UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

CARACTÉRISATION DE LA VOIE cGAS-STING DANS LA LIGNÉE MÉGACARYOCYTE-PLAQUETTE EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET INFECTIEUSES

THÈSE PRÉSENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
KARIMA LANDELOUCI

Août 2026

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (DOCTORAT)

Direction de recherche :

Geneviève Pépin	Directrice de recherche

Jury d'évaluation

Geneviève Pépin	Directrice de recherche
Marc Germain	Président du jury
Carlos Reyes-Moreno	Évaluateur interne
Luc Boudreau	Évaluateur externe

Je dédie cette thèse à ma fille et à mon mari,
ainsi qu'à mes parents et à toute ma famille.

REMERCIEMENTS

Cette aventure a pris vie à l'autre bout du monde, où l'intérêt pour le domaine de la recherche et la curiosité scientifique se sont croisés avec une union et un nouveau départ dans un nouveau pays. Je réalise que ce qui n'était qu'un projet à la fin de mon Master en Algérie, est aujourd'hui devenu réalité. Une famille algérienne et récemment canadienne unie, un mari formidable et un papa présent, une fille rayonnante et moi, une maman aimante et une chercheuse persévérante qui participe à l'avancement des connaissances scientifiques. Vu sous cet angle, cela semble magique, mais les défis étaient bien présents et sans le soutien de plusieurs personnes, la réalisation et la concrétisation de cette thèse n'auraient pas été possibles.

Avant toute chose, je tiens à remercier au plus profond de mon cœur ma directrice de recherche, Geneviève Pépin. Il serait difficile de dresser une liste exhaustive, mais je souhaite principalement t'exprimer ma gratitude pour ta compréhension, ta patience, ton soutien, ta disponibilité, ta bienveillance et ton encadrement riche et formateur. Merci d'avoir cru en moi, d'avoir mis à ma disposition les outils nécessaires pour que je puisse réaliser ce travail. Tes idées sont exceptionnelles, et ta manière de m'orienter m'a appris à développer un raisonnement scientifique rigoureux pour interpréter mes résultats avec objectivité, plutôt que d'y voir ce que je souhaitais.

Ensuite, je tiens à remercier les membres du jury : Dr Marc Germain, Dr Carlos Reyes-Moreno et Dr Luc Boudreau d'avoir accepté d'évaluer ma thèse. Merci pour votre temps, votre engagement et pour le partage de votre expertise qui contribuera à enrichir ce travail.

Merci à mes collègues de laboratoires, Firas El-Mortada, Félix-Antoine Aubé, William Boucher et Laurence Arsenault pour leur soutien, leur aide, leur collaboration et les échanges tout au long de ce travail. Un remerciement particulier à Amel Bidias pour son aide précieuse à l'animalerie. Je souhaite également remercier Mickael Dupont pour sa contribution et son travail assidu durant son stage.

Merci à mon amie Nihad Khiat pour son écoute attentive, son soutien, son encouragement envers une maman dépassée et pour ses mots qui ont fait la différence : *ce n'est pas difficile, c'est plutôt challengeant et tu vas réussir !* Merci à Sara, Anjali et Priya pour votre aide et pour ces liens que nous avons créés. Merci à Natacha et mélodie pour le temps qu'elles m'ont accordées, tant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon professeur Farid Cherbal de l'USTHB d'Alger. Merci de n'avoir jamais cessé de prendre de mes nouvelles et de m'avoir soutenu tout au long de mon parcours au Canada. Ça me rendait toujours le sourire dès que je rerecevais dans mes courriels « Best wishes from Algiers ».

À ma fille Aya, qui a grandi au rythme de la cellule MÉGA et des plaquettes, merci pour ta joie et ta bonne humeur. Tu es ma plus grande source de motivation.

À mon cher époux Walid, merci pour ton soutien indéfectible, pour ta patience infinie et pour m'avoir portée dans les moments où je touchais le fond. Merci pour tous les sacrifices que tu as faits pour m'aider à me relever, retrouver la santé et d'aller jusqu'au bout de ce Fameux DOCOTRAT.

Un immense merci à mes chers parents pour les valeurs que vous m'avez transmises, pour avoir cru en moi et soutenu dans ce qui n'était qu'un rêve. Merci d'avoir toujours pris le temps de comprendre sur quoi je travaillais et pour la joie que vous avez partagée à chacune de mes réussites. Je tiens également à remercier mes sœurs Imène, Kenza et Meriem, mes confidentes et mes piliers d'avoir toujours été présentes dans les moments de doutes comme dans les réussites. Merci à ma nièce Neila et mes neveux Mohamed, Amine et Racim de patienter jusqu'à ce que je termine mon doctorat pour que je puisse venir vous rendre visite en Algérie.

Je remercie également mes beaux-parents pour leur soutien, leur bienveillance, leurs précieux conseils et leurs encouragements tout au long de cette aventure, car sans leur accueil avec tant de générosité, ce parcours n'aurait jamais vu le jour.

Des remerciements chaleureux à tonton Mohamed, l'oncle de mon mari et sa femme Tata Fatiha, pour leur accueil dès notre arrivée au Canada, pour leur aide précieuse dans toutes les démarches et pour leur présence dans les moments les plus éprouvants où tout me semblait s'écrouler. Sans vous, je n'aurais pas pu me relever et mener à terme cette thèse.

Merci à Asmae El Abbas, l'éducatrice de ma fille pour m'avoir rassurée quant à l'intégration de ma fille et son bien-être, ce qui m'a facilité de poursuivre mon doctorat et travailler l'esprit serein. Par la même occasion, je tiens à remercier mon amie Nesrine Tair qui m'a offert son épaule lorsque je déposais ma fille à la garderie, toutes les deux en pleurs, pour reprendre ma thèse.

Merci à toute personne qui a participé d'une manière ou d'une autre pour me permettre de m'engager dans la carrière dont je rêvais.

RÉSUMÉ

Les plaquettes, produites par les mégacaryocytes (MK), jouent un rôle central non seulement dans l'hémostase, mais aussi dans la réponse immunitaire. Elles contribuent notamment à la thrombo-inflammation, un processus pathologique où inflammation et thrombose s'auto-entretiennent, menant à des lésions tissulaires lors d'infections sévères, dont l'infection par le virus de l'influenza A (IAV). Cette réponse est amplifiée par l'augmentation de protéines spécifiques dans les plaquettes. En effet, certaines protéines modulent l'activité des plaquettes, notamment la protéine antivirale IFITM3 (*Interferon-induced transmembrane protein 3)*. Durant les infections, l'augmentation d'IFITM3 amplifie l'activation des plaquettes et promeut la thrombo-inflammation.

Des données émergentes suggèrent que le stimulateur des gènes de l'interféron STING (*Stimulator of Interferon Genes*), composant central de la voie de détection d'ADN cytosolique cGAS-STING, amplifie la coagulation. Cette voie, largement décrite dans la majorité des cellules immunitaires, demeure toutefois non caractérisée dans la lignée mégacaryocyte-plaquette. Par ailleurs, des évidences ont montré que les plaquettes s'activent en réponse à l'ADN. Ces données nous ont amené à investiguer la présence et la fonctionnalité de cette voie dans les mégacaryocytes et les plaquettes en conditions physiologiques ainsi que sa modulation en conditions infectieuses.

De manière intéressante, nous rapportons pour la première fois l'expression fonctionnelle de cGAS (*Cyclic GMP-AMP synthase*) et STING dans l'axe mégacaryocyte-plaquette. Au sein des mégacaryocytes, la signalisation cGAS-STING opère de manière canonique pour induire la production d'interféron (IFN). En revanche, dans les plaquettes, nous avons découvert une fonction non canonique de cGAS et STING dans l'activation plaquettaire.

À l'aide d'un modèle murin d'infection IAV sévère, nous avons étudié la modulation de STING dans l'axe mégacaryocyte-plaquette. Nous montrons que la régulation de STING dans les plaquettes est biphasique, caractérisée par une augmentation précoce suivie d'un retour à des niveaux basaux plus tardifs. Sur le plan fonctionnel, cette augmentation initiale sensibilise les plaquettes à l'activation par le cGAMP (*cGMP-AMP*), le ligand endogène de STING. Nous démontrons que cette hausse résulte d'un transfert dirigé de STING depuis les mégacaryocytes, un mécanisme renforcé par l'IFN. À un stade plus tardif de l'infection, nous observons un retour de STING à des niveaux basaux dans les plaquettes, médié par l'interleukine-1β (IL-1β) via l'instauration d'un mécanisme de régulation négative dans les mégacaryocytes.

Ensemble, ces résultats soutiennent un modèle dans lequel la signalisation IFN dirige STING vers les plaquettes, tandis que l'IL-1β permet de rétablir l'homéostasie plaquettaire en fin d'infection. Ainsi, nous montrons que la présence de STING dans les plaquettes est modulée par la réponse des mégacaryocytes à leur environnement et contribue à leur hyperactivité. Des études futures détermineront si cette régulation est conservée dans d'autres contextes infectieux, tels que le sepsis bactérien, où une production d'IFN a également été rapportée. Ce travail met en lumière un nouveau niveau de complexité dans les mécanismes sous-jacents à la thrombo-inflammation durant les infections.

Mots clés : Mégacaryocyte, Plaquettes, Thrombo-inflammation, STING, Interféron, Infection, Influenza, Interleukine.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS v
RÉSUMÉ vii
TABLE DES MATIÈRES ix
LISTE DES FIGURES xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES xiv
CHAPITRE I 1
INTRODUCTION 1
1. Les plaquettes : de l'hémostase à l'immunité : 1
1.1. Organisation structurelle des plaquettes : 1
1.2. Rôle des plaquettes dans l'hémostase : 3
1.3. Les plaquettes comme cellules immunitaires : 7
1.3.1. Les plaquettes sécrètent des médiateurs inflammatoires : 8
1.3.2. Les plaquettes interagissent avec les cellules immunitaires : 9
1.3.3. Les plaquettes détectent des pathogènes : 11
2. La voie cGAS-STING : une voie clé de l'immunité innée : 13
2.1. Découverte de la voie cGAS-STING : 13
2.2. Signalisation moléculaire de cGAS-STING : 14
2.3. Régulation négative de la voie cGAS-STING : 17
2.4. Rôle de STING dans l'autophagie : 18
2.5. La voie cGAS-STING contribue à la coagulation : 20
3. Les plaquettes dans la thrombo-inflammation : 20
3.1. Concept de la thrombo-inflammation et conséquences : 21
3.2. Les interactions plaquettes-cellules amplifient la thrombo-inflammation : 23
3.3. L'infection au virus de l'influenza A (IAV) comme modèle thrombo-inflammatoire : 24
3.4. Modulation moléculaire et plaquettes hyperactives : 25
4. Le mégacaryocyte est à l'origine du contenu plaquettaire : 26
4.1. Hématopoïèse : 26

4.2. Mégacaryopoïèse : 28
4.2.1. Signalisation TPO-c-Mpl : 31
4.2.2. Maturation et polyploïdisation du MK par endomitose : 33
4.2.3. Maturation du MK par expansion cytoplasmique : 35
4.3. La thrombopoïèse : 37
5. Le mégacaryocyte en contexte inflammatoire et les conséquences sur la réponse plaquettaire : 40
5.1. Mégacaryopoïèse d'urgence : 40
5.2. Modulation du contenu des plaquettes par le MK en contexte inflammatoire : 44
6. Questions de recherche, hypothèses et objectifs : 46
CHAPITRE II 48
Megakaryocytes possess a functional STING pathway that is transferred to platelets to potentiate activation 48
Abstract 49
Summary blurb 50
Introduction 50
Results 52
STING stimulation of megakaryocytes induces a type-I Interferon response 52
STING stimulation induces ISGs in megakaryocytes 55
Dynamic localisation of cGAS during megakaryocyte maturation 56
STING drives a tonic activation of ISGs during megakaryocyte maturation .. 58
cGAS is detected in platelets and produces cGAMP 60
cGAS activation of washed platelets potentiates their activation 62
cGAS and STING stimulation potentiates human platelets aggregation. 62
Discussion 64
Materials and Methods 68
Acknowledgments 73
Conflict of interest 74
References 75
Supplementary Figures 81

CHAPITRE III 84
Dynamic regulation of STING in megakaryocytes shapes platelet responses to cGAMP during Influenza infection 84
Abstract 85
Introduction 86
Materials and Methods 88
IFN drives STING redistribution to platelets-forming regions in megakaryocytes 93
Influenza infection modulates STING protein level in platelets 94
Elevated STING level in platelets correlates with enhanced sensitivity to cGAMP 98
STING expression levels are modulated in bone marrow megakaryocytes during IAV infection 100
PI4KA inhibition in differentiated megakaryocytes impairs STING trafficking to proplatelets, whereas PIP5K1C downregulation may favor STING trafficking during IAV infection 102
IL1-β downregulates STING in megakaryocytes 104
Discussion 106
Statistical analysis 109
Acknowledgements 109
Conflict of interest statement 109
CHAPITRE IV 115
DISCUSSION ET CONCLUSION 115
1. Expression et fonctionnalité de STING dans les mégacaryocytes et les plaquettes : 116
2. La signalisation via STING contribue à l'activation plaquettaire : 118
3. Régulation dynamique de STING par redistribution indépendante de la transcription : 121
4. L'impact de la modulation de STING sur la sensibilité des plaquettes au cGAMP dans différents contextes pathologiques : 124
5. Mécanismes régulateurs de STING dans le stade tardif de l'infection IAV : 125
6. Modèle proposé de la modulation de STING durant l'infection : 127

7. Limitations : 128
8. Perspectives et directions futures 129
RÉFÉRENCES 131
ANNEXE 151
Type-I Interferon signaling in Fanconi Anemia 151

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure plaquettaire..... 2
Figure 2 : Principaux récepteurs plaquettaires et leurs ligands..... 3
Figure 3 : Adhésion et agrégation plaquettaire. 4
Figure 4 : Les phases de la coagulation. 6
Figure 5 : Les plaquettes sont des cellules immunitaires. 11
Figure 6 : La voie de détection d'ADN cytosolique cGAS-STING. 16
Figure 7 : La signalisation STING est liée à l'autophagie..... 19
Figure 8 : Thrombo-inflammation et rôle important des plaquettes. 22
Figure 9 : Les étapes de l'hématopoïèse. 27
Figure 10 : Vue d'ensemble de la mégacaryopoïèse. 28
Figure 11 : le modèle canonique et les nouvelles trajectoires de la mégacaryopoïèse. 30
Figure 12 : Signalisation thrombopoïétine-c-Mpl. 32
Figure 13 : Schéma comparatif d'une mitose classique avec l'endomitose des MK. 34
Figure 14 : Modèle de formation et de l'expansion du DMS. 36
Figure 15 : Modèles de thrombopoïèse. 38
Figure 16 : Production des plaquettes en contexte physiologique, inflammatoire et infectieux : Modèle d'Emma Lefrançais. 43
Figure 17 : L'adaptation du transcriptome et du protéome des MK en réponse aux stimuli est transmise aux plaquettes nouvellement produites..... 44
Figure 18 : Modèle proposé de la modulation de STING par l'IFNα et l'IL-1β durant l'infection IAV. 128

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviations	Définition
ACBD3	Acyl-coA Binding Domain Containing 3
ADNdb	Acide désoxyribonucléique double brin
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADP	Adénosine diphosphate
ARMH3	Armadillo-Like Helical domain-containing protein 3
CD41	Cluster de différenciation 41, intégrine αIIb, ITGA2B
cGAMP	Cyclic GMP-AMP
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
C-Mpl	Récepteur de la thrombopoïétine
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CXCL4	C-X-C motif ligand 4, appelé aussi PF4 (Platelet Factor 4)
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DMS	Demarcation membrane system »
dsRNA	Double strand Ribonucleic Acid, ARN double brin

GATA-1	GATA-binding protein 1
GFP	Green Fluorescence Protein
GMP	Granulocyte/Monocyte Progenitor
GP	Glycoprotéine
IAV	Infection par le virus de l’influenza A
IFITM3	Interferon-induced transmembrane protein 3
IFN I	Interféron de type I
IL	Interleukine
IMS	Invaginated membrane system
IRF3	Interferon regulatory factor 3
ISG	Interferon Stimulated Genes
KO	Knock out
LAMP1	Lysosomal Associated Membrane Protein
LPS	Lipopolysaccharide
LT-CSH	Long term-CSH
MEP	Megakaryocyte/Erythroid Progenitor
MK	Mégacaryocyte
MKP	Megakaryocyte Precursor
MPP	Multipotent progenitors

NETs	Neutrophil Extracellular traps, pièges extracellulaires des neutrophiles composés de filaments d'ADN et de protéines
NFE2	Nuclear factor, Erythroid 2
NFκB	Sous-unité 1 du facteur nucléaire kappa B
NK	Natural Killer
ODN	Oligodésoxynucleotides
OSBP	Oxysterol-binding protein
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns, motifs moléculaires associés aux pathogènes
PI4K2A	Phosphatidylinositol 4-phosphate 4-kinase 2A
PI4KB	Phosphatidylinositol 4-phosphate 4-kinase B
PI4P	Phosphatidyl-inositol-4-phosphate
PRR	Pattern recognition receptors
PS	Phosphatidylsérine
P-sélectine	Platelet Selectine, appelée aussi CD62P
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand 1
RAB22A	Ras related protein 22A
Rab7	Ras related protein 7
RE	Réticulum endoplasmique
RIG I	Retinoic Acid-inducible Gene I
ROS	Reactive Oxygen species

RUNX1	Runt-related transcription factor 1
Sac-1	Phosphatidylinositol phosphatase
SL-MKP	Stem like-MKP
ssRNA	Single strand Ribonucleic Acid, ARN simple brin
ST-CSH	Short term-CSH
STIM1	Stromal Interaction Molecule 1
STING	Stimulator of Interferon Genes
TBK1	TANK-binding kinase 1
TF	Tissue Factor, Facteur tissulaire
TLR	Toll-Like receptors
TPO	Thrombopoïétine
VWF	Facteur de Von Willebrand
WIPI2	WD repeat domain phosphoinositide-interacting
WT	Wild type

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. Les plaquettes : de l'hémostase à l'immunité :

Les plaquettes sont à l'interface entre coagulation et immunité. Elles circulent dans le sang avec une durée de vie limitée. Chez l'humain, la concentration normale des plaquettes se situe dans un intervalle de 140.0–418.6 × 10^9/l avec une durée de vie moyenne allant de 7 à 10 jours en circulation[1, 2]. Chez la souris, le compte des plaquettes est en moyenne entre 1000-1500 x 10^9/l avec une durée de vie plus courte de 3 à 4 jours[3-5]. Les plaquettes sont produites par les mégacaryocytes (MK) qui se développent dans la moelle osseuse par le mécanisme de la mégacaryopoïèse médullaire régulée par la thrombopoïétine (TPO), une hormone hépatique clé et la thrombopoïèse[6]. Bien que principalement médullaire, il convient de préciser que la thrombopoïèse peut se produire dans des sites extra-médullaires, notamment les poumons, le sang et la rate même en conditions homéostasiques[7-9]. Avant d'aller plus en détail dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse, je vais en premier lieu décrire les plaquettes, leur fonction dans l'hémostase et élargir sur leur rôle immunitaire puisque ce dernier constitue l'axe principal de ma thèse.

1.1. Organisation structurelle des plaquettes :

Longtemps décrites comme de simples acteurs de l'hémostase, les plaquettes possèdent une organisation fonctionnelle remarquable qui soutient leurs fonctions biologiques (Fig.1). Morphologiquement, les plaquettes ont une taille qui varie entre 2-3 um avec une membrane plasmique délimitée, riche en récepteurs tels que différents complexes glycoprotéiques et des phospholipides, notamment le complexe GPIIb/IIIa (αIIbβ3 ou CD41/CD61) essentiel à l'adhésion et l'agrégation des plaquettes (Fig.1-2)[10, 11]. Leur cytoplasme est riche en

différents organites et granules comme des mitochondries, des peroxysomes, des granules α, des granules denses et des lysosomes remplis de médiateurs bioactifs dont leur libération suit l'activation de la plaquette[10, 12]. Elles détiennent également un cytosquelette principalement formé d'actine et de tubuline bien dynamique qui leur permet de changer de forme rapidement et de réarranger leurs récepteurs membranaires suite à l'activation pour former des pseudopodes, adhérer et s'agréger entre elles[10, 12-14]. Bien que dépourvues de noyau, les plaquettes conservent des ARN (Acide ribonucléique) et une machinerie traductionnelle fonctionnelle qui leur permet d'adapter leur contenu protéique[15, 16]. Une telle composition leur confère une capacité de réponse modulable et suggère un rôle dépassant la coagulation.

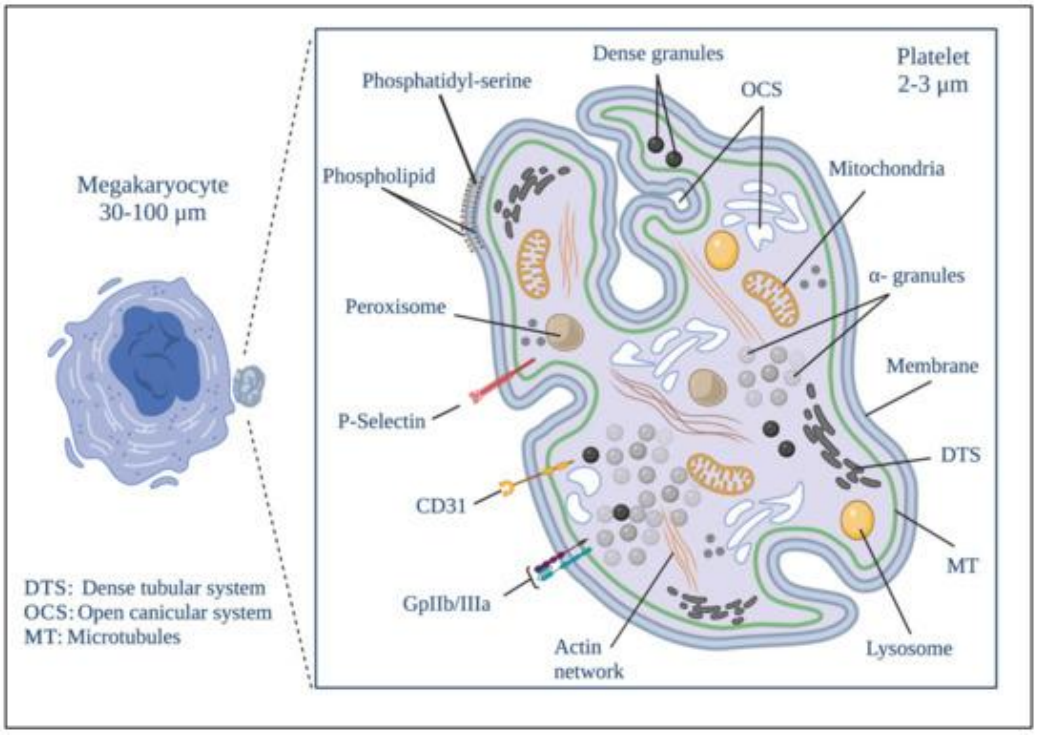


Figure 1 : Structure plaquettaire.

Membrane plasmique délimité riche en phospholipides. OCS (open canicular system) représente les invaginations membranaires forment le système caniculaire ouvert. DTS (dense tubular system) représente le réseau de canaux fermés du réticulum endoplasmique résiduel. Cytosquelette à base d'actine (Actin network). MT (microtubules). Organites (peroxisome, granules α, granules denses, mitochondries, lysosomes). Récepteurs membranaires (P-selectin/CD62P, GPIIb/IIIa/ CD41/CD61, CD31), tiré de [10].

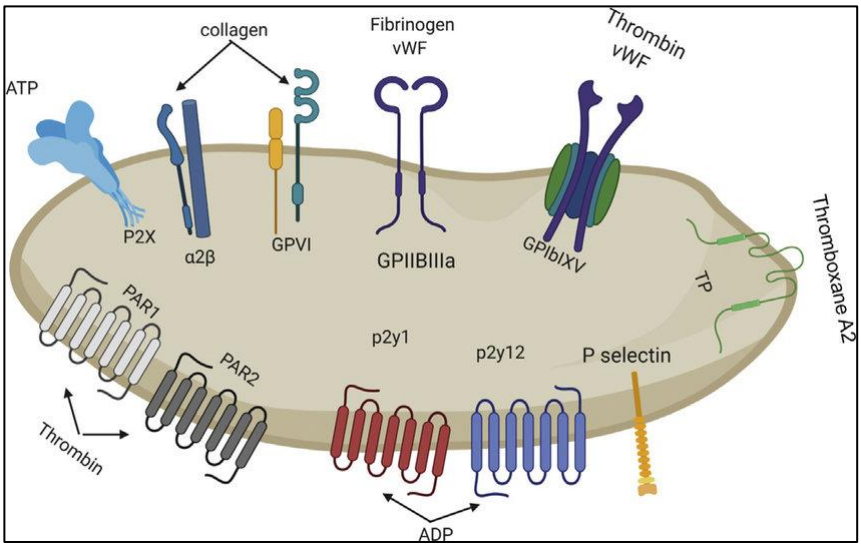


Figure 2 : Principaux récepteurs plaquettaires et leurs ligands.

Les récepteurs p2y1 et p2y2 sont activés par l'ADP (adénosine diphosphate) et participent à l'agrégation plaquettaire. Les récepteurs α2b et GPVI reconnaissent le collagène et sont essentiels à l'adhésion et à l'activation plaquettaire. GPIIb/IIIa (CD41/CD61) permet l'agrégation des plaquettes entre elles à travers sa liaison au fibrinogène. Le facteur VWF (Von Willebrand Factor) facilite l'adhésion des plaquettes à l'endothélium lésé et stimule leur activation et le déclenchement de la cascade de coagulation. Figure tirée de [11].

1.2. Rôle des plaquettes dans l'hémostase :

Au-delà de leur structure, les plaquettes sont des effecteurs clés de l'hémostase : un mécanisme majeur déclenché à la suite d'une lésion vasculaire afin de limiter les pertes sanguines et restaurer l'intégrité vasculaire. De façon générale, les plaquettes assurent cette fonction en participant à certaines étapes de la cascade de coagulation selon un modèle qui décrit trois phases successives : l'initiation – l'amplification et la propagation[17, 18].

La phase d'initiation débute au site de la lésion vasculaire et permet l'exposition des facteurs responsables de l'adhésion des plaquettes (Fig.3)[19] et le début de la cascade de coagulation (Fig.4)[18]. Dans cette phase, les dommages tissulaires et endothéliaux induisent l'exposition de la matrice sous endothéliale rendant accessible les fibres de collagènes et le facteur de von Willebrand (VWF) (Fig.3)[20]. Parallèlement, les cellules sous-endothéliales exposent le facteur

tissulaire (TF : facteur III) afin d'initier la cascade de coagulation (Fig.4)[20]. Les plaquettes circulantes adhèrent à la lésion à travers la liaison du complexe GPIb-IX-V au facteur VWF exposé facilitant ainsi l'interaction du GPVI (Glycoprotéine VI) plaquettaire avec le collagène pour initier l'activation des plaquettes traduite par un changement de forme et une dégranulation (sécrétion des granules : libération de l'ADP (Adénosine diphosphate), du thromboxane A2 (TxA2), du fibrinogène et du facteur V nécessaires à la cascade de coagulation[20]. Les plaquettes finissent par s'agréger entre elles par la liaison du fibrinogène au GPIIb/IIIa menant à la formation du caillot plaquettaire initial (Fig.3)[20].

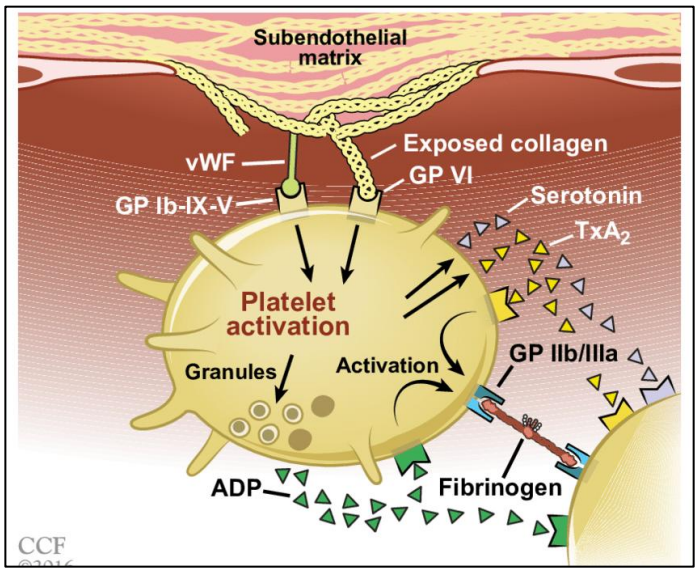


Figure 3 : Adhésion et agrégation plaquettaire.

L'exposition de la matrice sous-endothéliale entraîne l'agrégation des plaquettes à la paroi vasculaire via l'interaction du complexe GPIb-IX-V avec le facteur VWF exposé. Cette adhésion est renforcée par la liaison du GPIV au collagène exposé ce qui entraine l'activation de la plaquette par dégranulation : sécrétion de la sérotonine, le thromboxane A2 (TxA2) et l'ADP. Ces médiateurs agissent sur les plaquettes circulantes et favorisent leur agrégation via le complexe GPIIb/IIIa et le fibrinogène entraînant la formation du caillot plaquettaire initial. Figure tirée de [19].

Ces plaquettes activées affichent à leur surface les phosphatidylsérines (PS) chargés négativement qui sont nécessaires à l'amplification de la coagulation dans le but de générer la thrombine active et mener à la formation d'un caillot stable définitif reflétant l'hémostase secondaire[18, 20-22].

Enfin, dans la phase de propagation, la thrombine active transforme le fibrinogène circulant, libéré par les plaquettes activées en fibrines et participe à la formation de liaisons covalentes entre les polymères de fibrines incorporés dans l'agrégat plaquettaire (Fig.4)[18]. Ce réseau de fibrines stabilise le caillot sanguin et constitue un thrombus secondaire définitif qui sera résorbé par fibrinolyse, un processus qui survient simultanément avec la réparation tissulaire[23].

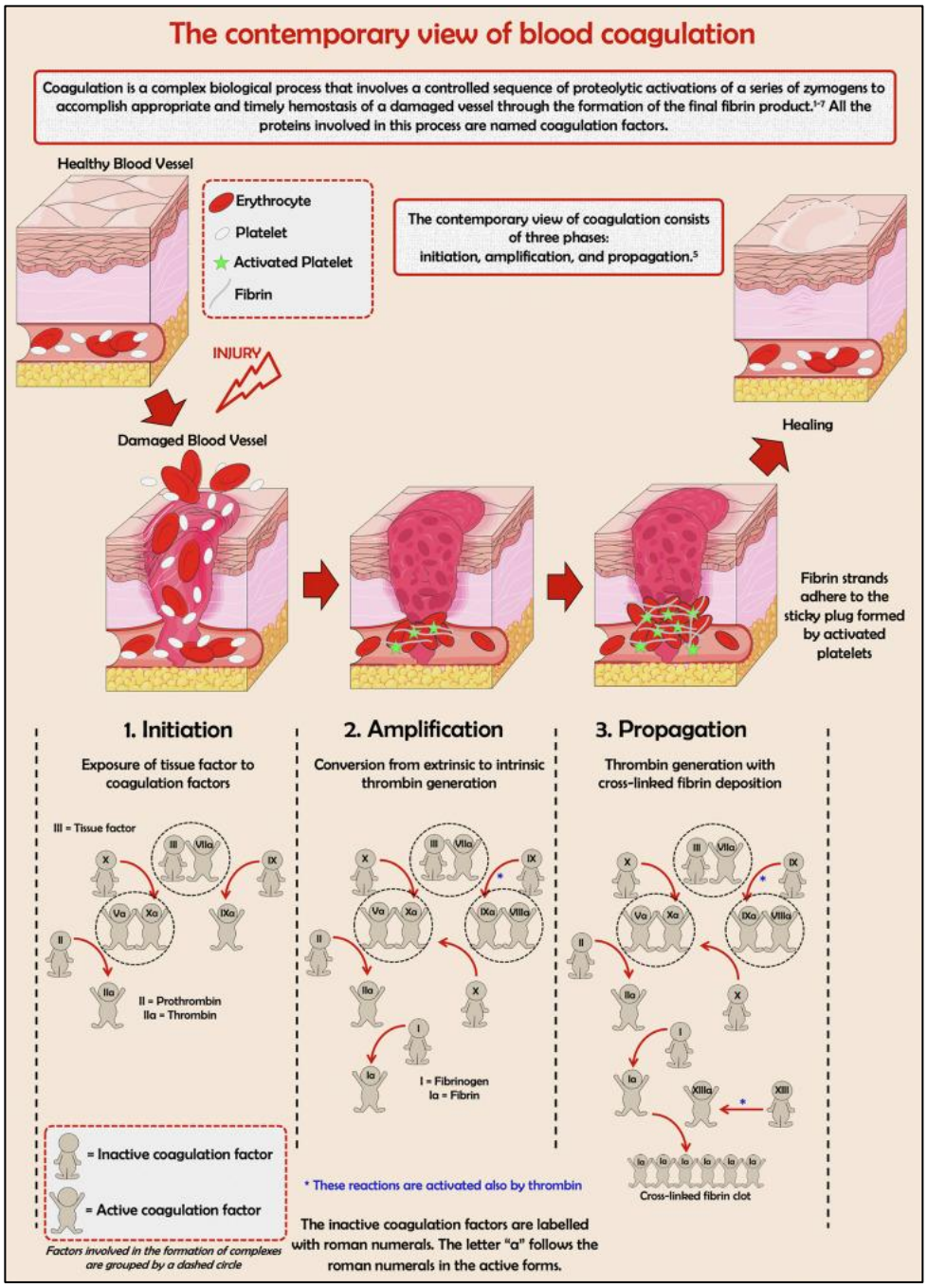


Figure 4 : Les phases de la coagulation.

L'activation des facteurs de coagulation est désignée par un a à la fin de leur identifiant. Par exemple : le facteur II qui représente la prothrombine s'écrit facteur IIa dans sa forme active de thrombine. Il existe trois phases de coagulation : l'initiation – l'amplification et la propagation et deux voies de coagulation : voie extrinsèque et voie intrinsèque qui mènent à l'activation du facteur X responsable de l'activation de la thrombine (facteur IIa). La phase d'initiation débute avec l'exposition du facteur tissulaire (TF ou facteur III) par les cellules endothéliales et active la

voie de coagulation extrinsèque, dans laquelle le TF interagit avec le facteur VII en présence de Ca2+ et forme le complexe III-VIIa qui convertie le facteur X en Xa. Ainsi, le facteur Xa interagit avec le facteur Va pour activer la thrombine (IIa). Dans la phase de propagation, la voie extrinsèque est convertie vers la voie intrinsèque dont l'activation dépend des charges négatives des phosphatidylsérines fournies par les plaquettes activées et du collagène exposé par l'endothélium. La thrombine active générée par la voie extrinsèque active le facteur IXa et favorise sont interaction avec le facteur VIIIa qui protéolyse le facteur Xa. D'autres facteurs non présentés dans la figure participent également à la formation du complexe IXa-VIIIa qui active le facteur Xa. Ainsi le complexe Xa-Va amplifie la formation de thrombine active qui clive le fibrinogène circulant (facteur I) en fibrine insoluble (facteur Ia). Dans la phase de propagation, la thrombine active catalyse la réaction protéolytique du XIII en XIIIa responsable de la formation de liaisons covalentes entre les polymères de fibrines incorporés dans l'agrégat plaquettaire. Ce réseau de fibrines stabilise le caillot sanguin et constitue un thrombus secondaire définitif qui sera résorbé par fibrinolyse, un processus qui survient simultanément avec la réparation tissulaire impliquant l'activation de facteurs anticoagulants. Figure tirée de [18].

1.3. Les plaquettes comme cellules immunitaires :

Outre leur rôle dans l'hémostase, l'activation des plaquettes est également accompagnée de la libération de médiateurs capables de moduler la réponse inflammatoire. D'ailleurs, dans les dernières années, l'implication des plaquettes dans la réponse immunitaire et inflammatoire a pris de l'ampleur et suscite un intérêt croissant dans la communauté scientifique. Les plaquettes participent à l'immunité et à l'inflammation à travers différents mécanismes incluant **(1)** le stockage de médiateurs inflammatoires et des molécules d'adhésion dans leurs granules, **(2)** la détection des pathogènes via l'expression des TLR (*Toll-Like receptors*) et d'autres PRR (*Pattern recognition receptors*) et enfin **(3)** par leur capacité d'interaction avec les cellules immunitaires[24].

Comme les plaquettes sont à la fois impliquées dans la coagulation et dans l'immunité, elles interviennent de manière coordonnée dans un processus physiologique qu'on appelle immuno-thrombose, dans lequel le système de coagulation et immunitaire opèrent conjointement pour éliminer les pathogènes[25]. En présence de pathogènes ou de stimuli inflammatoires, les plaquettes subissent une activation pour exercer leur fonction simultanément dans l'activation de la cascade de coagulation et dans le recrutement des cellules immunitaires[26-29]. Cependant, bien que l'activation des plaquettes soit bénéfique

pour la défense de l'hôte, une activation excessive en raison d'une dérégulation des systèmes de coagulation et immunitaire mènent au processus pathologique de la thrombo-inflammation[30], observée dans plusieurs pathologies, notamment les infections virales, sur lequel je reviendrai plus tard.

1.3.1. Les plaquettes sécrètent des médiateurs inflammatoires :

Suite à leur activation, les plaquettes sécrètent différentes cytokines et chimiokines CXCL1 (C-X-C motif ligand 1), PF4 (*Platelet factor 4* ou CXCL4), CXCL5, CXCL7, (IL-8 Interleukine-8 ou CXCL8), CXCL12, macrophage inflammatory protein- (MIP-) 1 α (CCL3), et CCL5 afin de réguler les fonctions immunitaires : migration des leucocytes, phagocytoses et génération des ROS (*Reactive Oxygen Species*)[27]. Par exemple, le CCL5 plaquettaire permet le recrutement des monocytes vers l'endothélium inflammé[31]. Le CXCL4, très abondant dans les plaquettes, est décrit comme une chimiokine immunomodulatrice vitale et indispensable à la protection des souris contre l'infection au virus de l'influenza A à travers son action dans le développement de lésions pulmonaires et la mobilisation des neutrophiles vers le poumon inflammé mettant en évidence le rôle important des plaquettes lors des infections[32].

Les plaquettes activées peuvent également libérer des médiateurs lipidiques inflammatoires comme le thromboxane A2 [33]. La libération du thromboxane A2 par les plaquettes est suivie par sa liaison à son récepteur thromboxane (TP) qui est couplé à une protéine G[34]. Cette liaison se traduit par l'activation de la protéine G et de la phospholipase C et la génération de l'inositol phosphate 3 (IP3) et du diacyl glycérol (DAG) à partir du phosphatidyl-inositol-phosphate 2 (PIP2)[33-35]. IP3 se lie alors à son récepteur IP3R (inositol-phosphate 3 receptor) sur le système tubulaire dense des plaquettes afin d'initier la libération intracellulaire du calcium menant à l'activation des scramblases et l'externalisation des phosphatidylsérines (PS) à la surface des plaquettes

activées[34, 36]. De plus, l'augmentation intracellulaire du calcium favorise l'activation des calpaïnes (*Calpains*) et la déstabilisation du cytosquelette entraînant le remodelage de la membrane plasmique et la libération de microvésicules pro-coagulants exposant les PS décrites comme médiatrices de l'inflammation[22, 37].

Remarquablement, une découverte majeure sur la contribution des plaquettes dans la médiation des réponses inflammatoires a été révélé, dans laquelle il a été démontré que les plaquettes libèrent leurs mitochondries dans le sang[38]. En raison de la théorie endosymbiotique, ces mitochondries plaquettaires libres deviennent la cible de la phospholipase A2 IIA dans le sang qui hydrolyse les phospholipides de la membrane mitochondriale, ce qui induit la libération de médiateurs inflammatoires notamment l'acide arachidonique (AA) et un lysophospholipide qui déstabilise la bicouche lipidique et perméabilise les mitochondries favorisant la fuite de l'ADNmt (Acide désoxyribonucléique mitochondrial) connu pour être lui aussi hautement inflammatoire[38]. De plus, ces mitochondries interagissent avec les neutrophiles *in vivo*, induisant leur activation et adhésion à la paroi endothéliale[38]. Ensemble, ces études illustrent les différentes stratégies par lesquelles les plaquettes sont des inductrices de l'inflammation.

1.3.2. Les plaquettes interagissent avec les cellules immunitaires :

Dans différents contextes infectieux, l'activation des plaquettes favorisent leur interaction avec d'autres cellules immunitaires, notamment les neutrophiles et les monocytes via des molécules d'adhésion plaquettaires et leurs récepteurs correspondants (Fig.5)[24, 39]. Parmi ces molécules, les plus étudiées sont la P-sélectine (*Platelet selectine* ou CD62P) sur les plaquettes et la PSGL-1 *(P-selectin glycoprotein ligand 1)* sur les neutrophiles et les monocytes[24, 39, 40]. Au repos, la P-Sélectine, une protéine transmembranaire est tournée vers le lumen

des granules plaquettaires. Dès lors que la plaquette est activée, une dégranulation plaquettaire favorise la translocation et l'exposition de la P-sélectine vers la membrane plasmique[41]. D'autres modes d'interaction existent impliquant d'autres molécules tel que GPIb-CD18/CD11b et CD40L (*CD40 Ligand*) -CD40 (Fig.5)[24, 42].

Ces interactions résultent en une activation bidirectionnelle qui se traduit par la libération des cytokines et chimiokines et la régulation à la hausse des récepteurs d'adhésion pour stabiliser cette communication intercellulaire. De plus, cette liaison facilite le recrutement accéléré des neutrophiles au site d'infection, notamment vers les tissus pulmonaires tel qu'observé lors de l'infection à l'influenza[42], leur survie et le renforcement de leurs fonctions antimicrobiennes, comme la phagocytose et la formation des ROS. Enfin, l'activation des neutrophiles à travers son interaction avec les plaquettes induit également la formation et la libération des NETs (*Neutrophil Extracellular traps* : pièges extracellulaires des neutrophiles composés de filaments d'ADN et de protéines) qui servent à piéger les pathogènes et limiter leur dissémination dans l'organisme[42]. Les conséquences de ces interactions s'avèrent bénéfiques pour la défense de l'hôte, bien qu'elles puissent devenir délétères et contribuer à la pathologie en cas de dysrégulation[30].

Il convient de noter que les microvésicules libérées par les plaquettes activées interagissent également avec les monocytes et qui résultent en la modulation de leurs profils de cytokines et de médiateurs lipidiques mais aussi avec les neutrophiles pour les capturer, les activer et promouvoir leur interaction avec l'endothélium potentialisant les réponses inflammatoires après un dommage tissulaire[43, 44].

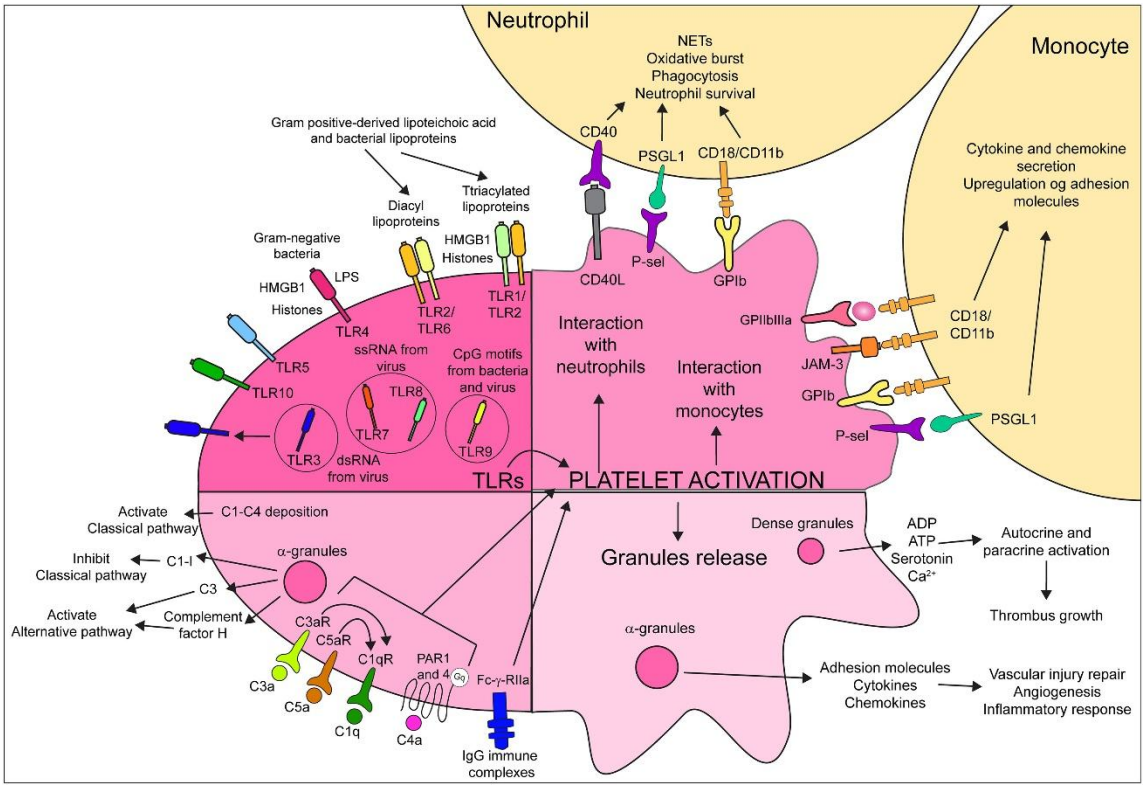


Figure 5 : Les plaquettes sont des cellules immunitaires.

Les plaquettes expriment des récepteurs de l'immunité pour détecter les pathogènes. Cette détection déclenche l'activation des plaquettes par dégranulation et entraîne la libération de médiateurs inflammatoires et les interactions plaquettes-neutrophiles et plaquettes-monocytes. Figure tirée de [24].

1.3.3. Les plaquettes détectent des pathogènes :

Au-delà de la sécrétion des médiateurs inflammatoires et de l'interaction avec les cellules immunitaires, les plaquettes assurent la détection d'agents pathogènes via l'expression de récepteurs immunitaires PRR capables de reconnaitre des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP : *Pathogen-associated molecular patterns*). Les plaquettes humaines expriment également le récepteur FcyRIIa, contrairement à ce qui est observé chez la souris[27]. Ce dernier détecte la portion Fc des immunoglobulines G (IgG) préalablement lié aux bactéries, contribuant entre autres, à la protection contre les infections[45]. Via ce

récepteur, les plaquettes humaines internalisent le virus influenza et déclenchent une réponse inflammatoire[46].

Par ailleurs, les plaquettes expriment une large gamme de TLR (TLR1 à 9), un sous type de PRR, impliqué dans la reconnaissance des différents composants des pathogènes incluant l'ADN et l'ARN microbiens. Grâce au TLR3 et au TLR7, les plaquettes peuvent détecter l'ARN double brin (dsRNA) et l'ARN simple brin (ssRNA) viral, respectivement[24, 47]. Particulièrement, après internalisation du virus de l'influenza, le TLR7 reconnait l'ARN simple brin du virus de l'influenza et initie l'activation des plaquettes, modulant ainsi les réponses immunitaires, notamment par l'activation des neutrophiles et la formation des NETs[48].

Quant au TLR9, responsable de la détection d'ADN, semble se situer dans un nouveau compartiment distinct des granules α[49]. La stimulation de l'activation des plaquettes par des agonistes puissants comme la thrombine ou le collagène IV induit la redistribution du TLR9 à la surface. Ce dernier, étant impliqué dans la reconnaissance des oligodésoxynucleotides (ODNs : acide nucléique à motif CpG non méthylé, caractéristique de l'ADN viral/bactérien/mitochondrial) augmente la translocation membranaire de la P-sélectine/CD62P et favorise une agrégation plaquettaire très rapide en présence d'ODNs[49]. Cependant, les plaquettes de souris TLR9-déficientes capturent environ 50% moins d'ODNs et affichent une réduction de la P-sélectine comparativement aux plaquettes de souris TLR9 WT (Wild type)[49]. Bien que cette réduction soit significative, le pourcentage d'expression de la P-sélectine à la surface des plaquettes demeure important. De plus, la formation rapide d'agrégats plaquettaires persiste chez les souris TLR9-déficientes et est comparable aux souris WT suite à l'exposition aux ODNs[49]. Ces résultats suggèrent l'existence d'un autre récepteur capable de reconnaitre les motifs CpG dans les plaquettes. Un travail plus récent a également observé que l'ADN relâché par les cellules nécrotiques induit l'activation des

plaquettes démontrée par une forte expression de la P-sélectine/CD62P à la surface et la libération de la PF4[50]. Cependant, le récepteur à l'origine de cette activation n'a pas été caractérisé.

À l'issue des données émergentes sur le rôle des plaquettes dans l'immunité innée et de l'observation d'une réponse plaquettaire maintenue à l'ADN en condition de TLR9-KO (*Knock out*), l'existence de mécanismes alternatifs de détection d'ADN dans les plaquettes s'avère très plausible. Parmi ces mécanismes, la voie de l'immunité innée cGAS-STING, responsable de la détection d'ADN cytosolique, constitue alors un candidat potentiel, et qui sera développée dans la prochaine section.

2. La voie cGAS-STING : une voie clé de l'immunité innée :

La voie cGAS-STING, une composante importante du système immunitaire innée, assure la protection de l'hôte contre les agents pathogènes externes et les dommages internes causées aux cellules. Dans cette partie, j'expose la signalisation canonique de cGAS et STING et les autres rôles en lien directe avec le sujet de ma thèse, notamment la coagulation.

2.1. Découverte de la voie cGAS-STING :

La découverte de la protéine STING est antérieure à celle de cGAS. En 2008, deux équipes décrivent STING, protéine résidente du RE (réticulum endoplasmique), comme médiatrice cruciale de l'IFN (Interféron) lors des infections virales[51, 52]. Ce n'est qu'en fin 2012 que le fil en amont de STING est reconstitué grâce à la découverte de cGAS par l'équipe du chercheur « Zhijian J. Chen ». Ce fut une fin d'année mémorable avec la parution de deux publications majeures dans le journal « Science » révélant la découverte de cGAS, un senseur d'ADN cytosolique capable de synthétiser un messager endogène, cGAMP (*Cyclic GMP-AMP*), reconnu par STING pour activer la voie d'IFN-I (IFN de type I)[53, 54]. Cependant, les ligands de STING connus étaient tous

d'origine bactérienne ou virale (3'3'-cGAMP – di-cGAMP). Et voilà qu'en 2013, la Dre Andrea Ablasser réalise une avancée majeure en démontrant que l'enzyme cGAS synthétise le messager 2'3'-cGAMP, qui active STING humain et murin à la suite de la détection d'ADNdb (ADN double brin) cytosolique[55]. En effet, lors d'un stress cellulaire et d'une instabilité génétique, l'ADN génomique et mitochondrial sont relâchés dans le cytosol et servent de ligands à cGAS afin d'induire la production d'IFN et de mobiliser les cellules immunitaires pour la clairance des cellules endommagées[56-58]. Ces études démontrent le rôle de cette voie dans divers mécanismes de défense de l'hôte.

2.2. Signalisation moléculaire de cGAS-STING :

L'activation de cette voie débute par la reconnaissance de l'ADN cytosolique d'origine exogène (ADN viral ou bactérien) ou endogène (ADN génomique ou mitochondrial dérivé du soi) par cGAS, ce qui induit sa dimérisation et l'activation de sa fonction catalytique de production de cGAMP (Fig.6)[59-62]. cGAMP se lie alors à STING et induit un changement de conformation facilitant sa translocation du RE vers l'appareil de Golgi afin de générer des dimères actifs de STING (Fig.6)[54, 55].

Un ancrage stable de STING au Golgi est nécessaire pour son activation et dépend fortement de la composition lipidique des membranes du Golgi[63]. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré une activation dépendante des phosphoinositides, particulièrement le phosphatidyl-inositol-4-phosphate (PI4P)[63-67]. Au niveau moléculaire, à la suite de la translocation déclenchée par le cGAMP, les protéines ACBD3 (*Acyl-coA Binding Domain Containing 3*) et ARMH3 (*Armadillo-Like Helical domain-containing protein 3*) recrutent et stabilisent la PI4KB (*Phosphatidylinositol 4-phosphate 4-kinase B)*, une enzyme qui enrichit le Golgi en PI4P, ce qui facilite l'ancrage de STING dans ce dernier[63, 64]. De plus, il a été démontré que l'inhibition de la protéine de transfert lipidique OSBP (*Oxysterol-binding protein*), responsable de l'échange du cholestérol entre

le RE et le Golgi par consommation de PI4P amplifie l'activation de STING en raison d'un enrichissement important des PI4P au niveau du Golgi[63]. Fait intéressant, la perturbation de la composition lipidique inhibe l'activation de STING, tandis qu'une élévation anormale des niveaux des PI4P cellulaires entraîne une activation de STING indépendante de cGAS[64, 66]. Ensemble, ces études soulignent que le trafic de STING dépend d'une organisation lipidique spécifique, modulée par des protéines de trafic intracellulaire.

Une fois stabilisé au Golgi, STING interagit avec la kinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) pour induire sa phosphorylation, une modification post-traductionnelle indispensable au recrutement et à l'activation par phosphorylation du facteur de transcription IRF3 (*Interferon regulatory factor 3)* (Fig.6)[52]. À l'état actif, IRF3 transloque au noyau pour stimuler les gènes de l'IFN de type I (Fig.6)[52]. L'activation de STING mène également au recrutement des kinases IKK qui phosphorylent l'inhibiteur IκB de NFκB (Sous-unité 1 du facteur nucléaire kappa B) (Fig.6)[68]. Cette phosphorylation marque l'inhibiteur IκB pour la dégradation par le protéasome libérant ainsi le facteur de transcription NFkB, qui peut alors transloquer dans le noyau pour induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Fig.6)[68]. L'IFN produit peut agir de façon autocrine ou paracrine pour stimuler les ISG (*Interferon Stimulated Genes*) mais aussi pour induire les gènes impliqués dans le rétrocontrôle négatif afin d'éteindre la signalisation (Fig.6)[58].

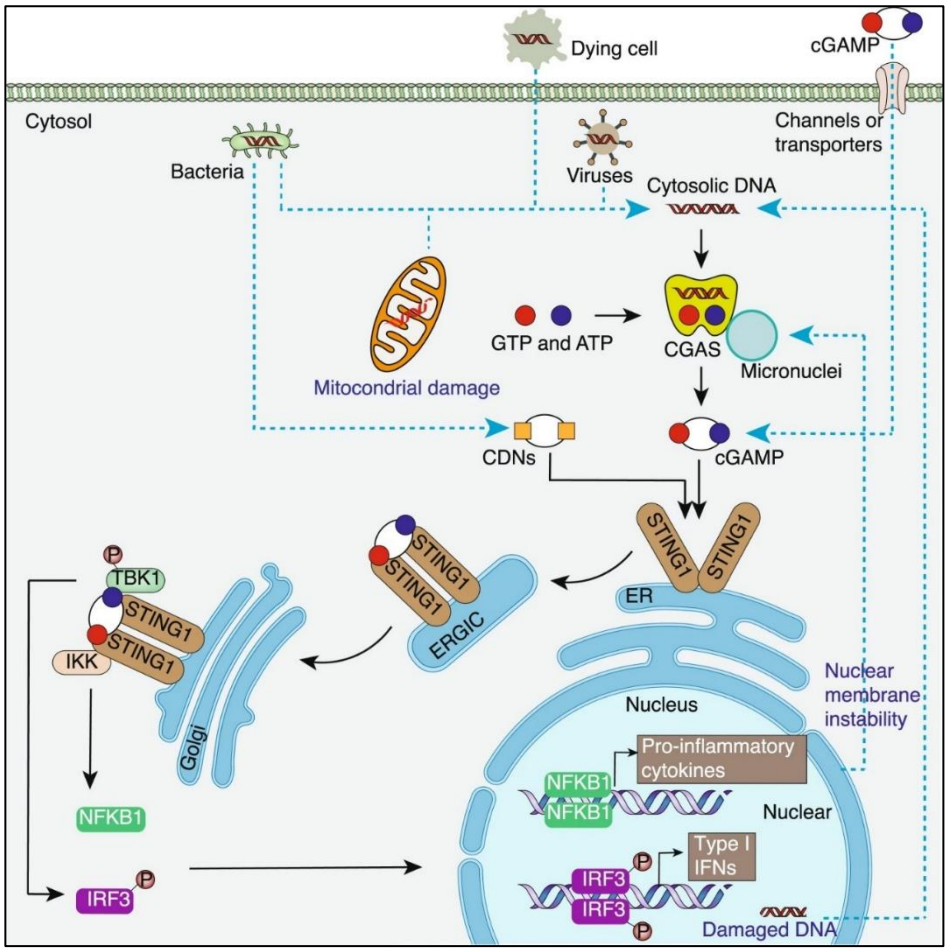


Figure 6 : La voie de détection d'ADN cytosolique cGAS-STING.

cGAS, un capteur d'ADN cytosolique, déclenche de fortes réponses immunitaires innées à la suite de la détection d'ADN viral, ADN bactérien, ADN des cellules nécrotiques, ADN mitochondrial et l'ADN génomique. Il induit la production de 2'3' cGAMP qui se lie à STING et l'active. STING activé par cGAMP intracellulaire et extracellulaire quitte la membrane du réticulum endoplasmique et migre vers l'appareil de Golgi via le complexe ERGIG, induisant la production d'IFN I par l'activation de la voie TBK1-IRF3. STING active également l'expression des cytokines inflammatoires dépendantes de NFκB. CDNs cytosolic cyclic dinucleotides, cGAMP cyclic GMP-AMP, CGAS cyclic GMP-AMP synthase, ER endoplasmic reticulum, ERGIC endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment, IFN interferon, IKK IκB kinase, IRF3 interferon regulatory factor 3, NFKB1 nuclear factor kappa B subunit 1, STING1 stimulator of interferon response cGAMP interactor 1, TBK1 TANK binding kinase 1. Figure tirée de [69].

