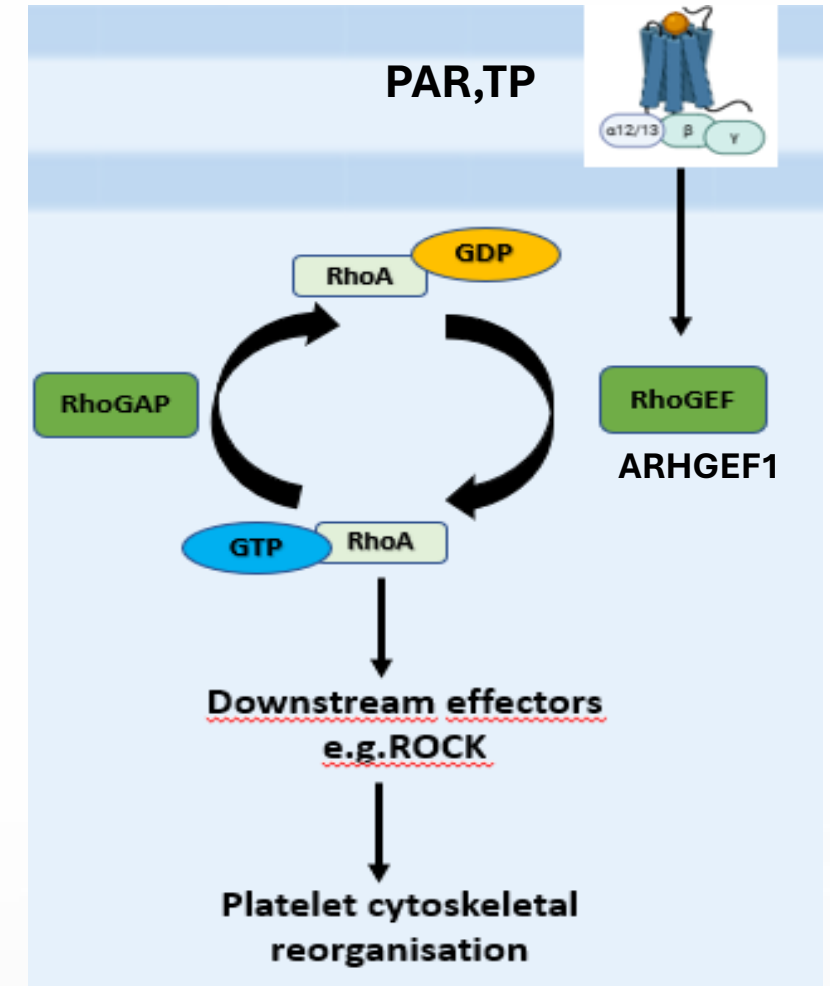


Caractérisation des fonctions plaquettaires chez une patiente déficiente en ARHGEF1

Manal Ibrahim-Kosta

ARHGEF1

- Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF)
- Spécifique de RhoA GTPase
- Exprimée principalement dans les cellules hématopoïétiques
- Signalisation plaquettaire en particulier des récepteurs de la thrombine (PAR 1 et 4) et le récepteur au Thromboxane A2 (TP) couplés aux protéines G α 12/13

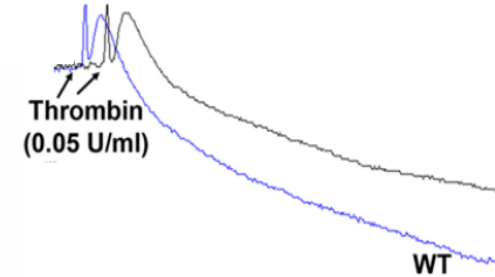


Modèle de souris ARHGEF1 -/-

- Numération plaquettaire normale
- Absence d'anomalie des autres lignées

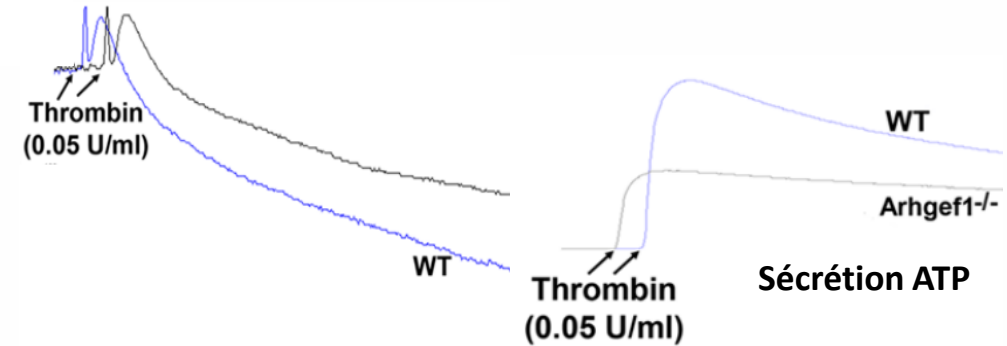
Modèle de souris ARHGEF1 -/-

- Numération plaquettaire normale
- Absence d'anomalie des autres lignées
- Dysfonction plaquettaire :
 - Allongement du temps de saignement
 - Hypoagrégation plaquettaire (Thrombine 0.05 et 0.1 U/mL; U46619 2,5 µM ; Collagène 5µg/mL)



