par oseltamivir. En effet, la combinaison de l'oseltamivir avec d'autres thérapies a permis d'obtenir une réponse plaquettaire soutenue chez des patients atteints d'un PTI anti-GPIIb $\alpha$  positif et qui n'avaient pas répondu aux traitements conventionnels. Les comptes plaquettaires pour les quatre patients étudiés étaient de 0, 3, 16 et 0 G/L avant traitement, et de 101, 134, 120 et 51 G/L après association de l'oseltamivir avec un ou plusieurs autres traitements (tels que la romiplostim, l'azathioprine, la prednisone et la dexaméthasone) [27]. La synergie obtenue par l'ajout de l'oseltamivir semble donc être une voie prometteuse dans ces thrombopénies. Récemment, il a été montré que des anticorps autres que les anticorps anti-GPIIb $\alpha$  pouvaient induire une désialylation. En effet, des anticorps anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb/IIIa) induiraient également le clivage de l'acide sialique entraînant une exposition du  $\beta$ -galactose. Ainsi, une étude récente décrit un patient atteint d'une thrombasthénie de Glanzmann acquise (PTI avec anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3) avec une désialylation plaquettaire dépendante du récepteur Fc $\gamma$ RIIIa. L'utilisation d'anticorps anti-Fc $\gamma$ RIIIa a permis d'inhiber cette désialylation [28].

Les bactéries pathogènes utilisent des sialidases pour piéger les acides sialiques de l'hôte, notamment pour échapper à la réponse immunitaire innée de l'hôte. Certains virus pathogènes utilisent également des sialidases. Plusieurs études suggèrent que les thrombopénies induites par les micro-organismes sont dues à un processus de désialylation plaquettaire. Cependant, les mécanismes conduisant à la désialylation varient en fonction du vecteur infectieux. Chez les patients infectés par le virus de la dengue, une liaison accrue du VWF aux plaquettes est probablement due à la désialylation des plaquettes et du VWF. La thrombopénie est améliorée par l'oseltamivir, vraisemblablement par inhibition de la NEU1 d'origine plaquettaire, car le virus de la dengue ne contient pas de sialidase [22]. Dans la maladie de Chagas, le parasite *Trypanosoma cruzi* libère de la trans-sialidase (une trans-sialidase permet le transfert d'acide sialique depuis la surface de l'hôte vers la surface du parasite), qui désialyle les plaquettes provoquant une thrombopénie [23]. Dans le sepsis, qui est une réponse systémique et délétère de l'hôte à l'infection, la thrombopénie est une observation fréquente. Une étude montre que les niveaux de désialylation plaquettaire mesurés chez 127 patients avec thrombopénie sont supérieurs à ceux de 134 patients sans thrombopénie. L'ajout de l'oseltamivir dans le traitement des patients thrombopéniques dans un contexte de sepsis a permis d'augmenter non seulement le compte plaquettaire mais également de réduire la quantité de plaquettes transfusées [21].

Enfin, puisque le VWF peut induire une désialylation plaquettaire, il est possible que dans les syndromes de Willebrand acquis où le facteur Willebrand serait activé – tels que dans les assistances circulatoires et chez les patients avec valvulopathies aortiques –, la désialylation plaquettaire pourrait être impliquée dans les thrombopénies observées. Notre groupe a également étudié la relation possible entre désialylation et thrombopénie dans le cas de maladies de Willebrand constitutionnelles, notamment dans la maladie de Willebrand de type 2B (VWD-





type 2B), une maladie hémorragique liée à la présence d'une thrombopénie et d'une thrombopathie [7]. En miroir du purpura thrombopénique immun, le VWF muté se fixe spontanément sur la GPIIb/IIIa plaquettaire et pourrait, au même titre que des anticorps anti-GPIIb/IIIa, induire une désialylation et contribuer à la thrombopénie. Nous avons exploré la relation entre la désialylation des plaquettes et la numération plaquettaire chez 36 patients atteints de VWD-type 2B et dans un modèle murin porteur de la mutation p.V1316M sur le Willebrand (souris 2B) conférant une maladie de Willebrand de type 2B sévère. Nous avons observé des taux anormalement élevés de désialylation plaquettaire chez les patients porteurs de la mutation p.V1316M ainsi que sur les plaquettes des souris 2B. En revanche, le traitement des souris 2B avec des inhibiteurs de la sialidase n'a pas été associé à une élévation du compte plaquettaire. Nous en avons conclu que la désialylation des plaquettes joue un rôle mineur dans la VWD-type 2B et n'est pas suffisante pour être responsable de la thrombopénie.