2.3. Régulation négative de la voie cGAS-STING :

Afin d'éviter une activation inappropriée de cette voie, les cellules ont développé des mécanismes que j'aborde brièvement dans ce paragraphe. Il a été rapporté que la présence de DNases qui dégradent l'ADN dans le cytoplasme (DNase III = Trex1), dans les lysosomes (DNase II) et dans le sérum (DNase I) représente un des mécanismes indispensables pour prévenir les maladies inflammatoires dépendantes de STING[70, 71]. De plus, la séquestration de cGAS au niveau de la membrane plasmique, via sa partie N-terminale, empêche une activation aberrante par l'ADN du soi[72], normalement neutralisé en amont par la dégradation cytosolique médiée par Trex1. Lors de la mitose, la rupture de l'enveloppe nucléaire expose l'ADN génomique à cGAS. La liaison de ce dernier aux histones et aux nucléosomes ainsi que son hyperphosphorylation illustrent d'autres manières de désensibiliser cGAS en abolissant sa capacité à catalyser la production de cGAMP[58, 73-75].

Concernant STING, il est connu que ce dernier est retenu au niveau du RE par STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) pour restreindre son activation[76]. De plus, le mouvement continu de STING via le transport antérograde et rétrograde par COP I et COP II constitue un autre niveau de régulation de son activation permettant son retour vers le RE ou son trafic vers le lysosome pour sa dégradation[77]. Enfin, la déphosphorylation par PPM1A (*protein phosphatase magnesium dependent 1 A)* dissocie le dimère de STING empêchant son action et par PTPN1/2 (*Tyrosine protein phosphatase non-receptor types 1 and 2*), conjointement avec son ubiquitination, participent au contrôle de sa signalisation en le redirigeant vers le protéasome[78].

2.4. Rôle de STING dans l'autophagie :

Outre sa fonction médiatrice d'IFN, STING participe également à l'induction d'autophagie de façon dépendante et indépendante de la lipidation de LC3[79]. La lipidation de LC3 signifie l'ajout d'un lipide à la protéine LC3 (LC3-I en LC3-II lipidé), facilitant son ancrage à la membrane des autophagosomes ce qui est nécessaire à la formation d'autophagosomes fonctionnels[80]. Ainsi, LC3 permet le recrutement des cargos ciblés pour dégradation[80]. La lipidation de LC3 repose sur le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 qui est recruté par WIPI2 *(WD repeat domain phosphoinositide-interacting*)[79, 80]. Le rôle de STING dans l'autophagie dépendante de LC3 survient en présence de cGAMP. Il est décrit que STING transloque via des vésicules COP II pour atteindre le ERGIC. À ce stade, STING interagit avec WIPI2 et permet le recrutement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 qui permet la lipidation LC3 et la formation d'autophagosomes à double membrane dont le rôle physiologique est de dégrader l'ADN cytosolique suite à la fusion avec les lysosomes[81]. Ainsi, l'induction de l'autophagie par STING permettrait d'éviter une activation excessive de la voie canonique cGAS-STING.

Il convient de noter que STING n'est pas dégradé par cette voie, mais par micro-autophagie impliquant des vésicules à clathrine dépendantes d'AP1 (Associated protein 1) provenant du Golgi qui empruntent la voie endosomale pour être tirer par la suite par la machinerie ESCRT afin de diriger les vésicules contenant STING versles lysosomes LAMP1 (*Lysosomal Associated Membrane Protein*) (Fig.7). STING peut également être dégradé par macroautophagie suite à son ubiquitination et sa reconnaissance par P62 qui recrute LC3. Ceci induit la formation d'autophagosomes qui seront dirigés vers les lysosomes pour induire la dégradation de STING[79, 82-84].

STING peut également être internalisé dans des autophagosomes indépendamment de la lipidation de LC3 via des vésicules périnucléaires à membrane unique dépendant de RAB22A (*Ras related protein 22A*) afin de

faciliter son transfert intercellulaire (Fig.7)[85]. RAB22A active la PI4K2A (*phosphatidylinositol 4-phosphate 4-kinase*) qui enrichie la membrane vésiculaire dérivé du RE en PI4P. Ceci facilite le recrutement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 et induit la formation d'un autophagosome contenant STING[85]. L'autophagosome formé fusionne avec des endosomes précoces facilitant la sécrétion des vésicules et le transfert de STING entre les cellules tout en inhibant la fusion lysosomale médiée par RAB7 (*Ras related protein 7*)[79, 85]. Ces études éclairent sur la manière dont STING trafique dans la cellule pour exercer ses fonctions.

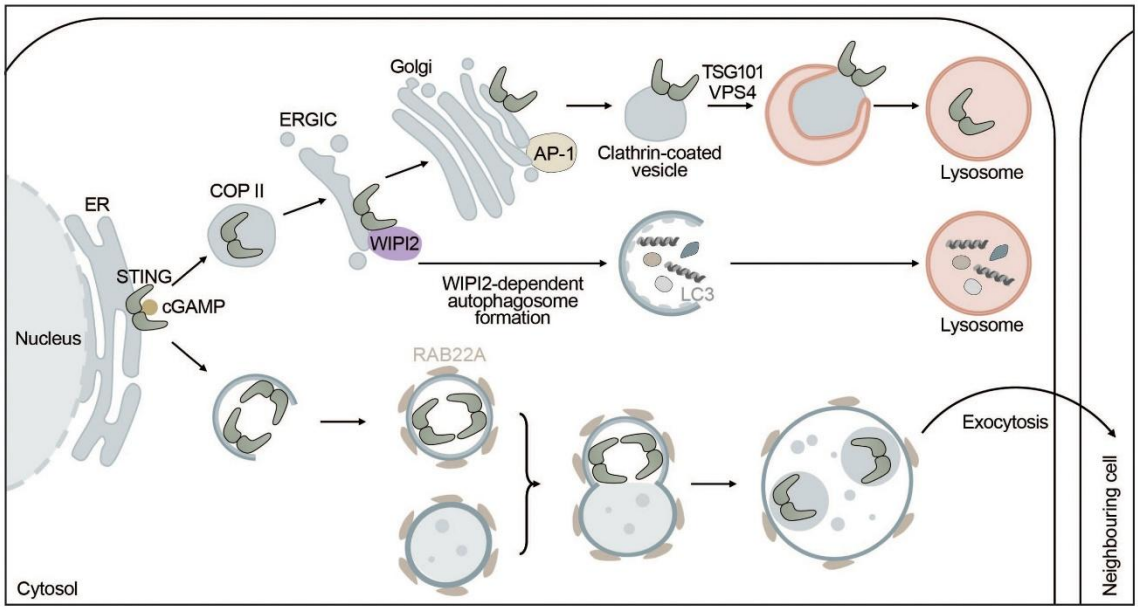


Figure 7 : La signalisation STING est liée à l'autophagie.

STING induit directement la formation d'autophagosomes au niveau du complexe ERGIC via l'interaction avec WIPI2, indépendamment des mécanismes d'autophagie canonique, pour favoriser la dégradation de l'ADN cytosolique. Après activation par cGAMP, STING est transporté entre les cellules voisines à l'intérieur d'autophagosomes non canoniques dépendants de RAB22A qui fusionnent avec des endosomes. La vésicule formée inactive Rab7 et échappe à la dégradation lysosomale pour activer la voie STING dans les tissus environnants. STING est dégradé par micro-autophagie, suite à son encapsulation dans des vésicules de clathrine provenant du Golgi par AP-1 qui seront internalisées dans des lysosomes, ce qui interrompt la signalisation de STING. Figure tirée de [79].

2.5. La voie cGAS-STING contribue à la coagulation :

L'activation de cGAS-STING par l'ADN induit une réponse inflammatoire capable d'activer l'endothélium, ce qui favorise l'expression des molécules pro-coagulantes et mène ainsi à la formation de micro-thromboses[86-88]. En effet, l'ADNmt libéré lors des dommages cellulaires contribue à l'activation de la voie cGAS-STING en engageant la voie inflammatoire de l'inflammasome menant à la sécrétion de l'IL-1, ce qui amplifie l'activation endothéliale et la coagulation[88]. De plus, les NETs constituent également une source majeure d'ADN capable d'activer la voie cGAS-STING dans les cellules endothéliales, d'induire l'expression du facteur tissulaire pour promouvoir la thrombose[86]. Durant les infections bactériennes, STING occupe un rôle essentiel dans la coagulation en induisant la sécrétion du facteur TF dans les macrophages. Au niveau moléculaire, l'activation de STING accroit le niveau de Ca^{2+} cytosolique entrainant le clivage et l'activation de la Gasdermine-D (GSDM D), ce qui déclenche la libération du facteur tissulaire TF, initiateur de la coagulation sanguine[89]. Ensemble, ces études suggèrent que la voie cGAS-STING est un pont entre la détection de l'ADN et l'activation de la coagulation, et que cette voie ne se limite pas à l'immunité antivirale mais participe bien à la régulation des réponses thrombo-inflammatoires. De ce fait, l'investigation de sa présence et fonctionnalité dans les cellules participantes à la coagulation, les plaquettes, s'avère très pertinente.

3. Les plaquettes dans la thrombo-inflammation :

À ce stade, nous avons déjà une vision plus élargie qui met en évidence le rôle des plaquettes à l'interface entre coagulation et immunité qui aboutissent au processus physiologique de l'immuno-thrombose. Dans sa forme physiologique, il s'agit d'un processus de formation de micro-thromboses régulées dans le but d'immobiliser les agents pathogènes ou de marquer les cellules endommagées en vue de leur élimination par les cellules immunitaires[25, 30, 90]. En d'autres

termes, l'immuno-thrombose désigne un mécanisme physiologique de défense de l'immunité innée où l'on retrouve une coopération des plaquettes avec les cellules immunitaires (neutrophiles et monocytes), l'endothélium et les molécules liées à la coagulation pour favoriser la formation de microthrombi localisés. Ces microthrombi vont servir de matrice intravasculaire qui facilite la reconnaissance, le confinement et la destruction des pathogènes, protégeant ainsi l'intégrité de l'hôte sans induire des dommages collatéraux majeurs[91]. Comme les plaquettes font partie de la première ligne de défense en cas de lésions vasculaires ou lors d'une infection, elles initient une réponse localisée qui associe coagulation et immunité afin d'éviter la dissémination des pathogènes. En effet, une régulation fine de l'interaction entre le système de coagulation et la réponse inflammatoire s'avère alors nécessaire pour maintenir l'homéostasie. Bien qu'initialement protecteur, ce processus peut devenir néfaste en cas de dérégulation et est alors qualifié de processus pathologique de la thrombo-inflammation où les plaquettes assurent le même rôle que celui durant l'immunothrombose mais de manière excessive et incontrôlée, ce qui mène à la formation de macrothrombi, à une coagulation intravasculaire disséminée, une défaillance d'organes et éventuellement à la mort[25].

3.1. Concept de la thrombo-inflammation et conséquences :

La thrombo-inflammation est la manifestation d'un dérèglement de l'inflammation et de l'hémostase[25, 30, 90]. D'une part, des réponses inflammatoires excessives peuvent conduire à la formation de thromboses dérégulées[30, 86, 87]. Par exemple, la libération importante des cytokines TNF-α, IL-1β et IL-6 durant le sepsis bactérien et viral favorise la formation de thromboses dérégulées menant à une coagulation intravasculaire disséminée[92, 93]. D'autre part, une activation exacerbée des plaquettes amplifie également la coagulation et la formation de thromboses pathologiques. En effet, il s'agit d'une boucle d'amplification pathologique dans laquelle l'inflammation et l'activation excessive des plaquettes

s'autoalimentent[30]. Celle-ci est observée dans différentes pathologies, notamment les infections virales graves, le sepsis ou encore certaines maladies auto-immunes résultant en différents états pathologiques comme la formation de thromboses dérégulées, une coagulation intravasculaire disséminée (DIC : *Disseminated intravascular coagulation*), des hémorragies vasculaires et une inflammation accrue (Fig.8)[30]. L'ensemble peut s'intensifier mutuellement et aura pour conséquences des dommages tissulaires et des défaillances d'organes mortelles[25, 30].

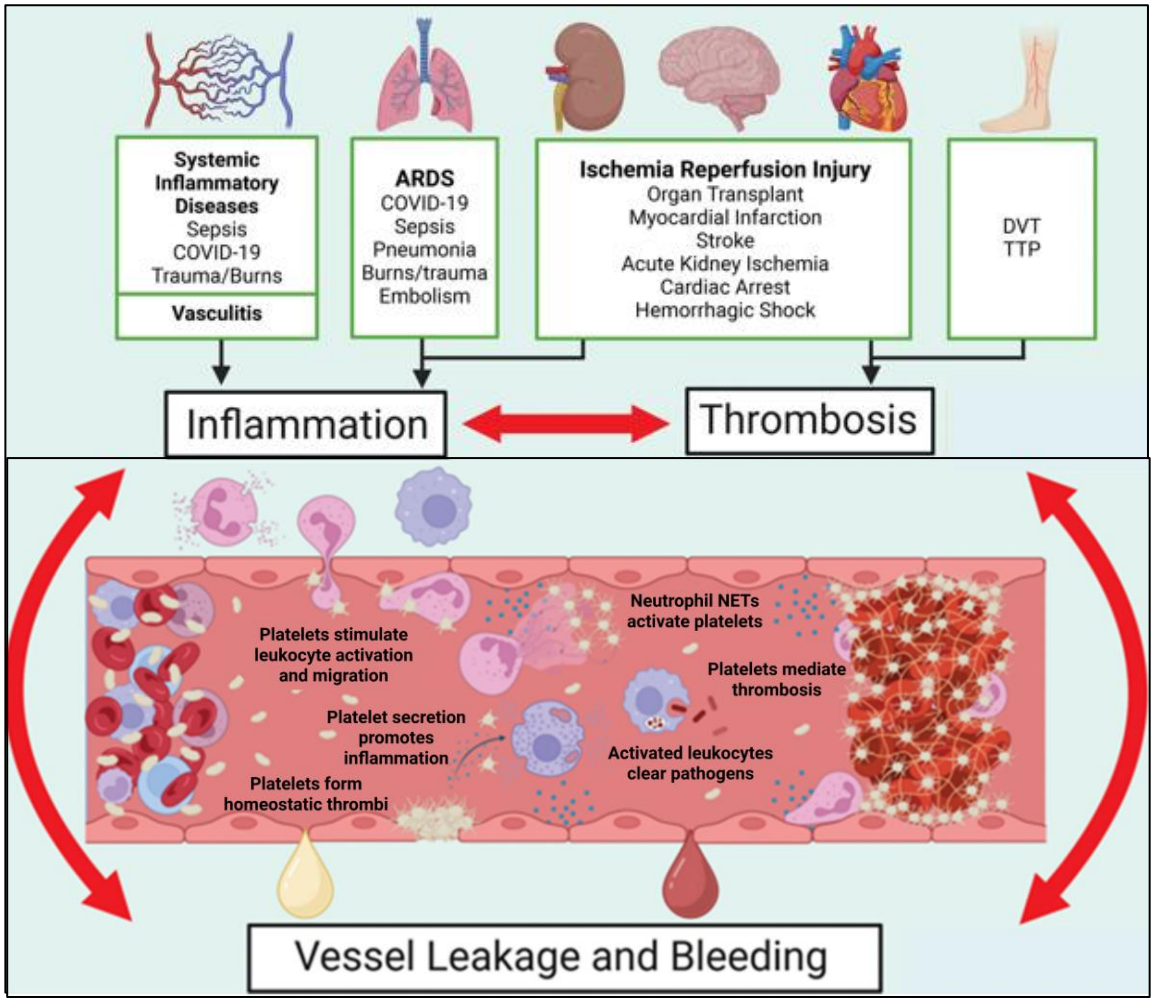


Figure 8 : Thrombo-inflammation et rôle important des plaquettes.

Dans la thrombo-inflammation, une infection ou des lésions tissulaires/cellulaires entraînent la formation de thromboses dérégulées, une inflammation et une hémorragie. Ces états

pathologiques contribuent de manière distincte à un pronostic défavorable et peuvent s'exacerber mutuellement. L'activation des plaquettes joue un rôle central dans la thrombo-inflammation. En effet, les plaquettes assurent un rôle protecteur dans le contrôle des fuites vasculaires et un rôle pathologique dans la thrombose et l'exacerbation de l'inflammation via l'activation des leucocytes, la promotion de l'inflammation et la formation de macro-thromboses. Les NETs générés par l'activation des neutrophiles amplifient l'activation des plaquettes et promeut la thrombo-inflammation. Figure adaptée de [30].

3.2. Les interactions plaquettes-cellules amplifient la thrombo-inflammation :

Comme décrit plus haut, les plaquettes sont des cellules immunitaires qui patrouillent à la recherche de pathogènes ou de lésions vasculaires, et s'activent alors afin de protéger l'organisme. Cette activation est caractérisée par une sécrétion accrue de leurs granules, une expression augmentée des molécules d'adhésion et d'une interaction renforcée avec les cellules immunitaires[29].

L'activation des plaquettes est amplifiée par des boucles de rétroaction impliquant leurs interactions avec les cellules immunitaires, notamment les lymphocytes B et T, les cellules NK « *Natural Killer* », les cellules dendritiques, les monocytes et les neutrophiles pour induire leur recrutement, activation et le relâchement de cytokines pro-inflammatoires[94, 95]. En effet, l'interaction plaquettes-neutrophiles via la P-sélectine-PSGL-1 favorise la redistribution des récepteurs Mac-1 (plaquette) et CXCR2 (neutrophiles), ce qui promeut leur migration et recrutement au niveau de l'endothélium pour initier l'inflammation[39, 96, 97]. Les neutrophiles activés et recrutés libèrent des NETs pour piéger les pathogènes mais induisent aussi des dommages aux cellules endothéliales, ce qui crée davantage de lésions à l'endothélium, activant ce dernier et promouvant ainsi la coagulation et la formation de thromboses[98-100]. De plus, les NETs générés par l'activation des neutrophiles, issue de l'interaction plaquettes-neutrophiles, amplifient à leur tour l'activation plaquettaire et la thrombo-inflammation[99, 101]. Les plaquettes activées interagissent également avec l'endothélium et contribuent alors à l'exposition du facteur tissulaire, créant une boucle d'amplification qui renforce la formation de thromboses[100].

Ce phénomène thrombo-inflammatoire est observé dans plusieurs contextes et est bien illustré dans les infections respiratoires comme la COVID-19 et l'influenza, où une hyperactivation accrue et persistante allant jusqu'à 40 jours a été rapporté[102-104]. Ceci met l'emphase sur l'effet néfaste d'une activation excessive des plaquettes qui conduit à un basculement vers des processus pathologiques.

3.3. L'infection au virus de l'influenza A (IAV) comme modèle thrombo-inflammatoire :

L'infection au virus de l'influenza est une infection respiratoire fréquente qui peut évoluer vers des formes sévères et qui est associée à une réponse inflammatoire importante. En effet, l'infection IAV activent les récepteurs impliqués dans les réponses antivirales comme le TLR7, RIG-I (*Retinoic Acid-inducible Gene I*) et cGAS-STING générant la production de l'IFN et l'induction de plusieurs protéines antivirales, notamment IFITM3 (Interferon-induced transmembrane protein 3)[105-108]. Cette dernière est importante pour la restriction de l'entrée des virus et leur direction vers des compartiments lysosomaux pour dégradation[109-115]. Cependant, bien que la réponse IFN soit bénéfique pour la défense de l'organisme, elle peut basculer rapidement vers un état pathologique en modulant certaines protéines inflammatoires. À titre d'exemple, la protéine IFITM3 est modulée en réponse à l'IFN dans les plaquettes dans différents contextes et contribue à promouvoir leur activation pathologique[116, 117].

Au-delà de cet exemple, un nombre croissant d'études a mis en évidence le rôle important de l'activation forte des plaquettes dans la réponse immuno-thrombotique lors de l'infection IAV. Il a été montré que l'activation, l'agrégation et l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales induisent une inflammation et des lésions pulmonaires, ce qui promeut la pathologie au virus de l'influenza[100, 118]. Récemment, la libération de NETs médiée par l'interaction des plaquettes avec les neutrophiles a été démontré amplifier la coagulopathie, entraînant une

pathologie pulmonaire chez les patients atteints d'une infection grippale sévère[42]. De manière intéressante, l'utilisation d'une thérapie combinée ciblant l'activation plaquettaire et la réplication virale a réduit l'inflammation et protégé les souris contre la pneumonie grippale mortelle[119, 120]. Ces données mettent en avant le rôle pathologique de l'hyperactivation des plaquettes dans la sévérité pathologique et incitent à investiguer plus en détails les régulateurs moléculaires de cette réactivité exacerbée.

3.4. Modulation moléculaire et plaquettes hyperactives :

Certaines protéines sont connues pour réguler l'activité des plaquettes[117, 121]. Les plaquettes acquièrent un nouveau phénotype en raison de la modulation de leur contenu moléculaire en contexte inflammatoire. En effet, en réponse à l'IFN, l'augmentation transcriptionnelle et traductionnelle d'IFITM3 dans les plaquettes régule à la hausse leur activité[117]. Au niveau moléculaire, il est démontré qu'IFITM3 interagit directement avec la clathrine et le récepteur αIIb du fibrinogène, modifiant leur localisation dans les complexes lipidiques des plaquettes[117]. Ceci résulte en l'augmentation d'endocytose du fibrinogène conférant un phénotype hyperactif aux plaquettes qui se traduisait par l'amplification de thrombose[117]. Ces données suggèrent que l'hyperactivité plaquettaire découle d'une modulation protéique relative à une régulation du trafic intracellulaire.

L'interleukine-1β représente un autre exemple de modulation moléculaire qui régule le phénotype des plaquettes en réponse au lipopolysaccharide (LPS)[121]. Sur le plan moléculaire, la liaison du LPS au TLR4 plaquettaire favorise leur activation par la stimulation de l'épissage et de la traduction de l'ARNm pro-IL-1β stocké dans leur cytoplasme. De plus, IL-1β produit par les plaquettes peut agir de manière autocrine pour augmenter l'activation des plaquettes dans une boucle d'amplification favorisant la formation de thrombose[121].

Bien que les plaquettes conservent la capacité à synthétiser certaines protéines comme l'IL-1β et IFITM3 en réponse à un stimuli, celle-ci demeure limitée car elles sont dépourvues de noyau. Ainsi leur contenu moléculaire est en grande partie déterminé en amont, particulièrement par leur cellule mère : le mégacaryocyte. Dans la prochaine section, je vais faire un rappel sur la manière dont les plaquettes sont produites par les MK pour élargir ensuite sur comment ils modulent la fonction des plaquettes dans des contextes inflammatoires.

4. Le mégacaryocyte est à l'origine du contenu plaquettaire :

Les MK sont principalement connus pour leur rôle dans la production des plaquettes. Cependant, les études transcriptomiques ont révélé une hétérogénéité dans les sous-populations de MK présentes dans la moelle osseuse [122-124]. En effet, chaque population affiche des fonctions distinctes incluant la production des plaquettes, le maintien de la niche et la participation aux réponses immunitaires[122, 123, 125]. Ces fonctions reposent sur une longue chaine de maturation et de différenciation, notamment l'hématopoïèse et la mégacaryopoïèse que j'aborde dans ce qui suit.

4.1. Hématopoïèse :

L'hématopoïèse, du grec « Production de sang » est le mécanisme par lequel les cellules du sang sont continuellement renouvelées dans la moelle osseuse tout au long de la vie d'un individu à partir d'une grande réserve de cellules qu'on appelle les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Fig.9)[126, 127]. Brièvement, grâce à la multipotence et la capacité d'auto-renouvellement, les CSH multipotentes (LT-CSH : *Long term-CSH* et ST-CSH : *Short term-CSH*) se différencient en toutes les lignées sanguines myéloïdes et lymphoïdes en passant par les progéniteurs multipotents (MPP : *Multipotent progenitors*) et les progéniteurs oligopotents engagés soit dans la lignée myéloïde (CMP : *Common Myeloid Progenitors*) qui bifurque en MEP (*Megakaryocyte/Erythroid Progenitor*), et en GMP (*Granulocyte/Monocyte Progenitor*)[128, 129] ou; dans la lignée

lymphoïde comme le progéniteur unipotent CLP (Fig.9)(C*ommon Lymphoid Progenitor)*[130, 131]. Ces progéniteurs se différencient en précurseurs unipotents qui génèrent enfin les cellules matures. Parmi ces précurseurs se trouve le **précurseur des mégacaryocytes** MKP (*Megakaryocyte Precursor*) qui génère les plaquettes par mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse que j'élabore dans ce qui suit.

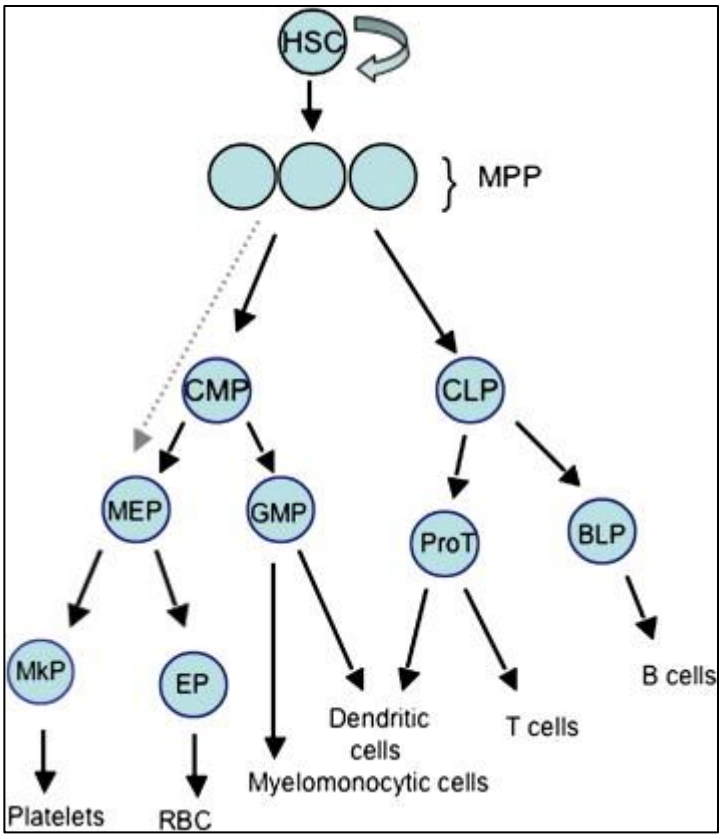


Figure 9 : Les étapes de l'hématopoïèse.

L'hématopoïèse repose sur la différenciation des cellules souches hématopoïétiques à renouvellement à long terme en toutes les cellules sanguines matures par l'intermédiaire des progéniteurs intermédiaires, MPP (multipotent progenitors) à renouvellement limité. Ces MPP se différencient en progéniteurs de lignées CMP (Common myeloid progenitor) et CLP (Common lymphoid progenitor), BLP (B lymphocytes progenitor), ProT (Lymphocytes T progenitor), GMP (Granulocytes/macrophages progenitor), MEP (Megakaryocyte/érythroïde progenitor) MCP (mast cell progenitor), MKP (Megakaryocyte progenitor) and EP (Erythroid progenitor). Figure tirée de [131].

4.2. Mégacaryopoïèse :

On entend par mégacaryopoïèse le processus de différenciation qui mène à la production des MK matures à la suite de la différenciation des CSH[132]. La mégacaryopoïèse est réalisée en 4 étapes : (1) la prolifération, (2) l'endomitose générant le MK polyploïde, (3) la maturation cytoplasmique et enfin (4) la formation de proplaquettes et la fragmentation du MK qui représente la thrombopoïèse (Fig.10)[132].

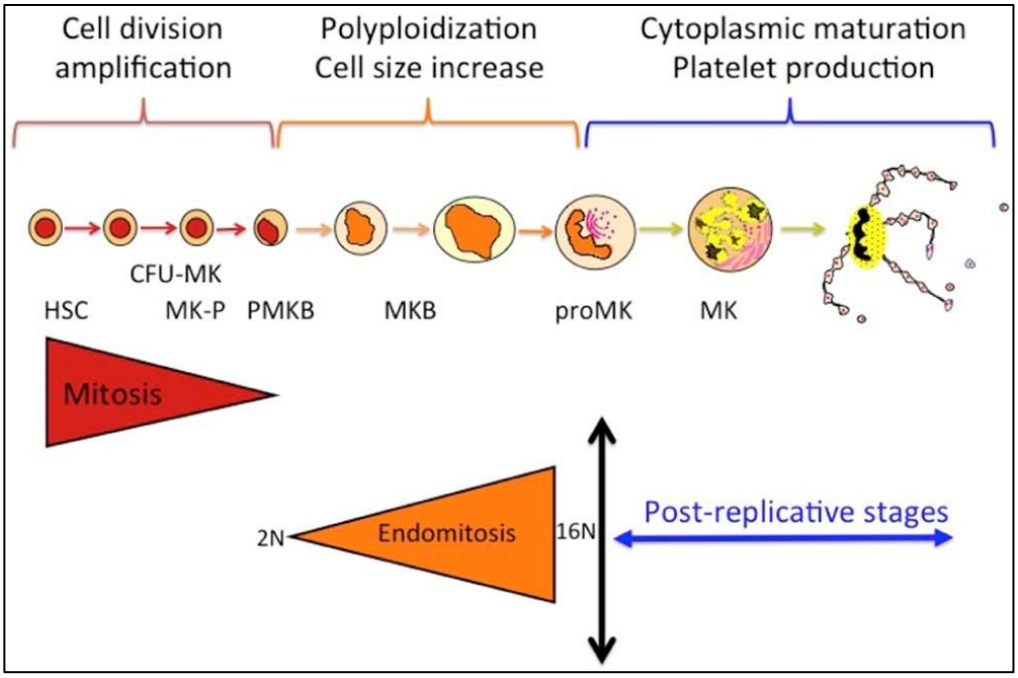


Figure 10 : Vue d'ensemble de la mégacaryopoïèse.

La mégacaryopoïèse se caractérise par 4 étapes : la prolifération aux stades précoces, l'endomitose qui génère le mégacaryocyte polyploïde, la maturation cytoplasmique du mégacaryocyte, et enfin la formation de proplaquettes et la fragmentation des mégacaryocytes. Figure tirée de [132].

Comme évoqué en haut, le modèle classique de la mégacaryopoïèse implique une différenciation à partir des CSH et du MPP. Ce dernier se différencie en progéniteur myéloïde commun CMP, puis en progéniteur de mégacaryocyte et d'érythroïde MEP et enfin en précurseur de mégacaryocyte MKP (Fig.9). À ce stade, le MK subit une maturation marquée par une expansion cytoplasmique

entraînant une augmentation de sa taille par une polyploïdisation dépendante de l'endomitose (Fig.10)[132-134]. Ces notions seront abordées avec davantage de précision dans le volet maturation du MK. Enfin, à maturité, le MK forme des prolongements au niveau des sinusoïdes dans la moelle osseuse pour libérer les plaquettes dans la circulation[132, 134].

Cependant, plusieurs études ont redéfini le dogme de la hiérarchisation hématopoïétique, en particulier l'origine des MK et l'existence de CSH biaisées vers la lignée mégacaryocytaire[135-137]. En effet, des voies de différenciation hâtives existent pour mener à la production des MK afin d'assurer une réponse immédiate au besoin instantané de plaquettes étant donné leur implication en première ligne de défense[133]. Récemment, la population MPP a été mieux caractérisée et semble être subdivisée en plusieurs stades allant du MPP1 au MPP4 où le MPP2 est biaisé vers la lignée myéloïde (MEP) et est le seul capable de repeupler le pool des plaquettes dans un transplant. De plus, il peut produire directement le MKP en omettant le CMP et le MEP constituant ainsi une *voie alternative* de production mégacaryocytaire (Fig.11)[133, 138, 139]. Par ailleurs, plusieurs travaux ont rapporté l'existence d'un pool de CSH biaisé vers la lignée mégacaryocytaire pouvant omettre les progéniteurs intermédiaires incluant le MPP2 et donnant lieu directement au MKP et ce même en condition physiologique par une *voie de différenciation directe* (Fig.11)[133, 139-142]. Particulièrement, ces CSH présentent des signatures moléculaires des MK habituellement acquises lors de la maturation, comme une forte expression du facteur de transcription GATA-1 (*GATA-binding protein 1*), du récepteur c-Mpl (récepteur membranaire de la thrombopoïétine) ainsi que du facteur d'agrégation endothéliale et plaquettaire le facteur de VWF[143]. Une étude ultérieure rapporte que cette population de CSH exprime **le marqueur CD41** qu'on retrouve à la surface des MK et des plaquettes, souvent utilisé pour étudier les MK [133, 143-145]. Plus tard, l'utilisation de souris transgénique VWF-GFP a révélé que 60% des CSH de la moelle osseuse sont VWF-GFP$^+$ suggérant que la majorité des CSH est biaisée

vers la lignée mégacaryocytaire(Fig.11)[140]. De plus, le suivi de la reconstitution dans le sang périphérique a révélé que les CSH-VWF^{+} sont situées en amont des CSH-VWF^{-} suggérant la perte du VWF au cours de la différenciation pour permettre la divergence vers d'autres lignées (Fig.11)[140].

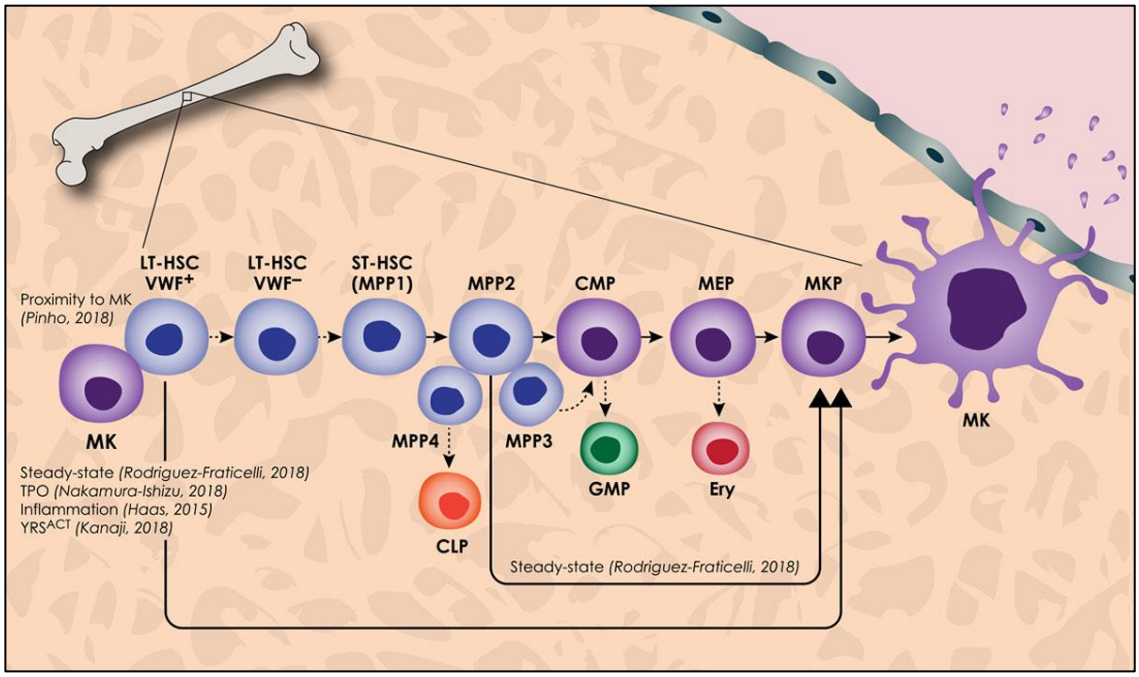


Figure 11 : le modèle canonique et les nouvelles trajectoires de la mégacaryopoïèse.

Le modèle canonique suit une différenciation hiérarchique à partir de LT-CSH en ST-CSH, MPP2, CMP, MEP et MKP. Le MKP subit une maturation impliquant l'augmentation de sa teneur en ADN et de son cytoplasme. Le MK étend ensuite ses proplaquettes dans les sinusoïdes des vaisseaux sanguins pour libérer les plaquettes dans la circulation. D'autres voies de différenciation orientée vers les mégacaryocytes sont mises en évidence, incluant une différenciation de LT-CSH en MEP via le MPP2, de LT-CSH directement en MKP et enfin de MPP2 en MKP. Figure tirée de [133].

4.2.1. Signalisation TPO-c-Mpl :

Le signal principal menant à la différenciation des CSH en MK repose sur la liaison de la thrombopoïétine (TPO) à son récepteur membranaire c-Mpl, ce qui enclenche l'activation des voies de signalisation permettant le développement de MK matures[133, 146-148]. Ceci débute par l'internalisation de ce complexe ainsi que de l'initiation de différentes voies de transduction de signal après la phosphorylation de JAK2 (*Janus kinase 2*)[133, 149, 150]. Cette phosphorylation peut engendrer l'activation de 3 voies : la voie STAT3 *(Signal transducer and activator of transcription*) /STAT5, la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) /ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) et la voie des PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) /AKT (*protein kinase B*) (Fig.12)[133, 151, 152]. Ces voies de signalisation induisent l'activation de facteurs de transcription permettant la régulation de l'expression de gènes spécifiques aux MK comme certains marqueurs de surface qui définissent un MK engagé mature[133]. Par exemple, l'expression de GATA1 (*GATA-binding protein 1*), FOG1 (*Friend of GATA-1*) et FLI1 (*Friend Leukemia integration 1*) enclenche l'expression du CD41, CD42b (*Glycoprotéine Ib alpha chain* : GPIbα) et du GPIX (*Glycoprotein IX)* respectivement (Fig.12)[133]. L'expression d'autres gènes tels que RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*) et NFE2 (*Nuclear factor, Erythroid 2*) est cruciale pour la maturation terminale du MK incluant la polyploïdisation et le développement cytoplasmique important pour la production plaquettaire[133].

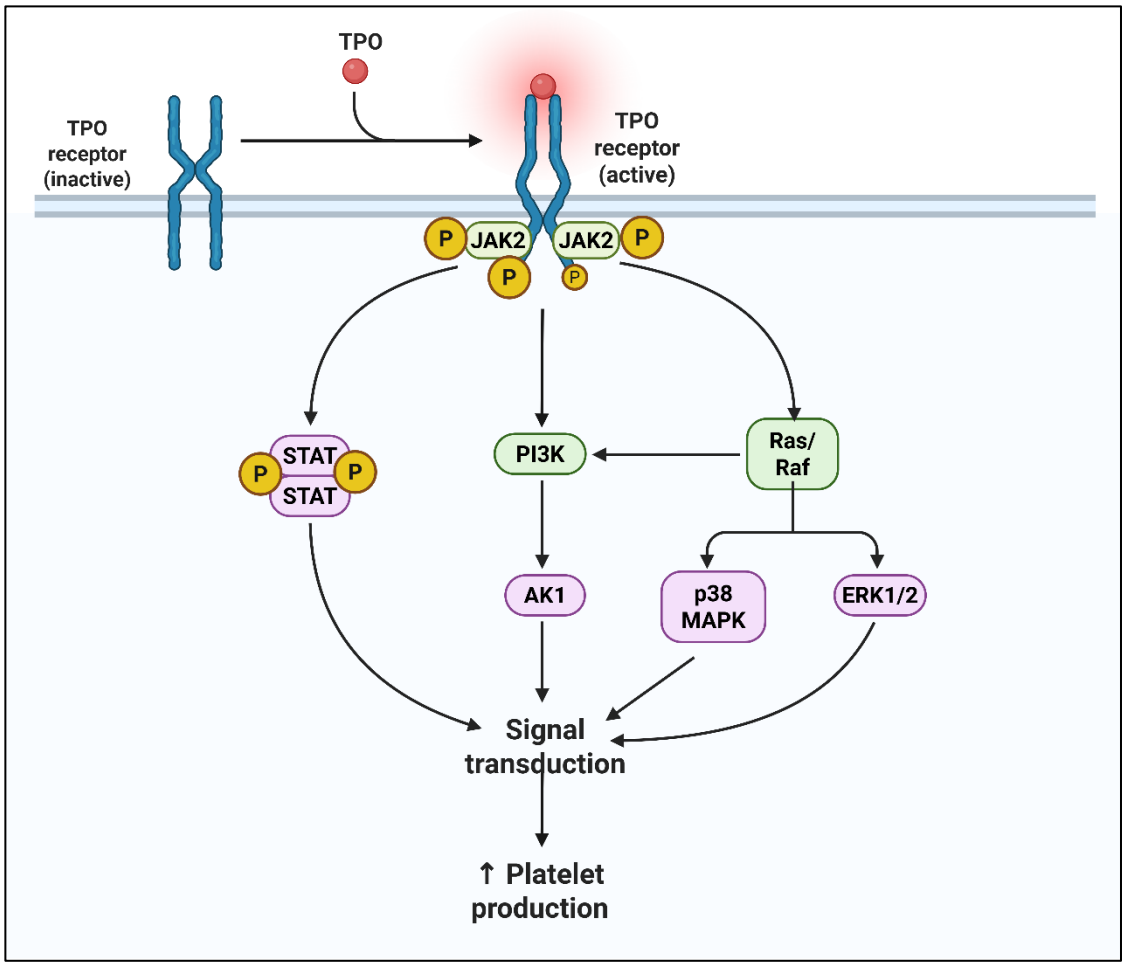


Figure 12 : Signalisation thrombopoïétine-c-Mpl.

La liaison de la thrombopoïétine (TPO) à son récepteur c-Mpl induit l'activation de JAK2 (Janus kinase 2), ce qui enclenche l'activation de 3 voies distinctes : la voie STAT3/5 (Signal transducer and activator of transcription), la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase) /AKT (protein kinase B) et la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) /ERK (Extracellular signal-regulated kinase). L'activation de ces voies induit l'expression des gènes spécifiques à la maturation des MK et favorise ainsi la production des plaquettes. Figure adaptée d'un modèle Biorender.

4.2.2. Maturation et polyploïdisation du MK par endomitose :

Lors de la maturation, le précurseur mégacaryocytaire, ou mégacaryoblaste, réalise l'endomitose qui est définit comme étant plusieurs cycles de réplication d'ADN sans cytokinèse (séparation en deux cellules filles) générant une cellule polyploïde[132]. En premier lieu, le MK entre dans un cycle réplicatif 2n semblable à celui des cellules hématopoïétiques. Ensuite, il enchaîne plusieurs cycles d'endomitose accumulant de nombreuses copies d'ADN de 4n, 8n,16n, 32n, 64n et même jusqu'à 128n dans un noyau polylobé chez l'humain (Fig.13)[132, 134, 153]. Il convient de noter que le MK murin présente un niveau de ploïdie plus faible, généralement autour de 16N[154]. C'est d'ailleurs une caractéristique importante qui nous permet de distinguer le MK des autres cellules.

Dans les cellules conventionnelles, le cycle cellulaire suit trois étapes clés : **l'interphase** (Phase G1 : croissance cellulaire – Phase S : Réplication de l'ADN – Phase G2 : Préparation finale avant la division), **la mitose** (Prophase – Métaphase – Anaphase – Télophase) et **la cytokinèse** (Division du cytoplasme) (Fig.13). Ce cycle est régulé par des protéines qui activent des kinases Cdk (*Cyclin dependent kinase*) qu'on appelle les Cyclines. Lors d'une mitose conventionnelle, la fin de la phase G2 est caractérisée par l'accumulation de la cycline B1 et de son association à la CDK1 (*Cyclin-dependent kinase 1* aussi connu sous le nom de Cdc2) formant le complexe cycline B1-CDK1 qui permet le déclenchement de la condensation des chromosomes, la rupture de l'enveloppe nucléaire, la formation du fuseau et l'anaphase[134]. Une activation forte et transitoire de ce complexe est primordiale pour une mitose complète avec ségrégation chromosomique et cytokinèse (cytocinèse). En revanche, des études ont rapporté que la polyploïdisation du MK est liée à un défaut de régulation du cycle cellulaire. Plus précisément, le MK présente une forte dégradation de la cycline B et une importante réduction de l'activité de CDK1 suggérant que la cellule n'atteint pas le niveau de CDK1 nécessaire pour conduire une mitose

complète favorisant une sortie de mitose précoce sans anaphase et cytokinèse[134, 155, 156].

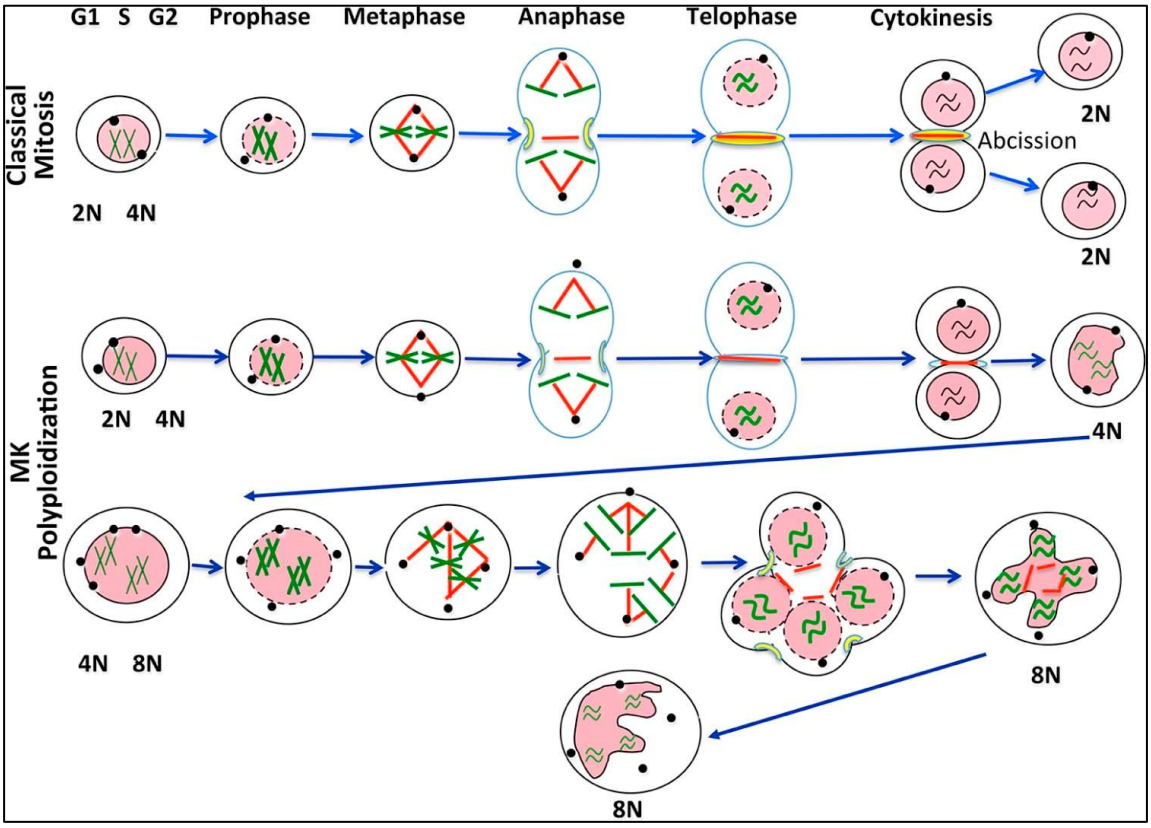


Figure 13 : Schéma comparatif d'une mitose classique avec l'endomitose des MK.

Le cycle cellulaire suit 3 étapes : l'interphase (la phase G1, la phase S et la phase G2), la mitose et la cytokinèse. Dans une mitose classique, la fin de la mitose s'achève par la cytokinèse qui donne naissance à deux cellules filles séparées. Lors de l'endomitose, le MK suit les mêmes étapes du cycle cellulaire avec une cytokinèse abortive, ce qui conduit à la formation d'un MK polyploïde. Figure tirée de [132].

Des études subséquentes ont confirmé le phénomène de mitose abortive en raison d'un défaut de la cytokinèse qui entraîne une formation incomplète du sillon de division permettant le passage de 2n à 4n [134, 157, 158]. Bien que l'inhibition de la cytokinèse soit démontrée être responsable de la polyploïdisation, les mécanismes régulant les nouveaux cycles de réplication d'ADN ne sont pas à négliger. D'ailleurs, de nombreuses études ont rapporté une régulation à la

hausse des modulateurs de la phase G1/S comme les cyclines D et E favorisant le développement de MK hautement polyploïdes[134, 159-161].

Il a longtemps été supposé que la polyploïdisation du MK est nécessaire pour produire une grande quantité d'ARNm et de protéines devant être empaquetés dans les plaquettes sans stress de la mitose et de la cytokinèse[159]. Cependant, la relation entre l'hyperploïdie du MK et la production augmentée de plaquettes demeure débattue. L'induction de la ploïdie des MK humains et murins par le nicotinamide, une forme de vitamine B3, dévoile un effet opposé sur la production de plaquettes[162, 163]. Il est également important de noter que l'administration du nicotinamide n'accroit pas les niveaux de plaquettes chez la souris[164]. De plus, la surexpression des régulateurs du cycle cellulaire notamment de la cycline D3, responsable d'un haut niveau de ploïdie des MK, ne se traduit pas par une augmentation du nombre de plaquettes *in vivo*[159]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour définir le lien entre polyploïdie et production de plaquettes.

En plus de l'endomitose, le MK poursuit sa maturation en augmentant la taille de son cytoplasme tout en générant un immense réservoir membranaire nécessaire à la thrombopoïèse qu'on appelle IMS pour « *Invaginated membrane system* » qu'on abordera dans la prochaine section.

4.2.3. Maturation du MK par expansion cytoplasmique :

La maturation du MK se poursuit avec une importante expansion cytoplasmique accroissant la taille du mégacaryocyte entre 50 à 100 um. Bien qu'immense, le MK représente une population très rare dans la moelle osseuse avec un pourcentage d'environ 0.5% de la composition cellulaire totale[165]. Cette maturation est caractérisée par la formation progressive d'un système membranaire complexe, continu avec la membrane plasmique et qui perméabilise le cytoplasme, autrement dit, il s'agit d'invaginations de la membrane plasmique du MK vers son cytoplasme. Ce système fut appelé initialement système de

démarcation membranaire pour DMS « *Demarcation membrane system* » car les chercheurs pensaient qu'il délimitait certaines zones dans le cytoplasme des MK à partir desquelles se formaient les plaquettes[134]. Toutefois, depuis l'établissement du modèle proplaquette, ce système est désormais désigné sous le nom de IMS « *Invaginated membrane system* » bien que l'appellation DMS perdure.

Le DMS est caractérisé par sa dérivation à partir de la membrane plasmique qui s'invagine dans le cytoplasme tout en maintenant un contact avec le milieu extracellulaire. D'ailleurs, la biogenèse du DMS semble progresser en étapes successives[166]. Elle est initiée par (1) l'assemblage de membrane à un endroit précis au niveau de la périphérie de la cellule. Tout en demeurant continue avec la périphérie de la cellule, (2) la membrane s'invagine dans la région autour du noyau et forme ainsi le Pré-DMS périnucléaire. (3) Ce dernier crée des contacts avec l'appareil de Golgi et le RE qui participent à son expansion par l'apport de membranes vésiculaires et de lipides, respectivement (Fig.14)[166].

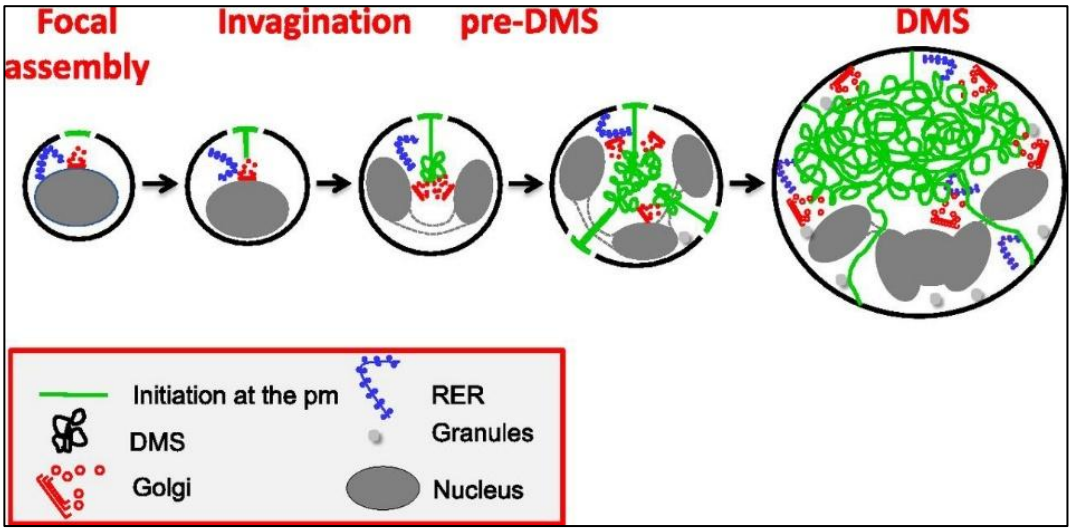


Figure 14 : Modèle de formation et de l'expansion du DMS.

La formation du DMS (Demarcation membrane system) débute au niveau des zones à la surface du MK. Lors de la maturation du MK, une structure pré-DMS distincte se forme dans la région périnucléaire via un processus d'invagination de la membrane plasmique. L'expansion du DMS nécessite l'apport de membranes vésiculaires provenant du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, un transfert qui dépend de la signalisation lipidique. Figure tirée de [166].

L'invagination de la membrane est dépendante de l'assemblage des fibres d'actine en réponse à la signalisation lipidique PI-4.5-P_2[167], ce qui met l'emphase sur l'importance des lipides dans la maturation des MK. De plus, une étude récente a investigué le rôle du PI4P qui contrôle le transport antérograde du Golgi vers la membrane plasmique dans la maturation du MK. Ils démontrent que le PI4P est enrichi dans le Golgi dans les MKs immatures sous l'effet de la phosphatase Sac-1 plutôt que dans la membrane plasmique comme dans les MK matures[168], mettant en évidence le rôle des phosphoinositides dans l'organisation membranaires lors de la maturation des MK et la thrombopoïèse. Cette invagination dans les régions périnucléaires favorise le bourgeonnement des vésicules à partir de Golgi, facilitant ainsi l'expansion du DMS et la biogenèse de granules dans le cytoplasme des MK[166]. À noter que ces granules sont facilement identifiables grâce à leur contenu incluant la P-sélectine/CD62P et le VWF[2], considérés comme des marqueurs de maturation des MK, et qui seront transférées aux plaquettes lors de la thrombopoïèse. Ceci indique que la mégacaryopoïèse structure non seulement l'organisation des MK, mais conditionne également le contenu des plaquettes produites.

