



AVIS DE SOUTENANCE

Mme GAIA ZIRKA présente ses travaux en soutenance le :

Mercredi 31 mars 2021 de 14h00 à 16h30

**Salle de Visioconférence
Rez-de-Chaussée – aile bleue
Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales
Campus Santé - Timone**

27 Boulevard Jean Moulin
13385 MARSEILLE Cedex 05

en vue de l'obtention du diplôme : **Doctorat en Biologie santé– Pathologie Vasculaire et Nutrition**

Titre des travaux : SLC44A2: DE LA THROMBOSE A L'INFLAMMATION
Ecole doctorale : Sciences de la vie et de la santé (62)
Formation doctorale : MASTER obtenu dans un établissement extérieur à Aix Marseille
Unité de recherche : Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition
Directeur : M. PIERRE-EMMANUEL MORANGE, PROFESSEUR DES UNIVERSITES
Codirecteur : Mme GRACE THOMAS, CHARGE DE RECHERCHE

Membres du jury

Nom	Qualité	Etablissement	Rôle
M. BENOIT HO-TIN-NOE	DIRECTEUR DE RECHERCHE	UNIVERSITE DE PARIS	Rapporteur du jury
M. THIERRY PEYRARD	DIRECTEUR DE RECHERCHE	EFS	Rapporteur du jury
Mme MARIE-CHRISTINE ALESSI	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE	Membre du jury
Mme CECILE DENIS	DIRECTEUR DE RECHERCHE	UNIVERSITE PARIS 11 - PARIS SUD	Membre du jury
M. PIERRE-EMMANUEL MORANGE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE	Directeur
Mme GRACE THOMAS	CHARGE DE RECHERCHE	UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE	Co-Directeur

Le Doyen


Georges LEONETTI

Abstract

Genome wide association studies linked the SLC44A2 rs2288904 (461G>A) polymorphism to venous thrombosis (VT) in humans. It leads to the expression of the human neutrophil antigen (HNA)-3a or HNA-3b on Slc44a2, HNA-3b being protective from VT. Slc44a2 is a ubiquitous transmembrane protein and a receptor for von Willebrand factor (VWF), a protein expressed by the inflamed endothelium. The aim of this work was to unravel the mechanisms linking SLC44A2 to VT using both *in vitro* and *in vivo* models. We have observed that Slc44a2 deficiency had no effect on thrombosis in a hypercoagulability mouse model. However, SLC44A2^{-/-} mice had significantly smaller thrombi than wild type mice in a VT mouse model where thrombosis is neutrophil-dependent. We verified the involvement of Slc44a2 in neutrophil recruitment and/or activation at the vessel wall, which is crucial for VT initiation. Transfected HEK293T or neutrophils homozygous for the HNA-3a or the HNA-3b-coding allele were perfused in flow chambers over VWF at venous shear rates. HNA-3a-expression was required for neutrophil adhesion on VWF. This adhesion was enhanced when neutrophils were activated with lipopolysaccharide. Specific shear conditions, high neutrophil concentration worked like a “second hit”, inducing the formation of neutrophil extracellular traps. The importance of Slc44a2 in the neutrophil recruitment process was then confirmed in mice by intravital microscopy done on mesenteric venules after endothelial degranulation. Mice deficient in Slc44a2 showed a massive reduction in neutrophil recruitment at the vessel wall. By showing that Slc44a2/HNA-3a is crucial for the adhesion and activation of neutrophils in veins during inflammation and when submitted to specific shears, this work proposes new mechanistic insights linking inflammation to VT.

Résumé

Des études d'association pangénomiques ont lié le polymorphisme SLC44A2 rs2288904 (461G> A) à la thrombose veineuse (TV) chez l'homme. Elle conduit à l'expression de l'épitope HNA-3a (human neutrophil antigen-3a) ou HNA-3b par Slc44a2, HNA-3b étant protecteur contre la TV. Slc44a2 est une protéine transmembranaire ubiquitaire et un récepteur du facteur von Willebrand (FVW), une protéine exprimée par l'endothélium inflammé. Le but de ce travail était de déchiffrer les mécanismes liant SLC44A2 à la TV en utilisant des modèles *in vivo* et *in vitro*. Nous avons observé que la déficience en Slc44a2 n'influait pas la thrombose dans un modèle murin d'hypercoagulabilité. Par contre, les souris SLC44A2^{-/-} avaient des thrombi significativement plus petits en comparaison avec les souris sauvages dans un modèle de TV dépendant des neutrophiles. Nous avons testé si Slc44a2 pouvait influencer le recrutement et/ou l'activation des neutrophiles à la paroi vasculaire, une étape importante dans l'initiation de la TV. Des cellules HEK293T transfectées ou des neutrophiles homozygotes pour l'allèle codant HNA-3a ou HNA-3b ont été perfusés sur du FVW à des taux de cisaillement veineux. L'expression de HNA-3a s'est révélée importante pour l'adhésion du neutrophile au FVW. Cette adhésion était amplifiée quand les neutrophiles étaient pré-activés avec des lipopolysaccharides. Des conditions de cisaillement spécifiques et une concentration élevée de neutrophiles ont agi comme un « 2ème hit » induisant la formation de « neutrophil extracellular traps ». L'importance de Slc44a2 dans le processus de recrutement des neutrophiles a été ensuite confirmé par microscopie intravitale sur veinules de souris après dégranulation endothéliale. Les souris déficientes en Slc44a2 ont présenté une réduction massive du recrutement des neutrophiles à la paroi vasculaire. En montrant que Slc44a2/HNA-3a est crucial pour l'adhésion et l'activation des neutrophiles dans les veines sous inflammation et taux de cisaillements spécifiques, ce travail propose de nouvelles perspectives mécanistiques reliant l'inflammation à la TV.