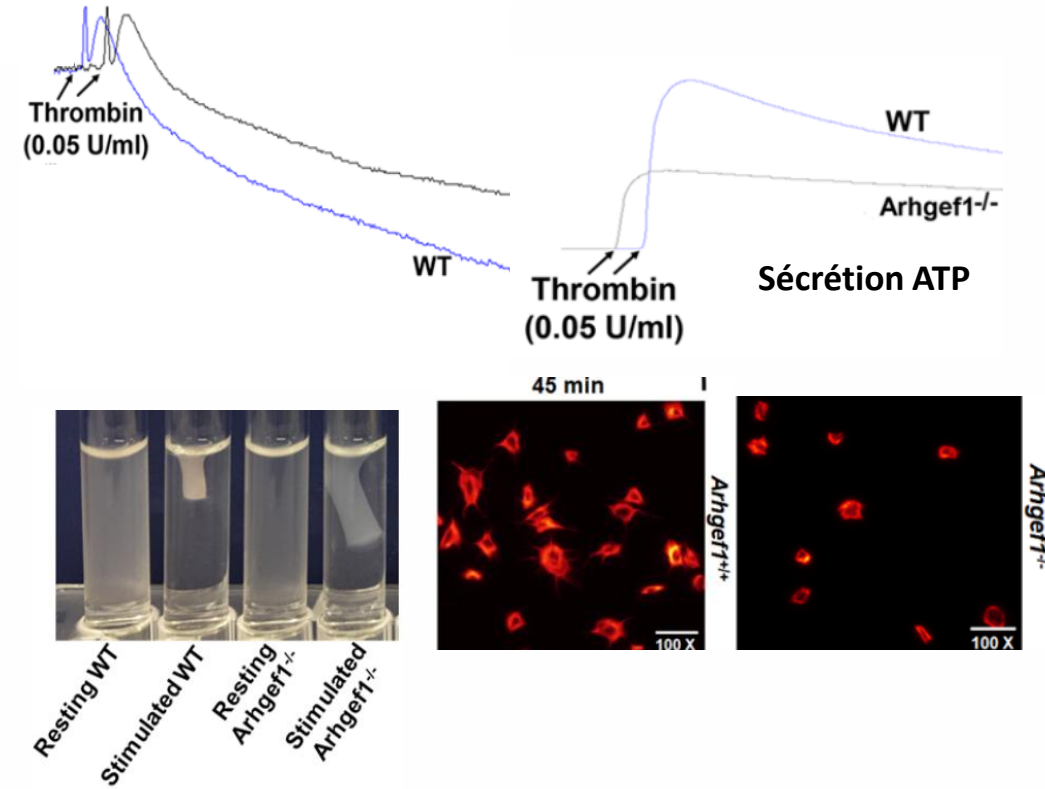
Modèle de souris ARHGEF1 -/-

- Numération plaquettaire normale
- Absence d'anomalie des autres lignées
- Dysfonction plaquettaire :
 - Allongement du temps de saignement
 - Hypoagrégation plaquettaire (Thrombine 0.05 et 0.1 U/mL; U46619 2,5 µM ; Collagène 5µg/mL)
- Défauts granulaires :
 - Diminution de la sécrétion d'ATP
 - Diminution de l'expression de la P-sélectine



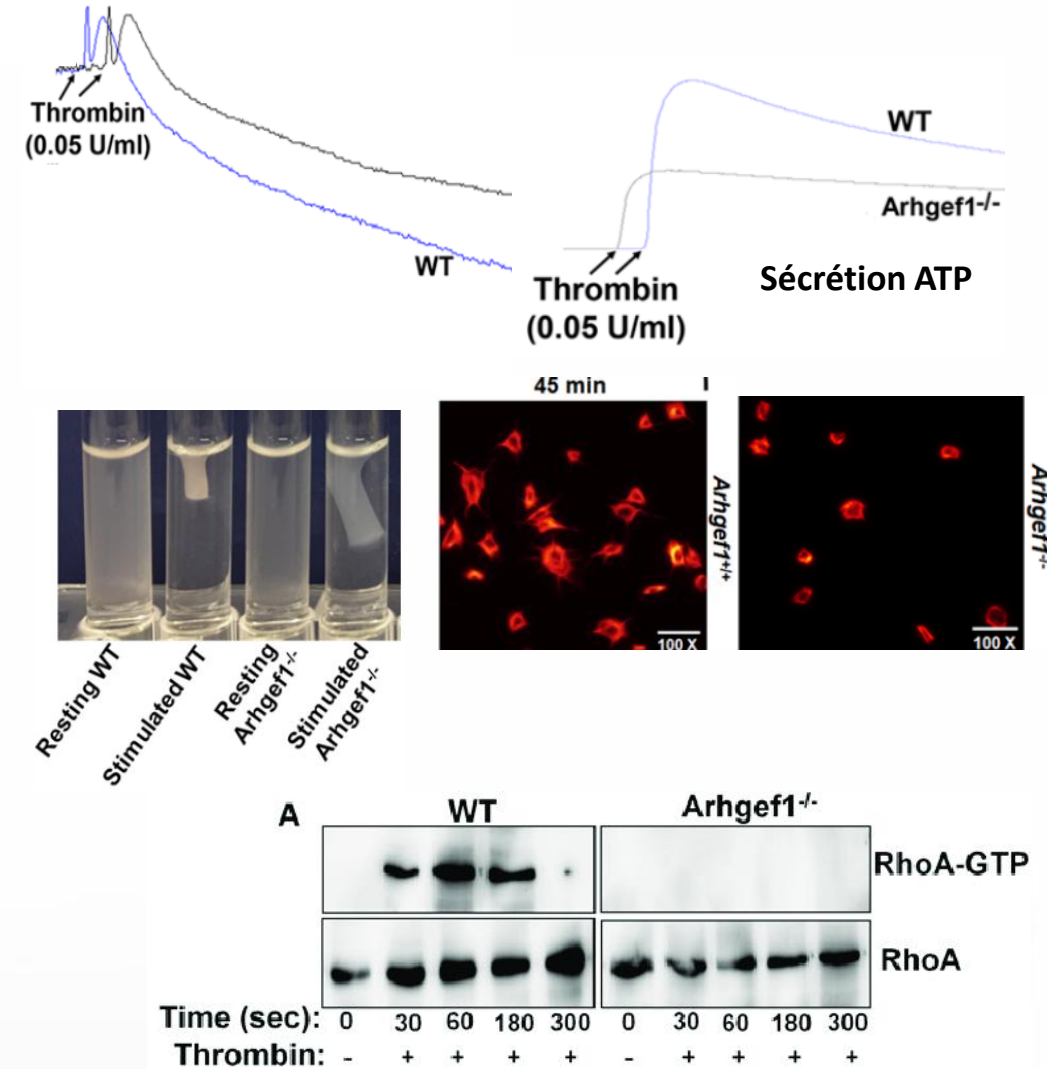
Modèle de souris ARHGEF1 -/-

- Numération plaquettaire normale
- Absence d'anomalie des autres lignées
- Dysfonction plaquettaire :
 - Allongement du temps de saignement
 - Hypoagrégation plaquettaire (Thrombine 0.05 et 0.1 U/mL; U46619 2,5 μ M ; Collagène 5 μ g/mL)
- Défauts granulaires :
 - Diminution de la sécrétion d'ATP
 - Diminution de l'expression de la P-sélectine
- Défauts de la signalisation GPIIb/IIIa :
 - Diminution d'expression après activation
 - Défaut de la rétraction du caillot
 - Défaut de l'étalement des plaquettes sur fibrinogène

