

Le terme thrombopénie constitutionnelle, dit aussi thrombopénie familiale, décrit une série de maladies affectant principalement la lignée mégacaryocytaire (MK), lignée conduisant à la production des plaquettes. Ce terme comprend des situations très différentes, car plus de 50 gènes ont été décrits comme responsables de désordres plaquettaires héréditaires. La rareté relative de ces affections, associée à un manque de connaissance de la physiopathologie de la maladie, est responsable d'une offre de traitement très limitée pour ces patients. En outre, une meilleure compréhension de leurs bases pathologiques serait très bénéfique à l'étude de la mégacaryopoïèse normale, puisque les mutations identifiées perturbent certains mécanismes de ce processus encore mal compris. L'amélioration de la compréhension de ces troubles bénéficierait non seulement aux patients, par le développement de nouvelles propositions thérapeutiques, mais aussi à la recherche fondamentale. Parmi ces différentes maladies, on peut distinguer ceux qui affectent l'engagement et la différenciation cellulaire précoce, de ceux qui affectent la maturation des mégacaryocytes et la formation des plaquettes. On peut également classer ces désordres de manière à mettre en évidence leur impact en dehors de la lignée MK, car nombreuses formes affectant l'hématopoïèse au sens plus large, ainsi que les cellules en dehors du système hématopoïétique. Enfin, une troisième façon de classer ces maladies est basée sur la taille des plaquettes produites.

Dans ce projet de thèse, j'ai travaillé sur deux thrombopénies familiales: la filaminopathie A et la thrombopénie 2 ou thrombopénie liée à l'ANKRD26. J'ai choisi d'utiliser un système expérimental relativement peu commun pour ce projet, les cellules souches induites à la pluripotence (iPSC), alors que ce type d'études utilise la plupart du temps des modèles de souris transgéniques, qui ne reflètent pas forcément le contexte humain. Dans ce projet, j'ai travaillé avec des iPSC générées directement à partir de cellules de patients : ces nouvelles lignées cellulaires contiennent la même information génétique que les individus affectés et présentent la capacité à se différencier en n'importe quelle cellule du corps humain, une caractéristique qui rend ce système très intéressant pour les études physiopathologiques.

Le terme filaminopathie A décrit des maladies très diverses, touchant plusieurs organes et affectant presque uniquement les femmes. Les individus portant des mutations dans le gène *FLNA*, un gène lié au chromosome X. Elles présentent deux populations différentes de plaquettes : l'une d'entre elles de grande taille- ainsi que des propriétés fonctionnelles modifiées, l'autre étant normale. Ceci s'explique par le fait que le gène de la *FLNA* est localisé sur le chromosome X, donc l'expression de la mutation est liée à l'X actif dans la cellule. Tout prélèvement de cellules primaires se traduit donc par un mélange de deux populations de cellules, exprimant soit l'allèle sauvage, soit l'allèle muté. Le rôle de la FLNa dans les MKs est encore mal connu et controversé. En effet, il existe certaines différences entre les données générées dans les modèles murins et ces qu'on observe chez l'homme. Dans

notre modèle d'étude, chaque lignée iPS générée a été dérivée d'une cellule humaine exprimant l'allèle sauvage ou muté. Par la conséquence, toutes les cellules hématopoïétiques produites à partir d'une lignée iPS expriment la *FLNA* sauvage ou la *FLNA* mutée vont garder ce même profil d'expression, ce qui en fait un modèle humain pertinent et approprié à l'étude des effets de la mutation de *FLNA*. Au cours de mon projet de doctorat, j'ai essayé de comprendre le rôle de la *FLNA* lors de la mégacaryopoïèse afin de décrire les fondements de la macrothrombopénie observée chez les patients. Au sein des lignées générées, la moitié expriment des niveaux normaux de FLNa, tandis que l'autre moitié exprime des niveaux réduits d'ARNm de *FLNA* et une perte totale de la protéine. Nous avons sélectionné deux clones pour chaque population pour deux patients (8 lignées cellulaires au total), afin de réduire la variabilité intraclonale. Les iPS ont été soumises à un protocole de différenciation *in vitro*, afin de produire des MKs. L'absence de FLNa n'a pas eu d'incidence sur la différenciation de MK, aucune différence statistiquement significative n'ayant été détectée dans l'expression de marqueurs de surface spécifiques de ce lignage, le CD41 et le CD42. Néanmoins, nous avons détecté une réduction profonde de la capacité des MKs *FLNA*^{mut} à produire des proplaquettes (PPT), donc nous avons conclu que l'absence de FLNa n'affecte pas la différenciation de MK, mais perturbe gravement la formation de PPT.