4.3. La thrombopoïèse :

La thrombopoïèse est le processus par lequel les mégacaryocytes matures fabriquent les plaquettes, selon 3 mécanismes distincts (Fig.15).

Le modèle classique de production plaquettaire, identifié comme dominant en conditions physiologiques, est celui reposant sur la formation d'extensions cytoplasmiques du MK mature qu'on appelle : (1) **proplaquettes** : un réseau d'extensions ramifiées de proplaquettes composées de gonflements de la taille d'une plaquette à leur extrémité[2]. L'allongement des proplaquettes s'appuie sur le glissement des microtubules [169-171], et est dirigé vers l'endothélium afin de faciliter le passage des proplaquettes à travers les vaisseaux sinusoïdes pour libérer les plaquettes dans la circulation sanguine[172]. Les constituants devant

être empaquetés dans les plaquettes sont acheminés vers les pointes des proplaquettes via les protéines liant les microtubules, les dynéines et les kinésines[173]. Des fragments de proplaquettes sont ensuite libérés dans la circulation grâce au flux sanguin et aux neutrophiles qui participent à leur détachement du MK[2, 174, 175]. Les fragments de proplaquettes libérés murissent dans le sang vers différents stades précurseurs de plaquettes comme les préplaquettes « *pre-platelets* » et les plaquettes en altère « *barbell*s »[176] à partir desquels sont libérées les plaquettes matures après un dernier évènement de fission dépendant des microtubules[176].

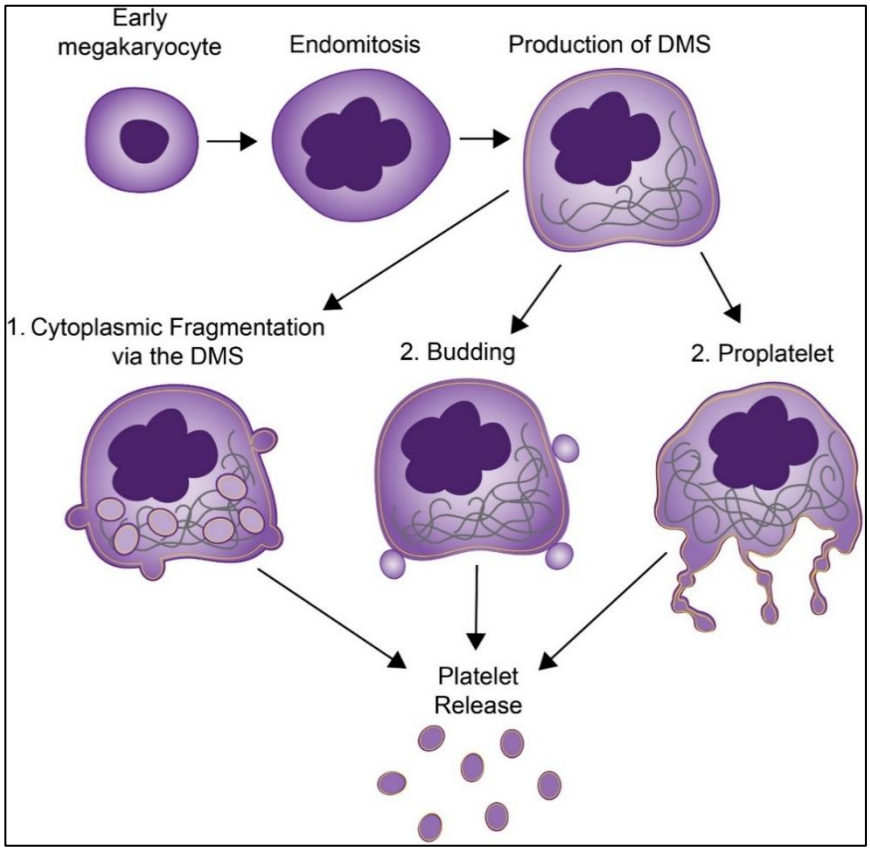


Figure 15 : Modèles de thrombopoïèse.

À la fin de la maturation, le MK produit les plaquettes selon 3 modèles : Fragmentation cytoplasmique via le DMS, bourgeonnement membranaire après protrusion à partir de la périphérie du MK et enfin par la formation de proplaquettes, des structures intermédiaires maintenues ensemble par des filaments cytoplasmiques. Figure tirée de [177].

En revanche, en 2015, un nouveau mécanisme de libération rapide des plaquettes est identifié : (2) **la rupture du MK**[178]. Ce modèle, présent en état physiologique, est augmenté et favorisé en réponse à des besoins aigus de plaquettes. L'utilisation de souris *Pf4*-$^{GFP+}$, fluorescentes pour les mégacaryocytes et plaquettes, a permis de démontrer que le MK subit des ondulations puis des changements irréguliers de sa forme et finit par libérer des particules de type plaquette^{GFP+} à partir de son cytoplasme d'où le nom rupture pour « fragmentation cytoplasmique »[178]. La libération de plaquettes^{GFP+} suit la baisse marquée de GFP (*Green fluorescence protein*) dans le MK. Ce phénomène est sous la régulation de l'IL-1α, et est augmenté en réponse à un besoin accru et rapide survenant en moins d'une heure au lieu de 2-3h permettant de fournir 20x plus de plaquettes que le modèle des proplaquettes[178]. Alors que le modèle proplaquettes est sous le contrôle de la TPO qui induit une régulation de l'expression des tubulines α et β pour former les proplaquettes, le mécanisme par rupture quant à lui survient suite à la liaison de l'IL1-α à son récepteur sur le MK et induit l'activation de la caspase qui inhibe la formation des proplaquettes, stimule une dérégulation de l'expression des tubulines diminuant ainsi la stabilité de la membrane plasmique et favorisant la thrombopoïèse par rupture cytoplasmique[178].

En 2020, un troisième mécanisme de biogenèse plaquettaire qui repose sur le bourgeonnement membranaire du MK est rapporté : (3) **membrane budding**[9]. Il a été proposé qu'il s'agît du mécanisme principal qui supplémente la majorité de la biomasse plaquettaire in vivo, et qui dépend de l'interaction GPIbα (CD42b) -filamin A[9, 179]. En effet, la présence de mitochondries et des marqueurs de plaquettes, comme le VWF et les granules α, ont confirmé que ces bourgeons « *buds* » sont des précurseurs plaquettaires[2, 180].

Nous comprenons jusqu'ici que suite à la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse, les plaquettes héritent d'un contenu déterminé par les MK,

incluant des protéines, ARN et organites, ce qui indique que la plaquette est préprogrammée en amont pour exercer ses fonctions.

5. Le mégacaryocyte en contexte inflammatoire et les conséquences sur la réponse plaquettaire :

Comme évoqué précédemment, un environnement inflammatoire entraîne des changements importants pouvant résulter en une activation exacerbée des plaquettes[117, 121]. Cette activation excessive ainsi qu'une consommation rapide de plaquettes sont connues pour provoquer une thrombocytopénie, très souvent observée dans des cas sévères d'infections, en raison d'un épuisement plaquettaire[26]. En réponse à la thrombocytopénie, l'organisme adapte sa réponse à la demande accrue de plaquettes médiée par des signaux inflammatoires afin d'avertir la moelle osseuse que la mégacaryopoïèse physiologique devient insuffisante, ce qui déclenche une réponse adaptative. La mégacaryopoïèse d'urgence constitue une réponse majeure permettant de soutenir la production plaquettaire en contexte inflammatoire[181], qui résulte en la production de plaquettes modulées pouvant être hyperactives contribuant à la thrombo-inflammation, comme observé dans l'infection IAV[93].

5.1. Mégacaryopoïèse d'urgence :

Comme mentionné précédemment, la mégacaryopoïèse suit une différenciation hiérarchique par étapes successives tout en comportant des voies alternatives suscitant une réflexion quant à l'intérêt de l'existence de ces raccourcis[133, 141, 182, 183]. Une équipe de chercheurs a mis en évidence des progéniteurs mégacaryocytaires semblables à des cellules souches : SL-MKP (*Stem like-MKP*), engagés vers la lignée MK mais qui demeurent quiescents en homéostasie[181]. Lors d'une inflammation aigue, ces SL-MKP déclenchent rapidement la synthèse de protéines mégacaryocytaires (CD41-VWF-Pf4) grâce à une régulation post-transcriptionnelle contrôlée par la réponse interféron via l'axe IFNAR- STAT1-mTOR, ce qui résulte en une maturation accélérée des MK

et une reconstitution rapide du déficit plaquettaire. C'est ainsi que ce groupe a introduit pour la première fois le concept de la **mégacaryopoïèse d'urgence** « *emergency megakaryopoïesis* » pour qualifier cette réponse adaptative[181].

Dans le contexte d'infection IAV, des CSH CD41+ biaisées vers la lignée mégacaryocytaire se différencient directement en MKP sous l'influence de l'IL-1 reflétant une mégacaryopoïèse d'urgence TPO-indépendante dans un contexte viral[93]. De manière intéressante, les plaquettes générées par cette mégacaryopoïèse d'urgence induite par IAV sont larges et immatures avec un phénotype pro-coagulant[93].

Depuis l'introduction du concept de la mégacaryopoïèse d'urgence, il est admis qu'il s'agit d'une voie de différenciation rapide empruntée pour combler un déficit plaquettaire. Or, une autre équipe redéfinit le dogme de la mégacaryopoïèse d'urgence en 2024 en ajoutant que la voie de différenciation choisie selon le contexte détermine les résultats fonctionnels de la mégacaryopoïèse adulte[184]. En homéostasie, les deux voies, par étapes et directe, sont utilisées avec une même cinétique et un même rendement. Par contre, suite à une ablation médullaire (élimination des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse par irradiation), la voie de différenciation directe est augmentée et est associée à une fréquence élevée en mégacaryocytes qui supportent la niche, en plus des mégacaryocytes thrombopoïétiques[184]. En revanche, en contexte inflammatoire (induit par le LPS), la voie par étapes prédomine et génère quant à elle une fréquence plus élevée de MK à phénotype immunitaire tout en maintenant une production de MK thrombopoïètique[182]. Ces MK immunitaires conservent leur capacité à produire des plaquettes révélant l'impact de la mégacaryopoïèse sur l'identité plaquettaire[182].

Rappelons que des sites de thrombopoïèse extra-médullaires existent. En effet, dans plusieurs contextes pathologiques une augmentation de MK

pulmonaires est signalée[8]. Chez l'humain, cette augmentation est associée aux maladies vasculaires en lien avec une coagulation excessive (infarctus du myocarde), aux lésions tissulaires (brulure, hémorragie), aux maladies pulmonaires inflammatoires (syndrome de détresses respiratoire aigüe ARDS : *acute respiratory distress syndrome*), ainsi qu'aux maladies infectieuses, notamment dans les infections respiratoires[8, 185-188] [187]. Dans l'influenza, des MK sont piégés dans les capillaires cérébraux suggérant une augmentation des MK dans la circulation[189].

La plupart des études sur l'augmentation des MK ont établi une corrélation avec la thrombocytopénie, ce qui pourrait les associer à une activité thrombopoïètique accélérée. L'ensemble de ces observations a conduit Emma Lefrançais à proposer un modèle (Fig.16) qui décrit une production adaptée de plaquettes, où en homéostasie, le site de production finale des plaquettes est la moelle osseuse, la rate et le poumon. Dans la moelle osseuse et la rate, les MK étendent leur cytoplasme dans le lumen des sinusoïdes pour former des proplaquettes. Ces dernières et rarement des MK entiers entrent en circulation et sont piégés dans la vasculature pulmonaire où ils accomplissent l'étape finale de libération plaquettaire[8]. En revanche, dans un contexte inflammatoire et infectieux, un nombre élevé de MK circulants est observé et corrèle avec une augmentation de production plaquettaire dans les vaisseaux pulmonaires, représentant un mécanisme d'adaptation aux besoins plaquettaires (Fig.16). Cependant, cette réponse ne se limite pas à restaurer le nombre de plaquettes, mais elle génère des plaquettes avec un profil fonctionnel modulé par le contexte

pathologique, un aspect abordé dans la section suivante, qui termine la partie descriptive de ce chapitre, et prépare la présentation des hypothèses et objectifs.

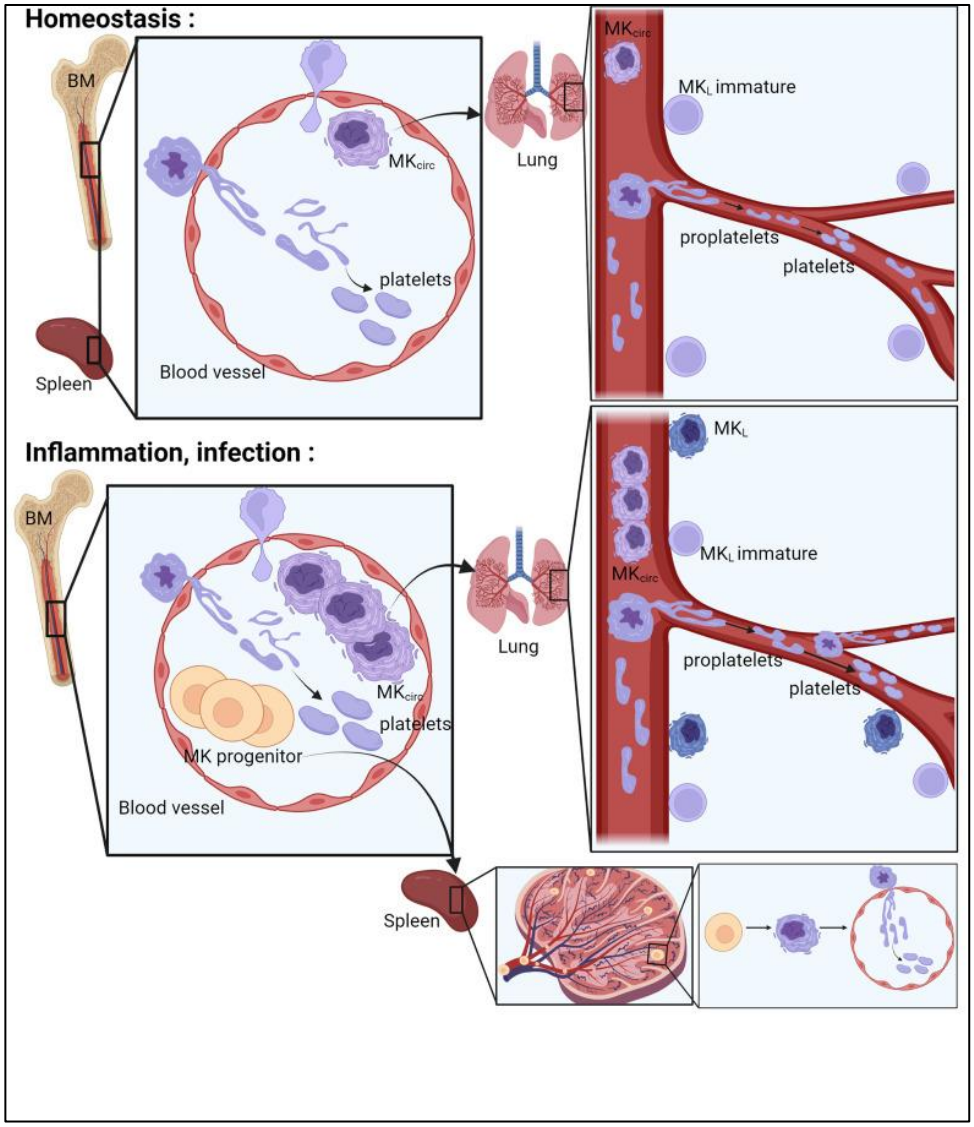


Figure 16 : Production des plaquettes en contexte physiologique, inflammatoire et infectieux : Modèle d'Emma Lefrançais.

En conditions physiologiques, les MK produisent les plaquettes dans la moelle osseuse, la rate et les poumons. Dans la moelle osseuse et la rate, le MK étend son cytoplasme dans la lumière des sinusoïdes pour former les proplaquettes. Ces dernières et certains MK entiers peuvent traverser la barrière vasculaire, circuler dans le sang pour aller se loger dans la vasculature pulmonaire. En contexte inflammatoire et infection, les MK circulent en grand nombre dans le sang et produisent une plus grande quantité de plaquettes dans la vasculature pulmonaire. Figure tirée de [8].

5.2. Modulation du contenu des plaquettes par le MK en contexte inflammatoire :

Comme les plaquettes sont anucléées, il est maintenant accepté que leur transcriptome et protéome soient hérités du MK, bien qu'un transfert rare, notamment d'ARNm et de mitochondries existe dans la circulation sanguine[190, 191]. Plusieurs études ont identifié des altérations dans le transcriptome et le protéome des mégacaryocytes et des plaquettes dans différents contextes, incluant le sepsis, l'infarctus du myocarde, le vieillissement et les infections virales[192]. En se basant sur ces données, l'équipe du Dr Rondina a établi le modèle représenté dans la figure 19, qui décrit qu'en fonction des signaux environnementaux, les mégacaryocytes adaptent leur transcriptome et protéome et les transfèrent aux plaquettes nouvellement formées[94, 116, 117, 192]. Ces dernières circulent avec un transcriptome et protéome unique qui influencent leurs réponses fonctionnelles, autrement dit, leur activation.

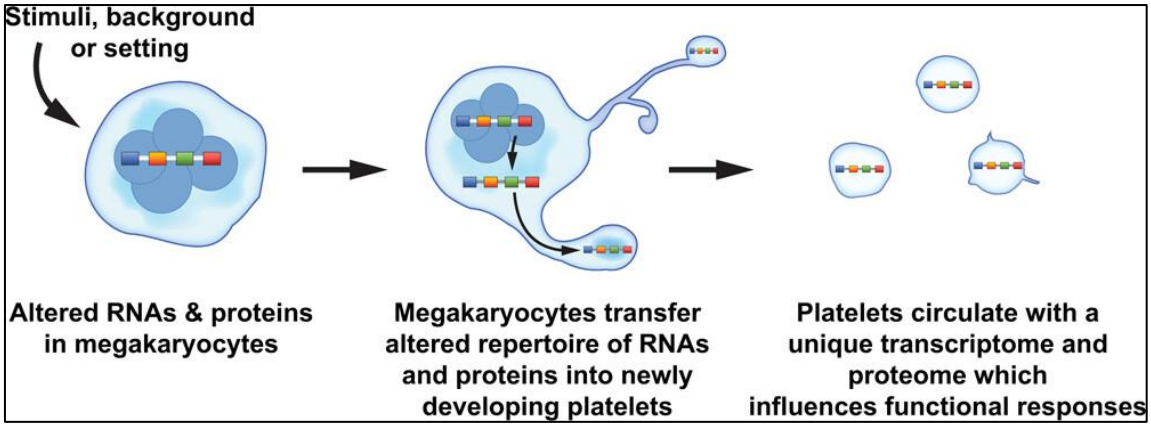


Figure 17 : L'adaptation du transcriptome et du protéome des MK en réponse aux stimuli est transmise aux plaquettes nouvellement produites.

Le signal reçu par le MK induit des changements au niveau de son profil transcriptomique et protéomique. Ces changements sont transmis aux plaquettes en formation et peuvent influencer leurs fonctions. Figure tirée de [192].

Récemment, une étude a démontré que l'IL1-α promeut l'emperipoïèse (processus par lequel les cellulules hématopoiétiques, principalement les neutrophiles, traversent le cytoplasme des MK transitoirement et en ressortent sans qu'aucune des deux cellules ne soit détruite) et induit un profil protéomique distinct, caractérisé par une abondance significativement plus élevée de protéine liées aux neutrophiles, de peptides antimicrobiens et de protéines inflammatoires dans les MK[193]. Ce résultat concorde avec les données d'une autre étude qui indique que l'inflammation oriente la mégacaryopoïèse à produire des MK immunitaires[184], pouvant former des plaquettes fonctionnellement adaptées au contexte.

D'autres protéines ont été rapporté être modulées dans différents contextes. Par exemple, dans le diabète de type 2, des chercheurs ont rapporté que la protéine SEC61B (*Protein transport protein sec 61 subunit beta*) du complexe SEC61 localisé au niveau du RE, et qui sert de canal de fuite du calcium est surexprimé dans les plaquettes de patients hyperglycémiques[194] Ils ont démontré chez la souris que cette modulation origine d'un stress au niveau du RE dans le mégacaryocyte, ce qui induit la surexpression de SEC61B[194]. Dans les plaquettes, l'augmentation de SEC61B corrélait avec un niveau élevé de stress dans le RE, une hausse de fuite calcique et une hyperactivation plaquettaire, pouvant contribuer aux thromboses chez ces patients[194]. Un autre travail rapporta dans le même contexte une corrélation entre l'activation plaquettaire et l'augmentation de certaines protéines chaperonnes HSP[195].

Fait intéressant, l'équipe du Dr Rondina a également rapporté que la protéine antivirale IFITM3, généralement indétectable chez les sujets sains, est surexprimée dans les plaquettes des patients infectés au virus Dengue et Influenza[116]. *In vitro*, la surexpression d'IFITM3 induite par l'IFNα/β a augmenté les niveaux d'IFITM3 et permis de limiter l'infection virale, non seulement dans les mégacaryocytes, mais aussi dans les cellules souches[116]. De ce fait, la

modulation d'IFITM3 dans la lignée mégacaryocyte-plaquette joue un rôle protecteur durant l'infection virale.

En revanche, la même équipe rapporte une augmentation pathologique des niveaux d'IFITM3 dans les MK et les plaquettes durant le sepsis non-viral[117]. L'augmentation transcriptionnelle et traductionnelle d'IFITM3 dans les MKs dépend de l'activation de STAT1-mTOR en réponse à l'IFN. Cette augmentation est reflétée dans les plaquettes, ce qui promeut leur état hyperactif et amplifie les thromboses[117]. Ces données suggèrent que l'hyperactivité plaquettaire découle d'une modulation protéique relative à l'adaptation du MK à la réponse IFN.

6. Questions de recherche, hypothèses et objectifs :

Il en ressort de l'examen de la littérature que les plaquettes influencent la coagulation pathologique par leur activation en réponse à l'ADN extracellulaire via le récepteur TLR9. Parallèlement, nous savons que la voie cGAS-STING promeut des réponses thrombotiques inappropriées par des mécanismes indépendants aux plaquettes. Bien que le TLR9 ait été identifié comme le récepteur clé de l'ADN dans les plaquettes, sa déplétion n'a pas complètement aboli l'activation plaquettaire en présence d'ADN, ce qui indique qu'un autre récepteur d'ADN coexiste au sein des plaquettes, et qui n'a pas encore été élucidé. Dans cette perspective, tout en considérant que les plaquettes héritent leurs constituants des mégacaryocytes, notre recherche vise d'abord à déterminer **les niveaux d'expression et la fonctionnalité de la voie cGAS-STING dans la lignée mégacaryocyte-plaquette.**

Objectif 1 : Caractériser la voie cGAS-STING dans les MK et les plaquettes.

1. Déterminer la présence et la fonctionnalité de la voie cGAS-STING dans les MK de la moelle osseuse de souris et dans les plaquettes murines et humaines.

2. Analyser l'effet de l'activation de la voie cGAS-STING sur l'activité plaquettaire par des tests de stimulation afin de mesurer l'expression de la P-sélectine/CD62P.

3. Effectuer des tests d'agrégation des plaquettes humaines en présence d'agonistes de cGAS et de STING.

Compte tenu du rôle pathologique de l'hyperactivité des plaquettes au cours des infections, notamment l'infection IAV, et de l'effet de la modulation de certaines protéines par l'interféron sur le phénotype hyperactif des plaquettes dans certains contextes pathologiques, nous cherchons à établir **si la protéine STING fait l'objet d'une modulation dans l'axe mégacaryocyte-plaquette en réponse à l'interféron que nous validerons dans un modèle *in vivo* d'infection IAV.**

Objectif 2 : Investiguer la modulation de STING en réponse à l'interféron *in vitro* dans les MK et plaquettes et dans un modèle *in vivo* d'infection IAV, ainsi que son impact sur l'activation plaquettaire.

1. Caractériser la modulation de STING *in vitro* et *in vivo.*

2. Déterminer son effet sur l'activation plaquettaire.

3. Élucider les mécanismes responsables de cette modulation.

CHAPITRE II

Megakaryocytes possess a functional STING pathway that is transferred to platelets to potentiate activation

Firas El-Mortada[1#], Karima Landelouci[1#], Samuel Bertrand-Perron[1], Félix-Antoine Aubé[1], Amélie Poirier[1], Amel Bidias[1], Georges Jourdi[7,8], Mélanie Welman[7,8], Michael P. Gantier[2,3], Justin R. Hamilton[4,5], Benjamin Kile[6], Marie Lordkipanidzé[7,8] and Geneviève Pépin[1*]

[#] Indicates shared co-first-authorship

[1.] Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada
[2.] Centre for Innate Immunity and Infectious Diseases, Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Australia
[3.] Department of Molecular and Translational Science, Monash University, Clayton, Australia
[4.] Australian Centre for Blood Diseases, Monash University, Melbourne, Australia.
[5.] CSL Innovation, Melbourne, Australia.
[6.] Monash Biomedicine Discovery Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Clayton, Australia.
[7.] Centre de recherche, Institut de cardiologie de Montréal, Montréal, Canada
[8.] Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Canada

* To whom correspondence should be addressed. Email: Genevieve.pepin3@uqtr.ca

Running title: STING potentiates platelet aggregation

Keywords: Megakaryocytes/ platelets/ cGAS-STING/ Interferon/ Innate Immunity/ cGAMP

Author contributions

Firas El-Mortada: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review and editing
Karima Landelouci: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review and editing
Samuel Bertrand-Perron: Investigation, Methodology, Writing—review and editing
Félix-Antoine Aubé: Formal analysis, Investigation, Writing—review and editing
Amélie Poirier: Investigation
Amel Bidias: Investigation, Methodology, Writing—review and editing
Georges Jourdi: Investigation, Methodology, Writing—review and editing
Mélanie Welman: Investigation, Methodology, Writing—review and editing
Michael P Gantier: Resources, Writing—review and editing
Justin R Hamilton: Resources, Writing—review and editing
Benjamin Kile: Resources, Writing—review and editing
Marie Lordkipanidzé: Resources, Supervision, Investigation, Methodology, Writing—review and editing
Geneviève Pépin: Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration

Abstract

Platelets display unexpected roles in immune and coagulation responses. Emerging evidence suggests that STING is implicated in hypercoagulation. STING is an adaptor protein downstream of the DNA sensor cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase (cGAS) that is activated by cytosolic microbial and self-DNA during infections, and in context of loss of cellular integrity, to instigate the production of type-I interferon (IFN-I) and pro-inflammatory cytokines. To date, whether the cGAS-STING pathway is present in platelets and contribute to platelet functions is not defined. Using a combination of pharmacological and genetic approaches, we demonstrate here that megakaryocytes and platelets possess a functional cGAS-STING pathway. Our results suggest that in megakaryocytes, STING stimulation activates a type-I Interferon response; and during thrombopoiesis cGAS and STING are transferred to proplatelets. Finally, we show that both murine and human platelets contain cGAS and STING proteins, and the cGAS-STING pathway contributes to potentiation of platelet activation and aggregation. Taken together, these observations establish for the first time a novel role for cGAS-STING DNA sensing axis in the megakaryocyte and platelet lineage.

Summary blurb

This work reveals that megakaryocytes transfer cGAS and STING proteins to platelets during thrombopoiesis, and that cGAS stimulation results in the activation and aggregation of platelets; suggesting a new role for cGAS in thromboinflammation.

Introduction

Host defense against infection relies on two important systems; the immune and the coagulation systems. Platelets are anucleate cells produced by megakaryocytes and are responsible for blood clotting and hemostasis [1]. They are also very abundant, and play unexpected roles in immune responses [2, 3]. Hence, platelets are at the crossroads of these critical processes. Platelets possess several immune receptors, including Toll-like receptors (TLRs), that detect microbial molecules and modulate platelet functions, including potentiating their activation and aggregation independently of their canonical transcriptional roles [4]. They also interact directly with other immune cells such as lymphocytes, monocytes, and neutrophils. Through these receptors and cellular interactions, they are implicated in coagulation, but also in bacterial clearance, defence against viruses and inflammatory responses [2, 3].

Interestingly, early literature suggests that platelets respond to double stranded (ds)DNA, by releasing inflammatory molecules stored in their secretory granules and by aggregating [5]. More recently, it was also observed that platelet activation by DNA leads to increased levels of the cell surface protein P-Selectin and the release of the chemokine Platelet Factor 4 (PF4/CXCL4), two markers of platelet activation and degranulation [6].

The cyclic GMP-AMP Synthase (cGAS) is a cytosolic DNA receptor. cGAS detects microbial DNA during infections and nuclear or mitochondrial self-DNA as

a result of loss of cellular integrity [7-10]. Upon DNA sensing, cGAS produces the second messenger, cyclic GMP-AMP (cGAMP), which then binds to the Stimulator of Interferon Genes (STING) adaptor protein [11, 12]. In cells with a nucleus, activated STING acts as a scaffold protein to recruit Tank Binding Kinase 1 (TBK1), and IKKe to allow for the phosphorylation of the transcription factors: Interferon Related Factor 3 (IRF3), and Nuclear Factor kappa B (NF-κB), resulting in the production of type-I Interferon (IFN-I) and pro-inflammatory cytokines [12-15]. Sustained activation of the cGAS-STING pathway underpins the inflammation observed in many pathological conditions, including cardiovascular diseases, ageing, obesity, and neurological disorders [10]. Using transcriptomic data from macrophages expressing the S365A STING mutant, specifically deficient for IFN-I signalling, a recent study has unveiled that the Interferon-independent STING activation pathways, emphasising the broad implication of this pathway beyond its canonical role [16]. Among these IFN-I independent functions of STING, a pivotal role for STING in lethal coagulation during sepsis has recently been reported. Molecularly, this study showed that STING activation in macrophages results in increased cytosolic calcium, which then causes the secretion of Tissue factor, ultimately contributing to a pathological coagulation cascade characterised by high levels of D-dimers during sepsis [17]. Despite this first evidence of a role for the cGAS-STING pathway in coagulation, whether the cGAS-STING proteins have a role in other cell populations contributing to coagulation, including in platelets, remains to be investigated until very recently. In fact, while revising our manuscript, a new study reported that STING in platelets contributes to thromboinflammation during sepsis, confirming some of the findings we are showing in this study [18].

Platelets are released into the vasculature from the fragmentation of cytoplasmic protuberances called proplatelets. Alternate methods of platelets generation, such as from the budding or the rupture of the megakaryocyte plasma membranes, have been observed in isolated studies that still require to be

corroborated [19-21]. Whether cGAS is present in platelets and whether the presence of cGAS and STING in platelets relies on their transfer from megakaryocytes remains to be defined.

In this work, we initially investigated the presence and functionality of the cGAS-STING axis in megakaryocytes and platelets. We demonstrated that megakaryocytes and platelets possess the cGAS and STING proteins, which can be functionally activated, albeit differently. As such, while STING drives a tonic response in megakaryocytes, it also potentiates the activation and aggregation of platelets. Taken together, our work demonstrates a previously unrecognised role for the cGAS-STING pathway in megakaryocytes and platelets, and raises important questions as to their functions in thromboinflammation.

Results

STING stimulation of megakaryocytes induces a type-I Interferon response

Platelets are released from cytoplasmic protuberances of megakaryocytes and have little translation capacity under resting conditions, so we hypothesise that to be present in platelets, the cGAS and STING proteins would first have to be translated in megakaryocytes. In fact, in silico analysis of platelets datasets shows that the mRNAs of cGAS and STING were either not detected, or detected at a very low level in murine and human platelets [22-24]. STING was however detected at the protein level in human platelets [25], and more recently in mouse platelet lysates [18]. To investigate the presence of cGAS and STING in megakaryocytes, we relied on *in vitro* differentiation of cells expressing CD41, an integrin specific of the megakaryocyte's lineage (hereafter named $CD41^+$ cells), isolated from adult mouse bone marrow that were then cultured in the presence of thrombopoietin (TPO) to stimulate their maturation. Consistent with the phenotype associated with mature megakaryocytes, we could observe the

formation of proplatelets structures in a high number of the megakaryocytes (Figure 1A). Mature megakaryocytes were easily identified in our brightfield images by their multilobed nucleus, and the expression of the CD41 integrin at the plasma membrane (Figure 1D-E-F). When stimulated with DMXAA, a synthetic murine STING agonist [26], we observed the release of IFN-β cytokines (Figure 1B), and CCL5 (RANTES) (Figure 1C).

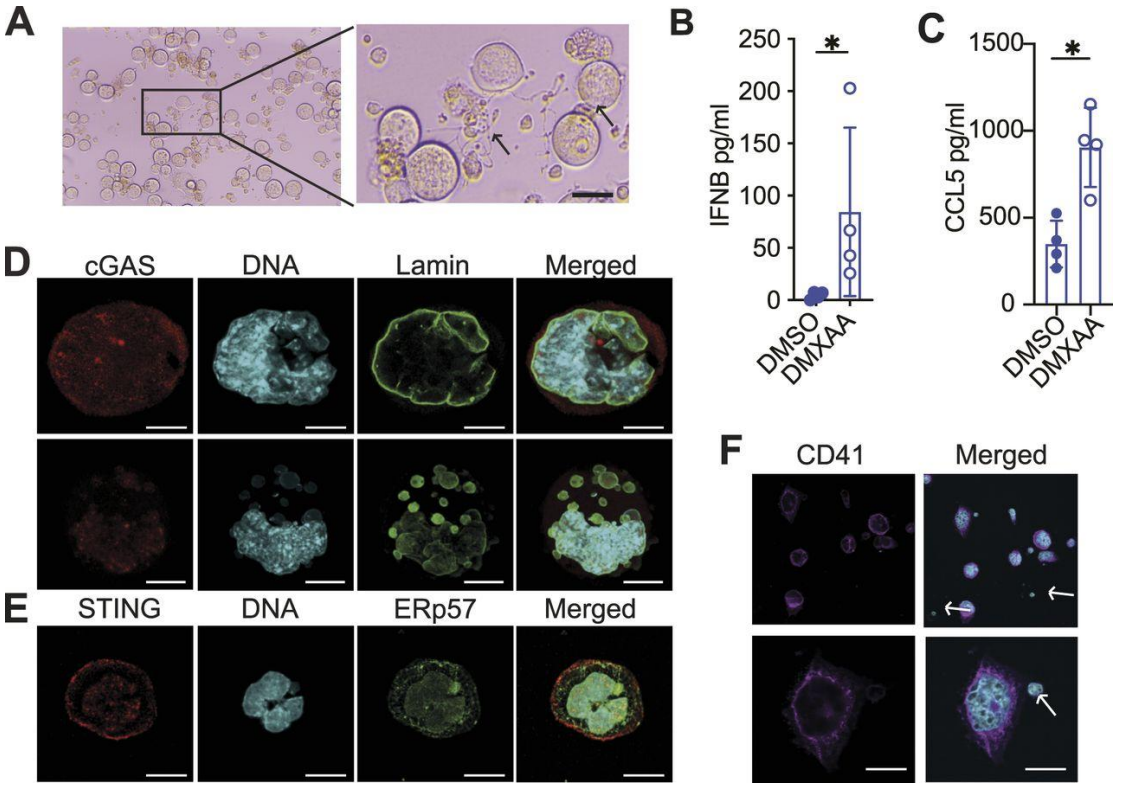


Figure 1- STING stimulation of megakaryocytes induces a type-I Interferon response

(A) Brightfield images of megakaryocytes isolated using anti-CD41 magnetic beads at day four of in vitro differentiation. Enlargement shows the production of proplatelets (black arrows) by mature megakaryocytes Scale bar: 30 μm. (B-C) Cytokine production analysis by ELISA of megakaryocytes stimulated with DMXAA for 5 h (B) and 24 h (C) showing a significant increase in IFNB and CCL5 cytokines, n=4 independent experiments, each dot represents data from one independent experiment, graph shows data ± STD and unpaired two-tailed t-tests, * p<0,05. (D-E) Representative immunofluorescence images of megakaryocytes

taken by confocal microscopy showing the localisation of cGAS or STING (red), ERp57 or Lamin A/C (green) and chromatin (blue), representative of n=3 independent experiments. Scale bars: 20 μm (D) and 15 μm (E). (F) Representative immunofluorescence images of CD41 positive (magenta for CD41+ blue for DNA) and negative (only blue) cells taken by confocal microscopy. Representative images of more than n=3 independent experiments. Scale bars: 30 μm.

The unique maturation process of megakaryocytes prompted us to determine the localisation of both cGAS and STING in megakaryocytes. cGAS intracellular localisation varied depending on the cell being analysed. We could detect cGAS in the nucleus, in the cytoplasm and in bright punctates (Figure 1D). In fact, these punctates were found in the nucleus and in micronuclei-like structures (small nuclear vesicles surrounded by Lamin A/C containing or not DNA). These different localisations of cGAS suggest that cGAS localisation is dynamic. The nuclear localisation of cGAS could be consistent with previous studies showing that during mitosis cGAS is located at the chromatin where its activity is reduced [27, 28]. While megakaryocytes do not undergo mitosis *per se*, they do replicate their DNA, and go through several rounds of abortive mitosis; a process called endomitosis [20], suggesting that cGAS might be similarly inhibited. Unfortunately, we also discovered that the antibody we used stained the nucleus in cGAS-deficient cells, and this non-specific staining changed depending on the batch we received. To our knowledge, this was the only antibody reported in the literature to stain endogenous murine cGAS [29]. Fortunately, this background was not present in the cytosolic part of the cells (Fig S4), and a closer look at the staining pattern demonstrated that the nucleus of cGAS expressing cells has two different kinds of staining: diffused and concentrated in foci, the latest being also present in the cGAS deficient-cells (Fig S1 and S4). These analyses confirm the presence of cGAS in the cytosolic and nuclear part of megakaryocytes, but

suggest that the analysis of cGAS in the nucleus will require additional validation though the generation of better antibodies.

We then imaged the endoplasmic reticulum (ER) resident protein STING, using an antibody we validated (Fig S2), together with the ERp57protein, a thiol isomerase protein previously reported to be concentrated in the dense tubular system of megakaryocytes and transferred to platelets [30]. Interestingly, ERp57 is also known to be located next to the ER membrane Ca^{2+} sensor, STIM1, which has been shown to retain STING at the ER [31] As shown by our image, STING has a similar localisation pattern than ERp57 (Figure 1E). Some areas of colocalization are also observed suggesting that both proteins might be transferred to platelets similarly.

STING stimulation induces ISGs in megakaryocytes

Because even a small number of contaminating cells can impact gene expression analysis experiments, we used the CD41 marker to determine the purity of our cell preparations. As shown in Figure 1F, non-CD41 small cells were contaminating our preparations. To determine whether cGAS or STING stimulation could result in IFN-I response, we conducted a gene expression analysis on CD41-CD42b sorted megakaryocytes (Figure 2A). In line with cGAS activity being reduced in megakaryocytes, DNA stimulation of megakaryocytes increases only to a small extent the expression level of *Ifit1* and *Ccl5*.

However, stimulation of the same cells with DMXAA increased the expression levels of the ISGs measured (*Ifit1*, *Rsad2* and *Ccl5*) supporting the capacity of STING to induce an IFN-I response in megakaryocytes. After activation, STING translocates from the ER to the Golgi during signaling [32]. To complement our study, we stained the DMXAA-treated cells and their control cells with the phospho (P)-STING antibody, that we previously validated (Fig S3), and

the Golgi marker TGN46 antibody (Figure 2B). Image analysis confirms an increase of cells with P-STING foci, with some foci colocalizing with TGN46 (Figure 2C). We also noticed that P-STING was present in the control cells, suggesting a basal activation of the pathway; a phenotype that could be driven by the genome instability of megakaryocytes during maturation.

Dynamic localisation of cGAS during megakaryocyte maturation

To investigate whether megakaryocytes display genome instability during maturation, we imaged megakaryocytes and separated them in groups based on their ploidy and their size (Figure 2D). The first group of cells included the smallest cells (average of 15 μm) and display 2 or 3 nuclei; the second group consisted of medium cells (average of 23 μm and display 3 to 5 nuclei; the third stage were larger cells (average of 30 μm) with more than 5 nucleus and the last stage were very large cells (up to 55 μm) with a multilobed shape. Besides cGAS itself, we chose to image P-γH2AX and the Lamin A/C to assess the presence of DNA damage, and the integrity of the nuclear membrane respectively. By doing so, we unveiled a correlation between cGAS localisation and the amount of DNA damage. In fact, in early stage of maturation, megakaryocytes displayed low levels of DNA damage (P-yH2AX), no signs of nuclear membrane ruptures and exhibited a predominantly nuclear distribution for cGAS. However, as megakaryocytes progressed into maturation, they accumulated DNA damage which coincided with a high proportion of cGAS detected predominately in the cytosol near the plasma membrane and in micronuclei. However, in the last stage of maturation, DNA damage was almost undetected, and the nuclear integrity of the cells was completely lost, thus it was difficult to assess the localisation of

cGAS. Together, these data suggest that genome instability contributes to cGAS activation (Figure 2E and 2F).

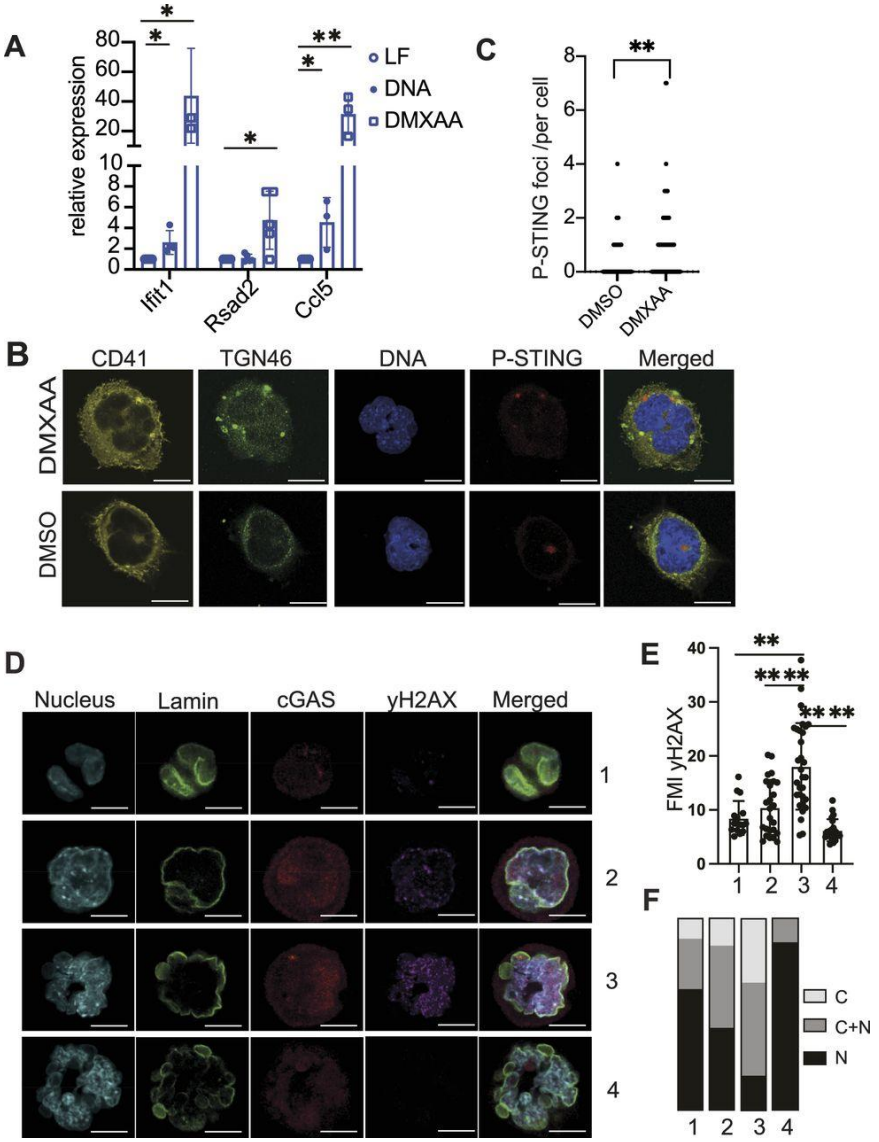


Figure 2- STING stimulation induces the expression of Interferon-stimulated genes

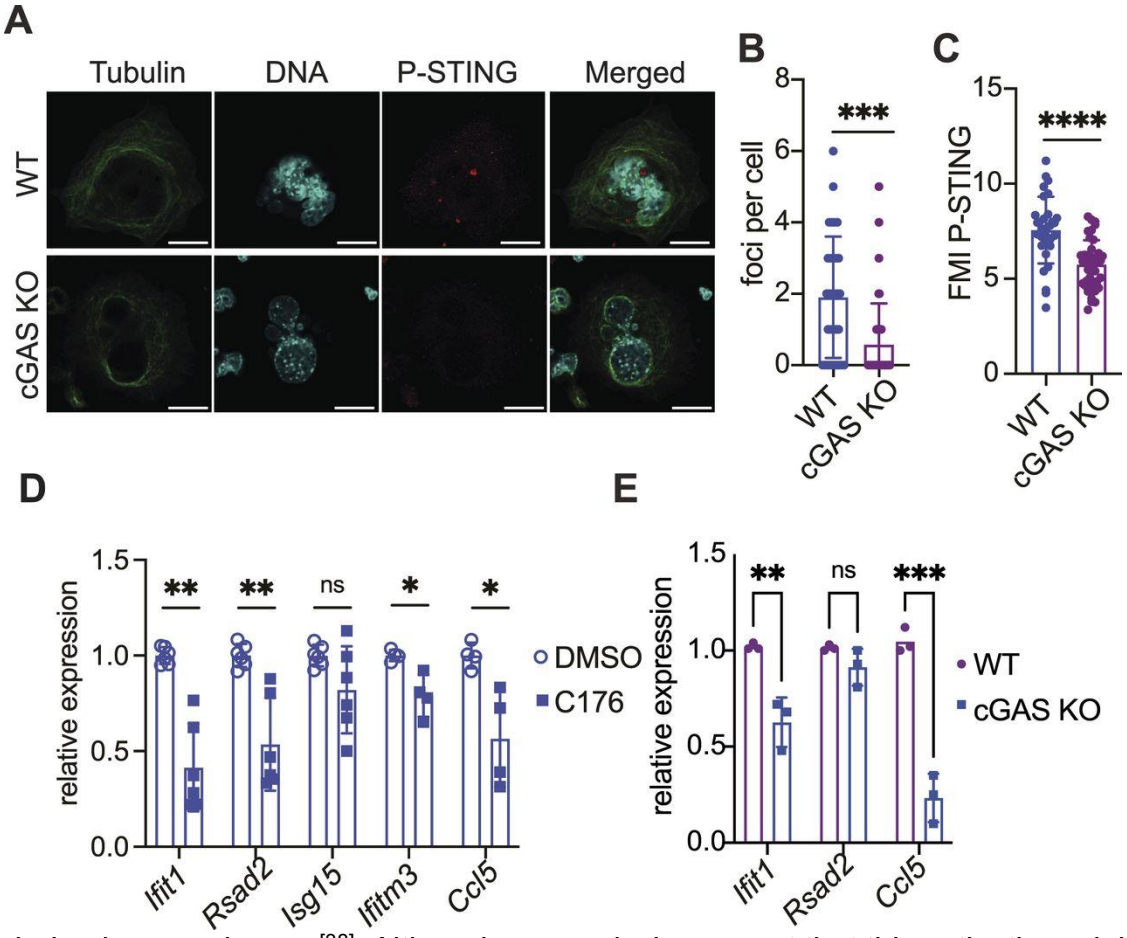
(A) Gene expression analysis of sorted megakaryocytes (based on the expression of CD41 and CD42b) stimulated with DNA + Lipofectamine (DNA) or Lipofectamine only (LF) for 5 h or with DMXAA for 2 h showing the level of specific ISGs (*Ifit1, Rsad2, Ccl5*), each dot represents the data from one experiment. Data are shown as ± STD and were analysed by unpaired two-tailed t-tests, * P≤0.05** P≤0.01. (B) Representative

immunofluorescence images of WT megakaryocytes stimulated or not with DMXAA taken by confocal microscopy showing the localisation of CD41 (yellow), P-STING (red), TGN46 (green) and chromatin (blue). n=3 independent experiments Scale bars: 20 μm. (C) Quantification of P-STING intracellular foci between WT megakaryocytes stimulated or not with DMXAA. Each dot represents the number of foci in one megakaryocyte. Images were taken from n=3 independent experiments. Data are shown as ± STD and were analysed by unpaired two-tailed t-tests, ** P≤0.01. (D) Representative immunofluorescence image of megakaryocytes taken by confocal microscopy showing the localisation of cGAS (red), Lamin A/C (green) and chromatin (blue) in relation to the amount of DNA damage (P-yH2AX) in the four stages of megakaryocyte's maturation (1 to 4) Scale Bars for lanes 1 and 2: 10 μm; for lanes 3 and 4: 20 μm. (E) Quantification of the fluorescence mean intensity (FMI) associated with the P-yH2AX DNA damage marker, each dot represents the measure for a single megakaryocyte; megakaryocytes were measured from at least n=2 independent experiments, graph shows data ± STD and unpaired two-tailed t-tests, ** P≤0.01 **** p<0,0001. (F) Schematic representation of the proportion of megakaryocytes from each stage in relation to cGAS localisation (nuclear, cytosolic or both).

STING drives a tonic activation of ISGs during megakaryocyte maturation

The fact that cGAS was present in micronuclei-like structures, a hallmark of genome instability [33-36], led us to ask whether cGAS could be basally activated during megakaryocytes maturation. We then posited that if cGAS was basally engaged, we should be able to detect P-STING in WT megakaryocytes, and so IFN-I stimulated gene expression should be basally higher than ~~in~~ cGAS-deficient cells. As expected, we detected a higher signal of P-STING in megakaryocytes WT than their cGAS$^{-/-}$ counterpart (Figure 3A and 3C). Furthermore, WT megakaryocytes displayed a higher number of P-STING punctates (Figure 3B), suggesting that the cGAS-STING pathway is basally activated in megakaryocytes. We also treated megakaryocytes with the STING inhibitor C176 during their differentiation [37]. STING inhibition resulted in a reduction in the expression levels of selected ISGs (Figure 3D). Next, we compared the level of ISGs from WT and cGAS$^{-/-}$ megakaryocytes, isolated from littermate mouse.

Accordingly, we found that the expression levels of Ccl5 and Ifit1 were reduced in cGAS$^{-/-}$ megakaryocytes (Figure 3E). Together, these results support a basal activation of the cGAS-STING axis in megakaryocytes that result in the induction of ISGs, as previously reported for other cell population including bone marrow-



derived macrophages [38]. Although our analysis suggest that this activation might be triggered by genome instability, we cannot exclude that the activation of STING is driven by *in vitro* culture of our megakaryocytes.

Figure 3- STING drives a tonic type-I Interferon response in megakaryocytes

(A) Representative immunofluorescence images of WT and cGAS KO megakaryocytes taken by confocal microscopy showing the localisation of P-STING (red), Tubulin (green) and chromatin (blue) showing an increase in P-STING fluorescence signal in WT megakaryocytes. (B-C) Quantification of P-STING intracellular foci (B) and of the

fluorescence intensity (C) for P-STING in WT megakaryocytes compare to cGAS KO each dot represents a single megakaryocyte image taken from n=2 biological replicates, graph shows data ± STD, and data were analysed by unpaired two-tailed t-tests, *** P≤0.001, ****p<0,00001. (D) Gene expression analysis of megakaryocytes treated with the STING inhibitor C176 for 48 h (500 nM 24 h and 1 uM 24 h) during differentiation showing a significant decrease in the expression levels of ISGs (*Ifit1, Rsad2, Ifitm3, Ccl5*), n=3 independent experiments in independent experiments. Graph shows data ± STD, and data were analysed by unpaired two-tailed t-tests, * p<0,05 ** P≤0.01). (E) Gene expression analysis of WT or cGAS KO megakaryocytes after differentiation showing a decrease in the expression levels of selected ISGs (*Ifit1 and Ccl5*). Data shown are from n=3 independent experiments. Data are shown as ± STD and were analysed by unpaired two-tailed t-tests, * p<0,05 ** P≤0.01).

cGAS is detected in platelets and produces cGAMP

In a subset of megakaryocytes, cGAS and STING were detected near the plasma membrane. This led us to investigate whether these proteins could be transferred to platelets. To test this idea, we cultured the megakaryocytes until we could detect the formation of proplatelets (usually four days). We were able to show that cGAS and STING were present in proplatelets using the B-Tubulin and CD41 markers (Figure 4A). These images prompted us to determine whether cGAS and STING could also be present in platelets. To test this, we isolated platelets from WT and cGAS$^{-/-}$ mice, depleted from contaminating leukocytes using CD45 negative selection. Protein analysis showed that both cGAS and STING are present in mouse platelets under physiological conditions, suggesting that inflammation is not necessary for their presence in platelets (Figure 4B). STING was detected in washed platelets by confocal immunofluorescence, in which we used the integrin CD41 to delineate the plasma membrane (Figure 4D). Unfortunately, cGAS signal was too weak and could not be detected above the background. However, when stimulated with DNA, platelets isolated from WT mice, but not from cGAS$^{-/-}$ mice produced a significant amount of cGAMP (Figure 4C), strongly supporting the presence and functionality of cGAS in platelets.