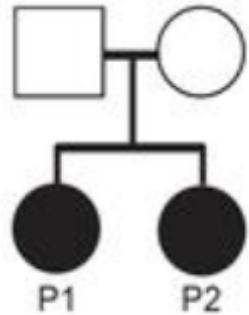


Modèle de souris ARHGEF1 -/-

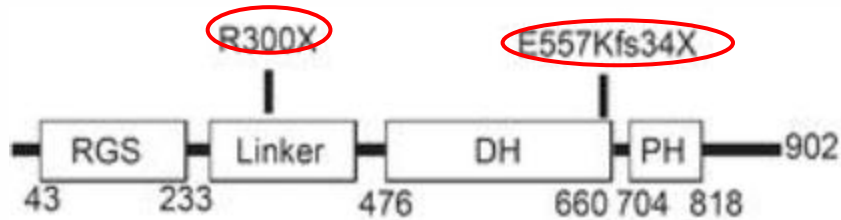
- Numération plaquettaire normale
- Absence d'anomalie des autres lignées
- Dysfonction plaquettaire :
 - Allongement du temps de saignement
 - Hypoagrégation plaquettaire (Thrombine 0.05 et 0.1 U/mL; U46619 2,5 μ M ; Collagène 5 μ g/mL)
- Défauts granulaires :
 - Diminution de la sécrétion d'ATP
 - Diminution de l'expression de la P-sélectine
- Défauts de la signalisation GPIIb/IIIa :
 - Diminution d'expression après activation
 - Défaut de la rétraction du caillot
 - Défaut de l'étalement des plaquettes sur fibrinogène
- Absence d'activation de RhoA dans les plaquettes



Déficit ARHGEF1 chez l'Homme



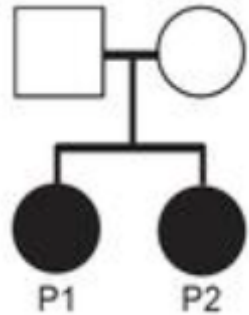
Variants *ARHGEF1* double hétérozygote



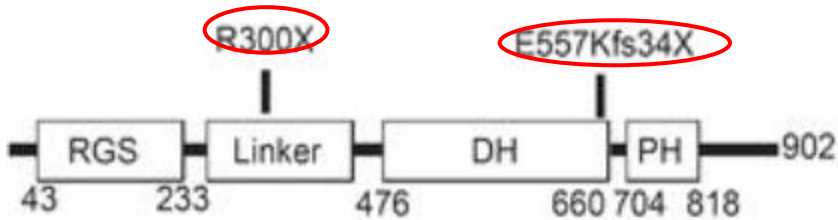
- **Déficit immunitaire primitif :**

- Infections respiratoires récurrentes des voies respiratoires supérieures et inférieures, bronchectasies, lobectomie pulmonaire chez P1 (bronchectasies) et P2 (carcinome épidermoïde)
- Hypogammaglobulinémie, lymphopénie B et T, absence de production d'anticorps post-vaccinale

Déficit ARHGEF1 chez l'Homme

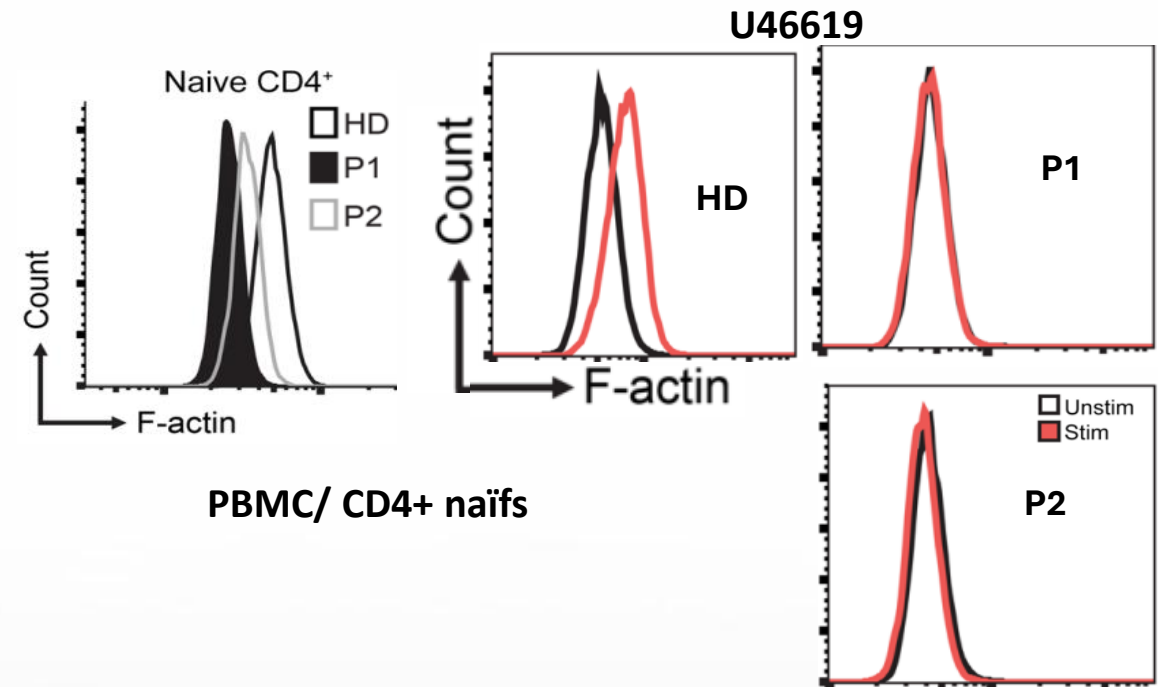
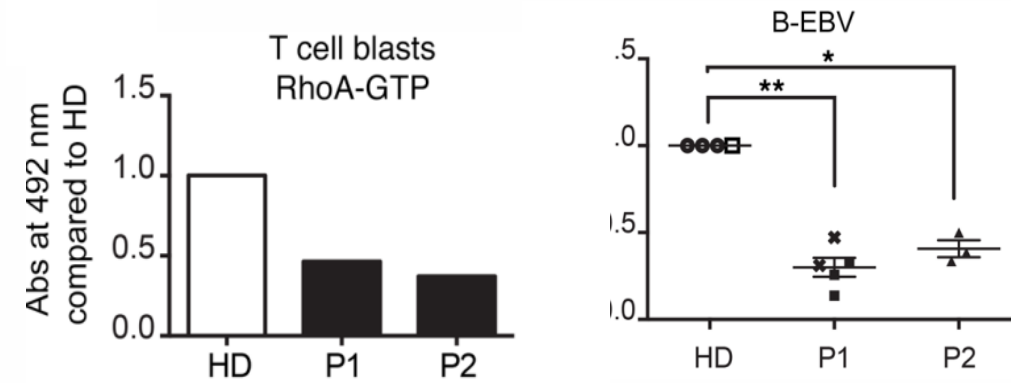