Pour mieux comprendre le rôle de la FLNa dans les MKs, nous avons conçu une série de quatre séquences d'ADNc mutantes, dépourvues de différents domaines de la FLNa que nous avons jugés potentiellement impliqués dans l'activité de la protéine. Ces mutants ont été introduits dans une lignée de cellules iPS n'exprimant pas la *FLNA*, ce qui permet d'étudier les seuls effets de l'expression de ces mutants. Nous avons choisi d'insérer ces transgènes en utilisant une technique d'édition du génome communément utilisée. En tant que contrôle positif, nous avons également réintroduit l'ADNc complet de la *FLNA*. Aucune des lignées générées ne présente de défaut de différenciation MK, mais leurs capacités à former des PPT *in vitro* est variable: seul le mutant dépourvu du domaine d'interaction avec la GPIb α (CD42) montrait un potentiel de formation des PPT normal, dans des conditions statiques. En conclusion, la protéine FLNa est impliquée dans la formation des PPT *via* plusieurs mécanismes, mais l'interaction entre FLNa et CD42 n'en fait pas partie, bien que nous ayons testé cette hypothèse dans un ensemble limité de conditions.

Après des essais d'adhérence au fibrinogène, nous montrons que les MKs *FLNA*^{mut} forment de grosses fibres de stress, contrairement aux MKs *FLNA*^{wt}. Ce phénotype suggère un défaut de contractilité de l'acto-myosine et pourrait être corrélé à une activation anormale de la voie RhoA. Parmi tous les mutants, ceux qu'ils manquent d'interaction entre $\beta 3$ et les GTPases donnent des résultats très similaires aux clones *FLNA*^{mut}. Cette observation est particulièrement intrigante et suggère un lien fonctionnel entre le récepteur pour le fibrinogène, la Filamine A et les petites GTPases. Pour mesurer l'activité de RhoA de manière

plus fiable, nous avons généré plusieurs lignées cellulaires iPS exprimant un biosenseur spécifique de RhoA, par transduction lentivirale. Cette sonde est capable de détecter l'activité de la petite GTPase RhoA, via le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Nous avons vérifié l'activité de RhoA en présence de substrats différents, en particulier le fibrinogène, le collagèneI et le facteur de von Willebrand. En présence de fibrinogène, donc d'une signalisation active de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, j'ai pu observer une nette augmentation de l'activité RhoA en absence de FLNA. Cette activité a été réduite grâce à la réexpression de l'ADNc complet de FLNA. En revanche, aucune différence au niveau de l'activité de RhoA n'a été détectée en présence des autres substrats, ce qui nous permet d'associer l'activité accrue de RhoA avec l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Enfin, les effets négatifs de la signalisation RhoA sur la formation de fibres de stress et des proplaquettes ont été efficacement réduits, grâce à l'inhibition chimique de ROCK1/2, un effecteur majeur de RhoA.

En conclusion, nous observons pour la première fois que l'absence de FLNA dans les MKs induit une maturation de MK défectueuse en raison d'une signalisation accrue de RhoA, dépendante éventuellement de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Ces observations sont novatrices dans le sens où l'implication d' $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ n'a jamais été observée dans la signalisation RhoA. De plus, la thrombasthénie de Glanzmann et d'autres macrothrombocytopénies partagent potentiellement certaines similitudes dans leur physiopathologie avec la filaminopathie A, donc c'est probable que l'activité de RhoA joue un rôle central dans le déploiement correct du cytosquelette.

L'autre trouble congénital plaquettaire que j'ai décrit dans ce manuscrit est la thrombocytopénie 2, également appelée thrombocytopénie liée à l'ANKRD26 ou THC2. Il s'agit d'une des thrombocytopénies héréditaires le plus souvent diagnostiquée et son tableau clinique comprend une transmission héréditaire autosomique dominante, une dysmégacaryopoïèse, une thrombocytopénie légère à sévère et un risque accru de développer des leucémies myéloïdes. Le THC2 est l'un des trois thrombocytopénies familiales décrites actuellement qui prédisposent au développement de leucémies. Alors que les deux autres troubles (FPD / AML et ETV6-RT) sont associés à des mutations de facteurs de transcription, THC2 est provoqué par des mutations de la partie 5'UTR de l'*ANKRD26*, a gène relativement inconnu et non associé à la transformation leucémique. Les mutations pathogéniques sont principalement localisées dans un court segment de nucléotides comprenant un motif de liaison pour le complexe de transcription formé par RUNX1 et FLI1. Les mutations dans la 5' UTR réduisent efficacement l'affinité pour l'ADN de ces deux facteurs de transcription et le gène n'est donc plus sous exprimé pendant la mégacaryopoïèse. Un premier rapport sur le rôle de l'ANKRD26, dans le contexte de la thrombocytopénie, décrit une activité anormale des voies de signalisation dépendantes de l'axe TPO/MPL, en particulier de la voie MAPK. Ceci est suffisant pour induire une formation de proplaquettes défectueuse, et expliquerait le