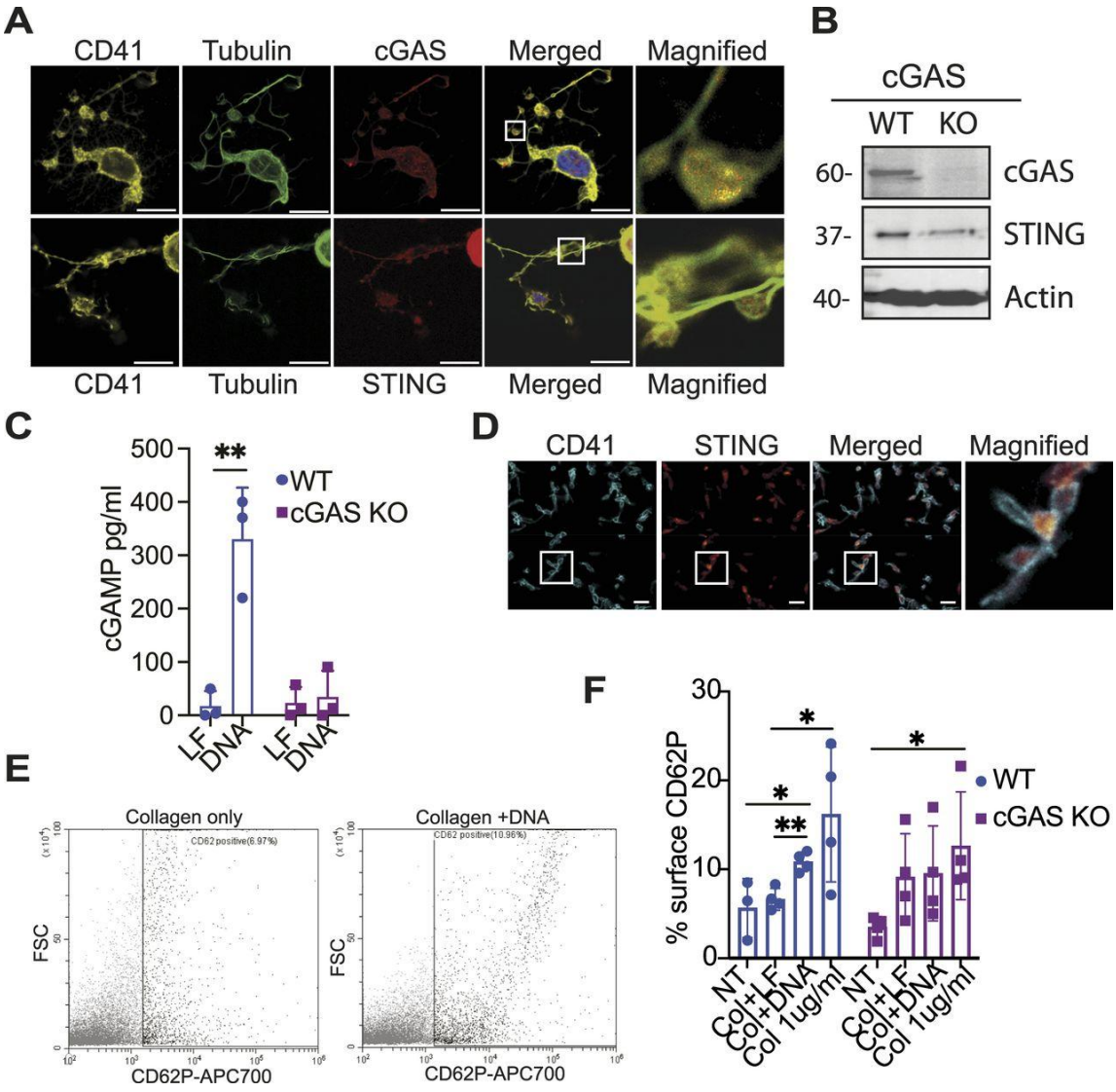


Figure 4- cGAS and STING stimulation potentiates the activation of platelets

(A) Representative immunofluorescence image of a megakaryocyte taken by confocal microscopy showing the localisation of CD41 (yellow), cGAS or STING (red), Tubulin (green) and chromatin (blue) in proplatelets. Images of megakaryocytes producing proplatelets were obtained from n=3 independent experiments (average of 5 images per experiment). Scale bars: 25µm. (B) Protein analysis by western blotting of murine platelets isolated from cGAS WT or KO mice. Representative of n=3 independent

experiments. (C) cGAMP production was measured from washed platelets isolated from WT or cGAS KO mice stimulated with DNA + Lipofectamine (DNA) or Lipofectamine only (LF) for 30 minutes prior to analysing their lysates by specific cGAMP ELISA. Data shown (data ± STD) are from n=3 biological replicates, each dot represents a single experiment and data were analysed by unpaired two-tailed t-tests, ** =P≤0.01. (D) Representative immunofluorescence images of mouse platelets taken by confocal microscopy showing the localisation of STING (red) and CD41 (blue), Images of platelets were obtained from n=2 independent experiments. Scale bars: 5µm. (E-F) Flow cytometry analysis of CD62P surface expression on platelets isolated from WT and cGAS KO mice, stimulated with collagen alone or in combination with DNA. Collagen 1 µg/ml was used as a positive control. Platelets were first gated on FSC, SSC and CD41 prior to the analysis of CD62P surface expression. Data are presented as % of platelets with CD62P above the unstimulated control. (F) Data shown are from n=4 independent experiments, each dot represents a single experiment, and data were analysed by unpaired two-tailed t-tests, *P≤0.05; (E) Representative dot plot of CD62P expression levels for WT platelets.

cGAS activation of washed platelets potentiates their activation

Given that platelets are anucleate, they are not capable of activating the canonical STING-IFN-I signalling in the presence of cGAMP. To investigate whether cGAS and STING stimulation could activate platelets, we relied on the analysis of the platelet activation and degranulation marker P-selectin (CD62P) [39]. Using washed platelets isolated from WT and cGAS$^{-/-}$ mice, we measured the level of P-selectin at the surface of platelets stimulated with DNA using flow cytometry. DNA alone could not induce translocation of P-selectin at the cell surface. However, when used in combination with a sub-threshold concentration of collagen, DNA stimulation significantly increased the level of P-Selectin at the platelets surface of WT compared to cGAS$^{-/-}$ platelets (Figure 4E and F), suggesting a synergistic effect.

cGAS and STING stimulation potentiates human platelets aggregation.

We investigated whether the activation of platelets by cGAS or STING was conserved between mice and humans, and could lead to platelets aggregation. To test this effect, we isolated platelets from healthy volunteers and confirmed the

presence of cGAS and STING by western blotting using washed platelets (Figure 5A and B). We next assessed the capacity of human platelets to aggregate by using different concentrations of collagen, with 1 ug/ml being sufficient to reach maximum aggregation (Figure 5D). In similarity to murine platelets, neither DNA, nor cGAMP alone could induce platelet aggregation. However, when using a sub-threshold concentration of collagen in combination with DNA or cGAMP, it led to a rapid aggregation of platelets (Figure 5C and 5D). Taken together, these results support a new role for the cGAS-STING pathway in the biology of platelets.

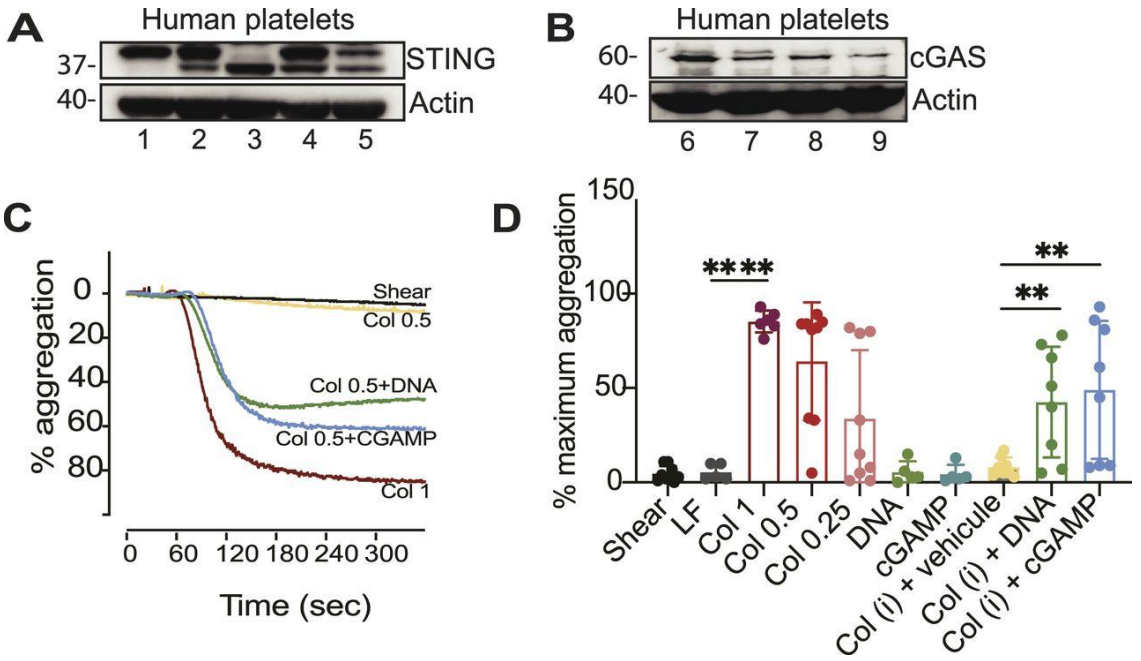


Figure 5- cGAS and STING stimulation potentiates the aggregation of human platelets

(A-B) Protein analysis by western blotting of human platelets taken from 5 donors (lanes 1 to 5) for STING and 4 donors (lanes 6 to 7) for cGAS. (C-D) Human platelets aggregation following treatment with type-I collagen (1, 0,5 or 0,25 ug/ml), DNA, cGAMP and vehicle alone (Lipofectamine); to test the capacity of DNA or cGAMP to potentiate aggregation, a sub-threshold dose of collagen was determined individually for each patient (col (i)) and used in combination with vehicle, DNA or cGAMP. Representative aggregation curves for 1 donor (C). Analysis of the maximum aggregation percentage for all donors (D) Data shown are from n= 8 donors (the data from 2 donors

were excluded based on our incapacity to obtain a sub-threshold dose of collagen to perform the potentiation experiment, graph shows data ± STD and unpaired two-tailed t-tests, ** P≤0.01 **** p<0,0001.

Discussion

This study is, to our knowledge, the first to report that megakaryocytes possess a functional cGAS-STING pathway. This is also the first demonstration that stimulation of the cGAS activates platelets and potentiates their aggregation. Our findings define a novel and non-canonical function for the cGAS-STING pathway.

Using both a pharmacological inhibitor of STING and the genetic depletion of cGAS, we discovered that STING activation using DMXAA results in the activation of ISGs. In contrast, we found that DNA stimulation of megakaryocytes did not stimulate this response. This could be attributed to similar mechanisms to what was reported for the inhibition of cGAS during mitosis [27, 28, 40-42]. We observed a difference on the level of P-STING between WT and cGAS$^{-/-}$ megakaryocytes, and measured a reduction of ISGs in megakaryocytes treated with the STING inhibitor C176 suggesting that there is a basal activation of STING signalling, which was also confirmed using WT and cGAS$^{-/-}$ megakaryocytes. The fact that we detected P-STING punctates in cGAS$^{-/-}$ megakaryocytes, although to lower extent, suggests that other cGAS-independent mechanisms might be at play. In fact, in cancer cells treated with the DNA damage agent etoposide, nuclear STING activation requires the DNA repair proteins; ataxia telangiectasia mutated (ATM), and poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1), and requires interferon-inducible protein 16 (IFI16), but not cGAS [43]. Nonetheless, our results using cGAS$^{-/-}$ megakaryocytes still suggest that cGAS is basally activated in megakaryocytes. Whereas the endogenous causes of the increase in DNA damage remain to be defined, one possible explanation is an increase in mitochondrial ROS, as suggested by a recent study [44]. Whether these mtROS

cause DNA damage and contribute to the translocation of cGAS will need further investigation, but our data supports this idea.

Megakaryocytes are also located in the lung vasculature, where they contribute to the production of a pool of blood platelets [1]. In this study, we selectively characterised megakaryocytes from the bone marrow, but lung-megakaryocytes have been suggested to act like antigen presenting cells [45, 46]. As such, we could expect cGAS and STING proteins to share a more cytosolic localisation to rapidly alert the cells of invading pathogens [47]. In line with that, it was recently shown that SARS-CoV2 RNA has been detected in lung megakaryocytes [48], and that elevated levels of lung megakaryocytes correlates with severe COVID-19 pathology [49]. Given that the cGAS-STING pathway contributes to the antiviral response against RNA viruses, including against SARS-COV2 [50-52], it would be interesting to determine whether cGAS is involved in the antiviral response of lung-megakaryocytes. Accordingly, a study reported that megakaryocytes infections by Dengue and Influenza viruses does induce a protective type-I IFN [53].

Besides their role in megakaryocytes, our study also reports for the first time that human and mouse platelets possess both cGAS and STING proteins. In our image analysis, we could indeed detect cGAS and STING in proplatelets. How these proteins traffic from megakaryocytes to reach the site of platelets generation is still not defined. STING is a transmembrane protein that is located at the endoplasmic reticulum and transits through the trans-Golgi, before being degraded into lysosomes or recycled after its activation [32, 54]. Based on that, one could easily envision a model in which STING use the trans-Golgi network and multivesicular bodies similarly to other membrane-associated receptors such as P-selectin or to the von Willebrand factor (VWF) found in alpha granules [55]. While we were revising our manuscript, a new study showed that STING in platelets

associates with the SNARE complex to regulate the secretion of alpha granules [18].

We have also discovered an unexpected role for cGAS and STING proteins in platelets. Our results show that cGAS and STING stimulation potentiates platelets activation and aggregation. Interestingly, aspirin, an inhibitor of platelet functions, also suppresses cGAS activity [56]. When activated, platelets release the content of their granules, which include inflammatory molecules, adhesion proteins, serotonin, and small nucleotides [55]. A similar priming effect to sub-threshold concentrations of classical platelet agonists was reported for TLR9, another DNA receptor [57]. However, it was later reported that platelets from TLR9 KO mice still aggregate when stimulated with CpG-dinucleotides and collagen, suggesting that at least another receptor is involved in DNA sensing [57]. Our study suggest that this receptor is cGAS, but more experiments are needed to confirm this hypothesis. Together, these studies suggest that DNA stimulation of platelets contributes to both inflammation and clotting.

One of the important questions raised by our study is the biological contexts allowing cGAS and STING stimulation. As discussed above, the recent study reported that one of these contexts is severe sepsis for which STING in platelets contributes to the pathological thromboinflammation [18]. Further analysis would be necessary to determine whether this activity is cGAS dependant. In this study, they also show that cGAMP could be detected in the platelets of septic mice. Given that our data suggest that platelets can produce cGAMP, it would be interesting to determine whether cGAMP is produced by cGAS from platelets or is uptake from the extracellular environment.

To get activated, platelets-cGAS and -STING would need to be in direct contact with DNA or with cGAMP. Direct activation of STING could occur during platelets infections of bacteria producing cyclic dinucleotides, or by viruses that engage the cGAS-STING pathway such as *Staphylococcus aureus* or HIV [58, 59].

Platelets are also known to endocytose molecules from their extracellular environment. Whether the endocytosed molecules could reach cGAS or STING would however need to be investigated. If possible, inflammatory contexts leading to the release of cellular content, such as infected cells that rupture [60] and circulating free DNA during sepsis [61], could lead to cGAS-STING activation in platelets and contribute to hypercoagulopathy. We also need to emphasise that STING activation in endothelial cells was reported in the context of severe COVID-19, in which high levels of activated platelets are present [62]. The outcome of activated platelets interacting with cGAMP-producing endothelial cells remains however to be determined. We can also foresee that platelets will be able to directly uptake extracellular cGAMP, as shown for antigen presenting cells [63, 64]. Conversely, a scenario in which cGAMP from platelets is transferred to interacting immune cells through protein channels like LRRC8 can also be envisioned [65]. In view of the many outcome resulting from STING activation, we could expect platelets cGAMP to modulate antigen presentation [66], autophagy [67], inflammatory response responses [68], and even cell death [69] in interacting cells.

In summary, we report for the first time that megakaryocytes and platelets possess a functional cGAS-STING pathway. We have identified a novel role for cGAS and STING in platelets, conserved in humans and mice. Taken together, these observations support a model in which STING activation in platelets potentiates activation and coagulation. This model could contribute to microbial clearance during acute immune responses but may also underpin tissue damage and hypercoagulopathy during uncontrolled immune responses, as seen during sepsis [18]. Given the growing contribution of megakaryocyte and platelets in immune responses, our findings pave the way to important research avenues.

Materials and Methods

Mice

The animal protocol was approved by the institutional review board protocol (*Université du Québec à Trois-Rivieres* (CBSA- ethic certificate 2021-G.P.1) and guidelines of the Canadian Council on Animal Care were followed. For our studies, we used male and female 8- to 14-week-old C57BL/6J wild type and cGAS$^{-/-}$ mice (B6(C)-Cgastm1d(EUCOMM)Hmgu/J; Jackson Laboratories). Mice were housed in a pathogen free environment. Mice were sex- and age- matched when directly compared. Blood was collected on mice anesthetized with isoflurane and bones were collected after cervical dislocation.

Megakaryocytes purification and culture

Bone marrow cells were obtained by flushing with DMEM the inside of bones (iliac crest, femurs, and tibiae from both legs of the mice) and centrifuged at 300g for 10 minutes at 4ºC and resuspended in 1mL of isolation buffer (phosphate-buffered saline 1x sterile (PBS), pH 7.2, 0.5% bovine serum albumin (BSA) (*BioTech*) and 2mM EDTA). The cells were centrifuged again at 300g for 10 minutes at 4ºC and resuspended in 90µL of isolation buffer. To isolate CD41^{+} cells, 10µL of FcR Blocking reagent (*Miltenyi Biotec*) was added to the cell suspension for 10 minutes at 4ºC. Cells were then labelled with 10 µL anti-CD41 antibody (coupled to Biotin or APC-*Miltenyi Biotec*) for 10 minutes at 4ºC, then washed with 2 mL of isolation buffer and centrifuged at 300g for 10 min. at 4ºC, twice prior to the addition of 20µL of Anti-Biotin/APC Microbeads (*Miltenyi Biotec*) and 70 µL of isolation buffer for 15 minutes at 4ºC. The cells were washed as described before and resuspended in 5 mL of isolation buffer solution. Then positive selection was carried out using large column cells according to the manufacturer protocol (*Miltenyi Biotec*). Finally, CD41^{+} cells were resuspended in growth medium

(DMEM medium with 4.5g/L Glucose, L-glutamine supplementation, and sodium pyruvate additive accompanied with 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum and 1% antimycotic antimycin) supplemented with 50 ng/mL of thrombopoietin and grown for 3-5 days at 37 °C in a 5% CO_2 and 95% air humidified incubator. When needed, cells were stimulated with 2μg/ml of a 70 nucleotides synthetic dsDNA hereafter refer to as DNA (unless mentioned otherwise) or 2μg/ml of cGAMP complexed with Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) with a ration of 1:0.5 in FBS free Medium (Optimem (1x) with HEPES additive, 2.4g/L sodium bicarbonate and L-glutamine supplementation (*Gibco*)) or with the murine STING agonist DMXAA at 20 μg/ml. For flow cytometry cell sorting, bone marrow cells were obtained as described above. Lineage cells were depleted using the Direct Lineage Cell Depletion Kit for mouse (Miltenyi Biotec # 130-110-470) according to the manufacturer protocol and the lineage negative cells were incubated for 48h in DMEM medium with 4.5g/L Glucose, L-glutamine supplementation, and sodium pyruvate additive accompanied with 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum and 1% antimycotic antimycin) supplemented with 50 ng/mL of thrombopoietin. Prior to the sort, cells were stained using CD41-VB515 130-122-768 and CD42b-PE clone 1C2 eBioscience™ 50245268 on a Melody cell sorter (BD) using a 100 μm nozzle on purity mode. Around 10 000 cells per mouse were recovered, and three mice per experiment were used.

Platelets isolation (mouse)

Blood was collected from the mice from the inferior *vena cava* (IVC) with a 25-gauge needle and a 1mL syringe containing 100 µl of 3.8% sodium citrate (3.22% citrate, 112.9 mM citrate, 123.6 mM glucose, 224.4 mM sodium and 114.2 mM hydrogen ions) as anticoagulant, and subsequently transferred to a 1.7ml microcentrifuge and gently inverted several times to ensure proper mixing. The blood solution was then diluted with 1:1 with PBS centrifuged at 130 g for 15

minutes at room temperature. All centrifugations were carried out without a brake and with low acceleration mode. Two thirds of the upper layer consisting of platelet rich plasma (PRP) was transferred to another 1.7ml microcentrifuge tube which was centrifuged at 130 g for 5 minutes to remove leucocyte contamination. This step was repeated and the supernatant was transferred to a new 1.7ml microcentrifuge and centrifuged at 1000g for 10 minutes with 100µl of 3.8% sodium citrate to pellet the platelets. Platelets were then resuspended in 90µL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) pH 6.4 and 5mM EDTA or Tyrode's buffer pH 7.35-7.4 depending on the experiment. To deplete residual contaminating leucocytes, 10µL of Biotinylated CD45 anti-mouse antibody (*Miltenyi Biotec*) was added to the platelets solution and incubated for 10 minutes at room temperature. The platelet solution was then submitted to negative selection by placing the tube on a magnet to bind the $CD45^+$ cells. The supernatant containing the platelets was then transferred to a new 1.7ml microcentrifuge tube and centrifuged for 1000g for 10 minutes to pellet the platelets without leucocyte contamination (platelets purity analysed by FACS was between 97-98%). Platelets were then resuspended in HBSS with 5mM EDTA 6.4 pH or in Tyrode's buffer for experimentations. When needed, mouse platelets were stimulated with 5µg/ml DNA and with 0,25 to 1 µg/ml Type-I collagen (*Chronolog inc*).

FACS

To measure the surface level of CD62P (P-Selectin), washed platelets were stimulated at 37°C under agitation with the indicated agonist for 30 minutes prior to adding the collagen for 15 minutes. Platelets were then stained with the anti-CD41-BV515 and anti-CD62P-R718 antibodies before being fixed for 15 minutes using 4% PFA, washed and analysed using a Beckman Cytoflex Cell analyser (4 lasers). 20 000 events were analysed per sample per condition. Results were analysed using the company software CytExpert (Beckman).

Platelets isolation (human)

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute (#2017-2154) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Participants were considered healthy if they were aged 18 years or older, did not require long-term medical therapy, had refrained from drugs known to influence platelet function in the previous 2 weeks, had not undergone major surgery in the previous 6 months, did not have a history of bleeding symptoms, and had platelet counts and hemoglobin levels within the normal reference range. Informed consent was obtained from each participant. Blood was drawn by venipuncture into syringes containing acid citrate dextrose (ACD-A, DIN: 00788139) in a 1:5 volume ratio (ACD/blood). Blood was transferred to 50mL-tubes, centrifuged at 200 g for 10 min without a brake, and PRP was collected. Prostaglandin E1 (1 µM) was added to PRP prior to centrifugation at 1000 g for 10 min. Plasma was removed and discarded. Pelleted platelets were resuspended in Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 11.9 mM $NaHCO_3$, 0.4 mM NaH_2PO_4, 2.7 mM KCl, 1.1 mM $MgCl_2$, 5.6 mM glucose, pH 7.4). Platelet counts were determined using a Beckman Coulter hematology analyzer (DxH 520) and adjusted to a final concentration of 2.5 x 10^8/mL. Platelets were allowed to rest at room temperature for 60 min prior to functional experiments.

Light transmission aggregometry

Platelet aggregation was measured using a Chronolog aggregometer (Model 700, Havertown, PA, USA) at 37 °C with continuous stirring at 1200 rpm. Platelet aggregation traces were recorded for 30 minutes using the AGGRO/LINK®8 Software package. Collagen (Chronolog) 0.06-1 µg/ml, was used to stimulate platelet. When specified, washed platelets were pre-incubated with DNA (2µg/ml),

cGAMP (2μg/ml) complexed with Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) with a ratio of 1:0.5 in FBS-free Medium (Optimem (1x) with HEPES additive, 2.4g/L sodium bicarbonate and L-glutamine supplementation (*Gibco*)), or vehicle for 30 min at room temperature.

Gene expression analysis

RNA was extracted from cell lysed with RLT lysis buffer using RNeasy Micro Kit (*Qiagen*) and according to the manufacturer protocol. RNA was reverse transcribed using Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse. Quantitative PCR reaction was performed using SensiFAST SYBR No-ROX Kit (*Bioline*) and specific primers for genes of interest were used (Table S1). QPCR was performed in an iCycler (*Bio-Rad*) qPCR instrument. Results were normalized on the housekeeping gene TBP and 18S using the ddCT method.

ELISA

mIFNB was measured from the supernatant of cells stimulated for 5 hours with DMXAA using the mouse IFN-beta Quantikine ELISA kit (*R&D Sytems*) according to the manufacturer protocol. mCcl5 was measured from the supernatant of cells stimulated for 24 hours with DMXAA using the mouse mCcl5 ELISA kit (*R&D Sytems*) according to the manufacturer protocol. cGAMP ELISA was performed using specific cGAMP specific ELISA (*Cayman*) on either cell lysates or platelets supernatants following 1 hour of stimulation with DNA according to the manufacturer protocol. For platelets stimulation, C176 was added at a concentration of 1μM for 30 minutes prior to DNA stimulation.

Microscopy

For live cell imaging of megakaryocytes, an Optika inverted trinocular LED fluorescence microscope was used. For fixed cells analysis, cells were prepared as followed. Platelets were isolated, fixed with PFA 4% for 10 minutes and added on coverslips. For megakaryocytes confocal imaging, CD41+ cells were grown and differentiated directly on coverslip for 1 to 4 days depending on the experiment. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Cells (not platelets) were permeabilized using 0.2% Triton in PBS 1X. Permeabilized cells or platelets were incubated in blocking solution (0.1% Triton with 1% BSA in PBS 1X) for 15 minutes prior to their incubation with specific antibodies. Coverslips were mounted on slides with ProLong™ Gold Antifade mounting reagent (*ThermoFisher*). DAPI was used to stain the DNA of megakaryocytes. Images were taken using a Leica SP8 laser scanning fluorescence confocal and analysed with the LAS X software from Leica.

Statistical analyses. Statistical analyses were carried out using Prism 7 (GraphPad Software Inc.). Two-tailed unpaired T- tests were used to compare pairs of conditions. Symbols used: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

Acknowledgments

We thank Dr Stephane Chappaz and Dr Kate McArthur for help with initial experiments; Melodie B. Plourde for training students on the instruments; and Natacha Merindol for help with the FACS.

Conflict of interest

ML has received speaker honoraria from Bayer and JAMP pharma; has received research grants to the institution from Idorsia; has served on a national advisory board for Servier and JAMP Pharma; and has received in-kind support for investigator-initiated grants from Fujimori Kogyo. There are no other conflicts of interest to disclose.

Funding

This research was supported by the *Université du Québec à Trois-Rivières*; the *Fonds de Recherche du Québec (FRQ-NT) – Nature et technologie* (266767 to GP); the *John Evans Leader Canadian Foundation for Innovation* (40780 to GP) and the *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada* (RGPIN-2022-04349 to GP); ML is a Canada Research Chair in Platelets as biomarkers and vectors (950-232706).

License: This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at https://creativecommons.org/ licenses/by/4.0/).

References

1. Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. **The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors**. *Nature 2017*; 544(7648):105–109.https://doi.org/10.1038/nature21706
2. Tokarz-Deptula B, Palma J, Baraniecki L, Stosik M, Kolacz R, Deptula W. **What Function Do Platelets Play in Inflammation and Bacterial and Viral Infections?** *Front Immunol 2021*; 12:770436.https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.770436
3. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, Semple JW. **The Immune Nature of Platelets Revisited**. *Transfus Med Rev 2020*; 34(4):209–220.https://doi.org/10.1016/j.tmrv.2020.09.005
4. Ebermeyer T, Cognasse F, Berthelot P, Mismetti P, Garraud O, Hamzeh-Cognasse H. **Platelet Innate Immune Receptors and TLRs: A Double-Edged Sword**. *Int J Mol Sci 2021*; 22(15).https://doi.org/10.3390/ijms22157894
5. Fiedel BA, Schoenberger JS, Gewurz H. **Modulation of platelet activation by native DNA**. *J Immunol 1979*; 123(6):2479–2483
6. Jansen MP, Emal D, Teske GJ, Dessing MC, Florquin S, Roelofs JJ. **Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps**. *Kidney Int 2017*; 91(2):352–364.https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.006
7. Civril F, Deimling T, de Oliveira Mann CC, Ablasser A, Moldt M, Witte G, et al. **Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS**. *Nature 2013*; 498(7454):332–337.https://doi.org/10.1038/nature12305
8. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. **Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway**. *Science 2013*; 339(6121):786–791.https://doi.org/10.1126/science.1232458
9. Guey B, Ablasser A. **Emerging dimensions of cellular cGAS-STING signaling**. *Curr Opin Immunol 2022*; 74:164–171.https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.01.004
10. Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA. **DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease**. *Nat Rev Genet 2019*; 20(11):657–674.https://doi.org/10.1038/s41576-019-0151-1
11. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. **Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA**. *Science 2013*; 339(6121):826–830.https://doi.org/10.1126/science.1229963
12. Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Rohl I, et al. **cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING**. *Nature 2013*; 498(7454):380–384.https://doi.org/10.1038/nature12306

13. Gao P, Ascano M, Zillinger T, Wang W, Dai P, Serganov AA, et al. **Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA**. *Cell 2013*; 154(4):748–762.https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.023
14. Ahn J, Ruiz P, Barber GN. **Intrinsic self-DNA triggers inflammatory disease dependent on STING**. *J Immunol 2014*; 193(9):4634–4642.https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401337
15. Gao P, Ascano M, Wu Y, Barchet W, Gaffney BL, Zillinger T, et al. **Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase**. *Cell 2013*; 153(5):1094–1107.https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.046
16. Wu J, Dobbs N, Yang K, Yan N. **Interferon-Independent Activities of Mammalian STING Mediate Antiviral Response and Tumor Immune Evasion**. *Immunity 2020*; 53(1):115–126 e115.https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.009
17. Zhang H, Zeng L, Xie M, Liu J, Zhou B, Wu R, et al. **TMEM173 Drives Lethal Coagulation in Sepsis**. *Cell Host Microbe 2020*; 27(4):556–570 e556.https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.004
18. Yang M, Jiang H, Ding C, Zhang L, Ding N, Li G, et al. **STING activation in platelets aggravates septic thrombosis by enhancing platelet activation and granule secretion**. *Immunity 2023*.https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.02.015
19. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. **Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow**. *Science 2007*; 317(5845):1767–1770.https://doi.org/10.1126/science.1146304
20. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, Le Couedic JP, Norol F, Larsen AK, et al. **Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis**. *Blood 1998*; 91(10):3711–3723
21. Potts KS, Farley A, Dawson CA, Rimes J, Biben C, de Graaf C, et al. **Membrane budding is a major mechanism of in vivo platelet biogenesis**. *J Exp Med 2020*; 217(9).https://doi.org/10.1084/jem.20191206
22. Nuhrenberg TG, Stockle J, Marini F, Zurek M, Gruning BA, Benes V, et al. **Impact of high platelet turnover on the platelet transcriptome: Results from platelet RNA-sequencing in patients with sepsis**. *PLoS One 2022*; 17(1):e0260222.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260222
23. Manne BK, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, et al. **Platelet gene expression and function in patients with COVID-19**. *Blood 2020*; 136(11):1317–1329.https://doi.org/10.1182/blood.2020007214
24. Campbell RA, Manne BK, Banerjee M, Middleton EA, Ajanel A, Schwertz H, et al. **IFITM3 regulates fibrinogen endocytosis and platelet reactivity in nonviral sepsis**. *J Clin Invest 2022*; 132(23).https://doi.org/10.1172/JCI153014
25. Su M, Chen C, Li S, Li M, Zeng Z, Zhang Y, et al. **Gasdermin D-dependent platelet pyroptosis exacerbates NET formation and inflammation in severe**

sepsis. *Nat Cardiovasc Res 2022*; 1(8):732–747.https://doi.org/10.1038/s44161-022-00108-7
26. Prantner D, Perkins DJ, Lai W, Williams MS, Sharma S, Fitzgerald KA, et al. **5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) activates stimulator of interferon gene (STING)-dependent innate immune pathways and is regulated by mitochondrial membrane potential**. *J Biol Chem 2012*; 287(47):39776–39788.https://doi.org/10.1074/jbc.M112.382986
27. Helbling-Leclerc A, Garcin C, Rosselli F. **Beyond DNA repair and chromosome instability-Fanconi anaemia as a cellular senescence-associated syndrome**. *Cell Death Differ 2021*; 28(4):1159–1173.https://doi.org/10.1038/s41418-021-00764-5
28. Zhong L, Hu MM, Bian LJ, Liu Y, Chen Q, Shu HB. **Phosphorylation of cGAS by CDK1 impairs self-DNA sensing in mitosis**. *Cell Discov 2020*; 6:26.https://doi.org/10.1038/s41421-020-0162-2
29. Volkman HE, Cambier S, Gray EE, Stetson DB. **Tight nuclear tethering of cGAS is essential for preventing autoreactivity**. *Elife 2019*; 8.https://doi.org/10.7554/eLife.47491
30. Crescente M, Pluthero FG, Li L, Lo RW, Walsh TG, Schenk MP, et al. **Intracellular Trafficking, Localization, and Mobilization of Platelet-Borne Thiol Isomerases**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol 2016*; 36(6):1164–1173.https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307461
31. Srikanth S, Woo JS, Wu B, El-Sherbiny YM, Leung J, Chupradit K, et al. **The Ca(2+) sensor STIM1 regulates the type I interferon response by retaining the signaling adaptor STING at the endoplasmic reticulum**. *Nat Immunol 2019*; 20(2):152–162.https://doi.org/10.1038/s41590-018-0287-8
32. Mukai K, Konno H, Akiba T, Uemura T, Waguri S, Kobayashi T, et al. **Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi**. *Nat Commun 2016*; 7:11932.https://doi.org/10.1038/ncomms11932
33. Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. **Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei**. *Nature 2017*; 548(7668):466–470.https://doi.org/10.1038/nature23470
34. Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ, et al. **cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity**. *Nature 2017*; 548(7668):461–465.https://doi.org/10.1038/nature23449
35. Gluck S, Guey B, Gulen MF, Wolter K, Kang TW, Schmacke NA, et al. **Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence**. *Nat Cell Biol 2017*; 19(9):1061–1070.https://doi.org/10.1038/ncb3586
36. Dou Z, Ghosh K, Vizioli MG, Zhu J, Sen P, Wangensteen KJ, et al. **Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer**. *Nature 2017*; 550(7676):402–406.https://doi.org/10.1038/nature24050

37. Haag SM, Gulen MF, Reymond L, Gibelin A, Abrami L, Decout A, et al. **Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors**. *Nature 2018*; 559(7713):269–273.https://doi.org/10.1038/s41586-018-0287-8
38. Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, Gainey MD, Shrestha B, Eitson JL, et al. **Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity**. *Nature 2014*; 505(7485):691–695.https://doi.org/10.1038/nature12862
39. Kappelmayer J, Nagy B, Jr. **The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression**. *Biomed Res Int 2017*; 2017:6138145.https://doi.org/10.1155/2017/6138145
40. Boyer JA, Spangler CJ, Strauss JD, Cesmat AP, Liu P, McGinty RK, et al. **Structural basis of nucleosome-dependent cGAS inhibition**. *Science 2020*; 370(6515):450–454.https://doi.org/10.1126/science.abd0609
41. Michalski S, de Oliveira Mann CC, Stafford CA, Witte G, Bartho J, Lammens K, et al. **Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin**. *Nature 2020*; 587(7835):678–682.https://doi.org/10.1038/s41586-020-2748-0
42. Zhao B, Xu P, Rowlett CM, Jing T, Shinde O, Lei Y, et al. **The molecular basis of tight nuclear tethering and inactivation of cGAS**. *Nature 2020*; 587(7835):673–677.https://doi.org/10.1038/s41586-020-2749-z
43. Dunphy G, Flannery SM, Almine JF, Connolly DJ, Paulus C, Jonsson KL, et al. **Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-kappaB Signaling after Nuclear DNA Damage**. *Mol Cell 2018*; 71(5):745–760 e745.https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.034
44. Poirault-Chassac S, Nivet-Antoine V, Houvert A, Kauskot A, Lauret E, Lai-Kuen R, et al. **Mitochondrial dynamics and reactive oxygen species initiate thrombopoiesis from mature megakaryocytes**. *Blood Adv 2021*; 5(6):1706–1718.https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002847
45. Pariser DN, Hilt ZT, Ture SK, Blick-Nitko SK, Looney MR, Cleary SJ, et al. **Lung megakaryocytes are immune modulatory cells**. *J Clin Invest 2021*; 131(1).https://doi.org/10.1172/JCI137377
46. Yeung AK, Villacorta-Martin C, Hon S, Rock JR, Murphy GJ. **Lung megakaryocytes display distinct transcriptional and phenotypic properties**. *Blood Adv 2020*; 4(24):6204–6217.https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002843
47. Barnett KC, Coronas-Serna JM, Zhou W, Ernandes MJ, Cao A, Kranzusch PJ, et al. **Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA**. *Cell 2019*; 176(6):1432–1446 e1411.https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.049
48. Shen S, Zhang J, Fang Y, Lu S, Wu J, Zheng X, et al. **SARS-CoV-2 interacts with platelets and megakaryocytes via ACE2-independent mechanism**. *J Hematol Oncol 2021*; 14(1):72.https://doi.org/10.1186/s13045-021-01082-6

49. Bernardes JP, Mishra N, Tran F, Bahmer T, Best L, Blase JI, et al. **Longitudinal Multi-omics Analyses Identify Responses of Megakaryocytes, Erythroid Cells, and Plasmablasts as Hallmarks of Severe COVID-19**. *Immunity 2020*; 53(6):1296–1314 e1299.https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.017
50. Sun B, Sundstrom KB, Chew JJ, Bist P, Gan ES, Tan HC, et al. **Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA**. *Sci Rep 2017*; 7(1):3594.https://doi.org/10.1038/s41598-017-03932-1
51. Sridharan A, Chen Q, Tang KF, Ooi EE, Hibberd ML, Chen J. **Inhibition of megakaryocyte development in the bone marrow underlies dengue virus-induced thrombocytopenia in humanized mice**. *J Virol 2013*; 87(21):11648–11658.https://doi.org/10.1128/JVI.01156-13
52. Domizio JD, Gulen MF, Saidoune F, Thacker VV, Yatim A, Sharma K, et al. **The cGAS-STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19**. *Nature 2022*; 603(7899):145–151.https://doi.org/10.1038/s41586-022-04421-w
53. Campbell RA, Schwertz H, Hottz ED, Rowley JW, Manne BK, Washington AV, et al. **Human megakaryocytes possess intrinsic antiviral immunity through regulated induction of IFITM3**. *Blood 2019*; 133(19):2013–2026.https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-873984
54. Lepelley A, Martin-Niclos MJ, Le Bihan M, Marsh JA, Uggenti C, Rice GI, et al. **Mutations in COPA lead to abnormal trafficking of STING to the Golgi and interferon signaling**. *J Exp Med 2020*; 217(11).https://doi.org/10.1084/jem.20200600
55. Chen Y, Yuan Y, Li W. **Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from alpha-granules**. *Biosci Rep 2018*; 38(5).https://doi.org/10.1042/BSR20180458
56. Dai J, Huang YJ, He X, Zhao M, Wang X, Liu ZS, et al. **Acetylation Blocks cGAS Activity and Inhibits Self-DNA-Induced Autoimmunity**. *Cell 2019*; 176(6):1447–1460 e1414.https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.016
57. Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H, et al. **T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling**. *J Cell Biol 2012*; 198(4):561–574.https://doi.org/10.1083/jcb.201111136
58. Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. **Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation**. *Blood 2002*; 99(11):4021–4029.https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0191
59. Corrigan RM, Abbott JC, Burhenne H, Kaever V, Grundling A. **c-di-AMP is a new second messenger in Staphylococcus aureus with a role in controlling cell size and envelope stress**. *PLoS Pathog 2011*; 7(9):e1002217.https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002217
60. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. **Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death**. *Cell Mol Immunol 2021*; 18(5):1106–1121.https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3

61. Margraf S, Logters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. **Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis**. *Shock 2008*; 30(4):352–358.https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31816a6bb1
62. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, Teixeira L, Barreto EA, Pao CRR, et al. **Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19**. *Blood 2020*; 136(11):1330–1341.https://doi.org/10.1182/blood.2020007252
63. Pepin G, De Nardo D, Rootes CL, Ullah TR, Al-Asmari SS, Balka KR, et al. **Connexin-Dependent Transfer of cGAMP to Phagocytes Modulates Antiviral Responses**. *mBio 2020*; 11(1).https://doi.org/10.1128/mBio.03187-19
64. Ahn J, Xia T, Rabasa Capote A, Betancourt D, Barber GN. **Extrinsic Phagocyte-Dependent STING Signaling Dictates the Immunogenicity of Dying Cells**. *Cancer Cell 2018*; 33(5):862–873 e865.https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.027
65. Zhou C, Chen X, Planells-Cases R, Chu J, Wang L, Cao L, et al. **Transfer of cGAMP into Bystander Cells via LRRC8 Volume-Regulated Anion Channels Augments STING-Mediated Interferon Responses and Anti-viral Immunity**. *Immunity 2020*; 52(5):767–781 e766.https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.016
66. Wang H, Hu S, Chen X, Shi H, Chen C, Sun L, et al. **cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade**. *Proc Natl Acad Sci U S A 2017*; 114(7):1637–1642.https://doi.org/10.1073/pnas.1621363114
67. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. **Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response**. *Proc Natl Acad Sci U S A 2009*; 106(49):20842–20846.https://doi.org/10.1073/pnas.0911267106
68. Anastasiou M, Newton GA, Kaur K, Carrillo-Salinas FJ, Smolgovsky SA, Bayer AL, et al. **Endothelial STING controls T cell transmigration in an IFNI-dependent manner**. *JCI Insight 2021*; 6(15).https://doi.org/10.1172/jci.insight.149346
69. Gulen MF, Koch U, Haag SM, Schuler F, Apetoh L, Villunger A, et al. **Signalling strength determines proapoptotic functions of STING**. *Nat Commun 2017*; 8(1):427.https://doi.org/10.1038/s41467-017-00573-w

Supplementary Figures

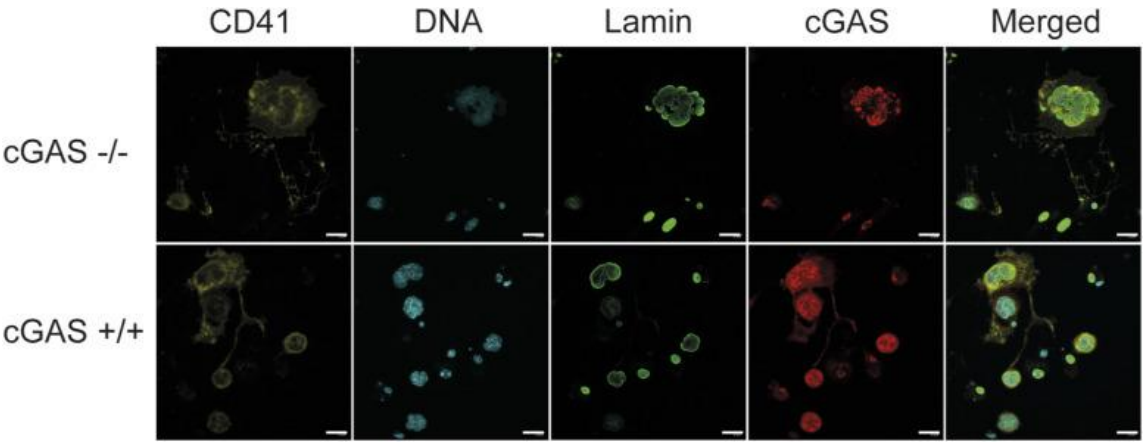


Figure S1: Validation of cGAS presence in proplatelets.

Confocal images showing the presence of cGAS (red) in proplatelets of WT megakaryocytes and not in cGAS KO megakaryocytes. Megakaryocytes were stained with the cGAS antibody (rabbit anti-cGAS, D3080, Cat #531659S, dilution 1/500; Cell Signaling). Scale bars: 20 µm.

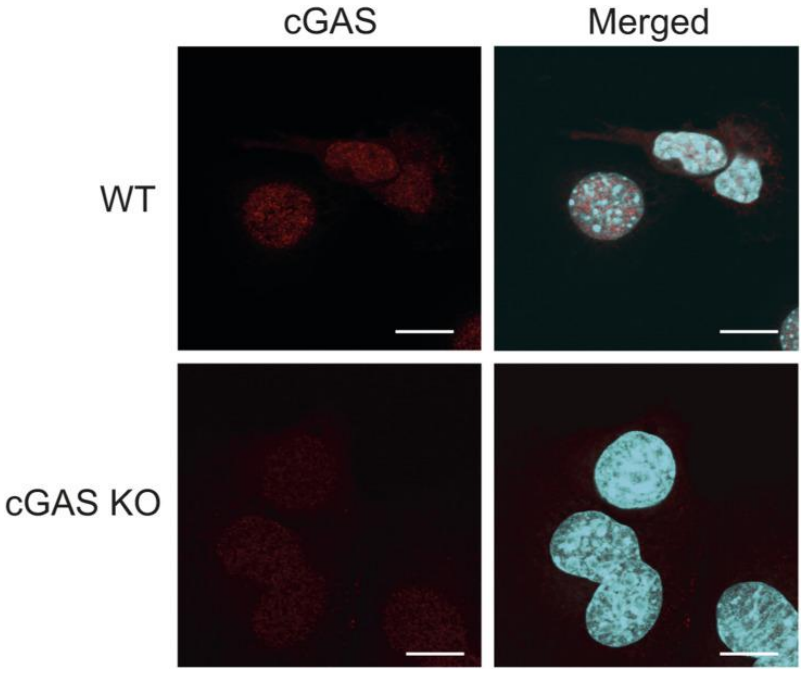


Figure S2: Validation of cGAS antibody.

Confocal images showing the specificity of cGAS antibody. Mouse embryonic fibroblasts (WT or cGAS KO) were stained with the cGAS antibody (rabbit anti-cGAS, D3080, Cat #31659S, dilution 1/500; Cell Signaling). DNA was stained using DAPI. Scale bars: 20 μm.

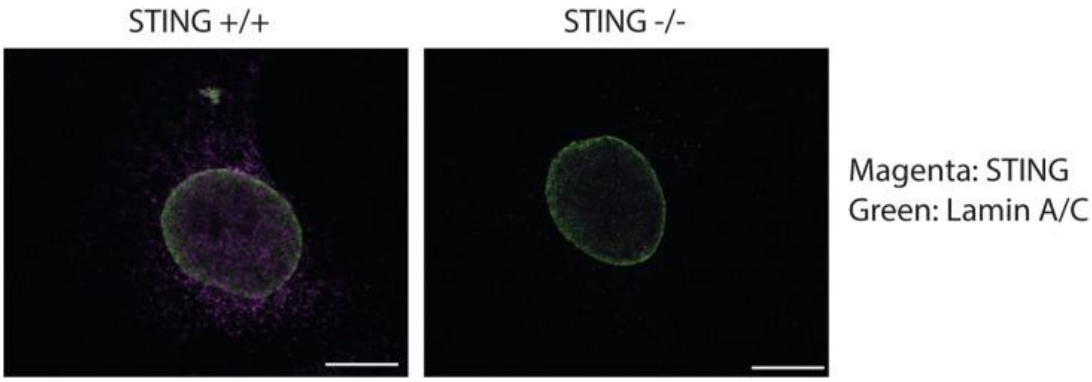


Figure S3: Validation of STING antibody.

Confocal images showing the specificity of STING antibody. Mouse embryonic fibroblasts (WT or STING KO) were stained with the STING antibody (rabbit anti-STING, D1V5L, Cat #50494S, dilution 1/500; Cell Signaling). Scale bars: 20 µm.

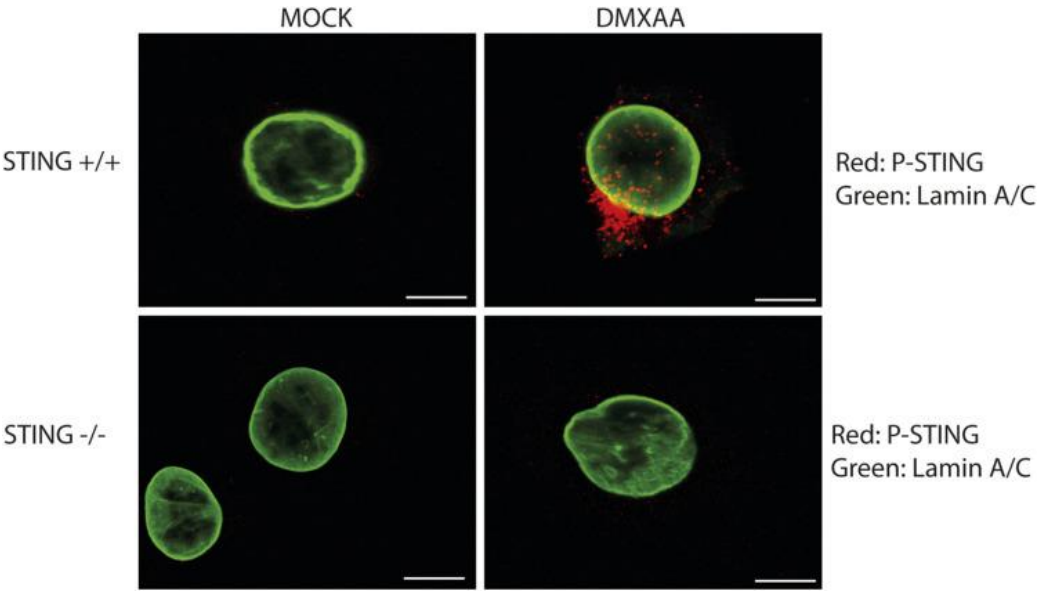


Figure S4: Validation of P-STING antibody.

Confocal images showing the specificity of P-STING antibody. Mouse embryonic fibroblasts (WT or STING KO) stimulated with DMXAA or DMSO as a control for 1 h were stained with the P-STING antibody (rabbit anti-P-STING, D1C4T, Cat #62912S, dilution 1/1,000; Cell Signaling). Scale bars: 20 µm.

CHAPITRE III

Dynamic regulation of STING in megakaryocytes shapes platelet responses to cGAMP during Influenza infection

*Karima Landelouci, Amel Bidias, Laurence Arsenault, William Boucher, Mickael Dupont, Pascale Lebeau, Erwan Pernet and Geneviève Pépin**

Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, G8Z 4M3, Canada

** To whom correspondence should be addressed. Tel: +819-xxxxxx; Fax: +xxxxx;*

Email: Genevieve.pepin3@uqtr.ca

Running title: STING trafficking in platelets

Keywords: Influenza - Thromboinflammation - Megakaryocytes – Platelets – STING – IFITM3 – PI4P – IL1-β – Trafficking proteins.

Authors contribution:

Karima Landelouci: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Writing—review and editing
Amel Bidias: Formal analysis, Investigation, Methodology
Laurence Arsenault: Investigation
William Boucher: Investigation
Mickael Dupont: Investigation
Pascale Lebeau: Technical assistance with intranasal instillation
Erwan Pernet: Resources, Supervision, Investigation, Methodology, Writing—review and editing
Geneviève Pépin: Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing—review and editing, Project administration

Abstract

Platelets are at the crossroads of coagulation and immune responses. They play key roles in fighting pathogens during infections but can also cause tissue damage by fueling inflammation and thrombosis. Platelet adaptations to infection arise, in part, from changes happening in megakaryocytes in responses to the cytokines present in their microenvironment. We recently reported that STING is transferred from megakaryocytes to platelets and that STING signaling in platelets enhances their activity. Notably, STING promotes alpha granule secretion, leading to increased platelet-leukocyte interactions, which have been shown to drive immunothrombosis during sepsis. STING has been reported to be upregulated during infections in several cell populations. However, whether and how STING is modulated in the megakaryocyte-platelet lineage by cytokines during infection remains unclear.

In this study, we first show that type I interferon stimulates the trafficking of STING to platelet-forming regions in murine bone marrow-derived megakaryocytes, potentially through a mechanism involving phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P). In contrast, we found that IL-1β, reduces STING levels in megakaryocytes.

Severe influenza viral infections are characterised by high levels of inflammatory cytokines such as type-I interferons and IL-1β. Using a murine model of Influenza A infection, we observed these dynamic changes of STING levels in vivo. Specifically, STING protein levels increase in platelets peak 3 days post-infection, correlating with enhanced sensitivity of platelets to cGAMP. By 5 days post-infection, when we detect IL-1β, STING levels return to baseline, which coincides with a significant decrease in STING protein levels in $CD41^{+}$ megakaryocytes.

Based on these findings, we propose a model in which the increase of STING in platelets relies on an early IFN-PI4P-dependent mechanism to boost STING levels in platelets, while IL-1β acts as a negative regulator of STING trafficking.

Introduction

Platelets are at the crossroads of inflammation and coagulation. As such, they play key roles in immune responses to fight infections. However, they can also fuel pathological inflammation, thereby increasing tissue and organ damage, as observed during viral and bacterial infections, including influenza[1, 2]. Following pathogen detection and adhesion to damaged endothelial cells, platelets become activated, release inflammatory mediators, and initiate coagulation[3]. The pro-inflammatory environment resulting from platelet activation promotes immune cell infiltration, particularly neutrophils, which release extracellular traps (NETs)[1, 4]. While NETs help trap pathogens, they also contribute to tissue injury and further enhance platelet activation[1, 5, 6]. In addition, platelet adhesion to endothelial cells promotes local coagulation and thrombus formation in capillaries, amplifying endothelial damage[3]. Together, these processes create a self-reinforcing loop that leads to thromboinflammation, a pathological state characterized by dysregulated coagulation and immune responses in which platelet hyperactivation and inflammation potentiate each other[7].

Platelet hyperactivation has been reported in various contexts[2, 8, 9]. Several proteins are now known to modulate platelet activity[9, 10]. For example, the interferon-induced transmembrane protein IFITM3 facilitates fibrinogen endocytosis, contributing to platelet hyperactivation[9]. Similarly, cytokines such as interleukin-1β (IL-1β) have been shown to enhance platelet reactivity[11]. Notably, these proteins are upregulated in platelets during infection, thereby amplifying platelet activation[9-11]. We previously identified that the stimulator of interferon genes (STING) is present in platelets[12]; however, whether STING expression can be modulated to enhance platelet responses remains unclear.

In nucleated cells, STING induces type I interferon (IFN-I) responses and the production of inflammatory cytokines downstream of the DNA sensor cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)[13, 14]. cGAS is activated upon detection of cytosolic double-stranded DNA (dsDNA) and catalyzes the production of cyclic GMP-AMP (cGAMP)[15-20]. Activation of STING then triggers the production of IFN-I and pro-inflammatory cytokines[13, 14]. In platelets, STING activation by cGAMP potentiates platelet activation and aggregation[8]. Mechanistically, STING recruits and activates syntaxin-binding protein 1 (STXBP1), facilitating SNARE complex assembly and enabling platelet α-granule secretion. This leads to the translocation of the activation marker CD62P to the platelet surface and the release of inflammatory mediators[8]. The exposure of CD62P promotes interactions between platelets and neutrophils, which in turn stimulates NET release[21], a process that contributes to immunothrombosis during bacterial sepsis.

We have previously shown that STING in platelets originates from their precursor cells, the megakaryocytes. While STING expression is increased in other cell types under inflammatory conditions, whether similar regulation occurs in megakaryocytes and platelets remains unknown.

Here, we show that STING is upregulated in murine platelets during influenza A virus (IAV) infection, rendering them more sensitive to *in vitro* cGAMP stimulation. We propose that this modulation is driven by the interferon response and may depend on PI4P levels, which facilitate STING trafficking from megakaryocytes to platelets. Finally, at later stages of infection, IL-1β downregulates STING levels in megakaryocytes, suggesting the existence of a negative feedback mechanism.

Materials and Methods

Mice

All animal procedures were approved by the institutional review board of Université du Québec à Trois-Rivières (CBSA ethics certificates 2023-G.P.7 and 2024-G.P.12) and conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. For in vivo studies, female C57BL/6J mice (8–10 weeks old; Jackson Laboratory) were used. For in vitro experiments, both female and male mice were included. Mice were housed in a pathogen-free environment. Blood and bones were collected post-mortem following isoflurane anesthesia prior to CO_2 euthanasia. Femurs, tibias, and iliac crests were harvested for bone marrow isolation and megakaryocyte purification.

Influenza A virus infection

Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus was kindly provided by Dr. Erwan Pernet. The virus was propagated and titrated in MDCK (Madin–Darby Canine Kidney) cells (ATCC) using a plaque-forming unit (PFU) assay. Female C57BL/6J mice (8–12 weeks old) were intranasally instilled with 600 PFU in 20 µL PBS for 3–5 days (as specified in the figure legends). Control mice received an equivalent volume of sterile PBS. Mice were monitored for weight loss, and a clinical score was recorded.

Megakaryocyte isolation and culture

Bone marrow cells were obtained by flushing iliac crests, femurs, and tibias with DMEM and centrifuged at 300 × g for 10 min at 4°C. Cells were resuspended in isolation buffer (PBS, pH 7.2, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) and processed as previously described[12]. Megakaryocytes were isolated using a CD41 antibody and large cell columns (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. $CD41^+$ cells were resuspended in growth medium (DMEM supplemented with 4.5 g/L glucose, L-glutamine, sodium pyruvate, 10% heat-

inactivated fetal bovine serum, and 1% antimycotic–antibiotic) supplemented with 50 ng/mL thrombopoietin and cultured for 4–5 days at 37°C in a humidified incubator (5% CO_2). Where indicated, cells were stimulated with 1000 U/mL IFN-α for 24 h (R&D Systems), 1 µg/mL IL-1β for 4 h (R&D Systems), or 100 nM GSK-A1 for 24 h (Adipogen).

Murine platelet isolation

Blood was collected post-mortem by cardiac puncture into ACD-containing tubes. Platelets were isolated as previously described[12]. Briefly, 250 µL of blood was diluted with 200 µL PBS and centrifuged at 180 × g for 10 min at room temperature to obtain platelet-rich plasma. Washed platelets were either stained for flow cytometry or pelleted and lysed for western blot analysis. For functional assays, platelets from infected and control mice were stimulated with 0.5–2 µg/mL type I collagen (Chronolog Inc.), alone or in combination with 1 µg/mL cGAMP, for 30 min at 37°C in a humidified incubator (5% CO_2). Platelets were then stained to assess activation via P-selectin (CD62P) expression. For activation assays, washed platelets were stained in FACS buffer (PBS + 0.5% BSA) with CD41-PB450 and CD62P-PE (1:100) for 30 min at room temperature. For aggregation analysis, platelets were stained with CD41-PB450, LY6G-APC, and LY6C-APC750 antibodies. After washing, samples were analyzed on a Beckman Cytoflex flow cytometer (four lasers), with 50,000 events acquired per sample. Data were analyzed using FlowJo (v10).