Variants *ARHGEF1* double hétérozygote



• Déficit immunitaire primitif :

- Infections respiratoires récurrentes des voies respiratoires supérieures et inférieures, bronchectasies, lobectomie pulmonaire chez P1 (bronchectasies) et P2 (carcinome épidermoïde)
- Hypogammaglobulinémie, lymphopénie B et T, absence de production d'anticorps post-vaccinale



OBJECTIF

Caractériser les fonctions plaquettaires chez la
patiente P2 déficiente en ARHGEF1



Phénotype plaquettaire chez la patiente déficiente en ARHGEF1

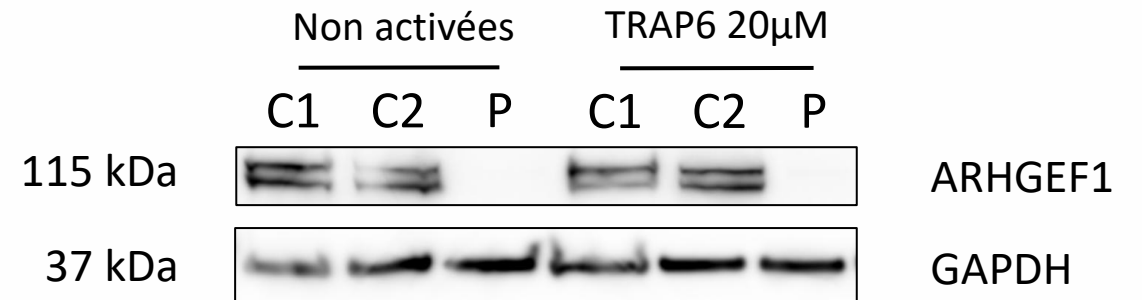
- Patiente, 36 ans
- Absence d'antécédent hémorragique
- Numération plaquettaire normale à 279 G/L
- Morphologie plaquettaire normale



Phénotype plaquettaire chez la patiente déficiente en ARHGEF1

- Patiente, 36 ans
- Absence d'antécédent hémorragique
- Numération plaquettaire normale à 279 G/L
- Morphologie plaquettaire normale

Expression plaquettaire d'ARHGEF1



C1= control 1
C2 = control 2
P = patient



**Absence d'expression d'ARHGEF1
dans les plaquettes de la patiente**

- **Test d'agrégation plaquettaire** : normal
- Intensité maximale >80% en réponse aux agonistes testés**

	Platelet aggregation, Maximal Intensity, %					
	ADP	Collagen	Epinephrine	TRAP	Ristocetin	Arachidonic acid
Reference Ranges	5μM: 73-95 10μM: 84-95	2μg/mL: 85-96 10μg/mL: 86-97	5μM: 80-100 25μM: NA	10μM: 88-97 20μM: 80-98 50μM: 86-97	1.25 mg/mL: 90-99	0.3 mg/mL: 86-96
Patient	5μM: 88 10μM: 84-95	2μg/mL: 85 10μg/mL: 86	5μM: 85 25μM: 88	10μM: 81 20μM: 86 50μM: 87	95	90

- **Test d'agrégation plaquettaire** : normal

Intensité maximale >80% en réponse aux agonistes testés

	Platelet aggregation, Maximal Intensity, %					
	ADP	Collagen	Epinephrine	TRAP	Ristocetin	Arachidonic acid
Reference Ranges	5μM: 73-95 10μM: 84-95	2μg/mL: 85-96 10μg/mL: 86-97	5μM: 80-100 25μM: NA	10μM: 88-97 20μM: 80-98 50μM: 86-97	1.25 mg/mL: 90-99	0.3 mg/mL: 86-96
Patient	5μM: 88 10μM: 84-95	2μg/mL: 85 10μg/mL: 86	5μM: 85 25μM: 88	10μM: 81 20μM: 86 50μM: 87	95	90

Reference Ranges		IIbIIIa (CD41)	PAC1	Ib (CD42b)
	Baseline	>12	<0.5	1.7-6
	TRAP	>15	>0.7	0.9-4
	ADP	>15	>3.5	0.8-3
Patient	Baseline	11.9	0.34	2.5
	TRAP	15.7	3.03	1.4
	ADP	15	6.27	1.4

- **Etude des glycoprotéines plaquettaires**

Expression normale des GPIIbIIIa et GPIb à l'état basal et après activation par le TRAP 50μM et l'ADP 10μM

- **Etude des granules denses**

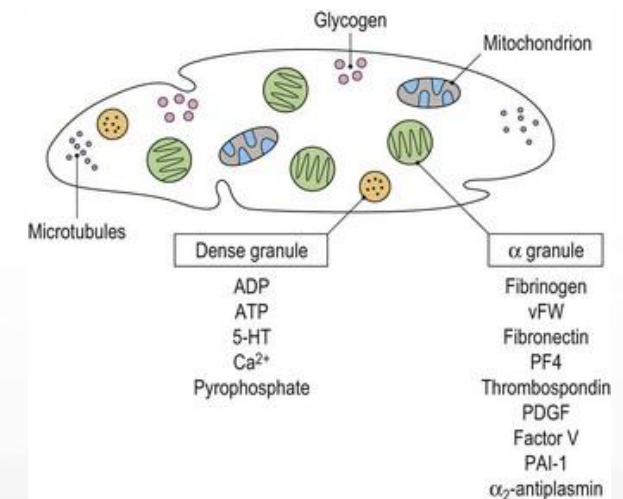
- Test à la mépacrine en cytométrie en flux :
 - Captation normale
 - Libération normale de la mépacrine après activation par le TRAP 23μM
- Expression normale du CD63 après activation plaquettaire par le TRAP 50μM et ADP 10μM
- Dosage sérotonine intraplaquettaire :
 - 0,70 μg/Giga de plaquettes
(VN 0,51-1,51 μg/Giga de plaquettes)
- Dosage des nucléotides :
 - Ratio ATP/ADP = 1,51 (VN 1,2-2,4)