Les traitements actuellement disponibles pour les patients thrombopéniques incluent la transfusion de plaquettes, des traitements immunosuppresseurs, l'utilisation d'immunoglobuline intraveineuses, d'agonistes de la TPO et parfois une procédure chirurgicale, la splénectomie. Ces traitements coûteux sont parfois peu efficaces et non dénués d'effets indésirables. Si l'efficacité de l'oseltamivir dans les thrombopénies liées à la désialylation se confirmait, les avantages à la fois cliniques et économiques seraient importants compte tenu de son faible coût, du peu d'événements indésirables associés à ce traitement et de sa facilité d'emploi.

### Mesure de l'exposition du $\beta$ -galactose

La confirmation de l'intérêt de l'oseltamivir dans le traitement de certaines thrombopénies nécessite la réalisation d'études randomisées de grande envergure. Il est cependant indispensable au préalable de disposer d'un test standardisé de quantification de la désialylation/exposition du  $\beta$ -galactose à la surface des plaquettes pour identifier les patients pouvant bénéficier d'un tel traitement. L'interprétation des résultats de la désialylation/exposition du  $\beta$ -galactose dans les études actuellement disponibles n'est pas standardisée, les méthodes sont hétérogènes et l'interprétation ne tient pas compte de la variabilité interindividuelle car aucune valeur de référence n'a été déterminée. Chez la souris, les plages de référence sont déterminées chez les animaux ayant le même bagage génétique, et une comparaison de l'exposition au  $\beta$ -galactose sur des plaquettes exposées à diverses conditions est souvent suffisamment informative. Chez l'homme, la détermination des valeurs de référence pour l'exposition du  $\beta$ -galactose plaquettaire dans une population saine est un prérequis indispensable pour identifier les patients atteints de thrombopénie susceptibles de répondre aux inhibiteurs des sialidases.

Nous avons développé un test standardisé par cytométrie en flux permettant de mesurer l'exposition de  $\beta$ -galactose en plasma riche en plaquettes (PRP), préparé à partir de sang prélevé sur tube EDTA, ce qui présente l'avantage de pouvoir travailler sur le même prélèvement que celui utilisé pour diagnostiquer ou contrôler la thrombopénie en pratique clinique courante. Pour cela nous avons utilisé une lectine appelée RCA-I (pour *ricinus communis agglutinin-I*) qui se fixe spécifiquement sur le  $\beta$ -galactose lorsque celui-ci est exposé après élimination de l'acide sialique terminal. Cette lectine est couplée à un fluorochrome permettant de la détecter en surface des plaquettes et de mesurer une intensité de fluorescence. Nous avons déterminé l'exposition de  $\beta$ -galactose chez 120 sujets sains avec une numération plaquettaire normale, permettant de déterminer un intervalle de référence dans la population saine. Ces valeurs mettent en évidence que l'exposition de  $\beta$ -galactose est indépendante du sexe et du groupe sanguin, permettant ainsi de comparer facilement les valeurs des patients indépendamment

de ces deux paramètres [30]. Le développement de ce protocole standardisé comme nous le proposons permettra des études cliniques larges visant à préciser le rôle de la désialylation plaquettaire dans différentes thrombopénies et l'efficacité des inhibiteurs de neuraminidases tels que l'oseltamivir.