Protein analysis

Protein analysis was performed by standard western blotting. Platelets or megakaryocytes (one mouse per sample) were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate) supplemented with protease inhibitors and Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% BSA in TBST for 1 h at room temperature and

incubated overnight at 4°C with primary antibodies against STING, cGAS, IFITM3, and β-actin. After washing, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Detection was performed using ECL substrates and imaged using a ChemiDoc MP system.

Protein levels in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were measured using the Bradford assay. BAL samples were collected by inserting a 22-gauge catheter into the trachea and washing the lungs three times with 1 mL sterile PBS. Samples were centrifuged at 400 × g for 5 min, and protein concentration was measured by adding Bradford reagent and reading absorbance using a Simple Reader ELISA plate reader.

Cytokine levels were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions. IL-1β and CXCL1 were quantified using DuoSet and Quantikine kits (R&D Systems), respectively.

Confocal microscopy

Megakaryocytes were cultured on coverslips for 4 days. After treatment, cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Cells were blocked with 1% BSA and stained with CD41-647 antibody for 1 h. Following permeabilization with 0.2% Triton X-100, cells were incubated with anti-STING primary antibody (1:200), followed by Alexa Fluor 555-conjugated secondary antibody (1:1000). Nuclei were stained with DAPI. Coverslips were mounted using ProLong Gold antifade reagent. Images were acquired using a Leica Stellaris 5 confocal microscope and analyzed with LAS X or ImageJ software. Mean fluorescence intensity (MFI) was quantified after background subtraction. For the analysis of proplatelet-forming regions (PFRs), a single focal plane was analyzed for each MK. PFRs, including polarized regions of deformed MK, proplatelets, and buds larger than approximately 1.5 μm, were identified and regions of interest (ROIs) corresponding to PFRs were manually

defined. Then, the STING MFI within these regions was measured using ImageJ, and the average PFR STING MFI was calculated for each MK. The STING MFI of the remaining cytosolic compartment, excluding PFRs, was also measured, and a PFR-to-cytosol STING MFI ratio was calculated for each MK.

For the GSK-A1 experiments, a single focal plan was analyzed for each MK, Proplatelets were manually delineated as ROIs, and the STING MFI within each proplatelet was measured using ImageJ.

To assess the intracellular distribution of STING following GSK-A1 treatment, fluorescence intensity profiles were generated using the **Plot Profile** function in LAS X. A line was drawn from the nucleus, identified by DAPI staining, across the cytoplasm. STING fluorescence intensity was plotted as a function of distance along the drawn line across the MK. Two regions were defined for the analysis: a perinuclear region and a non-perinuclear region. The perinuclear region was defined as the area immediately surrounding the DAPI-stained nucleus, while the remaining cellular area was considered as non-perinuclear region. GSK-A1-treated cells exhibited a prominent STING fluorescence peak adjacent to the DAPI signal, consistent with perinuclear accumulation of STING. In contrast, mock-treated cells displayed a more diffuse fluorescence profile throughout the non-perinuclear region, indicative of a more dispersed distribution of STING.

Gene expression analysis

RNA was extracted using the GENEzol TriRNA kit with DNase treatment (Geneaid) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR was performed using the SensiFAST SYBR No-ROX kit (Bioline) with gene-specific primers (Table S1) on a Bio-Rad iCycler system. Gene expression was normalized to GAPDH using the ΔΔCt method.

mcGAS-RT-FWD	TGAACATGTGAAGATTTCTGCTCC
mcGAS-RT-REV	TGACTCAGCGGATTTCCTCG
mIFITM3-FWD Set 1	GGTCTGGTCCCTGTTCAATAC
mIFITM3-REV Set 1	GTCACATCACCCACCATCTT
mSTING-FWD	TGGCCTTCTGGTCCTCTATAA
mSTING-REV	CTGGTAAGATCAACCGCAAGTA
mGAPDH-FWD	GCC TGC TTC ACC ACC TTC T
mGAPDH-REV	CCC CAA TGT GTC CGT CGT G

Results

IFN drives STING redistribution to platelets-forming regions in megakaryocytes

Megakaryocytes adapt to their environment by changing their proteome as observed by the effect of cytokines during infections[22]. For example, megakaryocytes respond to type-I IFN by inducing IFN-stimulated genes (ISG) including IFITM3, which as a result, is increased in platelets as well[9, 10]. We previously reported that STING is present in megakaryocytes and platelets[12], however whether STING can be modulated by type-I IFN remains unknown. To test this, we stimulated bone marrow-derived megakaryocytes with IFNα for 24 h and studied STING intensity levels and localization by confocal immunofluorescence. We first confirmed the treatment by showing that IFITM3 expression level was induced as previously reported. In contrast, STING protein level remains unchanged (Fig.1A-C). However, we observed an accumulation of STING localization in an area similar to a pre-budding structure, reminiscent of platelets-forming regions (PFR) in IFNα condition (Fig.1A and D). Moreover, we detected an increase in the percentage of megakaryocytes with PFR and in the number of PFR per cell following the treatment suggesting an enhanced thrombopoiesis (Fig.1E-F). As STING protein level did not change in megakaryocytes after IFNα treatment, these data suggest that IFNα stimulates STING trafficking to PFR.

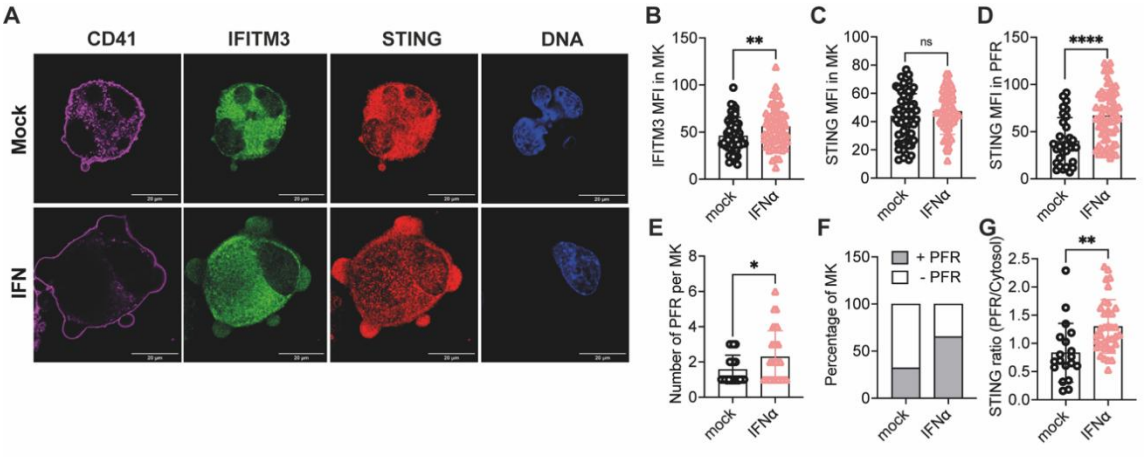


Figure 1. Type-I interferon promotes STING trafficking to platelet-forming region.

A- Representative images taken by confocal microscopy showing STING (red) and IFITM3 (green) intensity in CD41+ (magenta) megakaryocytes treated with type-I IFN (IFN) for 24 h and the associated mean fluorescence intensity quantification in B and C. D- Mean fluorescence intensity of STING in platelet-forming regions (PFR). E- Number of PFR per megakaryocyte. F-Percentage of megakaryocytes with and without PFR. G- Ratio of the mean fluorescence intensity of STING in PFR on STING in the cytosol of each MK analyzed. Each dot represents a single megakaryocyte. The experiment was performed n= 2 independent times and an average of 150 megakaryocytes were analyzed in each experiment. Welch's t-test were performed using PRISM software. *$*p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ **** $p \leq 0.0001$*

Influenza infection modulates STING protein level in platelets

Interferons are produced during viral infections, and we discovered that IFNα treatment directed STING to PFR suggesting that STING proteins levels could be modulated during viral infections. To test this, we relied on an established model of severe Influenza A viral (IAV) infection, known to cause thromboinflammation and de novo platelet production. Briefly, we instilled 600 PFU of Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) to 8-week-old female mice. As expected by the literature, we observed an average weight loss of more than 20% on day 5 post-

instillation (PI) and a high level of Influenza hemagglutinin (HA) protein in the bronchoalveolar lavage (BAL) (Fig.2A-B). We also detected an increase in total protein present in the BAL indicating high permeability of the alveolar-capillary membrane (Fig.2C). Moreover, we observed immune cells infiltration in lungs as demonstrated by the increase in leucocytes count (Fig.2D) and a trend toward increased of CXCL1 level in the BAL (Fig2.E), a known leucocyte chemoattractant. In addition, we noticed an increase in the percentage of neutrophils and monocytes in the BAL (Fig.3A-C). Platelets are known to interact with immune cells thus actively participating in inflammatory responses[23-25]. Upon activation platelet express P-selectin/CD62P, allowing interaction with immune cells through PSGL-1. To determine whether platelets were activated in our IAV model, we assess platelet-leucocytes aggregates (PLA) in IAV infected and non-infected control mice and found an increase in platelet-neutrophil and platelet monocytes aggregates at day 3 and 5 PI respectively (Fig.3D-E). Specifically, using flow cytometry, we measured an increase in CD41 staining on neutrophiles isolated from the blood on day 3 PI (Fig.3D) and on monocytes isolated from the lungs on day 5 PI (Fig.3E) of infected mice compared to littermate control. These results confirm that platelets form aggregates with immune cells during IAV infection. Collectively, these data indicate that our model represent a severe influenza infection.

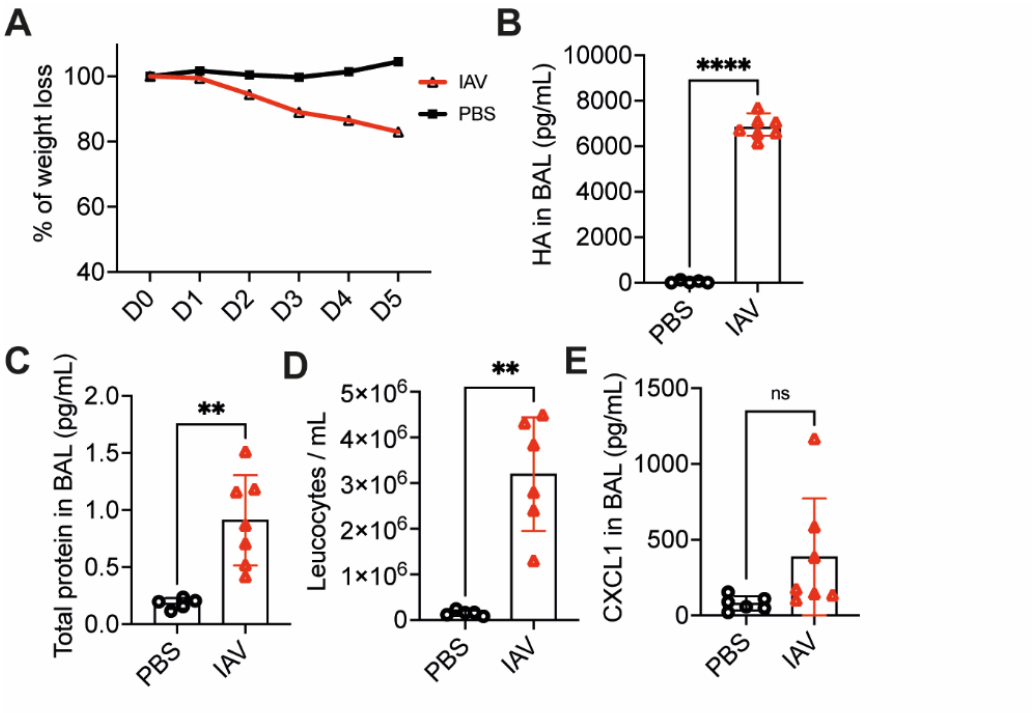


Figure 2. Clinical and inflammatory markers observed in severe IAV infections.

Female mice were intranasally instilled with 600 PFU of IAV strain H1N and monitor daily. A- Weight loss measured daily of IAV infected-female mice and PBS controls. Viral hemagglutinin protein (HA) (B), total protein content (C), leucocytes count (D) and CXCL1 (E) in the bronchoalveolar lavage (BAL) collected from mice at day 5 post-infection. Each dot represents one mouse. The experiment was performed n= 3 independent times. Welch's t-test were performed using PRISM software. *$p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ **** $p \leq 0.0$

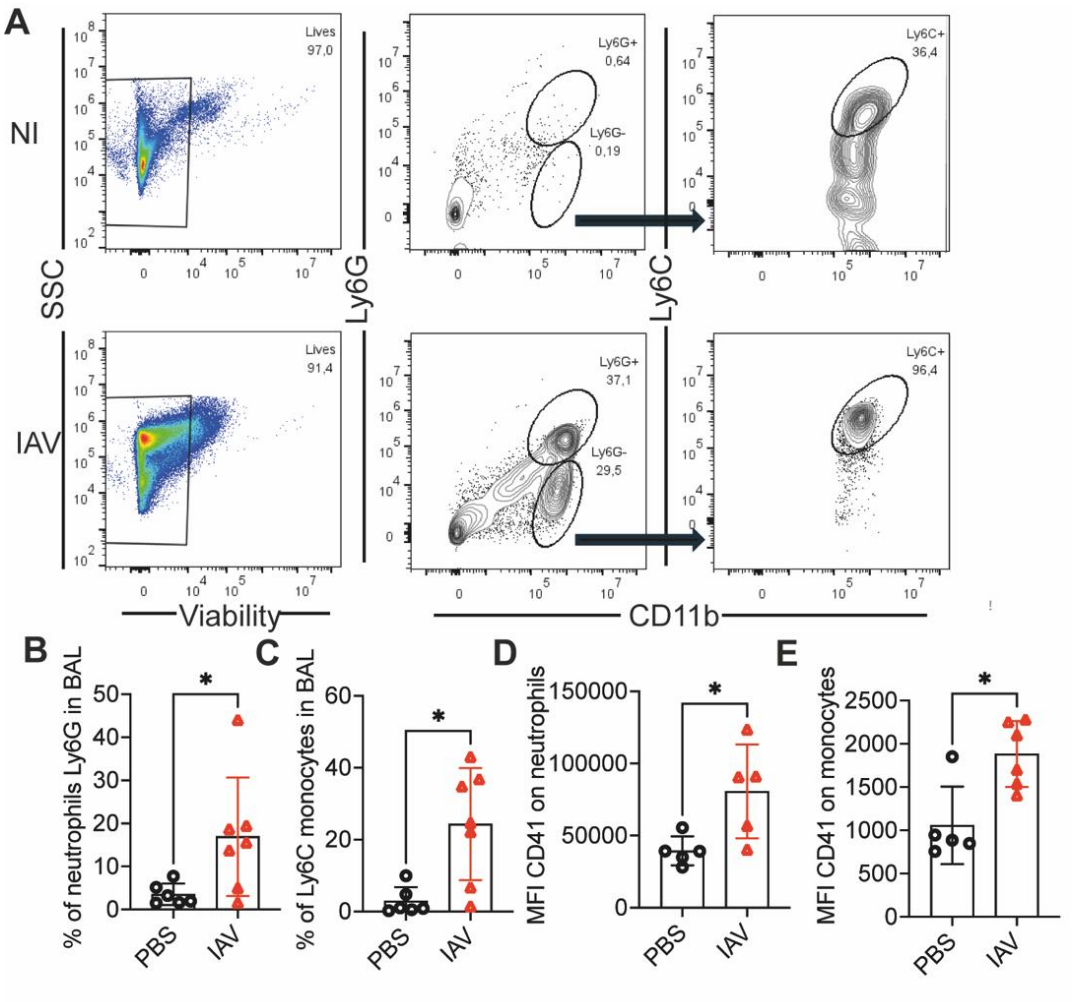


Figure 3. IAV infection induces immune cells infiltration and platelets-neutrophils aggregations.

A-C. Gating strategies (A) started from live cells and were used to identify the percentage of neutrophils (B) and monocytes (C) in bronchoalveolar lavage (BAL) in infected and control mice at day 5 post-infection. (D) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD41 on neutrophils ay day 3 post-infection in blood, and with monocytes (E) at day 5 post-infection in BAL. Each dot represents one mouse. The experiment was performed n= 3 independent times. Welch's t-test were performed using PRISM software. *$p \leq 0.05$*

Using this model, we next sought to determine whether STING expression level was modulated during IAV infection. Protein analyses by western blot of washed murine platelets isolated from IAV infected mice and PBS controls at day 3 and 5 PI first confirmed the increase of IFITM3 throughout the infection (Fig.4A-B), as previously reported[9, 10]. cGAS, which is also an ISG, followed a similar trend, slowly increasing at day 5 PI (Fig.4D). However, STING followed a different course, with an increase at day 3 PI and a return to baseline by day 5 PI (Fig.4C), suggesting that its increase was not due to a sustain transcriptional stimulation as reported for IFITM3.

Elevated STING level in platelets correlates with enhanced sensitivity to cGAMP

During infections, the reactivity of platelets is modulated. Platelets were found to have a stronger response to classical agonist such as thrombin and collagen[9]. We previously reported that platelet' STING stimulation with cGAMP enhances their reactivity to collagen as illustrated by the increase surface translocation of CD62P[12]. Because we detected more STING in platelets at 3 days PI, we wonder whether this could enhance their sensitivity to cGAMP. To answer this question, we isolated platelets from infected and non-infected mice 3 days PI and stimulated them with cGAMP, in the presence of a subthreshold dose of collagen (Fig.4E) and determine platelet activation by measuring surface CD62P by flow cytometry. By reporting the level of CD62P observed after the stimulation with collagen and cGAMP for each individual mouse on collagen stimulation, we could measure the relative increase in cGAMP platelet response. We found out that platelets from IAV infected mice were more sensitive to cGAMP stimulation than platelets from non-infected mice (Fig.4F). These data indicate that the upregulation of STING protein in platelets during IAV infection makes them more responsive to cGAMP, suggesting that high STING protein levels could increase immunothrombosis.

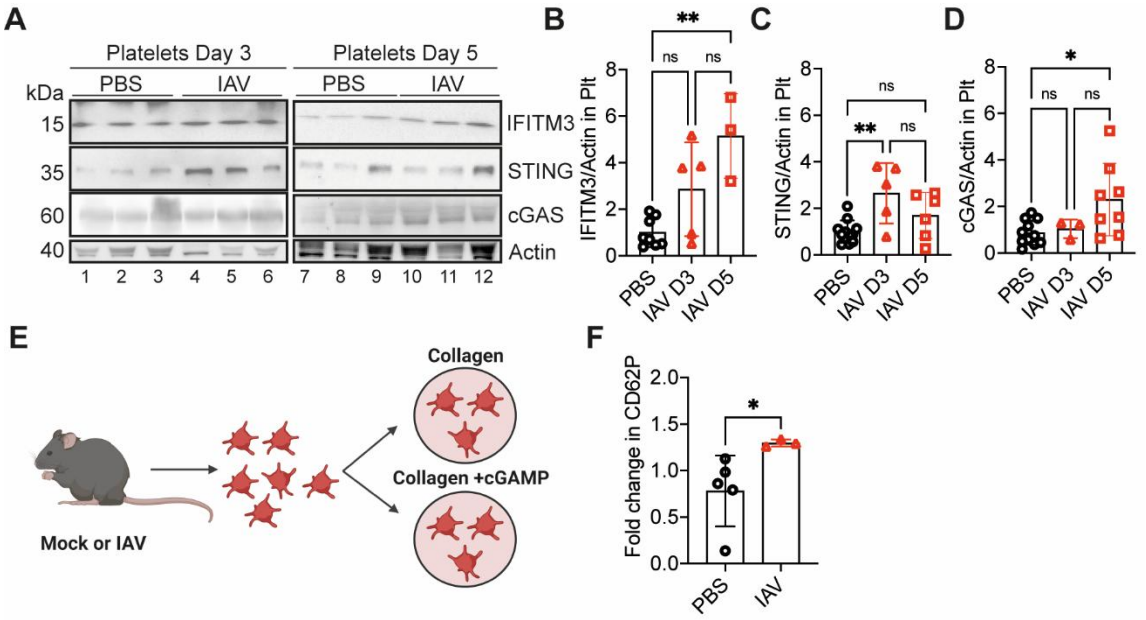


Figure 4. IAV infection increases STING protein level in platelets and enhances platelet sensitivity to cGAMP.

A- Protein level analysis from blood platelets isolated from IAV infected or control (PBS) mice at 3 and 5 days post-infection showing IFITM3 (B), STING (C), and cGAS (D) associated densitometry. E- Schematic representation of the experimental design showing that platelets isolated from IAV and PBS mice were stimulated in vitro with collagen alone for 15 min and in combination with cGAMP for an additional 15 min at 37 degrees. (F) CD62P translocation was measured and result is presented as the ratio of the mean fluorescence intensity of (cGAMP + collagen / collagen only) in each mice condition. Each dot represents one mouse. The experiment was performed n= 3 independent times. Welch's *t*-test was used for comparisons between two groups, while ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used for comparisons involving multiple groups. Statistical analyses were performed using PRISM software. *$p \leq 0.05$ **$p \leq 0.01$

STING expression levels are modulated in bone marrow megakaryocytes during IAV infection

Protein content in platelets can be modulated through different mechanisms, including de novo translation as reported for IL-1β [11] or following an increase in megakaryocytes like IFITM3[10]. However, we observed an early increase of STING in platelets followed by a return to baseline suggesting an alternative mechanism. To define whether the changes we saw in platelets were the consequences of the modulation of STING protein in megakaryocytes, we isolated CD41+ megakaryocytes from the bone marrow by positive selection and assess the mRNA and protein levels of STING, cGAS and IFITM3 by RT-qPCR and Western blot respectively. Gene expression analyses showed that IFITM3 was increased in CD41+ megakaryocytes and that a similar increase was observed at the protein level (Fig.5A, B and E). No change was observed with cGAS at either the protein or transcriptional level (Fig.5A, D-G). In sharp contrast with the gradual increase observed for IFITM3, STING protein level exhibits an opposite progression and showed a continuous decline up to 5 PI (Fig.5A and C) without any change at the transcriptional level (Fig.5F). Together with our in vitro IFNα data, these findings suggest that STING is redistributed within megakaryocytes toward proplatelets regions, thereby promoting its enrichment in platelets during IAV infection as observed at day 3 PI. This redistribution may rely on an intracellular trafficking mechanism.

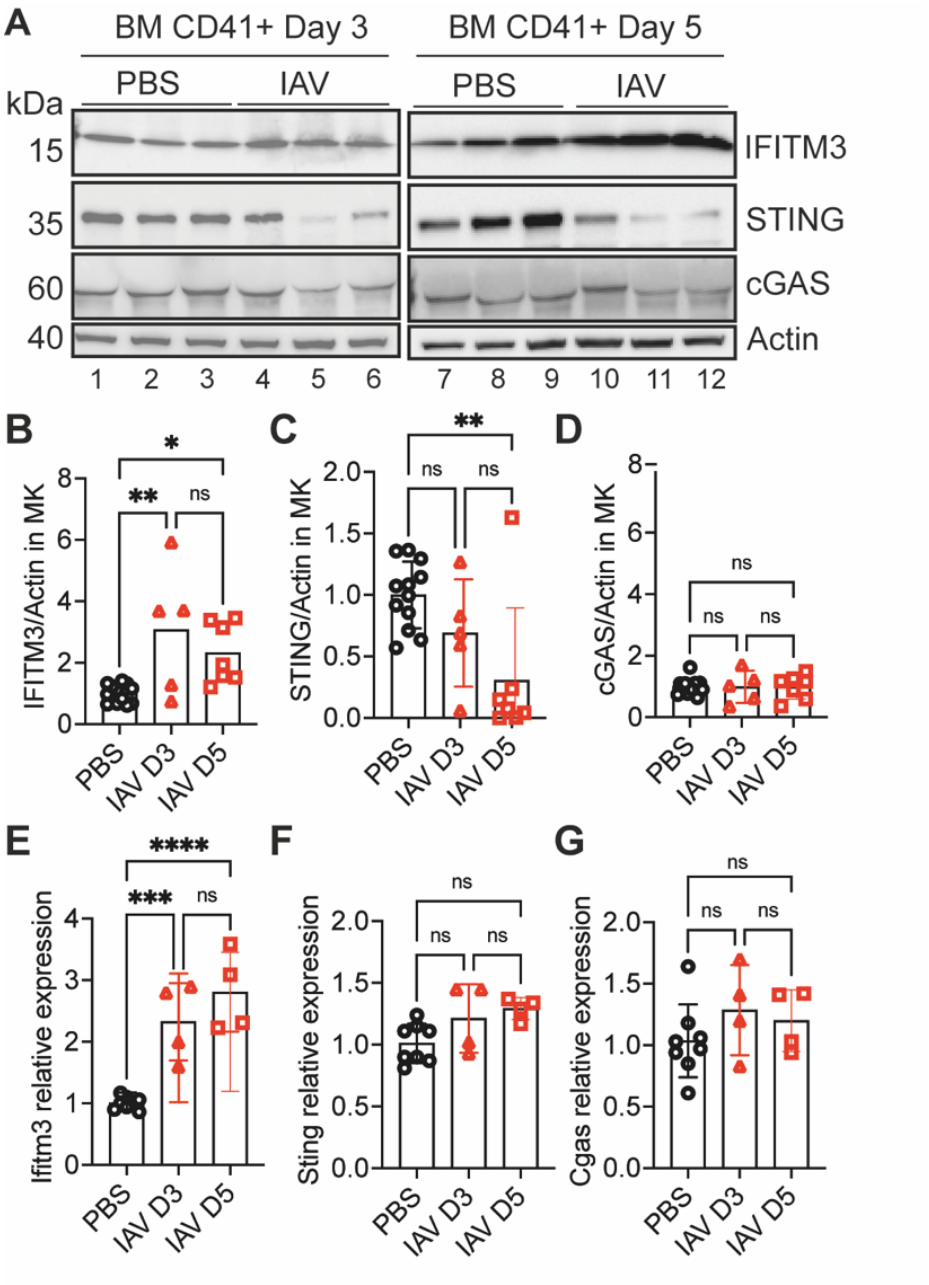


Figure 5. STING protein levels decrease in CD41+ megakaryocytes during IAV infection.

A- Protein level analysis of CD41+ bone marrow megakaryocytes isolated from IAV infected and control (PBS) mice 3 and 5 days post-infection showing IFITM3 (B), STING (C), and cGAS (D) associated densitometry. E-G- Gene expression analysis CD41+ bone marrow megakaryocytes of isolated from infected and PBS mice at day 3 and 5 post-infection showing the level of Ifitm3 (E), Sting (F) and

Cgas (G). Each dot represents one mouse. The experiment was performed n= 3 independent times. Ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used for comparisons involving multiple groups. Statistical analyses were performed using PRISM software. *$p \leq 0.05$ **$p \leq 0.01$*

PI4KA inhibition in differentiated megakaryocytes impairs STING trafficking to proplatelets, whereas PIP5K1C downregulation may favor STING trafficking during IAV infection

Several studies have recently revealed the critical role of phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) in STING intracellular trafficking[18-20]. Interestingly, PI4P were also reported to play a role in protein trafficking during thrombopoiesis[26]. To investigate whether PI4P could stimulate STING trafficking from the perinuclear-endoplasmic reticulum region to the plasma membrane, we stimulated bone marrow-derived megakaryocytes with a small molecule inhibitor of PI4KA, GSK-A1. PI4KA is known to convert phosphatidyl-inositol into PI4P during STING trafficking[27] and to ensure anterograde transport of Golgi vesicles to the plasma membrane during MK maturation[26]. In line with a key role of PI4KA in STING trafficking, we observed that STING was more enriched at the nuclear periphery/ER rather than a more diffused localization in control cells (Fig6A-B). Fluorescence intensity analyses confirm the perinuclear localization of STING in GSK-A1 treated cells (Fig.6B).

If STING was retained in the perinuclear region, we anticipate that it would prevent its presence in proplatelets. We tested this idea and measured the mean fluorescence intensity of STING in proplatelets of GSK-A1 treated megakaryocytes compared to non-treated cells. In line with STING being prevented from trafficking, we observed a reduction in STING mean fluorescence intensity in GSKA-1 treated MK (Fig.6C). Collectively, these results indicate that

blocking PI4P production inhibits STING transport into proplatelets, suggesting the contribution of PI4P in STING trafficking during thrombopoiesis.

Because IAV infection induces a robust type I interferon response[28], and that IFN has been shown to downregulate PIP5K1C (phosphatidylinositol-4phosphate 5-kinase type -1 gamma) expression and increase PI4P levels in macrophages[29], we next sought to determine whether this enzyme is similarly regulated in megakaryocytes during IAV infection. Importantly, we found that PIP5K1C expression is downregulated in megakaryocytes at 3 days PI (Fig.6E), which correlates with STING upregulation observed at day 3 PI in platelets. These findings suggest that modulation of the PI4P pool may contribute to STING redistribution toward platelets during IAV infection.

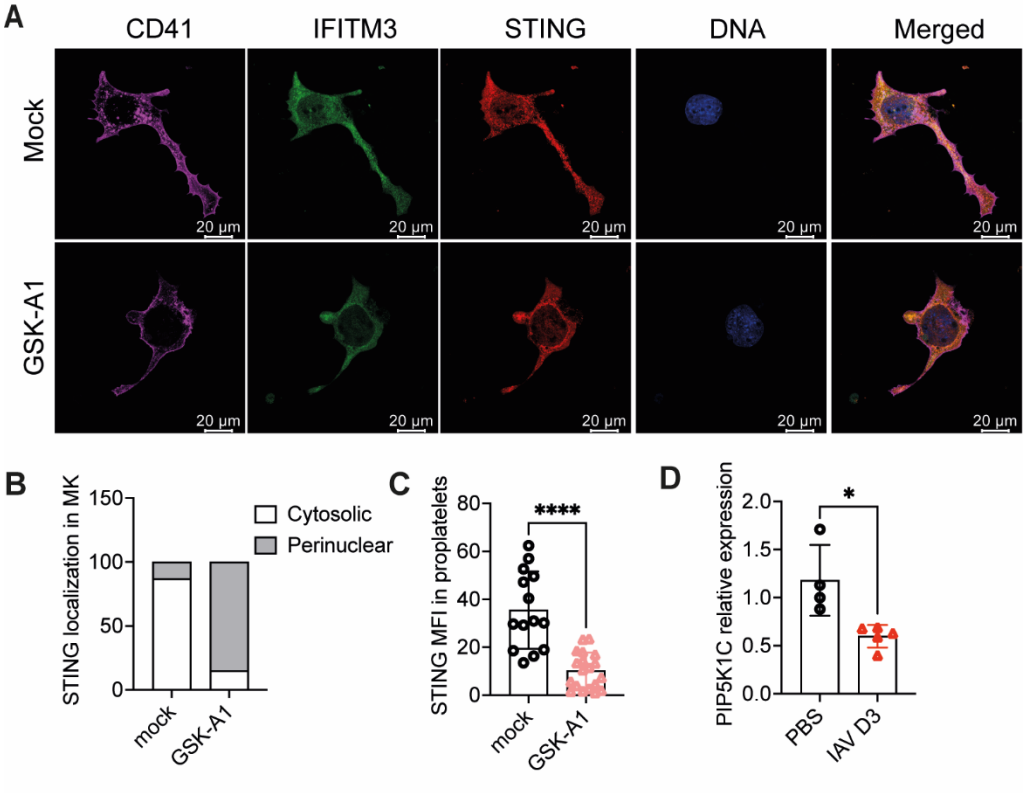


Figure 6. PI4KA inhibition reduces STING trafficking to proplatelets

A- Representative images taken by confocal microscopy showing STING (red) and IFITM3 (green) in CD41+ (magenta) megakaryocytes treated with GSK-A1 for 24 h. B- Proportion of cells with perinuclear and non-perinuclear STING localization. C- Mean fluorescence intensity of STING in proplatelets in GSK-A1 treated bone marrow megakaryocytes. The experiment was performed n= 2 and an average of 50 megakaryocytes were analyzed. Welch's t-test were performed using PRISM software. *$p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ **** $p \leq 0.000$*

IL1-β downregulates STING in megakaryocytes

During IAV infections, several cytokines are produced besides IFNs including Interleukin 1 (IL-1), known to stimulate thrombopoiesis and was detected in the bone marrow during IAV infection[30]. As we detected IL-1β in the BAL at 5 PI in our model (Fig.6B), we thus stimulated differentiated megakaryocytes with IL-1β to define whether it would affect STING expression and localization. We found out that IL-1β stimulation globally reduces STING levels in megakaryocytes and observed that STING localization shifted from perinuclear to non-perinuclear in IL-1β treated bone marrow megakaryocytes (Fig.7A, C and E). Furthermore, we noticed the formation of STING foci in IL-1-stimulated megakaryocytes (Fig.7A and D). Although STING protein levels were reduced following IL-1 β treatment, STING mRNA levels remained unchanged (Fig.7F). **Overall, these data identified a novel role for IL-1β in downregulating STING in megakaryocytes.**

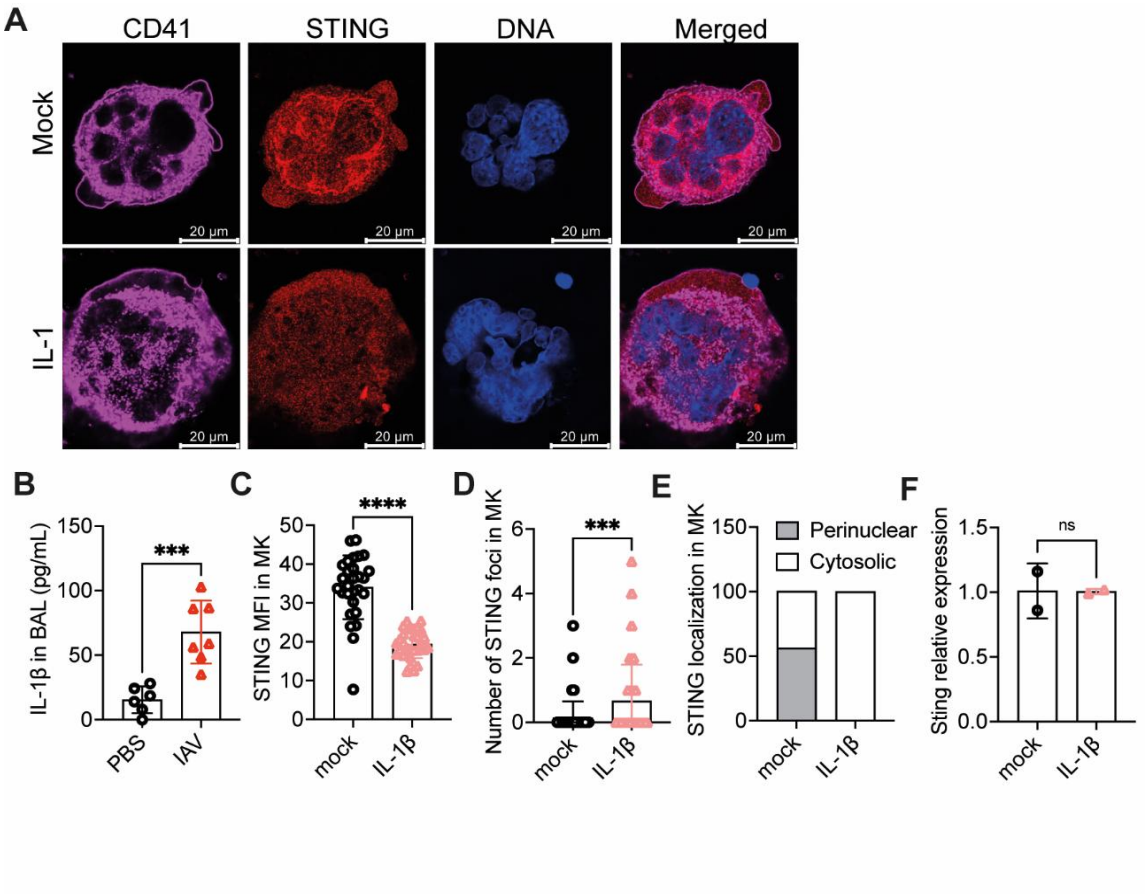


Figure 7. IL-1β treatment reduces STING protein level in megakaryocytes

A- Representative images taken by confocal microscopy showing STING (red) intensity in CD41+ (magenta) megakaryocytes treated with IL-1β for 4 h. B- IL-1β production in bronchoalveolar lavage (BAL) 5 days post-infection. C- Mean fluorescence intensity of STING in IL-1β treated bone marrow megakaryocytes and controls. D- Quantification of STING foci in megakaryocytes in IL-1β and mock conditions. E- Proportion of cells with perinuclear and non-perinuclear STING localization across IL-1β treatment and mock conditions. F- STING mRNA expression in megakaryocytes in IL-1β and mock conditions. Each dot represents a single megakaryocyte. The experiment was performed n= 2 independent times and an average of 150 megakaryocytes were analyzed. Welch's t-test were performed using PRISM software. *$p \leq 0.0$ 5 **$p \leq 0.01$ ***$p \leq 0.001$ ****$p \leq 0.0001$.

Based on our findings, we finally propose a model in which during the first phase of Influenza infection, IFN response facilitates STING trafficking across the megakaryocyte for high-level loading into platelets, sensitizing them to cGAMP.

During the second phase, IL1-β reduces STING in megakaryocytes providing a negative feedback regulation.

Discussion

We previously revealed that STING in platelets originates from their precursor cells, the megakaryocytes[12]. We and others have also reported that STING activation in platelets increases thrombosis by enhancing platelet activation during bacterial sepsis [8] and myocardial infarction[6]. While changes in platelet content during infections modulate platelet reactivity [9, 11], whether STING itself could be modulated remained unclear. Here, we report that STING protein levels are modulated during IAV infection in both megakaryocytes and platelets in response to inflammatory conditions.

Type I IFNs play a crucial role during viral infections, including IAV. These cytokines are rapidly produced early during infection and initiate antiviral protection in both infected and bystander cells. We observed that STING is rapidly increased in platelets during IAV infection (Fig.4). In contrast to the transcriptional increase of IFITM3 observed in platelets from COVID-19 and septic patients[9, 31, 32], which originates from megakaryocyte responses to IFN-I signaling, STING mRNA was not induced in $CD41^+$ bone marrow cells. Instead, we found that IFN-I stimulates the trafficking of STING to platelet-forming regions in megakaryocytes without increasing total STING protein levels (Fig.1). This is consistent with previous reports showing that STING is a dynamic protein that traffics from the ER to the Golgi and post-Golgi vesicles[13, 33, 34].

In nucleated cells, STING trafficking from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi depends on PI4P[17-20]. PI4P also contributes to anterograde transport in mature megakaryocytes and other cell types [26, 35]. We found that inhibition of PI4KA with GSKA-1, which reduces PI4P levels, prevents STING trafficking from the perinuclear region to the plasma membrane and proplatelets in

megakaryocytes (Fig.6), suggesting a key role for PI4P in the transfer of STING from megakaryocytes to platelets. Importantly, we found that PIP5K1C is downregulated in megakaryocytes at day 3 PI, which correlates with STING increased in platelets 3 days PI. This is consistent with evidence showing that IFN-I can increase PI4P levels by modulating kinase expression[29]. However, transcriptional analysis of PI4KA at day 3 post-infection showed decreased mRNA expression (data not shown), rather than an increase. This may reflect a negative feedback mechanism following an earlier induction, which could be tested at 1 day PI. Moreover, kinases are regulated by multiple mechanisms, including protein stability, which remains to be investigated. IFITM3, a membrane trafficking protein, has been shown to positively regulate PI4P levels by blocking the OSBP–VAPA interaction[18, 36]. Thus, a synergistic contribution of IFITM3 and PI4P-generating kinases may be involved and warrants further investigation. Finally, changes in lipid organization are common during viral infections and should be considered for their potential contribution to platelet hyperactivation[37, 38].

We further showed that increased STING levels in platelets from IAV-infected mice result in enhanced sensitivity to in vitro cGAMP stimulation, leading to increased platelet activation, a phenotype observed during influenza infection. However, we did not observe a significant role for platelet-specific STING deletion during IAV infection (data not shown). This may be explained by the absence of circulating cGAMP, as reported in bacterial sepsis, and by the more localized nature of IAV infection compared to systemic infections. Nevertheless, our results reveal a novel mechanism enhancing platelet activity through increased STING transfer from megakaryocytes to platelets.

While our data indicate that STING trafficking is enhanced early during IAV infection, we also observed that STING expression is gradually reduced in $CD41^+$ megakaryocytes. This decrease correlates with a return of STING protein levels in platelets to baseline. IL-1 is produced during IAV infection, and we measured

significant levels of IL-1β in infected mice (Fig.7B). Interestingly, IAV has been shown to induce emergency megakaryopoïesis and thrombopoiesis through IL-1R signaling[30]. Given the importance of IL-1R signaling, we examined its effect on STING in megakaryocytes and found that it reduces STING protein levels (Fig. 7), consistent with our in vivo observations (Fig.5). In addition, we observed an increase in STING puncta, a hallmark of STING activation and subsequent lysosomal degradation. Notably, IL-1 signaling has been reported to activate STING via cGAS sensing of mitochondrial DNA[39]. Since thrombopoiesis involves mitochondrial fragmentation and ROS production[40], IL-1 may enhance this process and promote mtDNA release. Further studies will investigate STING activation in megakaryocytes to clarify the mechanisms underlying STING downregulation.

In summary, we report for the first time that STING is modulated in both megakaryocytes and platelets during IAV infection, potentially in a PI4P-dependent manner. We also identify a novel role for IL-1β in downregulating STING in megakaryocytes. This may represent a mechanism to prevent excessive platelet activation or an indirect consequence of STING activation in megakaryocytes. This latter hypothesis is supported by recent work showing that cGAS and STING are activated in megakaryocytes in a model of non-lethal irradiation[41]. While our study focused on bone marrow megakaryocytes, these cells are also found in circulation, the lung, and the spleen. Notably, the lung has been proposed as a major site of platelet production during infection [42-44] suggesting that lung megakaryocytes may dynamically adapt to their microenvironment. Whether similar regulatory mechanisms occur in these compartments remains to be determined.

We show that IFN-I and IL-1 modulate STING during IAV infection. As these cytokines are not restricted to IAV, our findings may extend to other conditions, including viral infections such as COVID-19, bacterial sepsis, interferonopathies,

and coagulopathies [45-50]. We observed that STING upregulation occurs early during infection; however, how this process behaves in settings of sustained or unresolved IFN production remains unclear.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using Prism 7 (GraphPad Software Inc.). Welch's *t* tests were used to compare pairs of conditions and Ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used to compare multiple conditions. Symbols used are as follows: $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, and $****P \leq 0.0001$.

Acknowledgements

We thank Mélodie B Plourde, the platform manager, for help with the instruments, Dr Natacha Merindol with help with the flow cytometry and the team of the animal house facility for our support with animal studies (Nadia Desnoyers, Michel Demers, Vickie Beaupré). This research was supported by the John Evans Leader Canadian Foundation for Innovation (40780 to G Pépin); and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2022-04349 to G Pépin).

Conflict of interest statement

There are no other conflicts of interest to disclose.

References

1. Kim S-J, Carestia A, McDonald B, Zucoloto AZ, Grosjean H, Davis RP, et al. **Platelet-Mediated NET Release Amplifies Coagulopathy and Drives Lung Pathology During Severe Influenza Infection**. *Frontiers in Immunology 2021 Nov 11*; 12.https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.772859
2. Lê V, Schneider J, Boergeling Y, Berri F, Ducatez M, Guerin J, et al. **Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis - PubMed**. *American journal of respiratory and critical care medicine 04/01/2015*; 191(7).https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1031OC
3. Sugiyama MG, Gamage A, Zyla R, Armstrong SM, Advani S, Advani A, et al. **Influenza Virus Infection Induces Platelet-Endothelial Adhesion Which Contributes to Lung Injury**. *Journal of Virology 2015–12–4*; 90(4).https://doi.org/10.1128/jvi.02599-15
4. Guo L, Feng K, Wang YC, Mei JJ, Ning RT, Zheng HW, et al. **Critical role of CXCL4 in the lung pathogenesis of influenza (H1N1) respiratory infection**. *Mucosal Immunology 2017/11/01*; 10(6).https://doi.org/10.1038/mi.2017.1
5. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X, et al. **High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection**. *The Journal of Infectious Diseases 2018/01/17*; 217(3).https://doi.org/10.1093/infdis/jix475
6. Zhang W, Zhang Y, Han L, Bo T, Qi Z, Zhong H, et al. **Double-stranded DNA enhances platelet activation, thrombosis, and myocardial injury via cyclic GMP-AMP synthase - PubMed**. *Cardiovascular research 04/22/2025*; 121(2).https://doi.org/10.1093/cvr/cvae218
7. Mack A, Hoek TV, Du X. **Thromboinflammation and the Role of Platelets**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2024–06*; 44(6).https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.124.320149
8. Mina Yang, Haojie J, Chen Ding LZ, Nan Ding, Guoming Li , Fei Zhang, Jing Wang, Liufu Deng, Junling Liu, Yanyan Xu. **STING activation in platelets aggravates septic thrombosis by enhancing platelet activation and granule secretion**.
9. Campbell R, Manne B, Banerjee M, Middleton E, Ajanel A, Schwertz H, et al. **IFITM3 regulates fibrinogen endocytosis and platelet reactivity in nonviral sepsis - PubMed**. *The Journal of clinical investigation 12/01/2022*; 132(23).https://doi.org/10.1172/JCI153014
10. Campbell R, Schwertz H, Hottz E, Rowley J, Manne B, Washington A, et al. **Human megakaryocytes possess intrinsic antiviral immunity through regulated induction of IFITM3 - PubMed**. *Blood 05/09/2019*; 133(19).https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-873984
11. Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. **Lipopolysaccharide Stimulates Platelets through an IL-1β Autocrine Loop**.

The Journal of Immunology 2013/11/15;
191(10).https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300354
12. El-Mortada F, Landelouci K, Bertrand-Perron S, Aubé FA, Poirier A, Bidias A, et al. **Megakaryocytes possess a STING pathway that is transferred to platelets to potentiate activation - PubMed**. *Life science alliance 11/22/2023*; 7(2).https://doi.org/10.26508/lsa.202302211
13. Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Röhl I, et al. **cGAS produces a 2′-5′-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING**. *Nature 2013 498:7454 2013–05–30*; 498(7454).https://doi.org/10.1038/nature12306
14. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. **Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA - PubMed**. *Science (New York, NY) 02/15/2013*; 339(6121).https://doi.org/10.1126/science.1229963
15. Civril F, Deimling T, De Oliveira Mann CC, Ablasser A, Moldt M, Witte G, et al. **Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS**. *Nature 2013*; 498(7454):332–337.https://doi.org/10.1038/nature12305
16. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. **Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway**. *Science 2013*; 339(6121):786–791.https://doi.org/10.1126/science.1232458
17. Han J, Zhang S, Hou Y, Wang Y, Zhang Z, Yang J, et al. **A chemical agonist and the Golgi-resident lipid PI4P activate STING by inducing transmembrane helix rearrangement**. *Immunity 2026/01/13*; 59(1).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2025.11.004
18. Luteijn RD, Terwisga SRv, Eecke JEV, Onia L, Zaver SA, Woodward JJ, et al. **The activation of the adaptor protein STING depends on its interactions with the phospholipid PI4P**. *Science signaling 2024 Mar 12*; 17(827).https://doi.org/10.1126/scisignal.ade3643
19. Qin C, Feng S, Feng P. **STeerING PI4P for innate immune activation**. *Immunity 2023/03/14*; 56(3).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.02.012
20. Fang R, Jiang Q, Jia X, Jiang Z. **ARMH3-mediated recruitment of PI4KB directs Golgi-to-endosome trafficking and activation of the antiviral effector STING**. *Immunity 2023/03/14*; 56(3).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.02.004
21. Xu T, Zhang L, Geng ZH, Wang H-B, Wang J-T, Chen M, et al. **P-selectin Cross-links PSGL-1 and Enhances Neutrophil Adhesion to Fibrinogen and ICAM-1 in a Src Kinase-Dependent, but GPCR-Independent Mechanism**. *Cell Adhesion & Migration 2007–7–1*; 1(3).https://doi.org/10.4161/cam.1.3.4984
22. Davizon-Castillo P, Rowley JW, Rondina MT. **Megakaryocyte and Platelet Transcriptomics for Discoveries in Human Health and Disease**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2020*; 40(6):1432–1440.https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313280

23. Semple JW, Italiano JE, Freedman J, Semple JW, Italiano JE, Freedman J. **Platelets and the immune continuum**. *Nature Reviews Immunology 2011 11:4 2011–03–25*; 11(4).https://doi.org/10.1038/nri2956
24. Kral JB, Schrottmaier WC, Salzmann M, Assinger A. **Platelet Interaction with Innate Immune Cells**. *Transfusion Medicine and Hemotherapy 2016/03/01*; 43(2).https://doi.org/10.1159/000444807
25. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. **Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets - PubMed**. *Immunology and cell biology 2005 Apr*; 83(2).https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01314.x
26. Bura A, Čabrijan S, Bertović I, Begonja AJ. **The intracellular and plasma membrane pools of phosphatidylinositol-4-monophosphate control megakaryocyte maturation and proplatelet formation**. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 2023 Apr 26*; 7(4).https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100169
27. Craene J-OD, Bertazzi DL, Bär S, Friant S. **Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways**. *International Journal of Molecular Sciences 2017 Mar 15*; 18(3).https://doi.org/10.3390/ijms18030634
28. Muñoz-Moreno R, Martínez-Romero C, García-Sastre A. **Induction and Evasion of Type-I Interferon Responses during Influenza A Virus Infection**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2021 Oct*; 11(10).https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038414
29. Xue J, Tian X, Shuchen L, Ying Z, Yu X, Hang Y. **Exosomal lipid PI4P regulates small extracellular vesicle secretion by modulating intraluminal vesicle formation**. *Journal of Extracellular Vesicles 2023 Apr 6*; 12(4).https://doi.org/10.1002/jev2.12319
30. Rommel MGE, Walz L, Fotopoulou F, Kohlscheen S, Schenk F, Miskey C, et al. **Influenza A virus infection instructs hematopoiesis to megakaryocyte-lineage output**. *Cell Reports 2022/10/04*; 41(1).https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111447
31. Manne B, Denorme F, Middleton E, Portier I, Rowley J, Stubben C, et al. **Platelet gene expression and function in patients with COVID-19 - PubMed**. *Blood 09/10/2020*; 136(11).https://doi.org/10.1182/blood.2020007214
32. Nührenberg TG, Stöckle J, Marini F, Zurek M, Grüning BA, Benes V, et al. **Impact of high platelet turnover on the platelet transcriptome: Results from platelet RNA-sequencing in patients with sepsis**. *PLOS ONE Jan 27, 2022*; 17(1).https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260222
33. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen Z. **Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway - PubMed**. *Science (New York, NY) 02/15/2013*; 339(6121).https://doi.org/10.1126/science.1232458

34. Liu Y, Xu P, Rivara S, Liu C, Ricci J, Ren X, et al. **Clathrin-associated AP-1 controls termination of STING signalling**. *Nature 2022 610:7933 2022–10–19*; 610(7933).https://doi.org/10.1038/s41586-022-05354-0
35. Rajamanoharan D, McCue HV, Burgoyne RD, Haynes LP. **Modulation of phosphatidylinositol 4-phosphate levels by CaBP7 controls cytokinesis in mammalian cells**. *Molecular Biology of the Cell 2015–02–25*; 26(8).https://doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1243
36. Amini-Bavil-Olyaee S, Choi Youn J, Lee Jun H, Shi M, Huang I-C, Farzan M, et al. **The Antiviral Effector IFITM3 Disrupts Intracellular Cholesterol Homeostasis to Block Viral Entry**. *Cell Host & Microbe 2013/04/17*; 13(4).https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.006
37. Delang L, Paeshuyse J, Neyts J. **The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication**. *Biochemical Pharmacology 2012/12/01*; 84(11).https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.034
38. Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA, Randall G. **Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication - PubMed**. *Journal of virology 2011 Sep*; 85(17).https://doi.org/10.1128/JVI.00059-11
39. Aarreberg LD, Esser-Nobis K, Driscoll C, Shuvarikov A, Roby JA, Gale M, Jr. **Interleukin-1beta Induces mtDNA Release to Activate Innate Immune Signaling via cGAS-STING**. *Mol Cell 2019*; 74(4):801–815 e806.https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.038
40. Motohashi H, Kimura M, Fujita R, Inoue A, Pan X, Takayama M, et al. **NF-E2 domination over Nrf2 promotes ROS accumulation and megakaryocytic maturation - PubMed**. *Blood 01/21/2010*; 115(3).https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-223107
41. Chang-Hong D, Yi-Ding W, Ke Y, Wei-Nian L, Li R, Chao-Nan L, et al. **Apoptosis-resistant megakaryocytes produce large and hyperreactive platelets in response to radiation injury**. *Military Medical Research 2023 Dec 19*; 10(1).https://doi.org/10.1186/s40779-023-00499-z
42. Carminita E, Becker IC, Italiano JE. **What It Takes To Be a Platelet: Evolving Concepts in Platelet Production**. *Circulation Research 2024–08–02*; 135(4).https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.124.323579
43. Valet C, Magnen M, Qiu L, Cleary SJ, Wang KM, Ranucci S, et al. **Sepsis promotes splenic production of a protective platelet pool with high CD40 ligand expression - PubMed**. *The Journal of clinical investigation 04/01/2022*; 132(7).https://doi.org/10.1172/JCI153920
44. Lefrançais E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. **The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors**. *Nature 2017 544:7648 2017–03–22*; 544(7648).https://doi.org/10.1038/nature21706

45. Eloranta M, Franck-Larsson K, Lövgren T, Kalamajski S, Rönnblom A, Rubin K, et al. **Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis - PubMed**. *Annals of the rheumatic diseases 2010 Jul*; 69(7).https://doi.org/10.1136/ard.2009.121400
46. Postal M, Vivaldo JF, Fernandez-Ruiz R, Paredes JL, Appenzeller S, Niewold TB. **Type I interferon in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus**. *Current opinion in immunology 2020 Nov 24*; 67.https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.10.014
47. King KR, Aguirre AD, Ye Y-X, Sun Y, Roh JD, Richard P Ng J, et al. **IRF3 and Type I Interferons Fuel a Fatal Response to Myocardial Infarction**. *Nature medicine 2017 Nov 6*; 23(12).https://doi.org/10.1038/nm.4428
48. Song Y, Lu J, Qin P, Chen H, Chen L. **Interferon-I modulation and natural products: Unraveling mechanisms and therapeutic potential in severe COVID-19**. *Cytokine & Growth Factor Reviews 2025/04/01*; 82.https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2024.08.005
49. Oke V, Gunnarsson I, Dorschner J, Eketjäll S, Zickert A, Niewold T, et al. **High levels of circulating interferons type I, type II and type III associate with distinct clinical features of active systemic lupus erythematosus - PubMed**. *Arthritis research & therapy 04/29/2019*; 21(1).https://doi.org/10.1186/s13075-019-1878-y
50. Rackov G, Shokri R, De Mon MÁ, Martínez-A C, Balomenos D. **The Role of IFN-β during the Course of Sepsis Progression and Its Therapeutic Potential - PubMed**. *Frontiers in immunology 05/08/2017*; 8.https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00493

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les plaquettes jouent un rôle crucial dans l'immunité antivirale et dans les dysfonctions thrombo-inflammatoires. Elles tirent leur identité du MK qui contrôle leur réponse par un transfert adapté de son contenu, influencé par le milieu qui l'entoure[192]. Dans cette thèse, nous avons investigué la présence et la fonctionnalité de la voie de l'immunité innée cGAS-STING au sein de la lignée MK-plaquette en homéostasie, ainsi que sa modulation dans le contexte pathologique d'une infection sévère de la grippe.