• Etude des granules denses

- Test à la mépacrine en cytométrie en flux :
 - Captation normale
 - Libération normale de la mépacrine après activation par le TRAP 23μM
- Expression normale du CD63 après activation plaquettaire par le TRAP 50μM et ADP 10μM
- Dosage sérotonine intraplaquettaire :
 - 0,70 μg/Giga de plaquettes (VN 0,51-1,51 μg/Giga de plaquettes)
- Dosage des nucléotides :
 - Ratio ATP/ADP = 1,51 (VN 1,2-2,4)

• Etude des granules alpha

- Expression normale de la P-sélectine après activation plaquettaire par le TRAP 50μM et ADP 10μM
- Dosage PAI1 antigène sérique normal :
 - 0,75 μg/Giga de plaquettes (VN 0,33-1,07 μg/Giga de plaquettes)

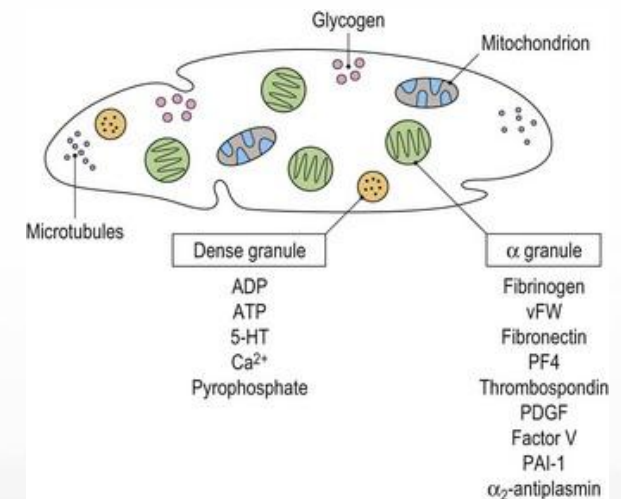


• Etude des granules denses

- Test à la mépacrine en cytométrie en flux :
 - Captation normale
 - Libération normale de la mépacrine après activation par le TRAP 23μM
- Expression normale du CD63 après activation plaquettaire par le TRAP 50μM et ADP 10μM
- Dosage sérotonine intraplaquettaire :
 - 0,70 μg/Giga de plaquettes (VN 0,51-1,51 μg/Giga de plaquettes)
- Dosage des nucléotides :
 - Ratio ATP/ADP = 1,51 (VN 1,2-2,4)

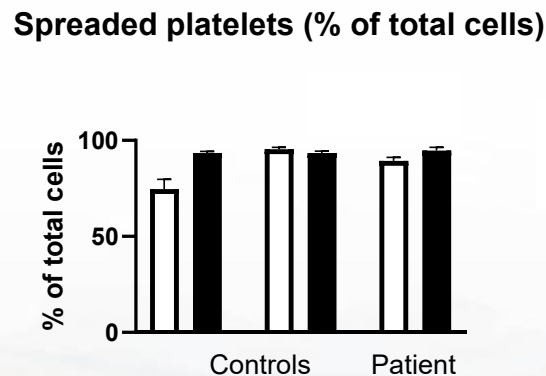
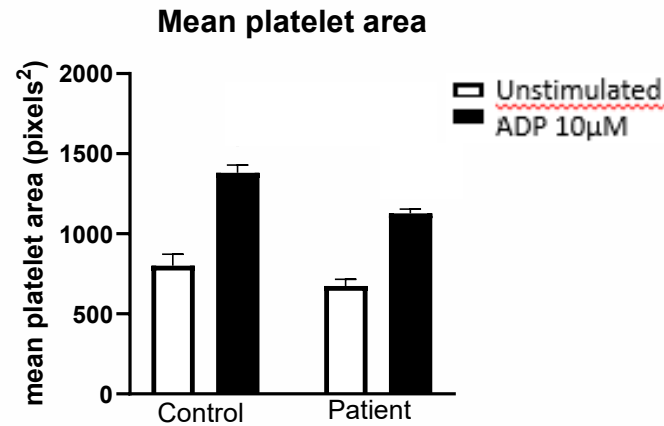
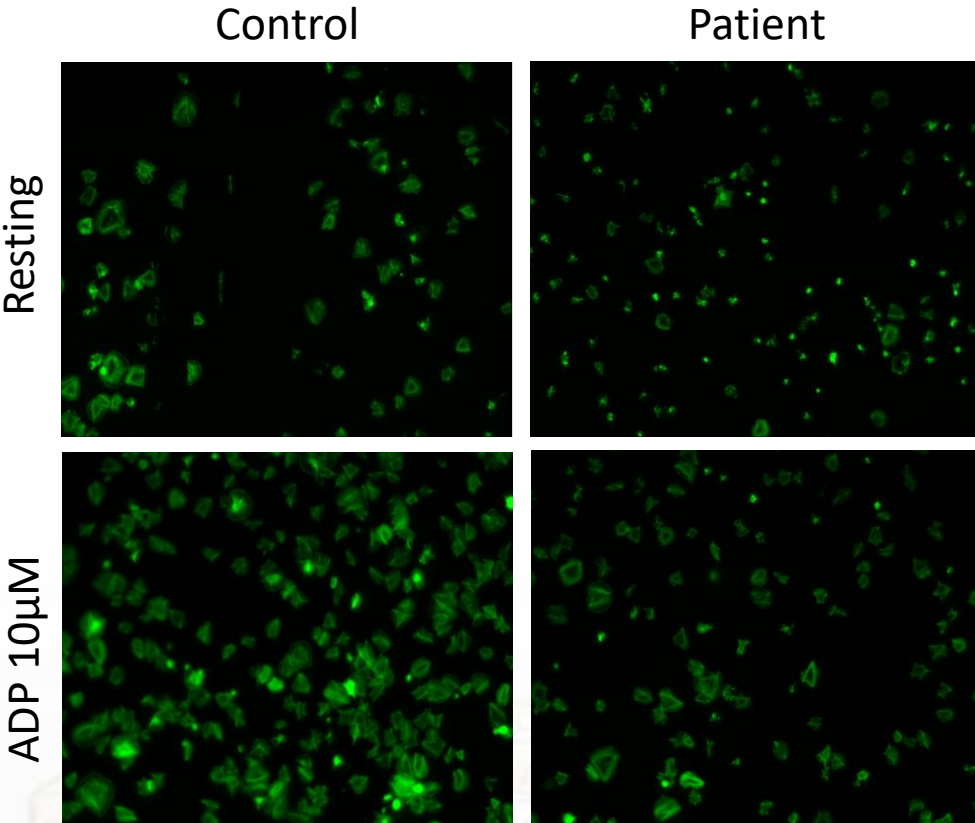
• Etude des granules alpha