## Les questions ouvertes

Une première question concerne le mécanisme d'expression et d'activation des NEU plaquettaires, aussi bien au cours du vieillissement des plaquettes que dans les pathologies où la désialylation est observée. Bien que les études montrent une relocalisation des NEU à la surface des plaquettes, l'activation plaquettaire induite par des agonistes ne semble pas aboutir à cette externalisation hormis l'activation par le VWF [6, 7]. Il se pourrait qu'une voie de signalisation probablement « unique » permette cette expression. Une fois en surface, comment les NEU sont-elles activées ? Probablement par homodimérisation des domaines transmembranaires, comme le suggèrent les études *in vitro* [9]. Dans d'autres types cellulaires comme les macrophages, il a été montré que la NEU1 interagit avec le récepteur CD36 et le désialyle [29]. Dans les plaquettes, différents récepteurs coopèrent et forment des dimères (homo-/hétérodimères), il est ainsi possible d'imaginer la formation de complexes protéiques où les NEU pourraient être associées et contrôlées la sialylation de glycoprotéines.

Quelles sont les cibles des sialidases ? De nombreuses glycoprotéines plaquettaires contiennent de l'acide sialique. GPIb $\alpha$  contient les niveaux les plus élevés, suivis par les deux sous-unités de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et les glycoprotéines GPV, GPVI, GPIb $\beta$  et GPIX, pour les principaux récepteurs plaquettaires chez l'homme [12]. GPIb $\alpha$  et l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 peuvent être désialylées, mais la désialylation de ces protéines ne semble pas suffisante, à elle seule, pour accélérer la clairance des plaquettes [6, 18]. Il semble possible que la désialylation soit globale ; de ce fait, une notion de seuil de désialylation pourrait être le signal de la clairance d'un point de vue quantitatif, plutôt que qualitatif [7].

Dans les années à venir, il est probable que la liste des pathologies associée à une thrombopénie liée à un mécanisme de désialylation s'allonge. Par exemple, les pathologies acquises liées au Willebrand, les infections en fonction du vecteur bactérien et viral, les pathologies hépatiques qui pourraient impacter le fonctionnement du récepteur AMR mais également les pathologies liées à des dysfonctions des macrophages. Également, l'implication de l'acide sialique dans l'hématopoïèse normale et pathologique devrait être mise au jour, puisqu'une des principales fonctions de l'acide sialique est de charger (négativement) les cellules en surface et de réguler les interactions cellulaires. Enfin, la mesure de la désialylation plaquettaire pourrait être un marqueur de la qualité des poches de concentrés plaquettaires avant transfusion, permettant ainsi d'optimiser le rendement transfusionnel.

## Références

- [1] Tanner ME. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg Chem* 2005 ; 33 (3) : 216-28.
- [2] Lee-Sundlov MM, Stowell SR, Hoffmeister KM. Multi-faceted role of glycosylation in transfusion medicine, platelets and red blood cells. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 (7) : 1535-47.
- [3] Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med* 1969 ; 280 (20) : 1094-8.
- [4] Scorer TG, Reddoch-Cardenas KM, Thomas KA, Cap AP, Spinella PC. Therapeutic utility of cold-stored platelets or cold-stored whole blood for the bleeding hematology-oncology patient. *Hematol Oncol Clin North Am* 2019 ; 33 (5) : 873-85.
- [5] Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister KM. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood* 2015 ; 126 (16) : 1877-84.
- [6] van der Wal DE, Davis AM, Mach M, Marks DC. The role of neuraminidase 1 and 2 in glycoprotein Ibalph-mediated integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation. *Haematologica* 2020 ; 105 (4) : 1081-94.
- [7] Dupont A, Soukaseum C, Cheptou M, et al. Relevance of platelet desialylation and thrombocytopenia in type 2B von Willebrand disease: preclinical and clinical evidence. *Haematologica* 2019 ; 104 (12) : 2493-500.
- [8] Li J, van der Wal DE, Zhu G, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 7737.