Nous avons d'abord révélé que les protéines cGAS et STING sont présentes et fonctionnelles dans les MK et les plaquettes. La stimulation in vitro de la voie cGAS-STING par des agonistes dans les MK active la signalisation canonique qui déclenche la production d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires. Dans les plaquettes, nous avons dévoilé pour la première une fonction non-canonique de la voie cGAS-STING dont le rôle est de potentialiser l'activation et l'agrégation plaquettaire.

Ensuite, nous avons découvert que la protéine STING est modulée dans la lignée MK-plaquette aussi bien dans un milieu inflammatoire in vitro induit par l'IFN et l'IL-1 que dans un contexte thrombo-inflammatoire in vivo au cours de l'infection IAV. Dans la phase précoce de l'infection, STING est redistribué à partir du MK vers les plaquettes selon un mécanisme IFN-PI4P dépendant pour augmenter son niveau dans les plaquettes (Figures 1-2). Cette augmentation sensibilise les plaquettes à l'activation par cGAMP (Figure 5E). À un stade ultérieur de l'infection, un rétrocontrôle dépendant de l'IL1-β est mis en place dans

le MK afin de restaurer des niveaux basaux de STING dans les plaquettes (Figure 6-7). À travers ces résultats, ma thèse met en évidence une reprogrammation immunologique des plaquettes, via la voie cGAS-STING, orchestrée par les MK et qui contribue au phénotype d'hyperactivité plaquettaire observé lors des infections.

Dans cette section, je discuterai les principaux résultats générés et de leurs implications dans d'autres contextes pathologiques, tout en adressant les questions de recherches qui découlent de notre découverte. Enfin, je clôturerai cette thèse par les limitations à considérer dans l'interprétation de notre étude.

1. Expression et fonctionnalité de STING dans les mégacaryocytes et les plaquettes :

La première découverte de notre étude fut la démonstration de l'existence des constituants de la voie cGAS-STING dans notre population d'intérêt, composée de cellules polyploïdes et de cellules anucléées. La présence de STING dans les plaquettes suggère fortement un héritage du MK, indiquant que les plaquettes possèdent une identité immunitaire préprogrammée au sein du MK, et ce qui nous a amené à investiguer la possibilité de la fonctionnalité de STING dans les plaquettes.

Dans les cellules nuclées, la voie cGAS-STING est bien caractérisée. Elle participe à différentes réponses biologiques, incluant la détection d'ADN cytosolique, l'induction de réponse IFN et antivirale ainsi que la régulation de l'autophagie et de la coagulation[51, 52, 54, 78, 79, 81, 82, 85, 86, 89, 108, 196]. Dans les MK, nous avons confirmé que l'activation canonique de cette voie induit la production d'IFN et de cytokines inflammatoires (Fig.1-2 du chapitre II). Cependant, la stimulation de cGAS par l'ADN a résulté en une faible activation de STING et à une production limitée de cytokines inflammatoires (Fig.2A-B du chapitre II). Ces résultats pourraient s'expliquer par l'intervention de mécanismes sous-jacents qui limitent l'activation de cGAS, par exemple, sa séquestration au niveau de la

membrane plasmique, son hyperphosphorylation et sa liaison aux histones afin de le désensibiliser[58, 72, 73, 197-200]. De plus, le niveau des DNases est également un bon facteur à considérer car elles pourraient dégrader rapidement l'ADN transfecté avant sa reconnaissance par cGAS[58, 70, 71, 201].

Nous avons également investigué la possibilité d'une activation basale de la voie cGAS-STING dans les MK (Fig.3 du chapitre II), en raison de la corrélation entre l'augmentation de dommages à ADN, marqué par P-yH2AX et la localisation cytosolique de cGAS (Fig.2E-F du chapitre II). Malgré une diminution marquée de la production des ISGs dans les MK cGAS-KO, l'intensité de pSTING se maintenait à un niveau relativement élevé bien qu'elle soit significativement moindre que dans les MK WT (Fig.3C du chapitre II). Cela suggère fortement une diversité fonctionnelle de STING, où il agirait indépendamment de cGAS, et qui reste à investiguer. Dans un contexte de sénescence, l'instabilité génomique et le stress oxydatif peuvent favoriser l'accumulation de l'ADN dans le cytosol d'origine nucléaire et mitochondriale[202, 203]. Des données soutiennent que le MK développe des caractéristiques associées au SASP (*senescence-associated-secretory phenotype*)[204], ce qui suggère que l'ADNmt pourrait se retrouver libre dans le cytosol des MK sénescents. Des études ont rapporté que l'hélicase DDX41, présente dans certaines cellules hématopoïétiques, est capable de détecter l'ADN cytosolique d'origine mitochondriale et activer STING par phosphorylation[205-208]. Cependant, la présence de DDX41 dans la lignée MK-plaquette n'est pas encore élucidée et mérite d'être investiguée car ça pourrait expliquer le maintien de phosphorylation de STING en absence de cGAS. De plus, il est connu que des niveaux élevés de PI4P favorise la phosphorylation de STING indépendamment de cGAS[64], et que la maturation du MK implique un remodelage lipidique dépendant des PI4P[168], ce qui pourrait favoriser un environnement favorable à l'activation de STING et expliquerait l'activation soutenue de STING en absence de cGAS.

Notre étude a mis en évidence l'existence d'une voie cGAS-STING fonctionnelle dans les plaquettes, ce qui suggère que la détection d'ADN dans ces dernières ne repose pas seulement sur les récepteurs retrouvés dans les endosomes (TLR9), mais implique également des voies cytosoliques. Alors que le TLR9 dépend fortement des compartiments endosomaux[49], la voie cGAS-STING est quant à elle cytosolique[54]. Cela signifie que la nature du ligand détecté diffère entre les deux voies. La voie TLR9 se limite à la détection d'ADN internalisé[49], tandis que la voie cGAS-STING couvre une large gamme de ligands extracellulaires (ADN viral, bactérien, NETs) et intracellulaires (ADN mitochondrial-génomique) libre dans le cytosol[52, 54, 56, 209, 210], ce qui souligne la complémentarité des deux systèmes pour permettre aux plaquettes d'élargir leur spectre de détection et couvrir ainsi plusieurs types de signaux.

Comme les plaquettes activées libèrent des microvésicules plaquettaires contenant certains constituants plaquettaires tels que des mitochondries fonctionnelles pouvant moduler les fonctions des cellules réceptrices [38] ainsi que des ARNs qui peuvent être capturés par les cellules endothéliales [211], il serait pertinent de déterminer si certains composants de la voie cGAS-STING sont incorporés dans ces microvésicules plaquettaires et qui pourraient favoriser une communication intercellulaire afin de diffuser une activation de la voie cGAS-STING au-delà du site initial de l'infection ou de l'inflammation.

2. La signalisation via STING contribue à l'activation plaquettaire :

Comme évoqué antérieurement, notre travail a mis en évidence que l'activation de la signalisation STING a un effet plutôt sur l'activité des plaquettes démontrée par l'augmentation de la translocation de la P-sélectine à leur surface. De manière concordante avec nos résultats, une étude menée en parallèle a décrit le mécanisme par lequel STING induit l'activation des plaquettes via son interaction avec la protéine STXBP2 (Syntaxin Binding Protein 2)[212]. L'interaction STING-STXBP2 médiée par le cGAMP extracellulaire enclenche l'assemblage du

complexe SNARE, la dégranulation plaquettaire et la translocation de la P-sélectine, ce qui promeut la thrombose septique[212]. Ce mécanisme suggère que la signalisation via STING représente un lien entre l'activation plaquettaire exacerbée et les états thrombo-inflammatoires observés dans différentes pathologies. En effet, ceci est cohérent avec les données rapportées dans différents contextes pathologiques d'inflammation stérile, d'irradiation et d'hypoxie, où STING a également été impliqué[209, 210, 213]. Ainsi, l'exposition des MK matures aux irradiations perméabilise la membrane mitochondriale et résulte en l'activation de cGAS-STING par le relâchement de l'ADNmt[210]. La production d'IFN subséquente augmente la GTPase guanylate-binding protein 2 (GBP2) qui corrèle avec la production de plaquettes larges et hyperactives qui favorisent la thrombose[210]. Par ailleurs, chez les patients présentant un infarctus du myocarde avec sus-décalage du segment ST (STEMI : *ST-Elevation Myocardial Infarction)*, une des formes de crises cardiaques les plus mortelles, des taux élevés d'ADNdb sont présents et ont un effet direct sur l'activation plaquettaire[209]. Cet ADNdb, issu des NETs, active cGAS après son entrée dans la plaquette induisant la production de cGAMP et activant STING selon un mécanisme dépendant de l'inflammasome NLRP3 et de la production d'IL1-β. Cette dernière renforce l'hyperactivation des plaquettes en stimulant la dégranulation et l'agrégation plaquettaire, ce qui promeut l'infarctus du myocarde[209]. Enfin, dans le contexte d'hypoxie, un état pathologique caractérisé par une faible saturation en oxygène dans le sang et fréquent dans les **maladies respiratoires et infections cardiovasculaires**, l'activation aberrante de la voie cGAS-STING par l'ADNmt dans les plaquettes provoque une activation plaquettaire excessive avec une formation accrue de NETs[213]. Ensemble, ces études soulignent le rôle pathologique de la signalisation de STING au sein des plaquettes dans plusieurs maladies, et ce de différentes manières.

Toutefois, dans le contexte thrombo-inflammatoire de l'infection IAV, la déplétion spécifique de STING dans les plaquettes n'améliore pas les marqueurs

de la pathologie et de l'inflammation chez la souris, ce qui suggère que STING n'est pas le déclencheur unique de la pathologie virale dans ce contexte (résultats non démontrés). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'IAV est une infection localisée aux poumons, alors que le sepsis est une infection systémique[212]. De plus, la coagulation et la thrombose observées dans l'infection de la grippe dépendent également de l'activation endothéliale et de l'abondance des cytokines pulmonaires,[100] ce qui pourrait justifier pourquoi cette déplétion n'est pas suffisante pour améliorer l'état pathologique des souris. Une étude a démontré que l'inhibition spécifique de l'agrégation plaquettaire par le Clopidogrel réduit l'activation plaquettaire mais n'améliore pas la survie chez les souris, sauf lorsqu'il est combiné à un inhibiteur de la réplication viral[119], ce qui souligne que l'activation plaquettaire est une composante qui contribue à la pathologie mais qui est non exclusive. Ces observations corrèlent avec nos données qui démontrent que bien que STING contribue à l'activation des plaquettes, sa déplétion ne procure pas un effet protecteur dans ce contexte.

Il convient de noter que nous n'avons pas observé une hausse dans l'exposition de la P-sélectine dans les plaquettes au jour 5 de l'infection, bien que certaines études l'aient démontrée[120, 137, 214, 215]. Cependant, les doses virales, le temps d'infection et le génotype de souris pourraient expliquer cette différence. Toutefois, même en l'absence d'augmentation de la P-sélectine, nous avons observé une hausse dans les interactions entre les neutrophiles et les plaquettes, ce qui suggère que le mécanisme d'interaction n'implique pas exclusivement les liaisons P-sélectine-PSGL1. Ceci concorde avec l'étude de l'équipe de Craig Jenne, dans laquelle les chercheurs démontrent que dans le contexte IAV, l'interaction entre ces deux cellules dépend également de la liaison du CD41 sur le CD18 des neutrophiles[42]. De plus, aucune mesure de la P-sélectine n'a été rapporté. Comme STING contribue à l'activation des plaquettes via la P-sélectine, sa déplétion n'empêche pas les plaquettes d'interagir avec les neutrophiles pour

amplifier la pathologie. Bien que nous ayons fait référence à ce mode d'activation, d'autres mécanismes pourraient contribuer à promouvoir la pathologie grippale.

Il est également pertinent de rappeler que l'activation des plaquettes engendre également la libération de microvésicules plaquettaires qui sont hautement pro-coagulantes en raison de l'exposition de la PS[216]. Ces microvésicules participent également à l'inflammation en favorisant les interactions avec les neutrophiles, les monocytes et les cellules endothéliales[43, 44], contribuant ainsi à la thromboinflammation. Il serait alors intéressant de quantifier la libération de ces microvésicules durant l'infection IAV car elles pourraient contribuer à amplifier les interactions avec les cellules immunitaires observées dans notre étude.

Malgré le fait que la mortalité causée par le virus soit multifactorielle dans l'infection IAV, STING agit pour autant sur la réactivité des plaquettes issues de l'infection en présence de cGAMP (Fig.4F du chapitre III), ce qui justifie d'investiguer sa régulation. D'autant plus que dans d'autres pathologies, la production d'IFN et la présence de cGAMP influencent fortement l'hyperactivation plaquettaire[212, 217-221]. De ce fait, comprendre comment STING est modulé demeure important pour expliquer la différence dans l'activation plaquettaire selon le contexte, pour démystifier le lien entre le mécanisme cellulaire et le contexte pathologique, et enfin pour permettre l'identification de cibles thérapeutiques.

3. Régulation dynamique de STING par redistribution indépendante de la transcription :

Nous avons rapporté que l'exposition des MK à l'IFN s'accompagne d'un enrichissement de STING dans les territoires pré-plaquettaires sans augmentation protéique dans les MK (Fig.1 du chapitre III). Ce résultat corrèle avec nos données in vivo, où une augmentation de STING dans les plaquettes est observée sans aucune modulation transcriptionnelle ni protéique dans les MK au jour 3 de l'infection. L'ensemble de nos observations sont en accord avec des

données transcriptomiques durant les infections, où l'ARNm de STING n'a pas été détecté dans les plaquettes[102, 117, 222]. Ces observations suggèrent fortement que l'augmentation de STING dans les plaquettes durant l'infection IAV diffère de ce qui est déjà établi pour d'autres protéines, c'est-à-dire, en dépit d'une augmentation transcriptionnelle et traductionnelle comme rapportée pour IFITM3[116], et pourrait impliquer des mécanismes de tri préférentiel médiés par l'IFN qui dirigent STING vers les plaquettes.

Dans notre modèle, nous suggérons que le mécanisme de tri qui augmente STING dans les plaquettes en réponse à l'IFN repose sur le PI4P. De manière intéressante, nous avons observé une réduction de la kinase PIP5K1C dans le MK au jour 3 de l'infection IAV (Fig.6D du chapitre III), ce qui suggère une accumulation du PI4P dans des vésicules de transports comme rapporté dans une étude qui a démontré que l'IFN est capable de moduler l'expression des kinases impliquées dans le métabolisme des PI (phosphoinositides)[223]. Néanmoins, des investigations complémentaires seront nécessaires afin de confirmer le rôle des PI4P dans ce mécanisme. Bien que nous ayons observé une diminution d'expression des kinases (PI4K et OCRL) responsables de la génération des PI4P au jour 3 et 5 de l'infection, ces analyses n'excluent pas l'existence d'une régulation précoce, à savoir au jour 1, où une augmentation transitoire pourrait survenir à une étape précédant la réduction de PIP5K1C. De plus, l'impact réel sur les niveaux et la distribution du pool des PI4P reste indéterminé en l'absence de mesures directes. Toutefois, l'analyse de l'expression des phosphatases, notamment sac1 (*Phosphatidylinositol-3-phosphatase*) demeure intéressant en raison de son implication dans le trafic des vésicules du Golgi vers la membrane plasmique du MK lors de sa maturation[168]. Son éventuelle réduction dans notre contexte pourrait être associée à une augmentation du pool des PI4P, ce qui faciliterait le trafic des vésicules du Golgi contenant STING vers la membrane plasmique, notamment dans les territoires pré-plaquettaires. Cependant, le métabolisme des phosphoinositides ne repose

pas uniquement sur la régulation transcriptionnelle de ces enzymes mais impliquent également d'autres mécanismes, notamment leur stabilité et leur recrutement subcellulaire. À titre d'exemple, la protéine ACBD3 est essentielle au recrutement et à la stabilisation de la PI4K pour la synthèse de PI4P nécessaire à la signalisation de STING[63].

Un autre niveau de régulation de la dynamique des PI4P repose sur l'homéostasie du cholestérol. En effet, la protéine d'échange lipidique OSBP (*Oxysterol-binding protein*) permet le transfert du cholestérol entre les différents compartiments membranaires, une réaction nécessitant la consommation du PI4P. En effet, l'inhibition d'OSBP engendre l'accumulation de PI4P au niveau du Golgi conduisant à un ancrage soutenu de STING[63]. Fait intéressant, la protéine antivirale IFITM3, induite par l'IFN et lors de l'infection IAV, est connu pour perturber l'échange du cholestérol entre les membranes en bloquant l'interaction OSBP-VAPA[114]. Ces données suggèrent une voie potentielle à explorer compte tenu du rôle d'IFITM3 dans le trafic membranaire[113, 117].

L'autophagie représente également un autre mécanisme de trafic membranaire. Comme STING active l'autophagie[81, 82], il est également plausible que ce système puisse être impliqué dans sa redistribution vers les plaquettes. En effet, STING assure la formation d'autophagosomes pour favoriser la clairance de l'ADN cytosolique[81], ce qui suggère que ces compartiments pourraient servir à trier et redistribuer STING vers les territoires pré-plaquettaires dans le MK. De plus, STING peut également faire l'objet d'un transfert intercellulaire pour sa signalisation[85], ce qui démontre que STING est dynamique dans la cellule et emprunte des voies de trafic cellulaire. Ce transfert repose sur la formation d'autophagosome à partir de vésicules périnucléaires dans lesquelles STING est internalisé, grâce à la synthèse des PI4P médiée par le recrutement de la PI4K2A par RAB22A[85]. Il serait toutefois très pertinent d'explorer cette voie compte tenu

de la formation de vésicules périnucléaires (réticulum endoplasmique- Golgi) pour la biogénèse du DMS lors de la maturation du MK[166].

4. L'impact de la modulation de STING sur la sensibilité des plaquettes au cGAMP dans différents contextes pathologiques :

Nous avons rapporté que l'augmentation de STING dans les plaquettes au jour 3 post-infection, médiée par l'axe IFN-PI4P, promeut l'activation des plaquettes en présence de cGAMP. De ce fait, bien que la déplétion spécifique de STING n'améliore pas les marqueurs pathologiques chez les souris infectées par IAV, notre travail révèle pour la première fois un nouveau niveau de régulation de l'identité immunologique des plaquettes. L'identification de ce mécanisme présente un intérêt majeur car cette régulation pourrait devenir plus critique dans divers contextes pathologiques.

En effet, une importante libération de cGAMP dans la circulation est rapportée dans les infections systémiques tel que le sepsis[212]. Ainsi, avec un niveau élevé de STING, les plaquettes deviennent très sensibles à l'activation lorsqu'exposées au cGAMP. Et donc, l'hyperactivation des plaquettes en présence de cGAMP et leur contribution dans la thrombo-inflammation observées dans le sepsis[212] pourrait provenir également de la modulation de STING au sein de la lignée MK-plaquette. Notons également le cas des co-infections, notamment une infection associant des agents pathogènes viraux et bactériens, la coexistence des signaux inflammatoires pourrait amplifier la sensibilité des plaquettes et favoriser la thrombo-inflammation.

Notre travail pourrait s'insérer également dans le contexte des interféronopathies, où une production importante des IFN est associée à des complications sévères incluant, une inflammation systémique chronique et dans certains cas des atteintes vasculaires et pulmonaires, suggérant un environnement favorable à l'activation plaquettaire et à l'installation de la thrombo-inflammation[218, 221, 224-227]. En effet, une augmentation de l'activation plaquettaire et des dommages

endothéliaux est démontrée dans la maladie de la sclérose systémique, caractérisée par une production chronique d'IFN, dans laquelle une incidence de 30% d'évènements thrombotiques est rapportée chez ces patients[227, 228]. Ceci pourrait être en lien avec une activation plaquettaire via des mécanismes impliquant une modulation de STING, et qui reste à investiguer.

Enfin, l'enrichissement de STING observé dans les plaquettes au cours de l'infection pourrait avoir des conséquences au-delà des plaquettes elle-même. Comme les plaquettes activées libèrent des microvésicules pro-coagulantes, dans certaines conditions inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, ces microvésicules peuvent s'accumuler dans le liquide synovial des patients atteints et contribuer à l'inflammation locale [38]. Bien que la présence de STING dans les microvésicules plaquettaires demeure hypothétique, il est possible que son enrichissement dans les plaquettes favorise son incorporation dans les microvésicules libérées lors de l'activation. Cette hypothèse s'appuie sur des études ayant démontré la capacité des plaquettes à enrichir les mitochondries dans les microvésicules plaquettaires pouvant les transférer aux neutrophiles pour moduler leurs fonctions inflammatoires [38], ainsi que sur la capacité de transfert intercellulaire de STING pour sa signalisation[85]. Ainsi, si STING était présent dans les microvésicules plaquettaires, celles-ci pourraient contribuer à la propagation de signaux inflammatoires vers d'autres tissus et renforcer la thrombo-inflammation.

5. Mécanismes régulateurs de STING dans le stade tardif de l'infection IAV :

Dans la phase tardive de l'infection, nous avons observé que les niveaux protéiques de STING diminuent dans les MK, sans variation transcriptionnelle (Figure 5 du chapitre III). À ce stade, les plaquettes restaurent un niveau normal de STING (Figure 4 du chapitre III). Parallèlement, nos données *in vitro* soutiennent que cette réduction dans les MK est sous-l'influence de l'IL1-β (Fig7

du chapitre III). Ceci suggère que la modulation de STING est transitoire et régulée par l'inflammation générée par l'infection, et qui pourrait limiter l'activation excessive et prolongée des plaquettes.

D'ailleurs, les cytokines inflammatoires de la famille de l'IL-1 sont connues pour remodeler les MK en favorisant la mégacaryopoïèse d'urgence et la production des plaquettes par le mécanisme de rupture/fragmentation cytosolique[93, 178]. En sachant que l'IL-1 est induite durant l'infection IAV[93], nous supposons que l'exposition des MK à cette cytokine pourrait refléter ce contexte inflammatoire et contribuer à modifier la distribution de STING, modulant ainsi indirectement la sensibilité des plaquettes au cGAMP. De plus, l'activation de STING via l'inflammasome NLRP3 conduit à la production de l'IL-1β par les plaquettes menant à leur hyperactivation[209]. Et donc, l'IL-1β pourrait provenir des plaquettes et agir de façon paracrine sur les MK afin de réduire les niveaux de STING et assurer un rétrocontrôle négatif.

Par ailleurs, la signalisation IL-1β a été rapporté induire un stress mitochondrial qui se traduit par le relâchement de l'ADNmt et l'activation de la voie cGAS-STING[229]. L'activation de STING est suivie de sa dégradation, ce qui pourrait expliquer la réduction observée en présence d'IL-1β et durant la phase tardive de l'infection IAV in vivo. À noter que cette réduction pourrait également impliquer une des voies de dégradation de STING, notamment la voie lysosomale et/ou la voie autophagique. Enfin, la question de savoir si la restauration basale de STING dans les plaquettes est due à l'arrêt de sa redistribution dirigée ou à une quantité insuffisante de STING disponible pour son transfert demeure ouverte.

Notons que dans notre étude, nous avons observé une modulation différente de STING selon le signal inflammatoire présent. Il convient de préciser qu'il s'agit d'une adaptation du MK au signal reçu et qui pourrait s'inscrire dans un contexte

compatible avec une mégacaryopoïèse d'urgence. En effet, l'exposition du MK à l'IFN ou à l'IL-1 déclenche une différenciation et une maturation plus rapide caractérisée par une mégacaryopoïèse d'urgence mais qui demeure toutefois distinctes selon le signal inflammatoire[93, 181]. Des données rapportent l'existence de SL-MKP (Stem-Like MKP) qui possèdent des ARNm codant pour des protéines de maturation des MK dont leur traduction demeure réprimée en homéostasie[181]. En revanche, la signalisation IFN déclenche la traduction massive de ces transcrits préexistants, indépendamment d'une modulation transcriptionnelle et qui permet la sortie de quiescence des SL-MKP et leur maturation pour répondre au besoin accru des plaquettes[181]. D'autres évidences suggèrent que la signalisation interleukine favorise la différenciation directe de CSH-CD41+ biaisées en MKP, omettant les progéniteurs intermédiaires, selon une mégacaryopoïèse d'urgence TPO-indépendante dans un contexte viral[93]. Les plaquettes générées par cette mégacaryopoïèse d'urgence induite par IAV sont larges et immatures avec un phénotype pro-coagulant[93].

6. Modèle proposé de la modulation de STING durant l'infection :

Ensemble, les découvertes de cette thèse révèlent que les mégacaryocytes possèdent la voie STING et la transfèrent aux plaquettes. Durant l'infection IAV, l'environnement inflammatoire module la distribution de STING du MK vers les plaquettes selon un mécanisme finement régulé indépendant de la transcription. Les résultats générés à partir des souris infectées par le virus de l'influenza nous ont permis de proposer le modèle suivant (Figure 18) dans lequel on observe que la modulation de STING survient en deux phases. U**ne phase précoce** de distribution dirigée de STING, IFN-PI4P dépendante, qui permet son tri sélectif au sein des plaquettes nouvellement produites. Ces plaquettes montrent alors une sensibilité accrue à l'activation en présence de cGAMP. Et **une phase tardive** de

rétrocontrôle dépendante de l'IL-1 qui réduit STING dans le mégacaryocyte, et rétablit ainsi son équilibre basal dans les plaquettes.

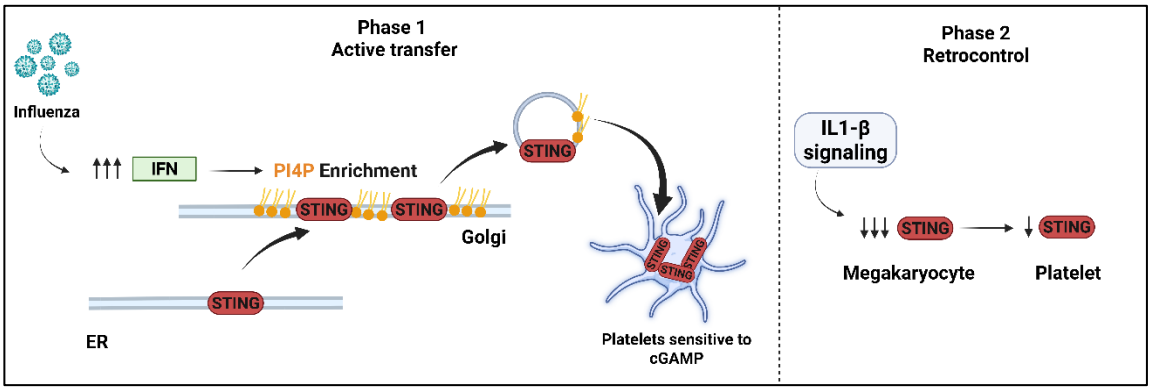


Figure 18 : Modèle proposé de la modulation de STING par l'IFNα et l'IL-1β durant l'infection IAV.

7. Limitations :

Bien que notre modèle propose une représentation globale des mécanismes observés durant l'infection influenza, des limitations existent et nous devrons les considérer pour interpréter les résultats de notre travail.

En premier lieu, nous évoquons que les MK et les plaquettes présentent des contraintes biologiques qui limitent leur utilisation dans certaines approches de la biologie cellulaire et moléculaire. En effet, les MK représentent une population très rare dans la moelle osseuse, il est donc difficile d'obtenir un matériel suffisant pour tester différentes conditions *in vitro*. Il convient de préciser que les MK sont très fragile et difficile à transfecter. De plus, leur analyse s'avère extrêmement complexe en raison de l'hétérogénéité de la population isolée, notamment la présence de MK avec un rôle distinct et des stades de maturation différents. Bien que nous utilisions un modèle de cellule primaire, leur culture in vitro ne reflète pas parfaitement leur environnement dans la moelle osseuse. En ce qui concerne les plaquettes, je note principalement leur rapide activation ex vivo, ce qui peut facilement générer des artefacts expérimentaux.

Notons également que la limite principale de notre étude est que le mécanisme impliquant le transfert de STING demeure principalement corrélatif, en raison de la difficulté à générer des plaquettes *in vitro* à partir des MK de la moelle osseuse pour démontrer une causalité directe. De plus, nous avons utilisé un modèle animal. Bien que le modèle murin soit très souvent utilisé pour étudier les maladies humaines, il convient de préciser qu'il existe certaines différences, notamment la ploïdie des MK qui est généralement plus faible chez la souris, la taille et la durée de vie des plaquettes chez la souris et l'homme et la différence dans l'expression de certains récepteurs plaquettaires, ce qui limitent la transposition directe chez l'humain. Il serait donc très pertinent de confirmer la modulation de STING chez les patients atteints de la grippe.

Enfin, je tiens à préciser que nous avons associé le phénotype plaquettaire observé aux mécanismes qui découlent de la régulation de STING au sein des MK de la moelle osseuse. En sachant que les MK circulants et pulmonaires sont augmentés durant l'infection, leur analyse s'avère nécessaire bien qu'ils soient difficiles à étudier en raison de leur faible fréquence et de la complexité de leur analyse due à la présence des agrégats plaquettes-neutrophiles dans le sang qui peuvent facilement être confondues avec les MK.

8. Perspectives et directions futures

Les résultats de la présente thèse éclairent sur la modulation dynamique de STING dans la lignée MK-plaquettes durant l'infection IAV. Toutefois, ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives et soulèvent plusieurs questions quant au rôle biologique de cette modulation. Principalement, il reste à déterminer si STING exerce une fonction spécifique au MK et si son transfert vers les plaquettes représente un mécanisme fonctionnel durant l'infection ou s'il s'agit simplement d'une conséquence de sa redistribution au cours de la thrombopoïèse.

Une autre perspective à considérer implique les mécanismes régulant la localisation intracellulaire de STING en réponse au milieu inflammatoire générée par l'infection. Une meilleure identification des voies responsables du trafic de STING permettrait de mieux comprendre la manière dont les MK adaptent le contenu immunitaire des plaquettes en contexte inflammatoire, en plus de caractériser si ce mécanisme est spécifique à l'infection IAV ou s'il représente un mécanisme plus général.

Finalement, les conséquences physiopathologiques de la modulation dynamique de STING restent à élucider. Au-delà de son rôle dans l'activation plaquettaire, STING pourrait contribuer à d'autres fonctions immunitaires des MK et des plaquettes et qui demeurent peu comprises. L'exploration de ces fonctions permettrait de mieux caractériser l'implication de la lignée MK-plaquette et la contribution de la voie cGAS-STING dans la régulation des réponses immunitaires et thrombo-inflammatoires.

RÉFÉRENCES

1. Abbas AB, Aldomaini A, Al-Qadri AA, Algorbani Za, Aljamali S, Alsiri S, et al. **Determine Complete Blood Count Reference Values Among Healthy Adult Populations**. *Journal of Blood Medicine 2024 Dec 19*; 15.https://doi.org/10.2147/JBM.S488050
2. Carminita E, Becker IC, Italiano JE. **What It Takes To Be a Platelet: Evolving Concepts in Platelet Production**. *Circulation Research 2024–08–02*; 135(4).https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.124.323579
3. Hamad MA, Schanze N, Schommer N, Nuhrenberg T, Duerschmied D. **Reticulated Platelets-Which Functions Have Been Established by In Vivo and In Vitro Data?** *Cells 2021*; 10(5).https://doi.org/10.3390/cells10051172
4. Rasmussen TV, Ahlen MT. **Murine models for studying treatment, prevention and pathogenesis of FNAIT**. *Transfusion and Apheresis Science 2020/02/01*; 59(1).https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102706
5. FUKUDA T, ASOU E, NOGI K, GOTO K. **Evaluation of mouse red blood cell and platelet counting with an automated hematology analyzer**. *The Journal of Veterinary Medical Science 2017 Aug 27*; 79(10).https://doi.org/10.1292/jvms.17-0387
6. Stone AP, Nascimento TF, Barrachina MN. **The bone marrow niche from the inside out: how megakaryocytes are shaped by and shape hematopoiesis**. *Blood 2022/01/27*; 139(4).https://doi.org/10.1182/blood.2021012827
7. Lefrançais E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. **The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors**. *Nature 2017 544:7648 2017–03–22*; 544(7648).https://doi.org/10.1038/nature21706
8. Gelon L, Fromont L, Lefrançais E. **Frontiers | Occurrence and role of lung megakaryocytes in infection and inflammation**. *Frontiers in Immunology 2022/11/29*; 13.https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1029223
9. Potts KS, Farley A, Dawson CA, Rimes J, Biben C, de Graaf C, et al. **Membrane budding is a major mechanism of in vivo platelet biogenesis**. *J Exp Med 2020*; 217(9).https://doi.org/10.1084/jem.20191206
10. Durán-Saenz NZ, Serrano-Puente A, Gallegos-Flores PI, Mendoza-Almanza BD, Esparza-Ibarra EL, Godina-González S, et al. **Platelet Membrane: An Outstanding Factor in Cancer Metastasis**. *Membranes 2022, Vol 12, Page 182 2022–02–03*; 12(2).https://doi.org/10.3390/membranes12020182
11. Sellers S, Gulsin G, Zaminski D, Bing R, Latib A, Sathananthan J, et al. **Platelets: Implications in Aortic Valve Stenosis and Bioprosthetic Valve Dysfunction From Pathophysiology to Clinical Care - PubMed**. *JACC Basic to translational science 11/17/2021*; 6(12).https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.07.008

12. Eisinger F, Patzelt J, Langer H. **The Platelet Response to Tissue Injury - PubMed**. *Frontiers in medicine 11/13/2018*; 5.https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00317
13. Saarikangas J, Zhao H, Lappalainen P. **Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides - PubMed**. *Physiological reviews 2010 Jan*; 90(1).https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2009
14. Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marín F, Rivera J, Teruel-Montoya R, Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marín F, et al. **Tubulin in Platelets: When the Shape Matters**. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol 20, Page 3484 2019–07–16*; 20(14).https://doi.org/10.3390/ijms20143484
15. WEYRICH AS, SCHWERTZ H, KRAISS LW, ZIMMERMAN GA. **Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives**. *Journal of Thrombosis and Haemostasis 2009/02/01*; 7(2).https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03211.x
16. Rowley J, Schwertz H, Weyrich A. **Platelet mRNA: the meaning behind the message - PubMed**. *Current opinion in hematology 2012 Sep*; 19(5).https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328357010e
17. Palta S, Saroa R, Palta A. **Overview of the coagulation system**. *Indian Journal of Anaesthesia Sep–Oct 2014*; 58(5).https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643
18. Troisi R, Balasco N, Autiero I, Sica F, Vitagliano L. **New insight into the traditional model of the coagulation cascade and its regulation: illustrated review of a three-dimensional view**. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 2023/08/01*; 7(6).https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.102160
19. Halkar M, Lincoff A. **Dual antiplatelet therapy for acute coronary syndromes: How long to continue? - PubMed**. *Cleveland Clinic journal of medicine 2016 Sep*; 83(9).https://doi.org/10.3949/ccjm.83a.15092
20. Neubauer K, Zieger B. **Endothelial cells and coagulation**. *Cell and Tissue Research 2021 May 20*; 387(3).https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2
21. Heemskerk JWM, Vuist WMJ, Feijge MAH, Reutelingsperger CPM, 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 1997/10/01*; 90(7).https://doi.org/10.1182/blood.V90.7.2615
22. Williams JK, Ngo JM, Murugupandiyan A, Croall DE, Hartzell HC, Schekman R. **Calpains orchestrate secretion of annexin-containing microvesicles during membrane repair**. *Journal of Cell Biology 2025/07/07*; 224(7).https://doi.org/10.1083/jcb.202408159
23. Risman RA, Kirby NC, Bannish BE, Hudson NE, Tutwiler V. **Fibrinolysis: an illustrated review**. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 2023 Feb 17*; 7(2).https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100081

24. Carestia A, Godin LC, Jenne CN. **Step up to the platelet: Role of platelets in inflammation and infection**. *Thrombosis Research 2023/11/01*; 231.https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.10.001
25. Schrottmaier W, Assinger A. **The Concept of Thromboinflammation - PubMed**. *Hamostaseologie 2024 Feb*; 44(1).https://doi.org/10.1055/a-2178-6491
26. Assinger A. **Frontiers | Platelets and Infection – An Emerging Role of Platelets in Viral Infection**. *Frontiers in Immunology 2014/12/18*; 5.https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00649
27. Chen Y, Zhong H, Zhao Y, Luo X, Gao W. **Role of platelet biomarkers in inflammatory response - PubMed**. *Biomarker research 08/02/2020*; 8(1).https://doi.org/10.1186/s40364-020-00207-2
28. Lam FW, Vijayan KV, Rumbaut RE. **Platelets and their interactions with other immune cells**. *Comprehensive Physiology 2015 Jul 1*; 5(3).https://doi.org/10.1002/cphy.c140074
29. Nicolai L, Pekayvaz K, Massberg S. **Platelets: Orchestrators of immunity in host defense and beyond**. *Immunity 2024/05/14*; 57(5).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.04.008
30. Mack A, Hoek TV, Du X. **Thromboinflammation and the Role of Platelets**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2024–06*; 44(6).https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.124.320149
31. von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AEI, et al. **Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium**. *Blood 2005/02/01*; 105(3).https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2475
32. Guo L, Feng K, Wang YC, Mei JJ, Ning RT, Zheng HW, et al. **Critical role of CXCL4 in the lung pathogenesis of influenza (H1N1) respiratory infection**. *Mucosal Immunology 2017/11/01*; 10(6).https://doi.org/10.1038/mi.2017.1
33. Arita H, Nakano T, Hanasaki K. **Thromboxane A2: Its generation and role in platelet activation**. *Progress in Lipid Research 1989/01/01*; 28(4).https://doi.org/10.1016/0163-7827(89)90002-7
34. Shen R-F, Tai H-H, Shen R-F, Tai H-H. **Thromboxanes: Synthase and receptors**. *Journal of Biomedical Science 1998 5:3 1998/05*; 5(3).https://doi.org/10.1007/BF02253465
35. Baldassare JJ, Tarver AP, Henderson PA, Mackin WM, Sahagan B, Fisher GJ. **Reconstitution of thromboxane A2 receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in isolated platelet membranes: involvement of phosphoinositide-specific phospholipase C-beta and GTP-binding protein Gq**. *Biochemical Journal 1993 Apr 1*; 291(Pt 1).https://doi.org/10.1042/bj2910235
36. Suzuki J, Nagata S. **Phospholipid scrambling on the plasma membrane**. *Methods Enzymol 2014*; 544:381–393.https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417158-9.00015-7

37. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Cooray P, Salem HH, Jackson SP. **Calpain Cleavage of Focal Adhesion Proteins Regulates the Cytoskeletal Attachment of Integrin αIIbβ3 (Platelet Glycoprotein IIb/IIIa) and the Cellular Retraction of Fibrin Clots ***. *Journal of Biological Chemistry 1997/01/17*; 272(3).https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1694
38. Boudreau L, Duchez A, Cloutier N, Soulet D, Martin N, Bollinger J, et al. **Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation - PubMed**. *Blood 10/02/2014*; 124(14).https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-573543
39. Xu T, Zhang L, Geng ZH, Wang H-B, Wang J-T, Chen M, et al. **P-selectin Cross-links PSGL-1 and Enhances Neutrophil Adhesion to Fibrinogen and ICAM-1 in a Src Kinase-Dependent, but GPCR-Independent Mechanism**. *Cell Adhesion & Migration 2007–7–1*; 1(3).https://doi.org/10.4161/cam.1.3.4984
40. Martins PAdC, van Gils JM, Mol A, Hordijk PL, Zwaginga JJ. **Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of β1 and β2 integrins**. *Journal of Leukocyte Biology 2006/03/01*; 79(3).https://doi.org/10.1189/jlb.0605318
41. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. **Quantification of Platelet Activation Status by Analyzing P-Selectin Expression**. *Biochemical and Biophysical Research Communications 2000/07/05*; 273(2).https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2977
42. Kim S-J, Carestia A, McDonald B, Zucoloto AZ, Grosjean H, Davis RP, et al. **Platelet-Mediated NET Release Amplifies Coagulopathy and Drives Lung Pathology During Severe Influenza Infection**. *Frontiers in Immunology 2021 Nov 11*; 12.https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.772859
43. Foulem RD, Mbarik M, Doiron JA, Soucy M-FN, Toro-Ramirez D, Pecourt F, et al. **Platelet-derived microvesicles modulate cytokine and lipid mediator profiles in THP-1 monocytes and macrophages**. *Immunology Letters 2025/10/01*; 275.https://doi.org/10.1016/j.imlet.2025.107029
44. Kuravi SJ, Harrison P, Rainger GE, Nash GB. **Ability of Platelet-Derived Extracellular Vesicles to Promote Neutrophil-Endothelial Cell Interactions**. *Inflammation 2018 Sep 14*; 42(1).https://doi.org/10.1007/s10753-018-0893-5
45. Riaz AH, Tasma BE, Woodman ME, Wooten RM, Worth RG. **Human platelets efficiently kill IgG-opsonized E. coli**. *FEMS Immunology & Medical Microbiology 2012/06/01*; 65(1).https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00945.x
46. Bote J, Corkrey HA, Koupenova M. **Human Platelets and Influenza Virus: Internalization and Platelet Activation**. *Platelets 2021 Aug 8*; 33(2).https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1961710
47. Koupenova M, Corkrey HA, Vitseva O, Manni G, Pang CJ, Clancy L, et al. **The role of platelets in mediating a response to human influenza infection**. *Nature Communications 2019 10:1 2019–04–16*; 10(1).https://doi.org/10.1038/s41467-019-09607-x

48. Koupenova M, Corkrey HA, Vitseva O, Manni G, Pang CJ, Clancy L, et al. **The role of platelets in mediating a response to human influenza infection**. *Nature Communications 2019 Apr 16*; 10(1).https://doi.org/10.1038/s41467-019-09607-x
49. Thon J, Peters C, Machlus K, Aslam R, Rowley J, Macleod H, et al. **T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling - PubMed**. *The Journal of cell biology 08/20/2012*; 198(4).https://doi.org/10.1083/jcb.201111136
50. Jansen MPB, Emal D, Teske GJD, Dessing MC, Florquin S, Roelofs JJTH. **Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps**. *Kidney International 2017/02/01*; 91(2).https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.006
51. Ishikawa H, Barber GN, Ishikawa H, Barber GN. **STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling**. *Nature 2008 455:7213 2008–08–24*; 455(7213).https://doi.org/10.1038/nature07317
52. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang Y-Y, Li Y, Diao F, et al. **The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation**. *Immunity 2008/10/17*; 29(4).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.003
53. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. **Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA**. *Science 2013–02–15*; 339(6121).https://doi.org/10.1126/science.1229963
54. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. **Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway**. *Science 2013–02–15*; 339(6121).https://doi.org/10.1126/science.1232458
55. Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Röhl I, et al. **cGAS produces a 2′-5′-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING**. *Nature 2013 May 30*; 498(7454).https://doi.org/10.1038/nature12306
56. Ahn J, Ruiz P, Barber GN. **Intrinsic Self-DNA Triggers Inflammatory Disease Dependent on STING**. *The Journal of Immunology 2014/11/01*; 193(9).https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401337
57. Mackenzie KJ, Carroll P, Martin C-A, Murina O, Fluteau A, Simpson D, et al. **cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity**. *Nature 2017 Jul 24*; 548(7668).https://doi.org/10.1038/nature23449
58. Zheng W, Chen N, Meurens F, Zheng W, Zhu J. **How Does cGAS Avoid Sensing Self-DNA under Normal Physiological Conditions?** *International Journal of Molecular Sciences 2023 Sep 29*; 24(19).https://doi.org/10.3390/ijms241914738
59. Civril F, Deimling T, de Oliveira Mann C, Ablasser A, Moldt M, Witte G, et al. **Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS - PubMed**. *Nature 06/20/2013*; 498(7454).https://doi.org/10.1038/nature12305
60. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen Z. **Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway -**

PubMed. *Science (New York, NY) 02/15/2013*; 339(6121).https://doi.org/10.1126/science.1232458
61. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. **Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA - PubMed**. *Science (New York, NY) 02/15/2013*; 339(6121).https://doi.org/10.1126/science.1229963
62. Guey B, Ablasser A. **Emerging dimensions of cellular cGAS-STING signaling**. *Current Opinion in Immunology 2022/02/01*; 74.https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.01.004
63. Luteijn RD, Terwisga SRv, Eecke JEV, Onia L, Zaver SA, Woodward JJ, et al. **The activation of the adaptor protein STING depends on its interactions with the phospholipid PI4P**. *Science signaling 2024 Mar 12*; 17(827).https://doi.org/10.1126/scisignal.ade3643
64. Fang R, Jiang Q, Jia X, Jiang Z. **ARMH3-mediated recruitment of PI4KB directs Golgi-to-endosome trafficking and activation of the antiviral effector STING**. *Immunity 2023/03/14*; 56(3).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.02.004
65. Han J, Zhang S, Hou Y, Wang Y, Zhang Z, Yang J, et al. **A chemical agonist and the Golgi-resident lipid PI4P activate STING by inducing transmembrane helix rearrangement**. *Immunity 2026/01/13*; 59(1).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2025.11.004
66. Qin C, Feng S, Feng P. **STeerING PI4P for innate immune activation**. *Immunity 2023/03/14*; 56(3).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.02.012
67. Li J, Tan J, Chen Z, Zhang X, Bai X. **Regulation of STING activation by phosphoinositide and cholesterol - PubMed**. *bioRxiv : the preprint server for biology 12/29/2025*.https://doi.org/10.64898/2025.12.29.696921
68. Dunphy G, Flannery SM, Almine JF, Connolly DJ, Paulus C, Jønsson KL, et al. **Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage**. *Molecular Cell 2018 Sep 6*; 71(5).https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.034
69. Zhang R, Kang R, Tang D, Zhang R, Kang R, Tang D. **The STING1 network regulates autophagy and cell death**. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2021 6:1 2021–06–02*; 6(1).https://doi.org/10.1038/s41392-021-00613-4
70. Simpson SR, Hemphill WO, Hudson T, Perrino FW. **TREX1 – Apex predator of cytosolic DNA metabolism**. *DNA Repair 2020/10/01*; 94.https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102894
71. Koyama R, Arai T, Kijima M, Sato S, Miura S, Yuasa M, et al. **DNase γ, DNase I and caspase-activated DNase cooperate to degrade dead cells**. *Genes to Cells 2016/11/01*; 21(11).https://doi.org/10.1111/gtc.12433
72. Barnett K, Coronas-Serna J, Zhou W, Ernandes M, Cao A, Kranzusch P, et al. **Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA - PubMed**. *Cell 03/07/2019*; 176(6).https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.049

73. Zhao B, Xu P, Rowlett CM, Jing T, Shinde O, Lei Y, et al. **The molecular basis of tight nuclear tethering and inactivation of cGAS**. *Nature 2020 587:7835 2020–09–10*; 587(7835).https://doi.org/10.1038/s41586-020-2749-z
74. Volkman HE, Cambier S, Gray EE, Stetson DB. **Tight nuclear tethering of cGAS is essential for preventing autoreactivity**. *eLife 2019*; 8:1–21.https://doi.org/10.7554/eLife.47491
75. Michalski S, de Oliveira Mann CC, Stafford CA, Witte G, Bartho J, Lammens K, et al. **Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin**. *Nature 2020*; 587(7835):678–682.https://doi.org/10.1038/s41586-020-2748-0
76. Srikanth S, Woo JS, Wu B, El-Sherbiny YM, Leung J, Chupradit K, et al. **The Ca2+ sensor STIM1 regulates the type I interferon response by retaining the signaling adaptor STING at the endoplasmic reticulum**. *Nature Immunology 2019 20:2 2019–01–14*; 20(2).https://doi.org/10.1038/s41590-018-0287-8
77. Jeltema D, Abbott K, Yan N. **STING trafficking as a new dimension of immune signaling**. *The Journal of Experimental Medicine 2023 Jan 27*; 220(3).https://doi.org/10.1084/jem.20220990
78. Sood A, Sood A. **The cGAS-STING axis: a comprehensive review from immune defense to disease pathogenesis**. *Immunologic Research 2025 73:1 2025–06–09*; 73(1).https://doi.org/10.1007/s12026-025-09648-z
79. Schmid M, Fischer P, Engl M, Widder J, Kerschbaum-Gruber S, Slade D. **Frontiers | The interplay between autophagy and cGAS-STING signaling and its implications for cancer**. *Frontiers in Immunology 2024/04/10*; 15.https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1356369
80. Klionsky DJ, Baehrecke EH, Brumell JH, Chu CT, Codogno P, Cuervo AM, et al. **A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition)**. *Autophagy 2011–11–1*; 7(11).https://doi.org/10.4161/auto.7.11.17661
81. Wan W, Qian C, Wang Q, Li J, Zhang H, Wang L, et al. **STING directly recruits WIPI2 for autophagosome formation during STING-induced autophagy**. *The EMBO Journal 2023 42:8 2023–03–06*; 42(8).https://doi.org/10.15252/embj.2022112387
82. Gui X, Yang H, Li T, Tan X, Shi P, Li M, et al. **Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway**. *Nature 2019 567:7747 2019–03–06*; 567(7747).https://doi.org/10.1038/s41586-019-1006-9
83. Kuchitsu Y, Mukai K, Uematsu R, Takaada Y, Shinojima A, Shindo R, et al. **STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes**. *Nature Cell Biology 2023 25:3 2023–03–13*; 25(3).https://doi.org/10.1038/s41556-023-01098-9
84. Prabakaran T, Bodda C, Krapp C, Zhang B, Christensen M, Sun C, et al. **Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-**

dependent autophagy pathway activated by TBK1 - PubMed. *The EMBO journal 04/13/2018*; 37(8).https://doi.org/10.15252/embj.201797858
85. Gao Y, Zheng X, Chang B, Lin Y, Huang X, Wang W, et al. **Intercellular transfer of activated STING triggered by RAB22A-mediated non-canonical autophagy promotes antitumor immunity**. *Cell Research 2022 32:12 2022–10–24*; 32(12).https://doi.org/10.1038/s41422-022-00731-w
86. Zhu S, Yu Y, Qu M, Qiu Z, Zhang H, Miao C, et al. **Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis formation via the STING pathway in sepsis-associated lung injury**. *Cell Death Discovery 2023 9:1 2023–08–25*; 9(1).https://doi.org/10.1038/s41420-023-01614-8
87. Luo S, Luo R, Lu H, Zhang R, Deng G, Luo H, et al. **Activation of cGAS-STING signaling pathway promotes liver fibrosis and hepatic sinusoidal microthrombosis**. *International Immunopharmacology 2023/12/01*; 125.https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.111132
88. Ju Y-n, Li H, Zhuo Z-p, Yang Q, Gao W. **Mitochondrial DNA from endothelial cells activated the cGAS-STING pathway and regulated pyroptosis in lung ischaemia reperfusion injury after lung transplantation**. *Immunobiology 2025/01/01*; 230(1).https://doi.org/10.1016/j.imbio.2024.152865
89. Zhang H, Zeng L, Xie M, Liu J, Zhou B, Wu R, et al. **TMEM173 Drives Lethal Coagulation in Sepsis**. *Cell host & microbe 2020 Mar 5*; 27(4).https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.004
90. Batista VL, Martins JR, Queiroz-Junior CM, Hottz ED, Teixeira MM, Costa VV, et al. **Mechanisms of Thromboinflammation in Viral Infections—A Narrative Review**. *Viruses 2025, Vol 17, Page 1207 2025–09–03*; 17(9).https://doi.org/10.3390/v17091207
91. Engelmann B, Massberg S, Engelmann B, Massberg S. **Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity**. *Nature Reviews Immunology 2012 13:1 2012–12–07*; 13(1).https://doi.org/10.1038/nri3345
92. H tC. **Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis - PubMed**. *Critical care medicine 2000 Sep*; 28(9 Suppl).https://doi.org/10.1097/00003246-200009001-00003
93. Rommel MGE, Walz L, Fotopoulou F, Kohlscheen S, Schenk F, Miskey C, et al. **Influenza A virus infection instructs hematopoiesis to megakaryocyte-lineage output**. *Cell Reports 2022*; 41(1):111447.https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111447
94. Guo L, Rondina MT. **Frontiers | The Era of Thromboinflammation: Platelets Are Dynamic Sensors and Effector Cells During Infectious Diseases**. *Frontiers in Immunology 2019/09/13*; 10.https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02204
95. Hottz ED, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Bozza FA, et al. **Platelet–leukocyte interactions in the pathogenesis of viral infections**. *Platelets 2022–02–17*; 33(2).https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1952179

96. Yang Y, Tang H, Yang Y, Tang H. **Aberrant coagulation causes a hyper-inflammatory response in severe influenza pneumonia**. *Cellular & Molecular Immunology 2016 13:4 2016–04–04*; 13(4).https://doi.org/10.1038/cmi.2016.1
97. Sreeramkumar V, Adrover J, Ballesteros I, Cuartero M, Rossaint J, Bilbao I, et al. **Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation - PubMed**. *Science (New York, NY) 12/05/2014*; 346(6214).https://doi.org/10.1126/science.1256478
98. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X, et al. **High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates With Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection**. *The Journal of Infectious Diseases 2018/01/17*; 217(3).https://doi.org/10.1093/infdis/jix475
99. Kim S, Carestia A, McDonald B, Zucoloto A, Grosjean H, Davis R, et al. **Platelet-Mediated NET Release Amplifies Coagulopathy and Drives Lung Pathology During Severe Influenza Infection - PubMed**. *Frontiers in immunology 11/11/2021*; 12.https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.772859
100. Sugiyama MG, Gamage A, Zyla R, Armstrong SM, Advani S, Advani A, et al. **Influenza Virus Infection Induces Platelet-Endothelial Adhesion Which Contributes to Lung Injury**. *Journal of Virology 2016 Jan 28*; 90(4).https://doi.org/10.1128/JVI.02599-15
101. McDonald B, Davis RP, Kim S-J, Tse M, Esmon CT, Kolaczkowska E, et al. **Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice**. *Blood 2017/03/09*; 129(10).https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-741298
102. Manne B, Denorme F, Middleton E, Portier I, Rowley J, Stubben C, et al. **Platelet gene expression and function in patients with COVID-19 - PubMed**. *Blood 09/10/2020*; 136(11).https://doi.org/10.1182/blood.2020007214
103. Zhang S, Liu Y, Wang X, Yang L, Li H, Wang Y, et al. **SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19 - PubMed**. *Journal of hematology & oncology 09/04/2020*; 13(1).https://doi.org/10.1186/s13045-020-00954-7
104. Nara N, Shimizu M, Yamamoto M, Nakamizo T, Hayakawa A, Johkura K. **Prolonged platelet hyperactivity after COVID-19 infection - PubMed**. *British journal of haematology 2024 Feb*; 204(2).https://doi.org/10.1111/bjh.19125
105. Miles MA, Liong S, Liong F, O'Leary JJ, Brooks DA, Selemidis S. **TLR7-mediated inflammation drives PD-L1 upregulation and T cell exhaustion during influenza A virus infection**. *iScience 2026/02/20*; 29(2).https://doi.org/10.1016/j.isci.2026.114776
106. Mohamed AA, Soler S, Wegner J, Bartok E, Stankovic S, Brooks AG, et al. **Influenza A Infection Stimulates RIG-I and Enhances Effector Function of Primary Human NK Cells**. *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol 24, Page 12220 2023–07–30*; 24(15).https://doi.org/10.3390/ijms241512220
107. Muñoz-Moreno R, Martínez-Romero C, García-Sastre A. **Induction and Evasion of Type-I Interferon Responses during Influenza A Virus Infection**.

Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2021 Oct; 11(10).https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038414
108. Moriyama M, Koshiba T, Ichinohe T. **Influenza A virus M2 protein triggers mitochondrial DNA-mediated antiviral immune responses - PubMed**. *Nature communications 10/11/2019*; 10(1).https://doi.org/10.1038/s41467-019-12632-5
109. Xu F, Wang G, Zhao F, Huang Y, Fan Z, Mei S, et al. **IFITM3 Inhibits SARS-CoV-2 Infection and Is Associated with COVID-19 Susceptibility**. *Viruses 2022, Vol 14, Page 2553 2022–11–18*; 14(11).https://doi.org/10.3390/v14112553
110. Rahman K, Datta SA, Beaven AH, Jolley AA, Sodt AJ, Compton AA. **Cholesterol Binds the Amphipathic Helix of IFITM3 and Regulates Antiviral Activity**. *Journal of Molecular Biology 2022 Jul 21*; 434(19).https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167759
111. Desai TM, Marin M, Chin CR, Savidis G, Brass AL, Melikyan GB. **IFITM3 Restricts Influenza A Virus Entry by Blocking the Formation of Fusion Pores following Virus-Endosome Hemifusion**. *PLOS Pathogens Apr 3, 2014*; 10(4).https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004048
112. Chesarino N, Compton A, McMichael T, Kenney A, Zhang L, Soewarna V, et al. **IFITM3 requires an amphipathic helix for antiviral activity - PubMed**. *EMBO reports 2017 Oct*; 18(10).https://doi.org/10.15252/embr.201744100
113. Spence J, He R, Hoffmann H, Das T, Thinon E, Rice C, et al. **IFITM3 directly engages and shuttles incoming virus particles to lysosomes - PubMed**. *Nature chemical biology 2019 Mar*; 15(3).https://doi.org/10.1038/s41589-018-0213-2
114. Amini-Bavil-Olyaee S, Choi Youn J, Lee Jun H, Shi M, Huang I-C, Farzan M, et al. **The Antiviral Effector IFITM3 Disrupts Intracellular Cholesterol Homeostasis to Block Viral Entry**. *Cell Host & Microbe 2013/04/17*; 13(4).https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.006
115. Jiménez-Munguía I, Beaven AH, Blank PS, Sodt AJ, Zimmerberg J. **Interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) and its antiviral activity**. *Current Opinion in Structural Biology 2022/12/01*; 77.https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102467
116. Campbell R, Schwertz H, Hottz E, Rowley J, Manne B, Washington A, et al. **Human megakaryocytes possess intrinsic antiviral immunity through regulated induction of IFITM3 - PubMed**. *Blood 05/09/2019*; 133(19).https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-873984
117. Campbell R, Manne B, Banerjee M, Middleton E, Ajanel A, Schwertz H, et al. **IFITM3 regulates fibrinogen endocytosis and platelet reactivity in nonviral sepsis - PubMed**. *The Journal of clinical investigation 12/01/2022*; 132(23).https://doi.org/10.1172/JCI153014
118. Lê V, Schneider J, Boergeling Y, Berri F, Ducatez M, Guerin J, et al. **Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis - PubMed**. *American journal of respiratory and*

critical care medicine 04/01/2015; 191(7).https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1031OC
119. Pulavendran S, Rudd JM, Maram P, Thomas PG, Akhilesh R, Malayer JR, et al. **Combination Therapy Targeting Platelet Activation and Virus Replication Protects Mice against Lethal Influenza Pneumonia**. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2019 Dec*; 61(6).https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0196OC
120. Jin L, Ying Z, Yu C, Zhang H, Yu W, Wu X. **Isofraxidin ameliorated influenza viral inflammation in rodents via inhibiting platelet aggregation - PubMed**. *International immunopharmacology 2020 Jul*; 84.https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106521
121. Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. **Lipopolysaccharide Stimulates Platelets through an IL-1β Autocrine Loop**. *The Journal of Immunology 2013/11/15*; 191(10).https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300354
122. Singh SV, Lucerne A, Ravid K, Singh SV, Lucerne A, Ravid K. **Immune and Inflammatory Properties of Megakaryocytes**. *Cells 2025, Vol 14, Page 1053 2025–07–10*; 14(14).https://doi.org/10.3390/cells14141053
123. Choudry FA, Bagger FO, Macaulay IC, Farrow S, Burden F, Kempster C, et al. **Transcriptional characterization of human megakaryocyte polyploidization and lineage commitment**. *Journal of Thrombosis and Haemostasis 2021/05/01*; 19(5).https://doi.org/10.1111/jth.15271
124. Tilburg J, Stone AP, Billingsley JM, Scoville DK, Pavenko A, Liang Y, et al. **Spatial transcriptomics of murine bone marrow megakaryocytes at single-cell resolution**. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 2023/05/01*; 7(4).https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100158
125. Malara A, Abbonante V, Di Buduo C, Tozzi L, Currao M, Balduini A. **The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control - PubMed**. *Cellular and molecular life sciences : CMLS 2015 Apr*; 72(8).https://doi.org/10.1007/s00018-014-1813-y
126. Palis J, Yoder M. **Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man - PubMed**. *Experimental hematology 2001 Aug*; 29(8).https://doi.org/10.1016/s0301-472x(01)00669-5
127. Yamane T. **Frontiers | Mouse Yolk Sac Hematopoiesis**. *Frontiers in Cell and Developmental Biology 2018/07/20*; 6.https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00080
128. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman I. **A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages - PubMed**. *Nature 03/09/2000*; 404(6774).https://doi.org/10.1038/35004599
129. Na Nakorn T, Traver D, Weissman I, Akashi K. **Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S - PubMed**. *The Journal of clinical investigation 2002 Jun*; 109(12).https://doi.org/10.1172/JCI15272

130. Kondo M, Weissman I, Akashi K. **Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow - PubMed**. *Cell 11/28/1997*; 91(5).https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80453-5
131. Weissman IL. **The E. Donnall Thomas Lecture: Normal and Neoplastic Stem Cells**. *Biology of Blood and Marrow Transplantation 2008/08/01*; 14(8).https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.05.003
132. Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. **Megakaryocyte and polyploidization**. *Experimental Hematology 2018/01/01*; 57.https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.10.001
133. Noetzli LJ, French SL, Machlus KR. **New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2019–07*; 39(7).https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312129
134. Machlus KR, Joseph E Italiano J. **The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation**. *The Journal of Cell Biology 2013 Jun 10*; 201(6).https://doi.org/10.1083/jcb.201304054
135. Noetzli LJ, French SL, Machlus KR. **New insights into the differentiation of megakaryocytes from hematopoietic progenitors**. In: Lippincott Williams and Wilkins; 2019. pp. 1288–1300.
136. Haas S, Hansson J, Klimmeck D, Loeffler D, Velten L, Uckelmann H, et al. **Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors As Driving Forces of IFN-Induced Emergency Megakaryopooesis**. *Blood 2015/12/03*; 126(23).https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.2391.2391
137. Rommel MGE, Walz L, Fotopoulou F, Kohlscheen S, Schenk F, Miskey C, et al. **Influenza A virus infection instructs hematopoiesis to megakaryocyte-lineage output**. *Cell Reports 2022/10/04*; 41(1).https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111447
138. Pietras E, Reynaud D, Kang Y, Carlin D, Calero-Nieto F, Leavitt A, et al. **Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions - PubMed**. *Cell stem cell 07/02/2015*; 17(1).https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003
139. Rodriguez-Fraticelli AE, Wolock SL, Weinreb CS, Panero R, Patel SH, Jankovic M, et al. **Clonal analysis of lineage fate in native hematopoiesis**. *Nature 2018 Jan 3*; 553(7687).https://doi.org/10.1038/nature25168
140. Sanjuan-Pla A, Macaulay I, Jensen C, Woll P, Luis T, Mead A, et al. **Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy - PubMed**. *Nature 10/10/2013*; 502(7470).https://doi.org/10.1038/nature12495
141. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph K, et al. **Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells - PubMed**. *Cell 08/29/2013*; 154(5).https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.007

142. Shin J, Hu W, Naramura M, Park C. **High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias - PubMed**. *The Journal of experimental medicine 02/10/2014*; 211(2).https://doi.org/10.1084/jem.20131128
143. Månsson R, Hultquist A, Luc S, Yang L, Anderson K, Kharazi S, et al. **Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors - PubMed**. *Immunity 2007 Apr*; 26(4).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.013
144. Miyawaki K, Arinobu Y, Iwasaki H, Kohno K, Tsuzuki H, Iino T, et al. **CD41 marks the initial myelo-erythroid lineage specification in adult mouse hematopoiesis: redefinition of murine common myeloid progenitor - PubMed**. *Stem cells (Dayton, Ohio) 2015 Mar*; 33(3).https://doi.org/10.1002/stem.1906
145. Gekas C, Graf T. **CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age - PubMed**. *Blood 05/30/2013*; 121(22).https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457929
146. Bartley T, Bogenberger J, Hunt P, Li Y, Lu H, Martin F, et al. **Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl - PubMed**. *Cell 07/01/1994*; 77(7).https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90450-2
147. Kaushansky K, Lok S, Holly R, Broudy V, Lin N, Bailey M, et al. **Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin - PubMed**. *Nature 06/16/1994*; 369(6481).https://doi.org/10.1038/369568a0
148. de Sauvage F, Hass P, Spencer S, Malloy B, Gurney A, Spencer S, et al. **Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand - PubMed**. *Nature 06/16/1994*; 369(6481).https://doi.org/10.1038/369533a0
149. Miyakawa Y, Drachman J, Gallis B, Kaushansky A, Kaushansky K. **A structure-function analysis of serine/threonine phosphorylation of the thrombopoietin receptor, c-Mpl - PubMed**. *The Journal of biological chemistry 10/13/2000*; 275(41).https://doi.org/10.1074/jbc.M005080200
150. Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, Kato T, Miyazaki H, Handa M, et al. **Recombinant Thrombopoietin Induces Rapid Protein Tyrosine Phosphorylation of Janus Kinase 2 and Shc in Human Blood Platelets**. *Blood 1995/07/01*; 86(1).https://doi.org/10.1182/blood.V86.1.23.bloodjournal86123
151. Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, Miyazaki H, Handa M, Ohashi H, et al. **Thrombopoietin Induces Tyrosine Phosphorylation of Stat3 and Stat5 in Human Blood Platelets**. *Blood 1996/01/15*; 87(2).https://doi.org/10.1182/blood.V87.2.439.bloodjournal872439
152. Yamada M, Komatsu N, Okada K, Kato T, Miyazaki H, Miura Y. **Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in a human thrombopoietin-dependent**

cell line - PubMed. *Biochemical and biophysical research communications 12/05/1995*; 217(1).https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2768
153. Zimmet J, Ravid K. **Polyploidy: Occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system**. *Experimental Hematology 2000/01/01*; 28(1).https://doi.org/10.1016/S0301-472X(99)00124-1
154. Pickens B, Mao Y, Li D, Siegel DL, Poncz M, Cines DB, et al. **Platelet-delivered ADAMTS13 inhibits arterial thrombosis and prevents thrombotic thrombocytopenic purpura in murine models**. *Blood 2015/05/21*; 125(21).https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-587139
155. Zhang Y, Wang Z, Ravid K. **The cell cycle in polyploid megakaryocytes is associated with reduced activity of cyclin B1-dependent cdc2 kinase - PubMed**. *The Journal of biological chemistry 02/23/1996*; 271(8).https://doi.org/10.1074/jbc.271.8.4266
156. Datta N, Williams J, Caldwell J, Curry A, Ashcraft E, Long M. **Novel alterations in CDK1/cyclin B1 kinase complex formation occur during the acquisition of a polyploid DNA content - PubMed**. *Molecular biology of the cell 1996 Feb*; 7(2).https://doi.org/10.1091/mbc.7.2.209
157. Geddis AE, Fox NE, Tkachenko E, Kaushansky K. **Endomitotic Megakaryocytes that Form a Bipolar Spindle Exhibit Cleavage Furrow Ingression Followed by Furrow Regression**. *Cell Cycle 2007–2–15*; 6(4).https://doi.org/10.4161/cc.6.4.3836
158. Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, et al. **Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling**. *Blood 2008/10/15*; 112(8).https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144956
159. Zimmet JM, Ladd D, Jackson CW, Stenberg PE, Ravid K. **A Role for Cyclin D3 in the Endomitotic Cell Cycle**. *Molecular and Cellular Biology 1997–12–1*; 17(12).https://doi.org/10.1128/MCB.17.12.7248
160. Muntean AG, Pang L, Poncz M, Dowdy SF, Blobel GA, Crispino JD. **Cyclin D–Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization**. *Blood 2007/06/15*; 109(12).https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-059378
161. Eliades A, Papadantonakis N, Ravid K. **New Roles for Cyclin E in Megakaryocytic Polyploidization ***. *Journal of Biological Chemistry 2010/06/11*; 285(24).https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102145
162. Giammona LM, Fuhrken PG, Papoutsakis ET, Miller WM. **Nicotinamide (vitamin B3) increases the polyploidisation and proplatelet formation of cultured primary human megakaryocytes**. *British Journal of Haematology 2006/11/01*; 135(4).https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06341.x
163. Leysi-Derilou Y, Duchesne C, Garnier A, Pineault N. **Single-cell level analysis of megakaryocyte growth and development**. *Differentiation 2012/04/01*; 83(4).https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.12.003
164. Konieczna IM, Panuganti S, DeLuca TA, Papoutsakis ET, Eklund EA, Miller WM. **Administration of nicotinamide does not increase platelet levels in**

mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases 2013/03/01*; 50(3).https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.11.007
165. Deutsch VR, Tomer A. **Megakaryocyte development and platelet production**. *British Journal of Haematology 2006/09/01*; 134(5).https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06215.x
166. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, Geerts W, Proamer F, Rinckel J-Y, et al. **Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes**. *Blood 2014/02/06*; 123(6).https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492330
167. Schulze H, Korpal M, Hurov J, Kim S-W, Zhang J, Cantley LC, et al. **Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis**. *Blood 2006 Jan 24*; 107(10).https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2755
168. Bura A, Čabrijan S, Bertović I, Begonja AJ. **The intracellular and plasma membrane pools of phosphatidylinositol-4-monophosphate control megakaryocyte maturation and proplatelet formation**. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis 2023 Apr 26*; 7(4).https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100169
169. Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, Wu S, Mazutis L, Deschmann E, et al. **Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein**. *Blood 2015/01/29*; 125(5).https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-600858
170. Patel S, Richardson J, Schulze H, Kahle E, Galjart N, Drabek K, et al. **Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes - PubMed**. In: *Blood*; 12/15/2005.
171. Becker IC, Wilkie AR, Unger BA, Sciaudone AR, Fatima F, Tsai I-T, et al. **Dynamic actin/septin network in megakaryocytes coordinates proplatelet elaboration**. *Haematologica 2024*; 109(3).https://doi.org/10.3324/haematol.2023.283369
172. Brown E, Carlin L, Nerlov C, Lo Celso C, Poole A. **Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels - PubMed**. *Life science alliance 05/21/2018*; 1(2).https://doi.org/10.26508/lsa.201800061
173. Richardson J, Shivdasani R, Boers C, Hartwig J, Italiano J. **Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production - PubMed**. *Blood 12/15/2005*; 106(13).https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2206
174. Asquith N, Carminita E, Rodriguez-Romera A, Freire D, Camacho V, Becker IC, et al. **The Bone Marrow Is the Primary Site of Thrombopoiesis**. *Blood 2023/11/02*; 142(Supplement 1).https://doi.org/10.1182/blood-2023-190991
175. Petzold T, Zhang Z, Ballesteros I, Saleh I, Polzin A, Thienel M, et al. **Neutrophil "plucking" on megakaryocytes drives platelet production and**

boosts cardiovascular disease. *Immunity 2022*; 55(12):2285–2299.e2287.https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.001
176. Kemble S, Dalby A, Lowe GC, Nicolson PLR, Watson SP, Senis Y, et al. **Analysis of preplatelets and their barbell platelet derivatives by imaging flow cytometry**. *Blood Advances 2022/05/10*; 6(9).https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006073
177. Jr JEI, Payne C, Bekendam RH. **Looking Under the Hood at the Cytoskeletal Engine of Platelet Production**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2025–02*; 45(2).https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.124.320392
178. Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, et al. **IL-1α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs - PubMed**. *The Journal of cell biology 05/11/2015*; 209(3).https://doi.org/10.1083/jcb.201410052
179. Ellis ML, Terreaux A, Alwis I, Smythe R, Perdomo J, Eckly A, et al. **GPIbα–filamin A interaction regulates megakaryocyte localization and budding during platelet biogenesis**. *Blood 2024/01/25*; 143(4).https://doi.org/10.1182/blood.2023021292
180. Ellis M, Alwis I, Smythe R, Yuan Y, Jackson S. **Megakaryocyte buds are distinct from microvesicles and likely to represent platelet precursors - PubMed**. *Blood advances 03/28/2023*; 7(6).https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008850
181. Haas S, Hansson J, Klimmeck D, Loeffler D, Velten L, Uckelmann H, et al. **Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors - PubMed**. *Cell stem cell 10/01/2015*; 17(4).https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.007
182. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. **Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny**. *Science 2016–01–08*; 351(6269).https://doi.org/10.1126/science.aab2116
183. Morcos MNF, Li C, Munz CM, Greco A, Dressel N, Reinhardt S, et al. **Fate mapping of hematopoietic stem cells reveals two pathways of native thrombopoiesis**. *Nature Communications 2022 13:1 2022–08–03*; 13(1).https://doi.org/10.1038/s41467-022-31914-z
184. Li J-J, Liu J, Li YE, Chen LV, Cheng H, Li Y, et al. **Differentiation route determines the functional outputs of adult megakaryopoiesis**. *Immunity 2024/03/12*; 57(3).https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.02.006
185. Valdivia-Mazeyra MF, Salas C, Nieves-Alonso JM, Martín-Fragueiro L, Bárcena C, Muñoz-Hernández P, et al. **Increased number of pulmonary megakaryocytes in COVID-19 patients with diffuse alveolar damage: an autopsy study with clinical correlation and review of the literature**. *Virchows Archiv 2020 478:3 2020–09–11*; 478(3).https://doi.org/10.1007/s00428-020-02926-1
186. Roncati L, Ligabue G, Nasillo V, Lusenti B, Gennari W, Fabbiani L, et al. **A proof of evidence supporting abnormal immunothrombosis in severe**

COVID-19: naked megakaryocyte nuclei increase in the bone marrow and lungs of critically ill patients. *Platelets 2020–11–16*; 31(8).https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1810224
187. Rapkiewicz AV, Mai X, Carsons SE, Pittaluga S, Kleiner DE, Berger JS, et al. **Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: A case series**. *eClinicalMedicine 2020/07/01*; 24.https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100434
188. Fortmann SD, Patton MJ, Frey BF, Tipper JL, Reddy SB, Vieira CP, et al. **Circulating SARS-CoV-2+ megakaryocytes are associated with severe viral infection in COVID-19**. *Blood Advances 2023*; 7(15):4200–4214.https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009022
189. McMullen P, Smith H, Pytel P. **Entrapped Megakaryocytes in the Microvasculature of Brain Tissues are not Specific to COVID-19 but can be Seen Across a Spectrum of Acute Lung Injuries**. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 2021/11/19*; 80(11).https://doi.org/10.1093/jnen/nlab048
190. Risitano A, Beaulieu LM, Vitseva O, Freedman JE. **Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer**. *Blood 2012 May 17*; 119(26).https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-396440
191. Inaba T, Miyamoto N, Hira K, Kijima C, Miyauchi Y, Xu H-B, et al. **Mitochondrial Intercellular Transfer via Platelets After Physical Training Exerts Neuro-Glial Protection Against Cerebral Ischemia**. *MedComm 2026/02/01*; 7(2).https://doi.org/10.1002/mco2.70590
192. Davizon-Castillo P, Rowley JW, Rondina MT. **Megakaryocyte and Platelet Transcriptomics for Discoveries in Human Health and Disease**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2020*; 40(6):1432–1440.https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313280
193. Kolman R, Voss H, Bertovic I, Peradinovic J, Munitic I, Engel DR, et al. **Interleukin-1alpha alters megakaryocyte maturation, promotes emperipolesis, and induces a distinct proteomic profile**. *J Thromb Haemost 2025*.https://doi.org/10.1016/j.jtha.2025.08.037
194. Kong YX, Rehan R, Moreno CL, Madsen S, Zhang Y, Zhao H, et al. **SEC61B regulates calcium flux and platelet hyperreactivity in diabetes**. *The Journal of Clinical Investigation 2025/08/15*; 135(16).https://doi.org/10.1172/JCI184597
195. Chiva-Blanch G, Peña E, Cubedo J, García-Arguinzonis M, Pané A, Gil PA, et al. **Molecular mapping of platelet hyperreactivity in diabetes: the stress proteins complex HSPA8/Hsp90/CSK2α and platelet aggregation in diabetic and normal platelets**. *Translational Research 2021/09/01*; 235.https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.04.003
196. Liu D, Wu H, Wang C, Li Y, Tian H, Siraj S, et al. **STING directly activates autophagy to tune the innate immune response**. *Cell Death and Differentiation 2018 Dec 19*; 26(9).https://doi.org/10.1038/s41418-018-0251-z

197. Zhong L, Hu M-M, Bian L-J, Liu Y, Chen Q, Shu H-B, et al. **Phosphorylation of cGAS by CDK1 impairs self-DNA sensing in mitosis**. *Cell Discovery 2020 6:1 2020–04–28*; 6(1).https://doi.org/10.1038/s41421-020-0162-2
198. Helbling-Leclerc A, Garcin C, Rosselli F, Helbling-Leclerc A, Garcin C, Rosselli F. **Beyond DNA repair and chromosome instability—Fanconi anaemia as a cellular senescence-associated syndrome**. *Cell Death & Differentiation 2021 28:4 2021–03–15*; 28(4).https://doi.org/10.1038/s41418-021-00764-5
199. Michalski S, de Oliveira Mann CC, Stafford CA, Witte G, Bartho J, Lammens K, et al. **Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin**. *Nature 2020 587:7835 2020–09–10*; 587(7835).https://doi.org/10.1038/s41586-020-2748-0
200. Boyer JA, Spangler CJ, Strauss JD, Cesmat AP, Liu P, McGinty RK, et al. **Structural basis of nucleosome-dependent cGAS inhibition**. *Science 2020–10–23*; 370(6515).https://doi.org/10.1126/science.abd0609
201. Anindya R. **Cytoplasmic DNA in cancer cells: Several pathways that potentially limit DNase2 and TREX1 activities**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 2022/08/01*; 1869(8).https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119278
202. Yu Q, Katlinskaya YV, Carbone CJ, Zhao B, Katlinski KV, Zheng H, et al. **DNA-Damage-Induced Type I Interferon Promotes Senescence and Inhibits Stem Cell Function**. *Cell Reports 2015*; 11(5):785–797.https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.069
203. Victorelli S, Salmonowicz H, Chapman J, Martini H, Vizioli MG, Riley JS, et al. **Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP**. *Nature 2023 622:7983 2023–10–11*; 622(7983).https://doi.org/10.1038/s41586-023-06621-4
204. Tanabe Y, Kawamoto S, Takaku T, Morishita S, Hirao A, Komatsu N, et al. **Expansion of senescent megakaryocyte-lineage cells maintains CML cell leukemogenesis**. *Blood Advances 2020 Dec 14*; 4(24).https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003117
205. Soponpong S, Amparyup P, Kawai T, Tassanakajon A. **A Cytosolic Sensor, PmDDX41, Binds Double Stranded-DNA and Triggers the Activation of an Innate Antiviral Response in the Shrimp Penaeus monodon via the STING-Dependent Signaling Pathway**. *Frontiers in Immunology 2019 Aug 29*; 10.https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02069
206. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu Y-J, et al. **The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells**. *Nature Immunology 2011 12:10 2011–09–04*; 12(10).https://doi.org/10.1038/ni.2091
207. Ma J, Ross SR. **Frontiers | Multifunctional role of DEAD-box helicase 41 in innate immunity, hematopoiesis and disease**. *Frontiers in Immunology 2024/08/09*; 15.https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1451705

208. Moriyama M, Koshiba T, Ichinohe T, Moriyama M, Koshiba T, Ichinohe T. **Influenza A virus M2 protein triggers mitochondrial DNA-mediated antiviral immune responses**. *Nature Communications 2019 10:1 2019–10–11*; 10(1).https://doi.org/10.1038/s41467-019-12632-5
209. Zhang W, Zhang Y, Han L, Bo T, Qi Z, Zhong H, et al. **Double-stranded DNA enhances platelet activation, thrombosis, and myocardial injury via cyclic GMP-AMP synthase - PubMed**. *Cardiovascular research 04/22/2025*; 121(2).https://doi.org/10.1093/cvr/cvae218
210. Chang-Hong D, Yi-Ding W, Ke Y, Wei-Nian L, Li R, Chao-Nan L, et al. **Apoptosis-resistant megakaryocytes produce large and hyperreactive platelets in response to radiation injury**. *Military Medical Research 2023 Dec 19*; 10(1).https://doi.org/10.1186/s40779-023-00499-z
211. Gidlöf O, van der Brug M, Öhman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, et al. **Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression**. *Blood 2013/05/09*; 121(19).https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461798
212. Mina Yang, Haojie J, Chen Ding LZ, Nan Ding, Guoming Li , Fei Zhang, Jing Wang, Liufu Deng, Junling Liu, Yanyan Xu. **STING activation in platelets aggravates septic thrombosis by enhancing platelet activation and granule secretion**.
213. Zhu Y, Wan M, Fu Y, Gu J, Ren Z, Wang Y, et al. **Platelet methyltransferase-like protein 4-mediated mitochondrial DNA metabolic disorder exacerbates oral mucosal immunopathology in hypoxia**. *International Journal of Oral Science 2025 17:1 2025–06–12*; 17(1).https://doi.org/10.1038/s41368-025-00373-9
214. Lê V, Schneider J, Boergeling Y, Berri F, Ducatez M, Guerin J, et al. **Platelet Activation and Aggregation Promote Lung Inflammation andInfluenza Virus Pathogenesis**.
215. Pulavendran S, Rudd JM, Maram P, Thomas PG, Akhilesh R, Malayer JR, et al. **Combination Therapy Targeting Platelet Activation and Virus Replication Protects Mice against Lethal Influenza Pneumonia**. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2019/12/01*; 61(6).https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0196OC
216. Burnouf T, Goubran HA, Chou M-L, Devos D, Radosevic M. **Platelet microparticles: Detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine**. *Blood Reviews 2014/07/01*; 28(4).https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.04.002
217. Eloranta M, Franck-Larsson K, Lövgren T, Kalamajski S, Rönnblom A, Rubin K, et al. **Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis - PubMed**. *Annals of the rheumatic diseases 2010 Jul*; 69(7).https://doi.org/10.1136/ard.2009.121400
218. Postal M, Vivaldo JF, Fernandez-Ruiz R, Paredes JL, Appenzeller S, Niewold TB. **Type I interferon in the pathogenesis of systemic lupus**

erythematosus. *Current opinion in immunology 2020 Nov 24*; 67.https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.10.014
219. King KR, Aguirre AD, Ye Y-X, Sun Y, Roh JD, Richard P Ng J, et al. **IRF3 and Type I Interferons Fuel a Fatal Response to Myocardial Infarction**. *Nature medicine 2017 Nov 6*; 23(12).https://doi.org/10.1038/nm.4428
220. Song Y, Lu J, Qin P, Chen H, Chen L. **Interferon-I modulation and natural products: Unraveling mechanisms and therapeutic potential in severe COVID-19**. *Cytokine & Growth Factor Reviews 2025/04/01*; 82.https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2024.08.005
221. Oke V, Gunnarsson I, Dorschner J, Eketjäll S, Zickert A, Niewold T, et al. **High levels of circulating interferons type I, type II and type III associate with distinct clinical features of active systemic lupus erythematosus - PubMed**. *Arthritis research & therapy 04/29/2019*; 21(1).https://doi.org/10.1186/s13075-019-1878-y
222. Nührenberg TG, Stöckle J, Marini F, Zurek M, Grüning BA, Benes V, et al. **Impact of high platelet turnover on the platelet transcriptome: Results from platelet RNA-sequencing in patients with sepsis**. *PLOS ONE Jan 27, 2022*; 17(1).https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260222
223. McPhail J, Burke J. **Molecular mechanisms of PI4K regulation and their involvement in viral replication - PubMed**. *Traffic (Copenhagen, Denmark) 2023 Mar*; 24(3).https://doi.org/10.1111/tra.12841
224. David C, Frémond M. **Lung Inflammation in STING-Associated Vasculopathy with Onset in Infancy (SAVI) - PubMed**. *Cells 01/18/2022*; 11(3).https://doi.org/10.3390/cells11030318
225. Kuang S, Li Y, Yang S, Han X. **Child Neurology: Aicardi-Goutières Syndrome Presenting as Recurrent Ischemic Stroke - PubMed**. *Neurology 08/30/2022*; 99(9).https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200952
226. Larsen M, Nørgaard L, Linge P, Larsen J, Langkilde H, Hauge E, et al. **Molecular mechanisms underlying thrombosis in systemic lupus erythematosus - A Systematic review - PubMed**. *Seminars in arthritis and rheumatism 2025 Jun*; 72.https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2025.152707
227. Larsen M, Nørgaard L, Linge P, Larsen J, Langkilde H, Hauge E, et al. **Molecular mechanisms underlying thrombosis in systemic lupus erythematosus – A Systematic review**. *Seminars in Arthritis and Rheumatism 2025/06/01*; 72.https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2025.152707
228. Sarabi ZS, Chang E, Bobba R, Ibanez D, Gladman D, Urowitz M, et al. **Incidence rates of arterial and venous thrombosis after diagnosis of systemic lupus erythematosus**. *Arthritis & Rheumatism 2005*; 53(4).https://doi.org/10.1002/art.21314
229. Aarreberg LD, Esser-Nobis K, Driscoll C, Shuvarikov A, Roby JA, Gale M, Jr. **Interleukin-1beta Induces mtDNA Release to Activate Innate Immune Signaling via cGAS-STING**. *Mol Cell 2019*; 74(4):801–815 e806.https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.038

ANNEXE

Type-I Interferon signaling in Fanconi Anemia

Karima Landelouci[1,2], Shruti Sinha[3] and Geneviève Pépin[1,2]*

1. Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada

2.Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada

3. Department of Biotechnology, GITAM Institute of Technology, GITAM deemed to be University, Visakhapatnam, 530045, India.

* To whom correspondence should be addressed.

Tel : 1-819-376-5011 extension 3356

Email : Genevieve.pepin3@uqtr.ca

ABSTRACT

Fanconi Anemia (FA) is a genome instability syndrome caused by mutations in one of the 23 repair genes of the Fanconi pathway. This heterogenous disease is usually characterized by congenital abnormalities, premature ageing and bone marrow failure. FA patients also show a high predisposition to hematological and solid cancers. The Fanconi pathway ensures the repair of interstrand crosslinks (ICLs) DNA damage. Defect in one of its proteins prevents functional DNA repair, leading to the accumulation of DNA breaks and genome instability. Accumulating evidence has documented a close relationship between genome instability and inflammation, including the production of type-I Interferon. In this context, type-I Interferon is produced upon activation of pattern recognition receptors by nucleic acids including by the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) that detects DNA. In mouse models of diseases displaying genome instability, type-I Interferon response is responsible for an important part of the pathological symptoms, including premature aging, short stature, and neurodegeneration. This is illustrated in mouse models of Ataxia-telangiectasia and Aicardi-Goutières Syndrome in which genetic depletion of either Interferon Receptor IFNAR, cGAS or STING relieves pathological symptoms. FA is also a genetic instability syndrome with symptoms such as premature aging and predisposition to cancer. In this review we will focus on the different molecular mechanisms potentially leading to type-I Interferon activation. A better understanding of the molecular mechanisms engaging type-I Interferon signaling in FA may ultimately lead to the discovery of new therapeutic targets to rescue the pathological inflammation and premature aging associated with Fanconi Anemia.

Running title: IFN-I in Fanconi Anemia

Keywords: Fanconi Anemia, Interferon, Inflammation, DNA damage, cytosolic DNA, cGAS/STING, RIG-I

Introduction

Fanconi anemia (FA) is a rare recessive disease characterized by genome instability that results from a defect in the Fanconi DNA repair pathway. FA patients present aplastic anemia, congenital defects and cancer predisposition [1]. Mechanistically, the FA pathway contributes to DNA damage recognition and repair, thus mutations in genes encoding FA pathway proteins lead to DNA damage accumulation and chromosome instability. As of today, 23 Fanconi and Fanconi-like DNA repair genes encoding either core complex proteins (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL and FANCM), ID2 complex proteins (FANCD2 and FANCI), and downstream proteins (FANCD1 (BRCA2), FANCJ (BRIP1), FANCN (PALB2), FANCO (RAD51C), FANCP (SLX4), FANCQ (ERCC4), FANCR (RAD51), FANCS (BRCA1), FANCT (UBE2T), FANCU (XRXX2), FANCV (MAD2L2/REV7), FANCW (RFWD3) and FANCY) have been identified. Findings from the last decade have unambiguously improved the management of the disease and prolonged the life of patients, and the many FA mouse models developed along the years were invaluable in getting a better understanding of the underlying cause of FA [2].

FA proteins are involved in DNA repair processes

The primary role attributed to FA proteins is the repair of inter-strand crosslinks (ICLs) DNA damage. ICLs, known to interfere with DNA replication and transcription, can be caused by exogenous sources such as chemotherapeutic agents like cisplatin and mitomycin C, or by endogenous cellular products like aldehydes. ICLs are repaired by the FA pathway (Figure 1), in the S-phase of the cell cycle [3]. The ICLs are first recognized by the FANCM–MHF1–MHF2 complex [4], followed by the activation of FANCM, which allows the recruitment of the core complex composed of ten proteins (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF,

FANCG, FANCL, FA associated protein 100 (FAAP100), FAAP20 and FAAP24). The core complex possesses an ubiquitin E3 ligase that upon detection of the ICLs will monoubiquitinate FANCI and FANCD2 (ID2 complex) to form a higher order structure that initiates DNA repair [5; 6]. This latter step is essential to recruit nucleases such as FANCP (SLX4) – FANCQ (XPF) and FAN1, and to activate downstream repair factors that belong to the Homologous Recombination (HR) DNA repair complex: FANCJ – FANCN (PALB2) – FANCD1 (BRCA2) – FANCO (RAD51C) [5; 6].

Besides the repair of ICLs, FA proteins are involved in other aspects of genome stability maintenance[1]. For instance, the FA pathway stabilizes the replication fork during DNA synthesis to prevent accumulation of ssDNA or DNA-RNA hybrids called R-loops [7; 8; 9]. FANCJ promotes RPA phosphorylation during nucleotide excision repair (NER) and interacts with the mismatched repair (MMR) proteins MLH1 and MSH2 after UV irradiation to maintain genome stability [10]. Furthermore, FANCC and FANCD2 cooperate with P53 to maintain the DNA damage-induced G2 checkpoint [11]. FANCA and FANCB were both reported to catalyze single-strand annealing and strand exchange independently of their canonical role in the FA pathway [12]. The FA pathway is also linked to the maintenance of telomere integrity as FANCD2 mutated patient cells display several telomeric abnormalities [13]. How these different genome stabilization roles directly translate into all of the FA associated pathological symptoms, however, remains to be clarified. Interestingly, in previous studies FA-patients- or FA mouse models-derived cells with mutation in either FANCA, B, C or D, were shown to express higher levels of pro-inflammatory cytokines. In addition, FA cells (FANCA, B, C, D) were more susceptible to inflammatory stimulus [14; 15]. These phenotypes were partly attributed to the dysregulated anti-oxidative response, as exemplified by the observation that FANCC knock-out cells express lower levels

of anti-oxidative response genes and display higher levels of reactive oxygen species (ROS) [16; 17].

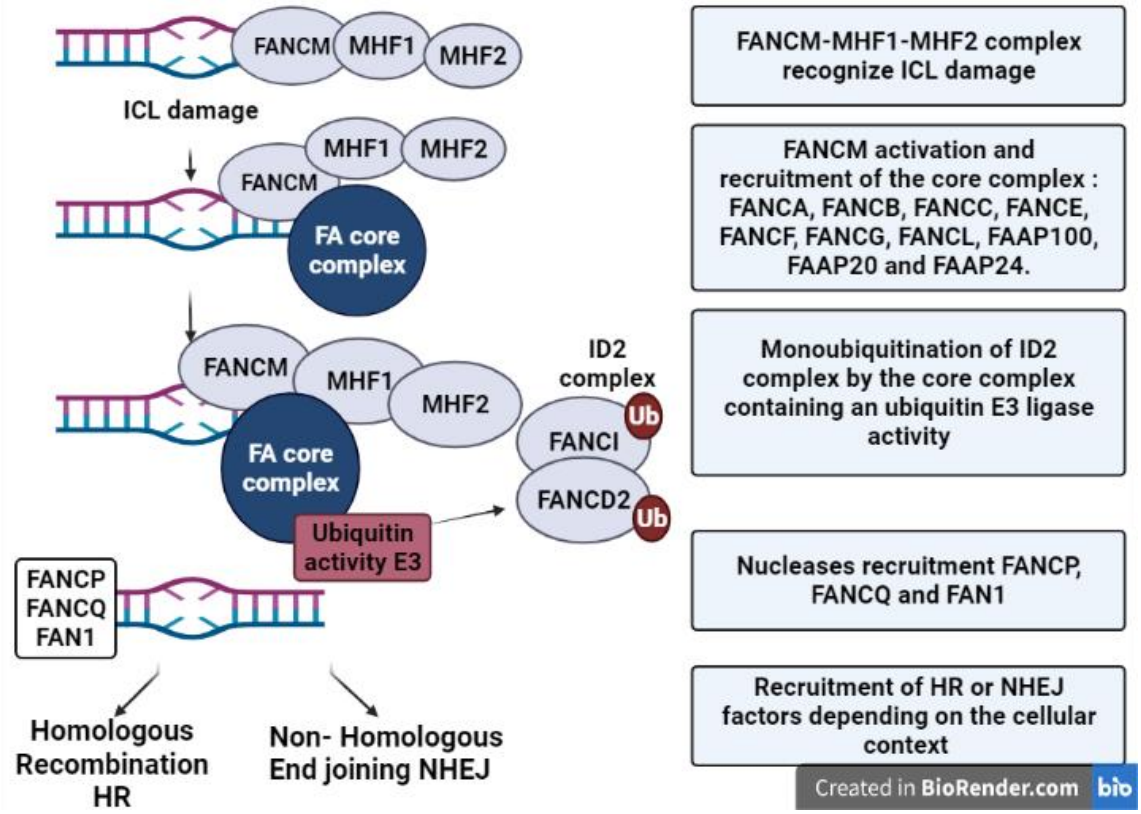


Figure 1. Schematic representation of ICLs repair by the Fanconi Anemia pathway.

The protein complex composed of FANCM-MHF1-MHF2 is recruited to the chromatin upon recognition of ICL damage. Then, FANCM is activated and allows the recruitment of the core complex of the FA pathway composed of: FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FAAP100, FAAP20 and FAAP24. The core complex contains an ubiquitin E3 ligase activity and is responsible for the monoubiquitylation of the ID2 complex composed of FANCI and FANCD2 proteins. Monoubiquitinylation of ID2 complex promotes the recruitment of the nucleases FANP, FANCQ and FAN1 and end resection at the DNA damage site. Depending on the cellular context, recruitment of downstream factors belonging to either Homologous Recombination (HR) or to Non-homologous End Joining (NHEJ) will finalize the repair.

During the last decade, a series of studies have demonstrated the complex intertwined relationship between DNA repair processes and immune responses. One key signaling axis involved in this association is the type-I Interferon (IFN-I)

response known to play a critical role in the antiviral response [18]. IFN-I response is essential to induce the transcription of genes involved in DNA repair and in nucleic acid degradation. Therefore, in the presence of defects in DNA repair processes or nucleic acid metabolism, cellular immune receptors can be activated by self-nucleic acids [18]. Given that new evidence suggests that loss of function of FA proteins causes IFN-I production [19; 20; 21], this review explores how defect in the FA pathway might contribute to the accumulation of cytosolic nucleic acids and activation of IFN-I (Figure 2).

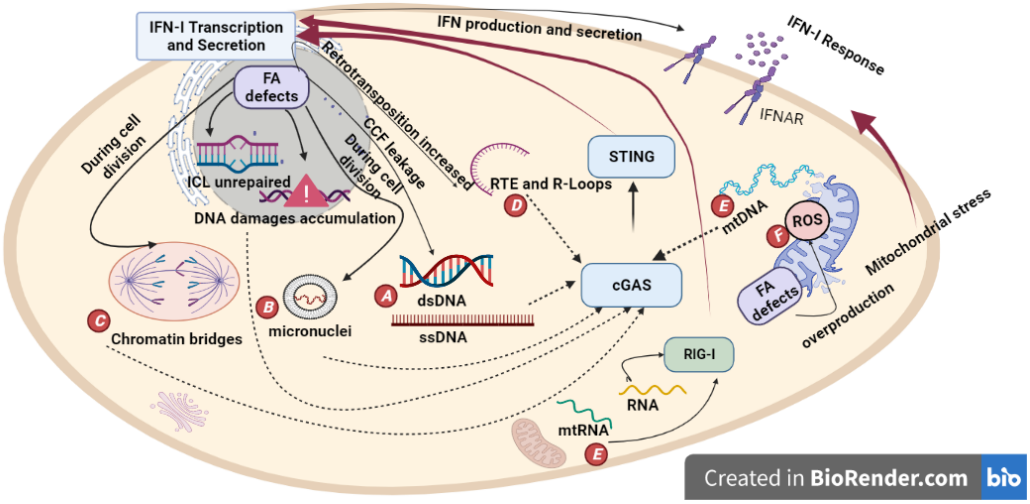


Figure 2. Proposed model depicting how defect in the FA pathway could induce pathological IFN-I production

FA proteins prevent genome instability by repairing DNA damage, repressing retrotransposition and allowing accurate cell division. In addition, FA proteins modulate anti-oxidative response and participate in mitochondria clearance by autophagy and mitophagy processes. Mutations in FA genes or loss of FA proteins contribute to DNA damage accumulation, genome instability, reactive oxygen species (ROS) production and defect in mitochondria's clearance. Under these pathological conditions, many types of self-nucleic acids such as ssDNA and dsDNA (A), micronuclei (B) chromatin bridges (C) retroelements (RTE) and R-loops (D), mtDNA/RNA (E), can activate type-I Interferon (IFN-I). This would occur by cGAS and RIG-I detection of cytosolic DNA and RNA molecules respectively and subsequent production of IFN-I. In addition, elevated levels of ROS might contribute to fuel the production of IFN-I by creating more DNA and mitochondria damage (F).

Microbial nucleic acids are detected by cellular receptors

During infections, cells rely on a complex system of cellular receptors called Pattern Recognition Receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) to elicit an immune response that will allow the cell to defend itself against the invaders and alert neighboring immune cells of the ongoing infection. Microbial nucleic acids are among these PAMPs and are detected by different families of PRRs including Toll-like receptors (TLR), RIG-I like receptors (RLR) and cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)[22]. TLRs that detect nucleic acids (TLR3-7-8 detect RNA and TLR9 detects DNA) are found predominantly within endosomes and are mostly expressed in specialized immune cells (monocytes, macrophages, dendritic cells and B lymphocytes) [23]. On the contrary, RLR and cGAS are expressed ubiquitously and are located within the cytoplasm of cells. While RIG -I and MDA-5 activate IFN-I upon sensing short and long cytosolic dsRNA respectively [24], cGAS detects dsDNA (or ssDNA fold into dsDNA) and DNA:RNA hybrids [23; 25; 26]. Upon sensing their specific nucleic acids, these PRRs activate an immune response that leads to the production of inflammatory cytokines and type I-Interferons (IFN-I). Cells and organisms rely on this response to fight microbial infections.

Sensing of nucleic acids by cellular receptors activates the type-I interferon response

At the molecular level, RIG-I and MDA5 receptors signal through the Mitochondrial antiviral-signaling adaptor protein (MAVS) to allow the translocation and activation of Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) that binds to regulatory elements on IFN-I genes to induce their transcription and translation [23]. Binding of IFN-I in an autocrine or paracrine manner activates Janus Kinase 1 (JAK1) and Tyrosine Kinase 2 (TYK2), which then phosphorylate the Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) and 2 (STAT2) transcription factors to allow

the transcription of thousands of genes collectively referred to as Interferon Stimulated Genes (ISGs) [27; 28]. These genes are known to alter cellular metabolism, arrest the cell cycle, induce apoptosis and favor the clearance of damaged cells by immune cells [27].

Upon cytosolic DNA detection, cGAS catalyzes the production of the cyclic dinucleotide GMP-AMP (cGAMP) from ATP and GTP [25]. Then, cGAMP acts as a secondary messenger to activate the Stimulator of Interferon Genes (STING), inducing its conformational change and subsequent activation [25; 29; 30]. In its activated form, STING interacts with Tank-binding Kinase I (TBK1) and the IKK complex to activate them, which leads to STING phosphorylation by TBK1, then recruitment and activation of IRF3 followed by the release of Nuclear Factor-kappaB (NF-κB), ultimately promoting the production of IFN-I and other inflammatory cytokines [31]. During acute immune responses, IFN-I activation is usually beneficial to the host by providing transcriptional changes that allow the orchestration of an efficient response. However, when this activation persists, it becomes detrimental and is associated with chronic diseases [32].

Cytosolic accumulation of self- nucleic acids allows activation of RLRs and cGAS

During the last decades, these PRRs were also shown to alert the host of the loss of cellular integrity. Indeed, RLRs and cGAS can also detect self-nucleic acids in non-infectious contexts [33]. To prevent unwanted inflammation, nucleic acids are usually protected from recognition by PRRs by localizing inside organelles or by being coated with proteins. However, under certain cellular conditions, these barriers are broken and self-nucleic acids are released into the cytosol. Fortunately, to avoid persistent immune activation, the genome encodes many DNases and RNases to degrade cytosolic nucleic acids [34]. Whether or not PRRs will get activated by self-nucleic acids is thus dependent on the balance

between the activity of DNases and RNases versus the amount of nucleic acids released into the cytosol at a given point. Thus, defect in either of these processes can result in PRR activation. This model has been validated by in vitro experiment, mouse models and clinical data. Indeed, higher levels of circulating IFN-I in mouse models and in patients with mutations in gene encoding DNases and RNAses were detected [32]. In addition to this, organelles and genome integrity also play a critical part in safeguard mechanisms. For instance, the nuclear envelope (NE) protects the genome inside the nucleus, maintains its dynamic shapes and regulates nuclear exchanges with the cytosol. Mutations in NE gene's structure result in the loss of NE integrity and promote genome instability and the release of nucleic acids into the cytosol [35]. Similarly, loss of mitochondria integrity causes mitochondrial (mt) DNA release into the cytosol and immune activation [36].

Constitutive activation of IFN-I in DNA repair and DNA metabolism related-diseases

Constitutive IFN-I activation is detected in different autoinflammatory syndromes such as Aicardi-Goutières syndrome (AGS) and Ataxia-telangiectasia (AT) syndrome. AGS is caused by mutations in genes involved in nucleic acid metabolism such as those encoding the Three Prime Repair Exonuclease 1 (TREX1) [40], the RNASEH2 [41] and the triphosphohydrolase SAMHD1 [42]. In mouse models of AGS, cytosolic DNA accumulation activates IFN-I. Notably, genetic depletion of cgas [43], sting [44], irf3 or ifnar [45] inhibits the IFN-I response and relieves autoinflammatory symptoms, confirming the important contribution of IFN-I to AGS pathology. AT syndrome is, on the other hand, more closely related to FA pathophysiology and also relies on chronic STING activation [46; 47]. AT is caused by mutations in the Ataxia-Telangiectasia-Mutated kinase (ATM), a master regulator of DNA repair. In fact, loss of ATM activity results in

cytosolic DNA accumulation due to genomic instability [47]. This can be explained by the crucial role of ATM in coordinating the cellular response to double-strand DNA breaks (DSBs). AT patients-derived cells and cells isolated from $Atm^{-/-}$ mice harbor single-strand (ss)DNA in their cytoplasm and an elevated IFN-I signature. Genetic depletion of sting inhibits the pathological IFN-I response in those cells [47]. As AT shares redundant phenotypes with FA, including high genomic instability, dysregulated immune responses, neurodegeneration, premature aging and predisposition to cancers and leukemias, and considering the preponderant role of IFN-I in AT, it is reasonable to suspect that IFN-I also contributes to the pathophysiology of FA.

FA deficient cells display cytosolic DNA accumulation

FA is a genome instability syndrome. The literature suggests that FA deficient cells display accumulation of cytosolic DNA, loss of nuclear integrity and a defect in mitochondria clearance [19; 20; 21; 37; 38; 39]. As mentioned above, these processes contribute to tipping the scale toward PRR activation and IFN-I production. Indeed, with their reported roles in DNA repair and cell division processes, FA proteins prevent genome instability and cytosolic DNA accumulation. In other genome instability syndromes, higher levels of IFN-I have been linked to neurological disorders, growth delays, premature ageing and skin pathologies among others.

Accumulation of cytosolic ssDNA in cells with defect in DNA repair mechanisms

Following the elucidation of how ATM deficiency activates the IFN-I response [47], several other examples of how DNA-repair defects trigger unwanted immune activation through the release of cytosolic ssDNA were

reported [19; 21; 42; 48; 49; 50; 51]. During repair, the ubiquitylated ID2 complex recruits the scaffold protein FANCP/SLX4 which serves as a docking site for the endonucleases that cleave the damaged DNA to create a DSB that will be repaired by homologous recombination (HR). These endonucleases generate ssDNA overhangs that are coated and protected from degradation by the replication protein A (RPA) and the recombinase RAD51. Notably, mutations in proteins controlling long-range DNA resection following double-strand break repair, like the endonuclease MUS81, the Bloom syndrome helicase (BLM) and the exonuclease 1 (EXO1) result in cytosolic ssDNA accumulation and cGAS-STING-IFN-I activation - a phenotype negatively controlled by the TREX1 exonuclease, which degrades these ssDNA [49; 51; 52]. Furthermore, knockdown of RPA or RAD51 leads to unprotected ssDNA which favors IFN-I production by the cGAS-STING pathway [53]. This phenomenon is seen in at least one other DNA repair mechanism. Indeed, defects in the mismatch repair pathway (MMR) have recently been shown to induce an uncontrolled activity of the EXO1 nuclease, leading to ssDNA release and RPA exhaustion causing cGAS-STING activation [51]. Given that FA proteins (FANCJ, FANCD2 and BRCA1) were suggested to interact with the MHL1 MMR factor during mismatch repair [54], this could be another mechanism that leads to IFN-I production in FA. Together, these data suggest that many factors like nucleases or signaling proteins are implicated in the amount of ssDNA released into the cytosol and thus in the activation of IFN-I. Indeed, in lymphomas, cytosolic DNA presence is dependent on the downstream signaling of Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) and to a lesser extent on ATM [55]. Given that FA deficient cells have defect in DNA repair mechanisms, cytosolic DNA could accumulate and be detected by cGAS to activate the production of IFN-I, as schematized in Figure 2A.

The presence of micronuclei correlates with cGAS self-DNA sensing

In addition to ssDNA fragments release, cGAS-STING-dependent IFN-I response correlates with micronuclei generation upon chromosomes mis-segregation [50; 56; 57], as represented in Figure 2B. In a seminal study, Harding et al. demonstrated that micronuclei formation requires cell division and a functional Non-Homologous End Joining (NHEJ) DNA repair pathway. Hence, inhibition of either NHEJ or cell cycle progression prevents cGAS activation [56]. However, how the DNA packaged in micronuclei activates cGAS is still under debate. Some plausible explanations include nuclear envelope rupture and then cGAS detection of the released cytosolic DNA [57]. Alternatively, if nuclear cGAS is packaged within micronuclei, cGAS activation after the nuclear envelope ruptures would require its reactivation because nuclear cGAS displays reduced enzymatic activity [56; 58; 59]. There might also be a threshold that needs to be reached/crossed since a recent study suggested that cGAS itself contributes to autophagic clearance of micronuclei [60]. Nonetheless, other less-visible DNA structures in cells displaying micronuclei could also contribute to the IFN-I activation. This hypothesis is supported by a new study in which the authors claim that DNA bridges and not micronuclei are responsible for cGAS activation [61]. However, whether cGAS is directly located along DNA bridges and how this positioning would allow cGAS activation remains to be elucidated. New data also proposes that the inclusion of cGAS in micronuclei can be modulated by the end-resection machinery, as pharmaceutical inhibition of end-resection or depletion of its components NBS1 and the DNA endonuclease CtIP favor cGAS localization in micronuclei [62]. Of interest, micronuclei were also observed in cancer cells in which FANCD1 (BRCA2) expression was abrogated [20; 21]. Interestingly, depletion of BRCA2 renders the cells more sensitive to Poly [ADP-ribose] polymerase (PARP) inhibitors [20] and to TNFα cytotoxicity in a cGAS dependent manner [21]. Given that cancer cells have already accumulated mutations, whether this would occur in FA patients-derived cells remains to be investigated.

The cGAS-STING-IFN-I axis might contribute to the HR-NHEJ DNA repair switch

FA cells are characterized by a propension to repair their DSBs using the more error-prone and mutagenic NHEJ rather than HR, which utilizes end-resection during the process [63; 64]. Accordingly, FA proteins cooperate with the kinase ATM to stimulate end-resection repair [65]. Thus, loss of either ATM or FA proteins shifts the repair mechanism toward NHEJ. Surprisingly, cGAS and STING were both reported to inhibit HR DNA repair, albeit using different mechanisms [66; 67]. STING-driven IFN-I production negatively regulates the transcription of genes implicated in HR repair like FANCD2 and other BRCA genes (including FANCC and FANCE). Importantly, treatment with the Jak 1/2 inhibitor, Ruxolitinib, was sufficient to rescue the HR defect, suggesting that their transcriptional repression is a result of IFN-I signaling [67]. Additionally, cGAS also prevents HR repair by a distinct mechanism. cGAS was shown to translocate to the nuclear compartment upon treatment with DNA damage agents, where cGAS inhibits HR by preventing the formation of PARP1-Timeless complex. However, it is not clear what the contribution of cGAS catalytic activity is in this model since the experiments were performed in U2OS cells which lack expression of the downstream signalling STING protein [68]. Given this newly discovered relationship, it would be of interest to determine if the depletion of cGAS-STING or IFNAR in FA deficient cells would redirect DNA repair toward HR.

cGAS independent activation of IFN-I response

As discussed above, cGAS detection of cytosolic DNA is a major route to produce IFN-I upon DNA damage. However, it is worth noting that several other mechanisms were also described. For instance, studies showed that DNA damage induced by etoposide or by doxorubicin instigates an ATM-dependent but cGAS-independent immune response [69; 70]. In addition, DNA-dependent

protein kinase (DNA-PK) was characterized as another DNA sensor contributing to IFN-I [71], and more recently, DNA-PK has been suggested to induce a cGAS-STING-independent IFN-I induction upon DNA damage in humans but not in mice, highlighting species differences in immune activation following DNA breaks [72]. Further, DNA-PK antagonizes cGAS activation through inhibition of its catalytic activity. In accordance with a role as a negative regulator of cGAS, cells lacking DNA-PK display an abnormal antiviral response and patients with mutations in the gene encoding DNA-PK suffer from autoimmunity [73]. Given that cGAS expression itself is induced by IFN-I, cGAS-independent activation of IFN-I is expected to sensitize cells to cGAS detection of cytosolic DNA including R-loops, which are also released in the context of FA [26; 74]. This positive loop might explain why healthy cells do not necessarily engage cGAS upon DNA damage while cells with defect in DNA repair with a basal IFN-I activation have a lower threshold for cGAS engagement[75; 76].

Micronuclei formation and chromatin bridges are a hallmark of cells with defective cell division

Unrepaired DNA damage during cell division can result in chromatin bridges (Figure 2C) and micronuclei formation (Figure 2B) and thus cause aneuploidy and genome instability. As mentioned in the previous section, these structures containing genomic DNA can activate cGAS [50; 56; 57; 61]. Besides their roles in DNA repair, evidence suggests that the FA proteins (FANCA, C, D2, D1, G, I, M) also regulate chromosome separation and cytokinesis [39; 77; 78; 79; 80; 81]. As such, an RNAi screen targeting 16 members of the FA complex showed that FA proteins prevent multinucleation of Taxol-treated cells. The relevance of this finding was confirmed by the fact that multinucleation was only observed in FA patients-derived fibroblast cells treated with Taxol but not in healthy patient cells [77]. In line with their role in cell division, many FA proteins,

including FANCA and FANCG, localize to the centrosome or elsewhere on mitotic chromosomes to prevent the formation of ultrafine chromatin bridges [39; 77; 78; 79; 81]. Accordingly, FANCA interacts with the spindle assembly checkpoint to prevent premature anaphase onset and sister chromatids segregation [77]. FANCA is also responsible for centrosome integrity since overexpression of a mutant form leads to an aberrant number of centrosomes [80]. As micronuclei and chromatin bridges activate cGAS, the defects in chromosome segregation and cytokinesis, observed in FA cells, are logically expected to result in IFN-I production (Figure 2B and C).