- Expression normale de la P-sélectine après activation plaquettaire par le TRAP 50μM et ADP 10μM
- Dosage PAI1 antigène sérique normal :
 - 0,75 μg/Giga de plaquettes (VN 0,33-1,07 μg/Giga de plaquettes)



Absence de défaut granulaire

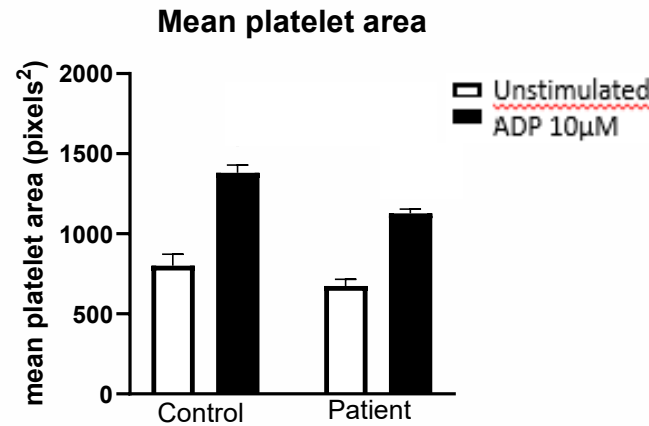
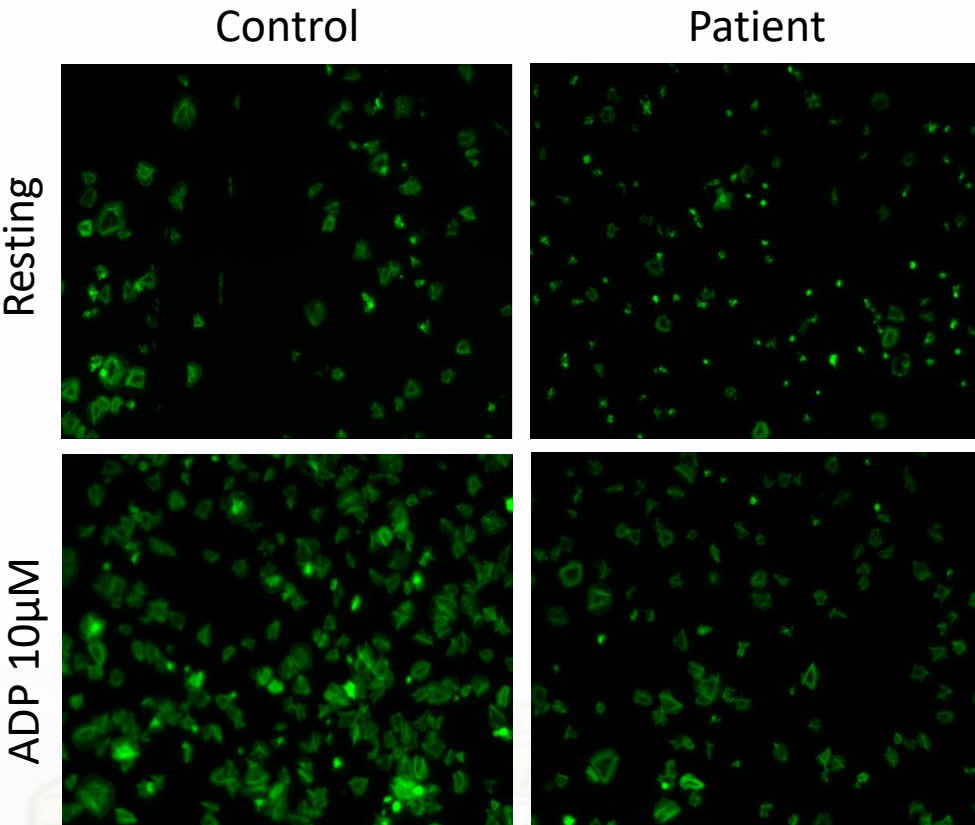
- Etude de la signalisation GPIIB/IIIa outside-in
- Etalement des plaquettes sur matrice de fibrinogène
100 µg/mL après activation par l'ADP 10µM



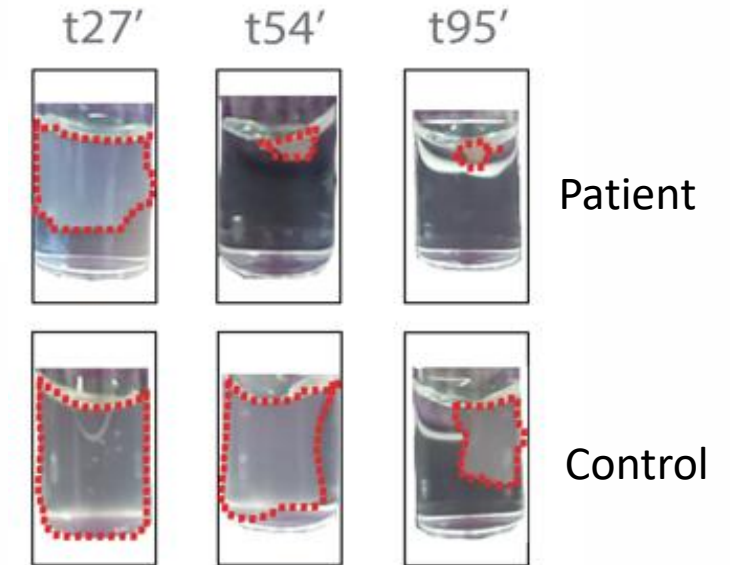
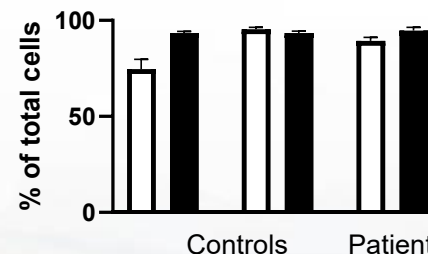
- Etude de la signalisation GPIIB/IIIa outside-in