- [9] Maurice P, Baud S, Bocharova OV, *et al.* New insights into molecular organization of human neuraminidase-1: transmembrane topology and dimerization ability. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 38363.
- [10] Sorensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S, *et al.* Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood* 2009 ; 114 (8) : 1645-54.
- [11] Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, *et al.* The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med* 2015 ; 21 (1) : 47-54.
- [12] Li Y, Fu J, Ling Y, *et al.* Sialylation on O-glycans protects platelets from clearance by liver Kupffer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 ; 114 (31) : 8360-5.
- [13] Deppermann C, Kratočil RM, Peiseler M, *et al.* Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets. *J Exp Med* 2020 ; 217 (4) : e20190723.
- [14] Futterer J, Dalby A, Lowe GC, *et al.* Mutation in GNE is associated with a severe form of congenital thrombocytopenia. *Blood* 2018 ; 132 (17) : 1855-8.
- [15] Izumi R, Niihori T, Suzuki N, *et al.* GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 (12) : 1068-72.
- [16] Revel-Vilk S, Shai E, Turro E, *et al.* GNE variants causing autosomal recessive macrothrombocytopenia without associated muscle wasting. *Blood* 2018 ; 132 (17) : 1851-4.
- [17] Zhen C, Guo F, Fang X, Liu Y, Wang X. A family with distal myopathy with rimmed vacuoles associated with thrombocytopenia. *Neurol Sci* 2014 ; 35 (9) : 1479-81.
- [18] Kauskot A, Pascreau T, Adam F, *et al.* A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica* 2018 ; 103 (12) : e603-17.
- [19] Willig TB, Breton-Gorius J, Elbim C, *et al.* Macrothrombocytopenia with abnormal demarcation membranes in megakaryocytes and neutropenia with a complete lack of sialyl-Lewis-X antigen in leukocytes-a new syndrome? *Blood* 2001 ; 97 (3) : 826-8.
- [20] Ma X, Li Y, Kondo Y, *et al.* Slc35a1 deficiency causes thrombocytopenia due to impaired megakaryocytopoiesis and excessive platelet clearance in the liver. *Haematologica* 2020 Apr 17;haematol.2019.225987. doi: 10.3324/haematol.2019.225987. Online ahead of print.
- [21] Li MF, Li XL, Fan KL, *et al.* Platelet desialylation is a novel mechanism and a therapeutic target in thrombocytopenia during sepsis: an open-label, multicenter, randomized controlled trial. *J Hematol Oncol* 2017 ; 10 (1) : 104.
- [22] Riswari SF, Tunjungputri RN, Kullaya V, *et al.* Desialylation of platelets induced by Von Willebrand Factor is a novel mechanism of platelet clearance in dengue. *PLoS Pathog* 2019 ; 15 (3) : e1007500.
- [23] Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamon MS, Campetella O. The sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun* 2005 ; 73 (1) : 201-7.
- [24] Li J, Callum JL, Lin Y, Zhou Y, Zhu G, Ni H. Severe platelet desialylation in a patient with glycoprotein Ib/IX antibody-mediated immune thrombocytopenia and fatal pulmonary hemorrhage. *Haematologica* 2014 ; 99 (4) : e61-3.
- [25] Shao L, Wu Y, Zhou H, *et al.* Successful treatment with oseltamivir phosphate in a patient with chronic immune thrombocytopenia positive for anti-GPIb/IX auto-antibody. *Platelets* 2015 ; 26 (5) : 495-7.
- [26] Zhang XH, Wang QM, Zhang JM, *et al.* Desialylation is associated with apoptosis and phagocytosis of platelets in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT. *J Hematol Oncol* 2015 ; 8 : 116.
- [27] Revilla N, Corral J, Minano A, *et al.* Multirefractory primary immune thrombocytopenia; targeting the decreased sialic acid content. *Platelets* 2018 ; 30 (6) : 1-9.
- [28] Zheng SS, Perdomo JS, Leung HHL, Yan F, Chong BH. Acquired Glanzmann thrombasthenia associated with platelet desialylation. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 (3) : 714-21.
- [29] Kawecki C, Hezard N, Bocquet O, *et al.* Elastin-derived peptides are new regulators of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014 ; 34 (12) : 2570-8.
- [30] Lasne D, Pascreau T, Darame S, *et al.* Measuring beta-galactose exposure on platelets: standardization and healthy reference values. *Res Pract Thromb Haemost* 2020 ; 4 : 813-22.