Derepression of retroelements results in cytosolic self-nucleic acids accumulation

Retroelements (RTE) such as LINE1 are ancient sequences that occupy around 40% of the genome. They can be transcribed into RNA and retrotranscribed into DNA forming RNA:DNA hybrids. Because of their retrotransposition activity, RTE contributes to genome instability and their expression correlates with ageing and induces IFN-I. Repressing RTE is another function of FA proteins. BRCA1 and the proteins of the FA core complex contribute to the broad repression of RTE, albeit using distinct mechanisms [82] (Figure 2D). In addition, Laguette's group showed that a mutation in SLX4 (FANCP) or loss of FANCD2 or MUS81 increases retrotransposition and IFN-I activation [19]. Accordingly, treatment of their cells with the retro-transcriptase inhibitor (RTi) Tenofovir abrogates both retrotransposition and IFN-I response. They went on to show that IFN-I production was dependent on the cGAS-STING pathway using specific shRNAs [19]. In cells derived from AGS mouse models, RTE induce both the cGAS-STING [83] and the RIG-I signaling axes [84]. However, the use of RTi in vivo did not impact the systemic IFN-I response observed in AGS mouse models while still preventing retrotransposition in the

animal cells [83]. Lack of therapeutic effect of RTi in AGS mouse models might be attributed to the difference in the cell population studied in vitro vs the cell populations implicated in the pathophysiology of the disease. Thus, the relevance of RTE-driven IFN-I response in FANCP (SLX4) mutated cells to FA pathophysiology warrants further investigation.

FA deficient cells display senescent features

Cellular senescence is defined as a stable cell-cycle arrest. It occurs naturally during embryogenesis and can be triggered in different contexts such as replicative senescence, oncogene-induced senescence or following cellular stress. Apart from developmental senescence, the other senescence categories usually rely on the p53/p21 axis and the pRB/p16 axis, the former usually triggered by DNA damage and genome instability. During senescence, cells undergo major phenotypic and molecular changes including structural changes as well as secretion of inflammatory molecules, proteases and signalling molecules that are collectively referred to as the senescence associated secretory phenotype (SASP). FA was recently suggested to be a premature ageing disease based on the several senescence characteristics observed in FA cells and patients [85]. In many FA mouse models, including Fancd2$^{-/-}$, Fancc$^{-/-}$ and Fanca$^{-/-}$, an exacerbated p53/p21 axis has been documented, contributing to bone marrow failure [86]. This hyperactive p53/p21 axis has also been observed in FA patient-derived cells [86]. Mechanistically, activation of the p53/p21 axis induces high levels of S-phase inhibitors which stop FA cell's growth leading them to arrest in G0/G1 due to replicative stress [86]. Another study reported that FANCD2 proteins prevent the progression of oncogene-induced senescence, meaning that its depletion favors premature senescence [87]. In parallel, Tumor Growth Factor β1 (TGFβ1), a known inducer of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21, is overproduced in cells isolated from the bone marrow of Fancd2$^{-/-}$ mice [88], thus

inhibiting hematopoietic stem cell (HSC) cycling and precipitating bone marrow failure by incapacitating the HSC to repopulate progenitor and differentiated blood cells. Notably, specific deletion of either TGFβ1 or p53 rescues bone marrow failure by stimulating HSC cycling [86; 88]. To overcome this cycling blockade, FA cells overexpressed the transcription factor MYC, which causes proliferative pressure and more DNA damage [89]. However, HSC cycling stimulation in FA mouse models leads to HSC exhaustion and bone marrow aplasia, indicating that the search for a better target in FA should continue. In this context, IFN-I signalling also promotes HSC cycling at the cost of more DNA damage in Fanca$^{-/-}$ mice [90]. These studies confirm the close relationship between FA and cell cycle arrest, but whether it is best characterized by senescence remains to be demonstrated. This idea is however supported by the fact that overexpression of SIRT6 histone deacetylases, previously reported to inhibit RTE transcription in Fanca$^{-/-}$ or Fancd2$^{-/-}$ mouse models, rescues stem cell exhaustion by reducing pathological inflammation [91; 92]. Interestingly, a study showed that RTE are derepressed in late senescence, allowing them to be detected by the cGAS-STING pathway, thus contributing to the IFN-I response [93].

Accumulation of cytosolic DNA during senescence drives IFN-I activation

Several reports have established that the cGAS-STING axis is activated in stress-induced senescence (e.g., replicative, oxidative and oncogene-induced senescence). The groups of Chen [94], Berger [95] and Hornung [96] demonstrated that cytosolic DNA detection by cGAS is a critical step in the amplification of the SASP. The faster spontaneous immortalization of mouse embryonic fibroblast (MEF) cells deficient in cGAS was the first hint to its role in senescence [94]. Initially associated to its role in SASP production, it was later discovered that cGAS also has a role in slowing down the replication fork and thus cell replication [97]. Nonetheless, cGAS engagement clearly contributes to the

SASP. Micronuclei, cytosolic chromatin fragments (CCF) and RTE are all suggested to be a source of cGAS activation in this context (Figure 2 A, B and D). Similar to what was found for the role of NBS1 in controlling cGAS localization in micronuclei, cGAS detection of CCF has been suggested to depend on HMGB2 and topoisomerase 1-DNA covalent cleavage complex (TOP1cc) [98]. Activation of cGAS in a senescent context might also result from an imbalance between the production of CCF and the cell capacity to degrade these CCF. Accordingly, DNASE2 and TREX1 usually prevent CCF accumulation; however, during senescence, their expression is reduced and CCF accumulates and activates cGAS [99]. In the disease context of AT syndrome, which presents striking phenotypic similarities to FA, cGAS is engaged during the senescence of AT patients olfactory neurosphere-derived cells and brain organoids, which display micronuclei. Importantly, cGAS and STING inhibition in this model prevents astrocyte senescence and protects brain organoids from neurodegeneration [46]. Given that FA syndrome was recently described as a '*senescence syndrome'* [85], the premature ageing observed in FA might also be an important source of IFN-I production.

Constitutive reactive oxygen species production in FA fuels DNA damage

Reactive oxygen species (ROS), mainly but not exclusively produced by mitochondria, have many functions in cells. They serve as signalling molecules and they oxidize biological molecules. The discovery that lymphocytes from FA patients grew better and generated less DNA breaks in low oxygen concentration was the first hint that the oxidative response was aberrant in these cells [100; 101]. This was later confirmed by the observation that cells isolated form Fancc$^{-/-}$ mice overproduced ROS upon inflammatory stimulation [17]. ROS are indeed produced upon stimulation with TNFα, a pro-inflammatory cytokine overproduced by FA cells in vitro and in vivo [14; 15; 16]. ROS overproduction has many effects

on cells, one of which is the generation of DNA damage through the oxidation of DNA bases. Guanines are hypersensitive to oxidation and result in 8-oxoguanine (8-oxoG), the most abundant DNA lesion formed after oxidative exposure. Accordingly, unrepaired 8-oxoG lesions have been observed in the peripheral tissues of FA patients harboring mutations in FANCA, FANCC and FANCD2 genes [102]. These lesions correlate with a lower expression of antioxidant genes, contributing to the excessive oxidation detected in cells from FA patients [102]. Fancc$^{-/-}$ mice also display higher levels of 8-oxoG DNA and yH2AX positive cells basally compare to wt mice. Interestingly, 8-oxoG DNA is resistant to degradation by TREX1 exonuclease [103]. ROS can also cause mtDNA damage, and a new study suggests that mtRNA is released and then detected by RIG-I, a potent activator of IFN-I, upon mtDNA double-strand breaks [104] as illustrated in Figure 2E. To our knowledge, RLR receptors have not been implicated in FA yet. In addition to mtRNA release, the RAD51C (FANCO) protein was recently shown to protect mitochondrial replication fork from degradation by the MRE11 mitochondrial nuclease during oxidative stress. In FA-derived patient cells with RAD51C mutation, this protection is lost and thus cytosolic mtDNA, derived from nascent mtDNA cleaved by MRE11, activates the cGAS-STING pathway [105]. Importantly, this process has been reported to rely on FANCD2 and downstream FANC factors but to be independent of the FA core complex, highlighting the importance of understanding the specific roles of FA proteins [105]. Thus, high levels of ROS might contribute to the creation of a pathological feedback loop by creating more DNA damage, ssDNA and mtDNA/RNA release and micronuclei formation that will induce IFN-I production which in turn would stimulate the production of more ROS (Figure 2F).

Constitutive IFN-I signaling in cells with defects in mitochondria clearance

Damaged mitochondria can be removed from the cell by classical autophagy, during which a membrane is formed around it and then it is fused to a lysosome, or by mitophagy, a process based on the specific recognition of mitochondrial factors by mitophagy receptors. Many FA proteins, including FANCC, FANCA and BRCA2, are required for two types of selective autophagy, the selective clearance of viruses (virophagy) and mitophagy. Consequently, a lack of these FA proteins impairs mitochondria clearance resulting in cellular accumulation of damaged mitochondria (Figure 2E and F) [37; 38]. FANCC directly interacts with PARKIN, which is involved in the clearance of damaged mitochondria and the reduction of ROS production. Importantly, using a specific variant of FANCC, c.67delG, it was shown that the DNA repair function and the mitophagy clearance function of FANCC are uncoupled, which suggests that the role of FANCC in mitophagy is relevant to FA pathophysiology [38]. Damaged mitochondria release Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs), including mtDNA, that are detected by innate immune receptors. Accordingly, mitochondrial stress arising from ATM inhibitor treatment, deletion of the nucleoid protein TFAM or Herpesvirus infection, causes mtDNA release and IFN-I response [106; 107]. The underlying mechanism of DNA release is not fully understood, although it was demonstrated that mitochondrial herniation mediated by BAK and BAX could be responsible for the DNA release [108].

The fact that FA mouse models do not recapitulate the full spectrum of FA pathophysiology has hampered our understanding of this disease for a long time. However, the discovery that FA mice subjected to environmental stress such as tail bleeding or inflammatory stimulus undergo complete bone marrow failure [90] changed our understanding of the disease. It became clear that FA mice, in their highly controlled living conditions, did not reflect the complexity of a human life. Researchers working on Parkinson’s using mice genetically deficient in

PINK1/Parkin faced the same challenge. In a seminal paper, Slitter and colleagues elegantly showed that if you submit these mice to exercise training, they developed cGAS-STING dependent symptoms highly resembling Parkinson's disease. They went on to characterize the underlying molecular mechanism and demonstrated that faulty mitophagy was causing mtDNA release and cGAS activation [109]. Critically, genetic depletion of Sting in their model abolishes the pathological inflammation and prevents dopaminergic neuron death. Damaged mitochondria and STING-dependent neuronal cell death were also observed in Amyotrophic lateral sclerosis, suggesting that STING activation is a recurrent cause of neurodegeneration [110]. Altogether, these findings highlight the complex interplay between DNA damage, immune response and cellular homeostasis.

Targeting IFN-I in FA and other genome instability syndromes

To our knowledge, there are currently no clinical trials involving the use of Jak 1,2 inhibitors or IFN-I receptor blocking antibodies in FA's closely-related syndromes such as AT. However, medical benefits were observed in diseases involving gain-of-function of STING and STAT1[111; 112]. In these syndromes, patients usually display measurably high levels of IFN-I. In AGS, treatment with the Janus kinase inhibitor Baricitinib confers a significant reduction in skin lesions and a possible improvement in neurologic symptoms [113]. Although these data are encouraging, it is worth noting that IFN-I signaling could still be measured in the blood of patients suggesting that these inhibitors have limited efficacy [112]. This lack of efficacy might be explained by the possibilities that the dosage needed to reach a stronger inhibition is prevented by the toxicity-associated side-effects of the drug or that the drug does not reach all cell populations equally. Nonetheless, these results suggest that IFN-I inhibition could relieve central nervous system (CNS) abnormalities in FA patients [114; 115].

Bone marrow failure is one of the most frequent symptoms for FA patients. IFN-I signalling is linked to bone marrow (BM) suppression. For instance, treatment of HCV patients with PEG-IFNα2a mediates BM suppression [116]. Interestingly, BM failure has also been documented in case of chronic viral infection suggesting that persistent low levels of IFN-I might be sufficient to promote BM failure[117]. In line with what is observed in FA, major suppressive impact of IFN-I on bone marrow will often occur following secondary stress[118]. While worth testing, long-term treatment to inhibit IFN-I might also worsen cytopenia as observed upon treatment with Jak inhibitor for patients with myelofibrosis[119]. Whether this side-effect would be observed in FA patients needs further investigation.

FA patients display a high prevalence of many types of cancer. Given the opposing roles of IFN-I in cancer, the use of Jak inhibitor might worsen FA patient's prevalence to cancer. On one side, IFN-I has critical role in cancer anti-tumor immunity, meaning it stimulates the ability of immune cells to destroy cancer cells. On the other side, prolonged IFN-I signaling can contribute to immune exhaustion and stimulates tumor growth[120].

Discussion

The last decade of research has recognized the crosstalk between DNA damage responses and inflammation, and emphasized its relevance in the study of syndromes caused by mutations in genes that maintain genome stability. The first demonstration of the implication of IFN-I in FA cells by Laguette's group opened new and exciting avenues to determine its importance in FA pathophysiology. Currently, a strong correlation between IFN-I signaling and defect in BRCA2 related genes has been made in several cancer cell lines [20; 21]. An important question arising from these studies is how transposable to primary cells are the findings obtained using cancer cells? We previously reported

that primary cells were more refractory to IFN-I induction upon DNA damage than their immortalized counterparts [75; 76]. In primary cells, prolonged cell cycle arrest following checkpoint activation prevents accumulation of self-nucleic acids[121]. To investigate this question, it would be important to analyze primary tissues and a diversity of cell population from FA patients when possible and mouse models. However, when analyzing tissue from mouse models, non-canonical roles of proteins will need to be considered. Recent studies indicating that cGAS promotes genome instability [66; 122; 123] and that STING modulates ROS metabolism [124] add new layers of complexity to the molecular mechanism underlying this already complex disease. Indeed, in future studies it might be recognized that the depletion of these proteins will not only affect IFN-I production but potentially genome stability itself, which will need to be considered.

Evidence suggesting that IFN-I in FA arises from the cGAS-STING pathway is accumulating. However, given the findings on mtRNA released after mtDNA damage [125], and the accumulation of RTE [84] and R-loops in FA deficient cells [8], it is possible that RLRs also contribute to IFN-I production in FA. In such cases, both self-DNA and self-RNA would have the capacity to further induce the expression of RLRs and cGAS, since these PRRs are themselves IFN-stimulated genes [27]. Elevated levels of these PRRs could then sensitize the cells even further to self-nucleic acids sensing, which would create a pathological feedback loop. However, similar to the role of cGAS in inhibiting HR, RIG-I has recently been shown to suppress NHEJ [126]. Given that FA deficient cells are more prone to repair their DNA using the NHEJ pathway rather than the HR pathway, these data suggest that in the context of FA, RIG-I would not play this NHEJ inhibitory role. These findings reflect the complex integration of immune signalling and DNA repair pathway. Thus, it is expected that RLRs and cGAS might have different roles and be differently regulated depending on the cellular context promoted by specific FA gene mutations.

Another important question is whether defect in each one of the 23 FA proteins have similar consequences on IFN-I. Research suggests that FA genes downstream of ID2 complex have a crucial role in orchestrating the HR response through the recruitment of endonucleases and other factors that will allow strand invasion and recombination. Loss of BRCA related genes contributes to a switch from HR to NHEJ and consequently facilitates cytosolic self-DNA accumulation and thus cGAS activation. Nonetheless, whether FA proteins upstream of ID2 complex will have the same consequences remains to be demonstrated specifically in cells with functional cell cycle checkpoint. In fact, in the case of the structure-specific endonuclease MUS81, a study shows that its activity was critical to the accumulation of cytosolic DNA. Consequently, if defects in specific FA genes prevent the action of endonucleases, inflammatory signals will not be produced.

FA is a phenotypically heterogenous disease, and while we can easily expect a role for IFN-I in bone marrow failure and cancer, its importance in congenital abnormalities is less clear. Contrary to AGS, IFN-I in FA is not expected to be produced at high levels and may be restricted to specific cell populations. In AGS, degradation of nucleic acids is impaired and, thus, self-nucleic acids accumulate without the need for cells to display high levels of DNA damage. In FA however, only cells that proliferate in the presence of DNA damage or with high demands in mitochondria clearance for instance are expected to display high levels of cytosolic DNA. As we report in this review, IFN-I in FA could be produced by distinct molecular mechanisms. As such, it would be of interest to investigate what the predominant mechanism in different cell populations is.

Future perspectives

Many questions warrant further investigations that will necessitate the generation of new mouse models. Generation of complete knock-out and

subsequently tissue-specific knock-out for the different players implicated in IFN-I signaling in FA (IFNAR, cGAS, STING and RIG-I). These new models should reveal not only if IFN-I is implicated in the pathophysiology of FA, but also in which cell population the production of IFN-I originates. Given the challenge associated with a complete inhibition of the IFN-I signaling, it is difficult to predict how Jak inhibitor would work in FA patients since we expect IFN-I levels to be lower than in AGS. To achieve better clinical results, other therapeutic targets, such as cGAS or STING, might need to be considered. On a positive note, these future researches have the potential to uncover new therapeutic opportunities for FA patients and hence contribute to expand their life expectancy.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank the *Fonds de Recherche du Québec* (FRSQ) – *Santé* (35071 to G.P.); *Chaire de Recherche Junior UQTR* (GP); CERMO-FC (GP); the Canadian Foundation for Innovation (CFI-40780 to GP); MITACS Globalink scholarship (UQTR-97834 to SS). We would like to thank Mélodie B. Plourde for editing; Dr Laure Guitton-Sert, Dr Sofiane Y. Mersaoui, Dr Jean-Yves Masson and Dr Patrick Narbonne for critical reading of this manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KL wrote sections of the first draft and edited the manuscript. SS designed, drew the schematic and edited the manuscript. GP designed, wrote and edited the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

Copyright © 2022 Landelouci, Sinha and Pepin. 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

REFERENCES

[1] A. Rodriguez, and A. D'Andrea, Fanconi anemia pathway. Curr Biol 27 (2017) R986-R988.

[2] L. Guitton-Sert, Y. Gao, and J.Y. Masson, Animal models of Fanconi anemia: A developmental and therapeutic perspective on a multifaceted disease. Semin Cell Dev Biol 113 (2021) 113-131.

[3] P. Knipscheer, M. Raschle, A. Smogorzewska, M. Enoiu, T.V. Ho, O.D. Scharer, S.J. Elledge, and J.C. Walter, The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. Science 326 (2009) 1698-701.

[4] T.R. Singh, D. Saro, A.M. Ali, X.F. Zheng, C.H. Du, M.W. Killen, A. Sachpatzidis, K. Wahengbam, A.J. Pierce, Y. Xiong, P. Sung, and A.R. Meetei, MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM. Mol Cell 37 (2010) 879-86.

[5] W. Tan, and A.J. Deans, The ubiquitination machinery of the Fanconi Anemia DNA repair pathway. Prog Biophys Mol Biol 163 (2021) 5-13.

[6] W. Tan, S. van Twest, A. Leis, R. Bythell-Douglas, V.J. Murphy, M. Sharp, M.W. Parker, W. Crismani, and A.J. Deans, Monoubiquitination by the human Fanconi anemia core complex clamps FANCI:FANCD2 on DNA in filamentous arrays. Elife 9 (2020).

[7] X. Xu, Y. Xu, R. Guo, R. Xu, C. Fu, M. Xing, H. Sasanuma, Q. Li, M. Takata, S. Takeda, R. Guo, and D. Xu, Fanconi anemia proteins participate in a break-induced-replication-like pathway to counter replication stress. Nat Struct Mol Biol 28 (2021) 487-500.

[8] M.L. Garcia-Rubio, C. Perez-Calero, S.I. Barroso, E. Tumini, E. Herrera-Moyano, I.V. Rosado, and A. Aguilera, The Fanconi Anemia Pathway Protects Genome Integrity from R-loops. PLoS Genet 11 (2015) e1005674.

[9] R.A. Schwab, J. Nieminuszczy, F. Shah, J. Langton, D. Lopez Martinez, C.C. Liang, M.A. Cohn, R.J. Gibbons, A.J. Deans, and W. Niedzwiedz, The Fanconi Anemia Pathway Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription. Mol Cell 60 (2015) 351-61.

[10] S. Guillemette, A. Branagan, M. Peng, A. Dhruva, O.D. Scharer, and S.B. Cantor, FANCJ localization by mismatch repair is vital to maintain genomic integrity after UV irradiation. Cancer Res 74 (2014) 932-44.

[11] B.W. Freie, S.L. Ciccone, X. Li, P.A. Plett, C.M. Orschell, E.F. Srour, H. Hanenberg, D. Schindler, S.H. Lee, and D.W. Clapp, A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induced G2 checkpoint. J Biol Chem 279 (2004) 50986-93.

[12] A. Benitez, W. Liu, A. Palovcak, G. Wang, J. Moon, K. An, A. Kim, K. Zheng, Y. Zhang, F. Bai, A.V. Mazin, X.H. Pei, F. Yuan, and Y. Zhang,

FANCA Promotes DNA Double-Strand Break Repair by Catalyzing Single-Strand Annealing and Strand Exchange. Mol Cell 71 (2018) 621-628 e4.
[13] I. Joksic, D. Vujic, M. Guc-Scekic, A. Leskovac, S. Petrovic, M. Ojani, J.P. Trujillo, J. Surralles, M. Zivkovic, A. Stankovic, P. Slijepcevic, and G. Joksic, Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. Genome Integr 3 (2012) 6.
[14] F. Rosselli, J. Sanceau, E. Gluckman, J. Wietzerbin, and E. Moustacchi, Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha. Blood 83 (1994) 1216-25.
[15] C. Dufour, A. Corcione, J. Svahn, R. Haupt, V. Poggi, A.N. Beka'ssy, R. Scime, A. Pistorio, and V. Pistoia, TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. Blood 102 (2003) 2053-9.
[16] X. Zhang, D.P. Sejas, Y. Qiu, D.A. Williams, and Q. Pang, Inflammatory ROS promote and cooperate with the Fanconi anemia mutation for hematopoietic senescence. J Cell Sci 120 (2007) 1572-83.
[17] D.P. Sejas, R. Rani, Y. Qiu, X. Zhang, S.R. Fagerlie, H. Nakano, D.A. Williams, and Q. Pang, Inflammatory reactive oxygen species-mediated hemopoietic suppression in Fancc-deficient mice. J Immunol 178 (2007) 5277-87.
[18] C. Taffoni, A. Steer, J. Marines, H. Chamma, I.K. Vila, and N. Laguette, Nucleic Acid Immunity and DNA Damage Response: New Friends and Old Foes. Front Immunol 12 (2021) 660560.
[19] C. Bregnard, J. Guerra, S. Dejardin, F. Passalacqua, M. Benkirane, and N. Laguette, Upregulated LINE-1 Activity in the Fanconi Anemia Cancer Susceptibility Syndrome Leads to Spontaneous Pro-inflammatory Cytokine Production. EBioMedicine 8 (2016) 184-194.
[20] T. Reislander, E.P. Lombardi, F.J. Groelly, A. Miar, M. Porru, S. Di Vito, B. Wright, H. Lockstone, A. Biroccio, A. Harris, A. Londono-Vallejo, and M. Tarsounas, BRCA2 abrogation triggers innate immune responses potentiated by treatment with PARP inhibitors. Nat Commun 10 (2019) 3143.
[21] A.M. Heijink, F. Talens, L.T. Jae, S.E. van Gijn, R.S.N. Fehrmann, T.R. Brummelkamp, and M. van Vugt, BRCA2 deficiency instigates cGAS-mediated inflammatory signaling and confers sensitivity to tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity. Nat Commun 10 (2019) 100.
[22] S. Kretschmer, and M.A. Lee-Kirsch, Type I interferon-mediated autoinflammation and autoimmunity. Curr Opin Immunol 49 (2017) 96-102.
[23] M. Schlee, and G. Hartmann, Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. Nat Rev Immunol 16 (2016) 566-80.

[24] S. Reikine, J.B. Nguyen, and Y. Modis, Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. Front Immunol 5 (2014) 342.
[25] A. Ablasser, M. Goldeck, T. Cavlar, T. Deimling, G. Witte, I. Rohl, K.P. Hopfner, J. Ludwig, and V. Hornung, cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. Nature 498 (2013) 380-4.
[26] A.K. Mankan, T. Schmidt, D. Chauhan, M. Goldeck, K. Honing, M. Gaidt, A.V. Kubarenko, L. Andreeva, K.P. Hopfner, and V. Hornung, Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS-STING axis. EMBO J 33 (2014) 2937-46.
[27] I. Rusinova, S. Forster, S. Yu, A. Kannan, M. Masse, H. Cumming, R. Chapman, and P.J. Hertzog, Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. Nucleic Acids Res 41 (2013) D1040-6.
[28] L.C. Platanias, Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat Rev Immunol 5 (2005) 375-86.
[29] J. Wu, L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, and Z.J. Chen, Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science 339 (2013) 826-30.
[30] L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, and Z.J. Chen, Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science 339 (2013) 786-91.
[31] K.R. Balka, and D. De Nardo, Molecular and spatial mechanisms governing STING signalling. FEBS J 288 (2021) 5504-5529.
[32] Y.J. Crow, and D.B. Stetson, The type I interferonopathies: 10 years on. Nat Rev Immunol (2021).
[33] A. Ablasser, and S. Hur, Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids. Nat Immunol 21 (2020) 17-29.
[34] P. Santa, A. Garreau, L. Serpas, A. Ferriere, P. Blanco, C. Soni, and V. Sisirak, The Role of Nucleases and Nucleic Acid Editing Enzymes in the Regulation of Self-Nucleic Acid Sensing. Front Immunol 12 (2021) 629922.
[35] B.R. Gauthier, and V. Comaills, Nuclear Envelope Integrity in Health and Disease: Consequences on Genome Instability and Inflammation. Int J Mol Sci 22 (2021).
[36] A. Lepelley, T. Wai, and Y.J. Crow, Mitochondrial Nucleic Acid as a Driver of Pathogenic Type I Interferon Induction in Mendelian Disease. Front Immunol 12 (2021) 729763.
[37] P. Shyamsunder, M. Esner, M. Barvalia, Y.J. Wu, T. Loja, H.B. Boon, M.E. Lleonart, R.S. Verma, L. Krejci, and A. Lyakhovich, Impaired mitophagy in Fanconi anemia is dependent on mitochondrial fission. Oncotarget 7 (2016) 58065-58074.
[38] R. Sumpter, Jr., S. Sirasanagandla, A.F. Fernandez, Y. Wei, X. Dong, L. Franco, Z. Zou, C. Marchal, M.Y. Lee, D.W. Clapp, H. Hanenberg, and B.

Levine, Fanconi Anemia Proteins Function in Mitophagy and Immunity. Cell 165 (2016) 867-81.
[39] V. Naim, and F. Rosselli, The FANC pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. Nat Cell Biol 11 (2009) 761-8.
[40] G. Rice, W.G. Newman, J. Dean, T. Patrick, R. Parmar, K. Flintoff, P. Robins, S. Harvey, T. Hollis, A. O'Hara, A.L. Herrick, A.P. Bowden, F.W. Perrino, T. Lindahl, D.E. Barnes, and Y.J. Crow, Heterozygous mutations in TREX1 cause familial chilblain lupus and dominant Aicardi-Goutieres syndrome. Am J Hum Genet 80 (2007) 811-5.
[41] Y.J. Crow, A. Leitch, B.E. Hayward, A. Garner, R. Parmar, E. Griffith, M. Ali, C. Semple, J. Aicardi, R. Babul-Hirji, C. Baumann, P. Baxter, E. Bertini, K.E. Chandler, D. Chitayat, D. Cau, C. Dery, E. Fazzi, C. Goizet, M.D. King, J. Klepper, D. Lacombe, G. Lanzi, H. Lyall, M.L. Martinez-Frias, M. Mathieu, C. McKeown, A. Monier, Y. Oade, O.W. Quarrell, C.D. Rittey, R.C. Rogers, A. Sanchis, J.B. Stephenson, U. Tacke, M. Till, J.L. Tolmie, P. Tomlin, T. Voit, B. Weschke, C.G. Woods, P. Lebon, D.T. Bonthron, C.P. Ponting, and A.P. Jackson, Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutieres syndrome and mimic congenital viral brain infection. Nat Genet 38 (2006) 910-6.
[42] F. Coquel, M.J. Silva, H. Techer, K. Zadorozhny, S. Sharma, J. Nieminuszczy, C. Mettling, E. Dardillac, A. Barthe, A.L. Schmitz, A. Promonet, A. Cribier, A. Sarrazin, W. Niedzwiedz, B. Lopez, V. Costanzo, L. Krejci, A. Chabes, M. Benkirane, Y.L. Lin, and P. Pasero, SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. Nature 557 (2018) 57-61.
[43] E.E. Gray, P.M. Treuting, J.J. Woodward, and D.B. Stetson, Cutting Edge: cGAS Is Required for Lethal Autoimmune Disease in the Trex1-Deficient Mouse Model of Aicardi-Goutieres Syndrome. J Immunol 195 (2015) 1939-43.
[44] A. Gall, P. Treuting, K.B. Elkon, Y.M. Loo, M. Gale, Jr., G.N. Barber, and D.B. Stetson, Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. Immunity 36 (2012) 120-31.
[45] D.B. Stetson, J.S. Ko, T. Heidmann, and R. Medzhitov, Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. Cell 134 (2008) 587-98.
[46] J. Aguado, H.K. Chaggar, C. Gomez-Inclan, M.R. Shaker, H.C. Leeson, A. Mackay-Sim, and E.J. Wolvetang, Inhibition of the cGAS-STING pathway ameliorates the premature senescence hallmarks of Ataxia-Telangiectasia brain organoids. Aging Cell 20 (2021) e13468.
[47] A. Hartlova, S.F. Erttmann, F.A. Raffi, A.M. Schmalz, U. Resch, S. Anugula, S. Lienenklaus, L.M. Nilsson, A. Kroger, J.A. Nilsson, T. Ek, S. Weiss, and N.O. Gekara, DNA damage primes the type I interferon system via

the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. Immunity 42 (2015) 332-343.
[48] Y.A. Chen, Y.L. Shen, H.Y. Hsia, Y.P. Tiang, T.L. Sung, and L.Y. Chen, Extrachromosomal telomere repeat DNA is linked to ALT development via cGAS-STING DNA sensing pathway. Nat Struct Mol Biol 24 (2017) 1124-1131.
[49] E. Erdal, S. Haider, J. Rehwinkel, A.L. Harris, and P.J. McHugh, A prosurvival DNA damage-induced cytoplasmic interferon response is mediated by end resection factors and is limited by Trex1. Genes Dev 31 (2017) 353-369.
[50] M. Gratia, M.P. Rodero, C. Conrad, E. Bou Samra, M. Maurin, G.I. Rice, D. Duffy, P. Revy, F. Petit, R.C. Dale, Y.J. Crow, M. Amor-Gueret, and N. Manel, Bloom syndrome protein restrains innate immune sensing of micronuclei by cGAS. J Exp Med 216 (2019) 1199-1213.
[51] J. Guan, C. Lu, Q. Jin, H. Lu, X. Chen, L. Tian, Y. Zhang, J. Ortega, J. Zhang, S. Siteni, M. Chen, L. Gu, J.W. Shay, A.J. Davis, Z.J. Chen, Y.X. Fu, and G.M. Li, MLH1 Deficiency-Triggered DNA Hyperexcision by Exonuclease 1 Activates the cGAS-STING Pathway. Cancer Cell 39 (2021) 109-121 e5.
[52] S.S. Ho, W.Y. Zhang, N.Y. Tan, M. Khatoo, M.A. Suter, S. Tripathi, F.S. Cheung, W.K. Lim, P.H. Tan, J. Ngeow, and S. Gasser, The DNA Structure-Specific Endonuclease MUS81 Mediates DNA Sensor STING-Dependent Host Rejection of Prostate Cancer Cells. Immunity 44 (2016) 1177-89.
[53] C. Wolf, A. Rapp, N. Berndt, W. Staroske, M. Schuster, M. Dobrick-Mattheuer, S. Kretschmer, N. Konig, T. Kurth, D. Wieczorek, K. Kast, M.C. Cardoso, C. Gunther, and M.A. Lee-Kirsch, RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA. Nat Commun 7 (2016) 11752.
[54] M. Peng, J. Xie, A. Ucher, J. Stavnezer, and S.B. Cantor, Crosstalk between BRCA-Fanconi anemia and mismatch repair pathways prevents MSH2-dependent aberrant DNA damage responses. EMBO J 33 (2014) 1698-712.
[55] A.R. Lam, N.L. Bert, S.S. Ho, Y.J. Shen, L.F. Tang, G.M. Xiong, J.L. Croxford, C.X. Koo, K.J. Ishii, S. Akira, D.H. Raulet, and S. Gasser, RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. Cancer Res 74 (2014) 2193-2203.
[56] S.M. Harding, J.L. Benci, J. Irianto, D.E. Discher, A.J. Minn, and R.A. Greenberg, Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. Nature 548 (2017) 466-470.
[57] K.J. Mackenzie, P. Carroll, C.A. Martin, O. Murina, A. Fluteau, D.J. Simpson, N. Olova, H. Sutcliffe, J.K. Rainger, A. Leitch, R.T. Osborn, A.P. Wheeler, M. Nowotny, N. Gilbert, T. Chandra, M.A.M. Reijns, and

A.P. Jackson, cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. Nature 548 (2017) 461-465.
[58] M. Gentili, X. Lahaye, F. Nadalin, G.P.F. Nader, E. Puig Lombardi, S. Herve, N.S. De Silva, D.C. Rookhuizen, E. Zueva, C. Goudot, M. Maurin, A. Bochnakian, S. Amigorena, M. Piel, D. Fachinetti, A. Londono-Vallejo, and N. Manel, The N-Terminal Domain of cGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus. Cell Rep 26 (2019) 2377-2393 e13.
[59] H.E. Volkman, S. Cambier, E.E. Gray, and D.B. Stetson, Tight nuclear tethering of cGAS is essential for preventing autoreactivity. Elife 8 (2019).
[60] M. Zhao, F. Wang, J. Wu, Y. Cheng, Y. Cao, X. Wu, M. Ma, F. Tang, Z. Liu, H. Liu, and B. Ge, CGAS is a micronucleophagy receptor for the clearance of micronuclei. Autophagy (2021) 1-17.
[61] P.J.K. Flynn, P.D. and Mitchison, T.J., Chromatin Bridges, not Micronuclei, Activate cGAS after Drug-induced

Mitotic Errors in Human Cells. bioRxiv preprint (2021).
[62] S.M. Abdisalaam, S.; Bhattacharya, S.; Sinha, D.; Kumari, S.; Sadek, H.A.; Ortega, J.; Li, G. and Asaithamby, A., NBS1-CtIP–Mediated DNA End Resection Regulates cGAS Binding to Micronuclei. bioRxiv preprint (2020).
[63] A. Adamo, S.J. Collis, C.A. Adelman, N. Silva, Z. Horejsi, J.D. Ward, E. Martinez-Perez, S.J. Boulton, and A. La Volpe, Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. Mol Cell 39 (2010) 25-35.
[64] L.J. Eccles, A.C. Bell, and S.N. Powell, Inhibition of non-homologous end joining in Fanconi Anemia cells results in rescue of survival after interstrand crosslinks but sensitization to replication associated double-strand breaks. DNA Repair (Amst) 64 (2018) 1-9.
[65] M.Y. Cai, C.E. Dunn, W. Chen, B.S. Kochupurakkal, H. Nguyen, L.A. Moreau, G.I. Shapiro, K. Parmar, D. Kozono, and A.D. D'Andrea, Cooperation of the ATM and Fanconi Anemia/BRCA Pathways in Double-Strand Break End Resection. Cell Rep 30 (2020) 2402-2415 e5.
[66] H. Liu, H. Zhang, X. Wu, D. Ma, J. Wu, L. Wang, Y. Jiang, Y. Fei, C. Zhu, R. Tan, P. Jungblut, G. Pei, A. Dorhoi, Q. Yan, F. Zhang, R. Zheng, S. Liu, H. Liang, Z. Liu, H. Yang, J. Chen, P. Wang, T. Tang, W. Peng, Z. Hu, Z. Xu, X. Huang, J. Wang, H. Li, Y. Zhou, F. Liu, D. Yan, S.H.E. Kaufmann, C. Chen, Z. Mao, and B. Ge, Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis. Nature 563 (2018) 131-136.
[67] L.J. McLaughlin, L. Stojanovic, A.A. Kogan, J.L. Rutherford, E.Y. Choi, R.C. Yen, L. Xia, Y. Zou, R.G. Lapidus, S.B. Baylin, M.J. Topper, and F.V. Rassool, Pharmacologic induction of innate immune signaling directly drives homologous recombination deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 117 (2020) 17785-17795.

[68] T. Deschamps, and M. Kalamvoki, Impaired STING Pathway in Human Osteosarcoma U2OS Cells Contributes to the Growth of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus. J Virol 91 (2017).
[69] G. Dunphy, S.M. Flannery, J.F. Almine, D.J. Connolly, C. Paulus, K.L. Jonsson, M.R. Jakobsen, M.M. Nevels, A.G. Bowie, and L. Unterholzner, Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-kappaB Signaling after Nuclear DNA Damage. Mol Cell 71 (2018) 745-760 e5.
[70] P. Luthra, S. Aguirre, B.C. Yen, C.A. Pietzsch, M.T. Sanchez-Aparicio, B. Tigabu, L.K. Morlock, A. Garcia-Sastre, D.W. Leung, N.S. Williams, A. Fernandez-Sesma, A. Bukreyev, and C.F. Basler, Topoisomerase II Inhibitors Induce DNA Damage-Dependent Interferon Responses Circumventing Ebola Virus Immune Evasion. mBio 8 (2017).
[71] B.J. Ferguson, D.S. Mansur, N.E. Peters, H. Ren, and G.L. Smith, DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. Elife 1 (2012) e00047.
[72] K. Burleigh, J.H. Maltbaek, S. Cambier, R. Green, M. Gale, Jr., R.C. James, and D.B. Stetson, Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway. Sci Immunol 5 (2020).
[73] X. Sun, T. Liu, J. Zhao, H. Xia, J. Xie, Y. Guo, L. Zhong, M. Li, Q. Yang, C. Peng, I. Rouvet, A. Belot, H.B. Shu, P. Feng, and J. Zhang, DNA-PK deficiency potentiates cGAS-mediated antiviral innate immunity. Nat Commun 11 (2020) 6182.
[74] O. Chatzidoukaki, K. Stratigi, E. Goulielmaki, G. Niotis, A. Akalestou-Clocher, K. Gkirtzimanaki, A. Zafeiropoulos, J. Altmuller, P. Topalis, and G.A. Garinis, R-loops trigger the release of cytoplasmic ssDNAs leading to chronic inflammation upon DNA damage. Sci Adv 7 (2021) eabj5769.
[75] G. Pepin, C. Nejad, J. Ferrand, B.J. Thomas, H.J. Stunden, E. Sanij, C.H. Foo, C.R. Stewart, J.E. Cain, P.G. Bardin, B.R.G. Williams, and M.P. Gantier, Topoisomerase 1 Inhibition Promotes Cyclic GMP-AMP Synthase-Dependent Antiviral Responses. mBio 8 (2017).
[76] G. Pepin, C. Nejad, B.J. Thomas, J. Ferrand, K. McArthur, P.G. Bardin, B.R. Williams, and M.P. Gantier, Activation of cGAS-dependent antiviral responses by DNA intercalating agents. Nucleic Acids Res 45 (2017) 198-205.
[77] G. Nalepa, R. Enzor, Z. Sun, C. Marchal, S.J. Park, Y. Yang, L. Tedeschi, S. Kelich, H. Hanenberg, and D.W. Clapp, Fanconi anemia signaling network regulates the spindle assembly checkpoint. J Clin Invest 123 (2013) 3839-47.
[78] J. Zou, F. Tian, J. Li, W. Pickner, M. Long, K. Rezvani, H. Wang, and D. Zhang, FancJ regulates interstrand crosslinker induced centrosome amplification through the activation of polo-like kinase 1. Biol Open 2 (2013) 1022-31.

[79] A. Nakanishi, X. Han, H. Saito, K. Taguchi, Y. Ohta, S. Imajoh-Ohmi, and Y. Miki, Interference with BRCA2, which localizes to the centrosome during S and early M phase, leads to abnormal nuclear division. Biochem Biophys Res Commun 355 (2007) 34-40.
[80] S. Kim, S.K. Hwang, M. Lee, H. Kwak, K. Son, J. Yang, S.H. Kim, and C.H. Lee, Fanconi anemia complementation group A (FANCA) localizes to centrosomes and functions in the maintenance of centrosome integrity. Int J Biochem Cell Biol 45 (2013) 1953-61.
[81] P. Vinciguerra, S.A. Godinho, K. Parmar, D. Pellman, and A.D. D'Andrea, Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. J Clin Invest 120 (2010) 3834-42.
[82] P. Mita, X. Sun, D. Fenyo, D.J. Kahler, D. Li, N. Agmon, A. Wudzinska, S. Keegan, J.S. Bader, C. Yun, and J.D. Boeke, BRCA1 and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells. Nat Struct Mol Biol 27 (2020) 179-191.
[83] M. Achleitner, M. Kleefisch, A. Hennig, K. Peschke, A. Polikarpova, R. Oertel, B. Gabriel, L. Schulze, D. Lindeman, A. Gerbaulet, U. Fiebig, M.A. Lee-Kirsch, A. Roers, and R. Behrendt, Lack of Trex1 Causes Systemic Autoimmunity despite the Presence of Antiretroviral Drugs. J Immunol 199 (2017) 2261-2269.
[84] K. Zhao, J. Du, Y. Peng, P. Li, S. Wang, Y. Wang, J. Hou, J. Kang, W. Zheng, S. Hua, and X.F. Yu, LINE1 contributes to autoimmunity through both RIG-I- and MDA5-mediated RNA sensing pathways. J Autoimmun 90 (2018) 105-115.
[85] A. Helbling-Leclerc, C. Garcin, and F. Rosselli, Beyond DNA repair and chromosome instability-Fanconi anaemia as a cellular senescence-associated syndrome. Cell Death Differ 28 (2021) 1159-1173.
[86] R. Ceccaldi, K. Parmar, E. Mouly, M. Delord, J.M. Kim, M. Regairaz, M. Pla, N. Vasquez, Q.S. Zhang, C. Pondarre, R. Peffault de Latour, E. Gluckman, M. Cavazzana-Calvo, T. Leblanc, J. Larghero, M. Grompe, G. Socie, A.D. D'Andrea, and J. Soulier, Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. Cell Stem Cell 11 (2012) 36-49.
[87] A. Helbling-Leclerc, F. Dessarps-Freichey, C. Evrard, and F. Rosselli, Fanconi anemia proteins counteract the implementation of the oncogene-induced senescence program. Sci Rep 9 (2019) 17024.
[88] H. Zhang, D.E. Kozono, K.W. O'Connor, S. Vidal-Cardenas, A. Rousseau, A. Hamilton, L. Moreau, E.F. Gaudiano, J. Greenberger, G. Bagby, J. Soulier, M. Grompe, K. Parmar, and A.D. D'Andrea, TGF-beta Inhibition Rescues Hematopoietic Stem Cell Defects and Bone Marrow Failure in Fanconi Anemia. Cell Stem Cell 18 (2016) 668-81.

[89] A. Rodriguez, K. Zhang, A. Farkkila, J. Filiatrault, C. Yang, M. Velazquez, E. Furutani, D.C. Goldman, B. Garcia de Teresa, G. Garza-Mayen, K. McQueen, L.A. Sambel, B. Molina, L. Torres, M. Gonzalez, E. Vadillo, R. Pelayo, W.H. Fleming, M. Grompe, A. Shimamura, S. Hautaniemi, J. Greenberger, S. Frias, K. Parmar, and A.D. D'Andrea, MYC Promotes Bone Marrow Stem Cell Dysfunction in Fanconi Anemia. Cell Stem Cell 28 (2021) 33-47 e8.
[90] D. Walter, A. Lier, A. Geiselhart, F.B. Thalheimer, S. Huntscha, M.C. Sobotta, B. Moehrle, D. Brocks, I. Bayindir, P. Kaschutnig, K. Muedder, C. Klein, A. Jauch, T. Schroeder, H. Geiger, T.P. Dick, T. Holland-Letz, P. Schmezer, S.W. Lane, M.A. Rieger, M.A. Essers, D.A. Williams, A. Trumpp, and M.D. Milsom, Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. Nature 520 (2015) 549-52.
[91] M. Simon, M. Van Meter, J. Ablaeva, Z. Ke, R.S. Gonzalez, T. Taguchi, M. De Cecco, K.I. Leonova, V. Kogan, S.L. Helfand, N. Neretti, A. Roichman, H.Y. Cohen, M.V. Meer, V.N. Gladyshev, M.P. Antoch, A.V. Gudkov, J.M. Sedivy, A. Seluanov, and V. Gorbunova, LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. Cell Metab 29 (2019) 871-885 e5.
[92] Y. Li, X. Li, A. Cole, S. McLaughlin, and W. Du, Icariin improves Fanconi anemia hematopoietic stem cell function through SIRT6-mediated NF-kappa B inhibition. Cell Cycle 17 (2018) 367-376.
[93] M. De Cecco, T. Ito, A.P. Petrashen, A.E. Elias, N.J. Skvir, S.W. Criscione, A. Caligiana, G. Brocculi, E.M. Adney, J.D. Boeke, O. Le, C. Beausejour, J. Ambati, K. Ambati, M. Simon, A. Seluanov, V. Gorbunova, P.E. Slagboom, S.L. Helfand, N. Neretti, and J.M. Sedivy, L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. Nature 566 (2019) 73-78.
[94] H. Yang, H. Wang, J. Ren, Q. Chen, and Z.J. Chen, cGAS is essential for cellular senescence. Proc Natl Acad Sci U S A 114 (2017) E4612-E4620.
[95] Z. Dou, K. Ghosh, M.G. Vizioli, J. Zhu, P. Sen, K.J. Wangensteen, J. Simithy, Y. Lan, Y. Lin, Z. Zhou, B.C. Capell, C. Xu, M. Xu, J.E. Kieckhaefer, T. Jiang, M. Shoshkes-Carmel, K. Tanim, G.N. Barber, J.T. Seykora, S.E. Millar, K.H. Kaestner, B.A. Garcia, P.D. Adams, and S.L. Berger, Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. Nature 550 (2017) 402-406.
[96] S. Gluck, B. Guey, M.F. Gulen, K. Wolter, T.W. Kang, N.A. Schmacke, A. Bridgeman, J. Rehwinkel, L. Zender, and A. Ablasser, Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. Nat Cell Biol 19 (2017) 1061-1070.
[97] H. Chen, H. Chen, J. Zhang, Y. Wang, A. Simoneau, H. Yang, A.S. Levine, L. Zou, Z. Chen, and L. Lan, cGAS suppresses genomic instability as a decelerator of replication forks. Sci Adv 6 (2020).

[98] B. Zhao, P. Liu, T. Fukumoto, T. Nacarelli, N. Fatkhutdinov, S. Wu, J. Lin, K.M. Aird, H.Y. Tang, Q. Liu, D.W. Speicher, and R. Zhang, Topoisomerase 1 cleavage complex enables pattern recognition and inflammation during senescence. Nat Commun 11 (2020) 908.
[99] A. Takahashi, T.M. Loo, R. Okada, F. Kamachi, Y. Watanabe, M. Wakita, S. Watanabe, S. Kawamoto, K. Miyata, G.N. Barber, N. Ohtani, and E. Hara, Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. Nat Commun 9 (2018) 1249.
[100] H. Joenje, F. Arwert, A.W. Eriksson, H. de Koning, and A.B. Oostra, Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. Nature 290 (1981) 142-3.
[101] D. Schindler, and H. Hoehn, Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. Am J Hum Genet 43 (1988) 429-35.
[102] W. Du, R. Rani, J. Sipple, J. Schick, K.C. Myers, P. Mehta, P.R. Andreassen, S.M. Davies, and Q. Pang, The FA pathway counteracts oxidative stress through selective protection of antioxidant defense gene promoters. Blood 119 (2012) 4142-51.
[103] N. Gehrke, C. Mertens, T. Zillinger, J. Wenzel, T. Bald, S. Zahn, T. Tuting, G. Hartmann, and W. Barchet, Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. Immunity 39 (2013) 482-95.
[104] M. Tigano, D.C. Vargas, S. Tremblay-Belzile, Y. Fu, and A. Sfeir, Nuclear sensing of breaks in mitochondrial DNA enhances immune surveillance. Nature 591 (2021) 477-481.
[105] J.W. Luzwick, E. Dombi, R.A. Boisvert, S. Roy, S. Park, S. Kunnimalaiyaan, S. Goffart, D. Schindler, and K. Schlacher, MRE11-dependent instability in mitochondrial DNA fork protection activates a cGAS immune signaling pathway. Sci Adv 7 (2021) eabf9441.
[106] A.P. West, W. Khoury-Hanold, M. Staron, M.C. Tal, C.M. Pineda, S.M. Lang, M. Bestwick, B.A. Duguay, N. Raimundo, D.A. MacDuff, S.M. Kaech, J.R. Smiley, R.E. Means, A. Iwasaki, and G.S. Shadel, Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. Nature 520 (2015) 553-7.
[107] M. Hu, M. Zhou, X. Bao, D. Pan, M. Jiao, X. Liu, F. Li, and C.Y. Li, ATM inhibition enhances cancer immunotherapy by promoting mtDNA leakage and cGAS/STING activation. J Clin Invest 131 (2021).
[108] K. McArthur, L.W. Whitehead, J.M. Heddleston, L. Li, B.S. Padman, V. Oorschot, N.D. Geoghegan, S. Chappaz, S. Davidson, H. San Chin, R.M. Lane, M. Dramicanin, T.L. Saunders, C. Sugiana, R. Lessene, L.D. Osellame, T.L. Chew, G. Dewson, M. Lazarou, G. Ramm, G. Lessene, M.T. Ryan, K.L. Rogers, M.F. van Delft, and B.T. Kile, BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. Science 359 (2018).

[109] D.A. Sliter, J. Martinez, L. Hao, X. Chen, N. Sun, T.D. Fischer, J.L. Burman, Y. Li, Z. Zhang, D.P. Narendra, H. Cai, M. Borsche, C. Klein, and R.J. Youle, Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. Nature 561 (2018) 258-262.
[110] C.H. Yu, S. Davidson, C.R. Harapas, J.B. Hilton, M.J. Mlodzianoski, P. Laohamonthonkul, C. Louis, R.R.J. Low, J. Moecking, D. De Nardo, K.R. Balka, D.J. Calleja, F. Moghaddas, E. Ni, C.A. McLean, A.L. Samson, S. Tyebji, C.J. Tonkin, C.R. Bye, B.J. Turner, G. Pepin, M.P. Gantier, K.L. Rogers, K. McArthur, P.J. Crouch, and S.L. Masters, TDP-43 Triggers Mitochondrial DNA Release via mPTP to Activate cGAS/STING in ALS. Cell 183 (2020) 636-649 e18.
[111] L.R. Forbes, T.P. Vogel, M.A. Cooper, J. Castro-Wagner, E. Schussler, K.G. Weinacht, A.S. Plant, H.C. Su, E.J. Allenspach, M. Slatter, M. Abinun, D. Lilic, C. Cunningham-Rundles, O. Eckstein, P. Olbrich, R.P. Guillerman, N.C. Patel, Y.Y. Demirdag, C. Zerbe, A.F. Freeman, S.M. Holland, P. Szabolcs, A. Gennery, T.R. Torgerson, J.D. Milner, and J.W. Leiding, Jakinibs for the treatment of immune dysregulation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) or STAT3 mutations. J Allergy Clin Immunol 142 (2018) 1665-1669.
[112] Y.J. Crow, B. Neven, and M.L. Fremond, JAK inhibition in the type I interferonopathies. J Allergy Clin Immunol 148 (2021) 991-993.
[113] A. Vanderver, L. Adang, F. Gavazzi, K. McDonald, G. Helman, D.B. Frank, N. Jaffe, S.W. Yum, A. Collins, S.R. Keller, P. Lebon, J.F. Meritet, J. Rhee, A. Takanohashi, T. Armangue, N. Ulrick, O. Sherbini, J. Koh, K. Peer, C. Besnier, C. Scher, K. Boyle, H. Dubbs, J. Kramer-Golinkoff, A. Pizzino, S. Woidill, and J. Shults, Janus Kinase Inhibition in the Aicardi-Goutieres Syndrome. N Engl J Med 383 (2020) 986-989.
[114] S.M. Stivaros, R. Alston, N.B. Wright, K. Chandler, D. Bonney, R.F. Wynn, A.M. Will, M. Punekar, S. Loughran, J.P. Kilday, D. Schindler, L. Patel, and S. Meyer, Central nervous system abnormalities in Fanconi anaemia: patterns and frequency on magnetic resonance imaging. Br J Radiol 88 (2015) 20150088.
[115] T. Aksu, F. Gumruk, T. Bayhan, C. Coskun, K.K. Oguz, and S. Unal, Central nervous system lesions in Fanconi anemia: Experience from a research center for Fanconi anemia patients. Pediatr Blood Cancer 67 (2020) e28722.
[116] K.Y. King, K.A. Matatall, C.C. Shen, M.A. Goodell, S.I. Swierczek, and J.T. Prchal, Comparative long-term effects of interferon alpha and hydroxyurea on human hematopoietic progenitor cells. Exp Hematol 43 (2015) 912-918 e2.
[117] D. Binder, J. Fehr, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel, Virus-induced transient bone marrow aplasia: major role of interferon-alpha/beta during

acute infection with the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus. J Exp Med 185 (1997) 517-30.
[118] A.M. de Bruin, O. Demirel, B. Hooibrink, C.H. Brandts, and M.A. Nolte, Interferon-gamma impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. Blood 121 (2013) 3578-85.
[119] P. Bose, and S. Verstovsek, JAK Inhibition for the Treatment of Myelofibrosis: Limitations and Future Perspectives. Hemasphere 4 (2020) e424.
[120] G.M. Boukhaled, S. Harding, and D.G. Brooks, Opposing Roles of Type I Interferons in Cancer Immunity. Annu Rev Pathol 16 (2021) 167-198.
[121] J. Chen, S.M. Harding, R. Natesan, L. Tian, J.L. Benci, W. Li, A.J. Minn, I.A. Asangani, and R.A. Greenberg, Cell Cycle Checkpoints Cooperate to Suppress DNA- and RNA-Associated Molecular Pattern Recognition and Anti-Tumor Immune Responses. Cell Rep 32 (2020) 108080.
[122] H. Jiang, X. Xue, S. Panda, A. Kawale, R.M. Hooy, F. Liang, J. Sohn, P. Sung, and N.O. Gekara, Chromatin-bound cGAS is an inhibitor of DNA repair and hence accelerates genome destabilization and cell death. EMBO J 38 (2019) e102718.
[123] D. Banerjee, K. Langberg, S. Abbas, E. Odermatt, P. Yerramothu, M. Volaric, M.A. Reidenbach, K.J. Krentz, C.D. Rubinstein, D.L. Brautigan, T. Abbas, B.D. Gelfand, J. Ambati, and N. Kerur, A non-canonical, interferon-independent signaling activity of cGAMP triggers DNA damage response signaling. Nat Commun 12 (2021) 6207.
[124] T.J. Hayman, M. Baro, T. MacNeil, C. Phoomak, T.N. Aung, W. Cui, K. Leach, R. Iyer, S. Challa, T. Sandoval-Schaefer, B.A. Burtness, D.L. Rimm, and J.N. Contessa, STING enhances cell death through regulation of reactive oxygen species and DNA damage. Nat Commun 12 (2021) 2327.
[125] R. Ghosh, S. Roy, and S. Franco, PARP1 depletion induces RIG-I-dependent signaling in human cancer cells. PLoS One 13 (2018) e0194611.
[126] G. Guo, M. Gao, X. Gao, B. Zhu, J. Huang, X. Tu, W. Kim, F. Zhao, Q. Zhou, S. Zhu, Z. Wu, Y. Yan, Y. Zhang, X. Zeng, Q. Zhu, P. Yin, K. Luo, J. Sun, M. Deng, and Z. Lou, Reciprocal regulation of RIG-I and XRCC4 connects DNA repair with RIG-I immune signaling. Nat Commun 12 (2021) 2187.