- Etalement des plaquettes sur matrice de fibrinogène
100 µg/mL après activation par l'ADP 10µM

- Etude de la rétraction du caillot

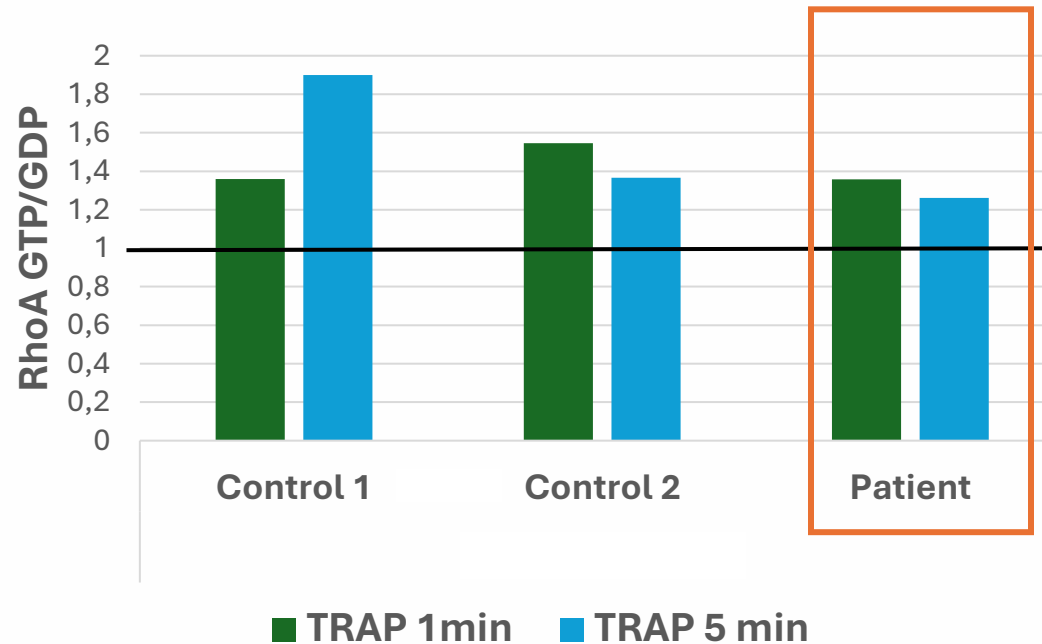


Spreaded platelets (% of total cells)



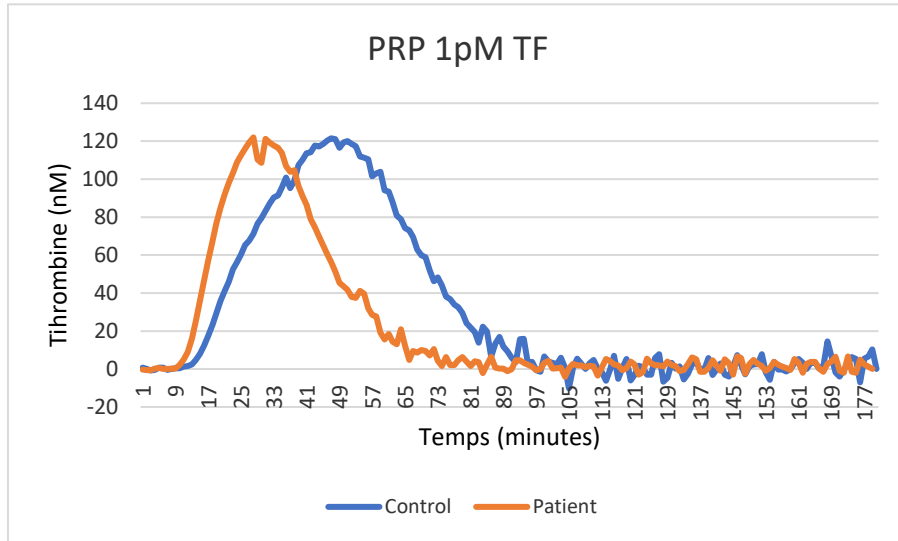
Absence de défaut d'étalement des plaquettes
Absence de défaut de la rétraction du caillot

- Etude de l'activation de RhoA (G-LISA®)



Activation normale de RhoA

- **Test de génération de la thrombine**



	PRP 1pM TF	
	Pool Norm	Patient
Lagtime (min)	5,55	4,55
ETP (nmol/L.min)	1869,5	1261
Peak (nmol/L)	125,96	119,8
Time to peak (min)	16,09	11,24



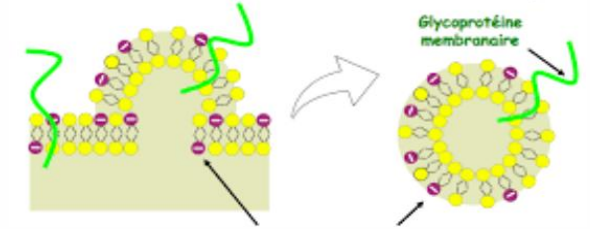
Génération de la thrombine normale

• Etude des microparticules plaquettaires

Numération des sous-populations de microparticules plasmatiques exprimant la phosphatidylsérine (PS+)

	Résultat (MV/μl)	Valeurs de références (MV/μl)
Microvésicules (MV PS+ totale)	3020	1500-3000
MV Plaquettaires PS+ (CD41)	2100	500-3000
MV érythrocytaires PS+ (CD235a)	280	<400
MV granulocytaires PS+ (CD15)	2	<50
MV monocytaires PS+ (HLA-DR)	40	<200

Méthodologie : Cytométrie en flux fluo-sensible (Cytoflex, Standardisation Mégamix SSC 0.16-0.9)



Phospholipides anioniques (PS) externalisés
= support pour les facteurs de coagulation

Numération des microparticules procoagulantes PS+ dans le surnageant du plasma riche en plaquettes

	Non activé (MV/μl)	Activé (thrombine/collagène) (MV/μl)
Patient	210	22500
Contrôles	100-700	>10000