développement de la thrombocytopénie héréditaire. Néanmoins, on ignore actuellement si ces mutations ont un impact plus large que celui observé dans la lignée MK. Les premières données cliniques indiquent chez certains individus une augmentation du nombre de leucocytes, mais aucune anomalie évidente dans la moelle osseuse –si ce n’est la dysmégacaryopoïèse- n’a été décrite. De plus, aucune hypothèse n’a été formulée pour expliquer la prédisposition à la leucémie observée. Par conséquent, le but de mes travaux a été de comprendre le mécanisme reliant les mutations pathogènes de la séquence 5’UTR de l’ANKRD26 et la prédisposition leucémique. Mon hypothèse de départ était basée sur la possibilité qu’un défaut similaire à celui décrit pour le récepteur de la TPO soit également présent sur le récepteur du G-CSF, car il joue un rôle important dans la prolifération et la maturation des granulocytes, l’un des types de leucocytes le plus fréquente. Cette hypothèse était basée sur les similitudes fonctionnelles et structurelles entre MPL (le récepteur de la TPO) et le G-CSFR.

Pour le faire efficacement, nous avons généré plusieurs clones iPS à partir de trois patients, afin d’accroître la robustesse de nos observations. Les lignées cellulaires des patients ont été comparées à trois lignées cellulaires générées à partir de milieux génomiques différents, ce qui augmente la spécificité des résultats. De plus, nous avons comparé directement les résultats obtenus à partir des iPSCs avec certains échantillons primaires obtenus à partir de patients porteurs des mêmes mutations. J’ai optimisé les conditions de culture et les protocoles de différenciation utilisés pour les études de Filaminopathie A, afin de permettre la prolifération et la différenciation des granulocytes, provenant à la fois de ces iPSC, mais aussi par des cellules primaires, isolé à partir du sang périphérique des patientes. Nous avons utilisé une batterie de tests pour caractériser la granulopoïèse des cellules mutées. Nous avons aussi réussi à générer des lignées cellulaires qui sont dépendantes du G-CSF, et qui sont tout autant d’outils efficaces à l’évaluation de changements dans la voie de signalisation dépendant de la cytokine.

Nous avons étudié l’expression de l’ANKRD26 dans différentes populations et nous avons constaté une expression accrue de ce gène dans les granulocytes et les cellules déjà engagées dans le destin granulo-monocytaire, mais pas dans les cellules plus immatures. Nous avons aussi observé une prolifération accrue associée à une maturation retardée de la lignée granulocytaire, deux caractéristiques communes à plusieurs troubles hématologiques affectant la signalisation induite par le G-CSF et son récepteur. Ces résultats sont générés à partir de différentes origines génomiques de patients, mais ils doivent être systématiquement confirmés pour toutes les lignées iPSCs générées, en particulier les données relatives à la maturation, car ce phénotype est fortement dépendant des conditions expérimentales. En exploitant deux stratégies différentes, nous avons pu générer deux modèles qui nous ont permis d’évaluer le dosage de l’ANKRD26 sur l’activité de G-CSFR. En effet, avec les deux modèles, nous avons constaté différents niveaux d’expression de surface du G-CSFR, suggérant un rôle actif de

l'ANKRD26 dans la modulation de la signalisation médiée par le G-CSF. De plus, l'analyse de la dynamique d'activation des récepteurs a révélé une augmentation de la signalisation de STAT3 et de MAPK, à la fois en fonction du temps et de la dose. Cette dernière caractéristique a particulièrement attiré mon attention, car l'hypersensibilité aux cytokines est une des caractéristiques de certains troubles congénitaux évoluant en leucémie, comme la neutropénie congénitale sévère (NSC). Nous avons commencé à confirmer ces observations obtenues dans notre modèle de cellules cancéreuses aussi dans le modèle iPS bien qu'à titre préliminaire, ce qui témoigne d'une dérégulation de certaines voies de signalisation.

En conclusion, nous proposons un nouveau modèle de prédisposition pré-leucémique, qui est dépendant d'une sensibilité accrue de la lignée granulocytaire au G-CSF. Cette caractéristique sous-tend l'existence d'un terrain fertile pour l'acquisition d'autres événements mutationnels et l'émergence de clones mutés, d'où la progression vers une leucémie.