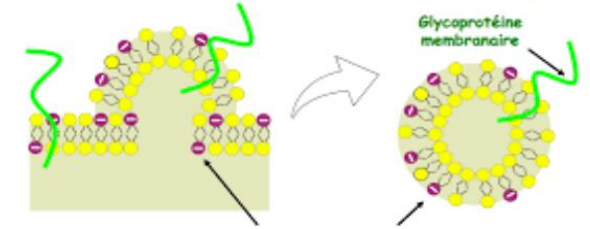
Méthodologie : Cytométrie en flux fluo-sensible (Cytoflex, Standardisation Mégamix SSC 0.16-0.9)

• Etude des microparticules plaquettaires

Numération des sous-populations de microparticules plasmatiques exprimant la phosphatidylsérine (PS+)

	Résultat (MV/μl)	Valeurs de références (MV/μl)
Microvésicules (MV PS+ totale)	3020	1500-3000
MV Plaquettaires PS+ (CD41)	2100	500-3000
MV érythrocytaires PS+ (CD235a)	280	<400
MV granulocytaires PS+ (CD15)	2	<50
MV monocytaires PS+ (HLA-DR)	40	<200

Méthodologie : Cytométrie en flux fluo-sensible (Cytotflex, Standardisation Mégamix SSC 0.16-0.9)



Phospholipides anioniques (PS) externalisés
= support pour les facteurs de coagulation

Numération des microparticules procoagulantes PS+ dans le surnageant du plasma riche en plaquettes

	Non activé (MV/μl)	Activé (thrombine/collagène) (MV/μl)
Patient	210	22500
Contrôles	100-700	>10000

Méthodologie : Cytométrie en flux fluo-sensible (Cytotflex, Standardisation Mégamix SSC 0.16-0.9)

Absence d'anomalie quantitative des microparticules PS+ circulantes quelle que soit leur origine cellulaire
Absence d'anomalie de la génération de microparticules plaquettaires PS+ après activation

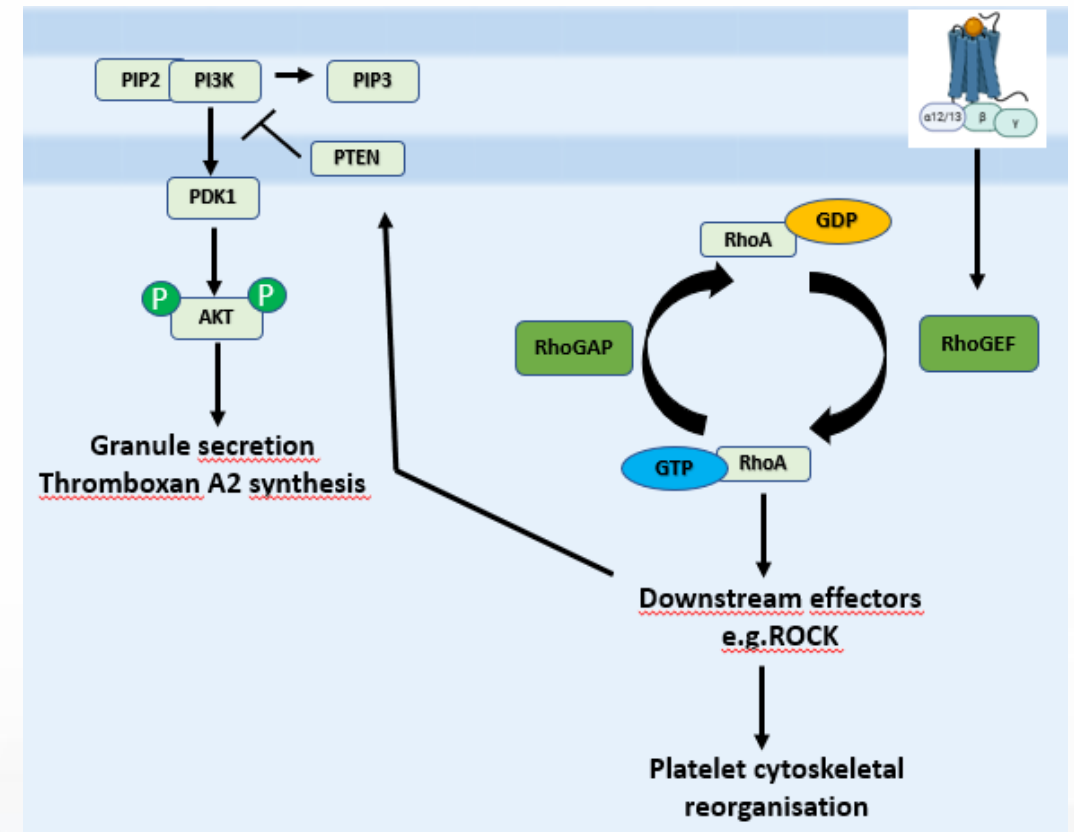
Conclusion

- Patiente porteuse d'un déficit en ARHGEF1
 - Effet délétère sur la fonction lymphocytaire → déficit immunitaire sévère
 - Absence d'effet sur la production/fonction plaquettaire
 - absence de thrombopénie/thrombopathie
 - activation normale de RhoA
 - absence de profil procoagulant



Conclusion

- Patiente porteuse d'un déficit en ARHGEF1
 - Effet délétère sur la fonction lymphocytaire → déficit immunitaire sévère
 - Absence d'effet sur la production/fonction plaquettaire
 - absence de thrombopénie/thrombopathie
 - activation normale de RhoA
- Explorer la voie PI3K/Akt dans les plaquettes de la patiente
 - Voie dérégulée dans les lymphocytes des deux patientes
- Voies d'activation de RhoA indépendante d'ARHGEF1?
 - Exploration d'autres RhoA GEF plaquettaires : ARHGEF2 10, 12, 18





C2VN – Groupe « plaquette / mega »

Alessi Marie-Christine
Bastelica Delphine
Gabinaud Elisa
Ibrahim-Kosta Manal
Maurizio Julien
Poggi Marjorie
Saultier Paul
Suffit Justine
Veneziano-Broccia Mathilde

CHU Timone-CRPP

Bernot Denis
Ernest Vincent
Falaise Céline
Saut Noémie
Tomeï Enora

CHU Timone-Secteur de Biologie vasculaire

Dignat-Georges Françoise
Lacroix Romaric

CHU Timone-Service de Médecine Interne

Derrida Lucie
Dol Chloé
Galicier Lionel
Poggi Claire

Merci de votre attention



