

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 10 juillet 2018

Par M. Paul SAULTIER

Né le 17 septembre 1987 à Ambilly (74)

TITRE DE LA THÈSE : Pathologies plaquettaires constitutionnelles associées aux défauts des facteurs de transcription FLI1, ETV6 et GATA1

Pour obtenir le grade de DOCTORAT d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : Pathologie Humaine - Spécialité Pathologie Vasculaire et Nutrition

Membres du Jury de la Thèse :

Mme. Marie-Christine ALESSI, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (directeur de thèse)
Mme Marjorie POGGI, Maître de Conférence des Universités (co-directeur de thèse)
M. Guy LEVERGER, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (rapporteur)
M. Bernard PAYRASTRE, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (rapporteur)
Mme Anita ECKLY-MICHEL, Ingénieur de Recherche (examineur),
M. Hervé CHAMBOST, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (examineur)

REMERCIEMENTS

Au Professeur Marie-Christine Alessi, directrice de ma thèse. Je vous témoigne mes plus sincères remerciements d'avoir accepté de m'accueillir dans votre laboratoire. Il est certain que l'environnement scientifique et humain dont j'ai pu bénéficier grâce à vous aura profondément marqué ma formation. Je suis très reconnaissant de votre soutien appuyé au cours de ces deux années et demi d'immersion dans la recherche et de m'avoir fait bénéficier de vos connaissances et de votre expérience. J'ai énormément appris à vos côtés. Veuillez trouver dans ce travail toute l'estime que je vous porte.

Au Docteur Marjorie Poggi, co-directrice de ma thèse. Marjorie, au moment d'écrire ces remerciements, j'avoue ne pas vraiment savoir où commencer. Je te suis très reconnaissant d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci de m'avoir accueilli avec tant de bienveillance. Tu as fait en sorte que, tout au long de ma thèse, je sois à la fois parfaitement épaulé mais aussi très libre. Tu m'as appris un nouveau métier en transmettant, avec toute la patience qui était souvent nécessaire, ton raisonnement, ton savoir-faire et ton expérience. Merci de m'avoir continuellement valorisé. Merci pour ton amitié.

A Messieurs les Professeurs Guy Leverger et Bernard Payrastre. Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail. Puisse-t-il vous exprimer l'estime, que je vous porte.

A Madame le Docteur Anita Eckly-Michel. Chère Anita, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je te remercie également d'avoir accepté de collaborer

avec notre équipe au cours de ce travail de thèse. Ta contribution à ces travaux a été essentielle.

Au Professeur Hervé Chambost. Je vous remercie du plaisir et de l'honneur que vous me faites en acceptant de siéger dans mon jury de thèse. Je vous suis très reconnaissant de la confiance et la bienveillance que vous m'accordez depuis le début de ma formation médecine-science. Que cette thèse vous exprime toute la gratitude et l'estime que je vous porte.

Au Professeur Gérard Michel. Je vous remercie de me soutenir et de me guider tout au long de ma formation clinique et de recherche. Merci de me faire profiter de votre savoir et de votre expérience. Veuillez trouver dans ce travail toute l'estime que je vous porte.

Au Docteur Matthias Canault. Matthias, merci pour ton accueil et pour tout ce que tu m'as appris. La liste est extrêmement longue. C'était vraiment un grand plaisir de travailler avec toi et de partager ton bureau. Merci pour ton amitié.

A Sandrine. Merci mille fois pour ton aide. J'ai eu beaucoup de chance qu'il y a quelques mois tu rejoignes notre équipe dont on dirait que tu fais partie depuis toujours.

Aux Docteurs Céline Falaise et Katia Pouymayou. Céline et Katia, merci pour votre aide tout au long de cette thèse. C'était un plaisir de travailler avec vous. Cette période a été l'occasion de mieux vous connaître et j'en suis très heureux.

Au Docteur Denis Bernot. Denis, c'était un plaisir de te connaître grâce à ce travail de thèse. Merci beaucoup pour tout ce que tu m'as appris et pour l'aide que tu m'a apporté au cours de ce travail.

Au Docteur Michel Pucéat. Cher Michel, merci d'avoir accepté de collaborer avec notre équipe et de m'avoir appris à planifier, réaliser et à interpréter les expériences de ChIP-seq. Votre aide a été très précieuse pour pouvoir mener ce travail.

Au Docteur Jean-François Landrier. Merci beaucoup pde m'avoir aidé dans l'analyse des résultats de RNA-seq.

Au Docteur Jean-Claude Bordet. Merci d'avoir accepté de collaborer avec notre équipe à de nombreuses reprises pour nous apporter votre expertise en microscopie électronique.

Aux Docteurs Stéphane Loyau, Martine Jandrot-Perrus, Laurence Panicot-Dubois et Christophe Dubois pour leur aide dans le travail sur le variant *FERMT3*.

Au Docteur Fabrice Malergue, pour son aide dans la réalisation et l'interprétation d'expériences de cytométrie de flux.

A toutes les équipes du laboratoire NORT/C2VN et du laboratoire d'hématologie de la Timone qui m'ont accueilli à bras ouverts et aux étudiants que j'ai rencontrés. Delphine, Anna, Flo, Véro, Monique, Patricia, Béné, Madame Dutour, Franck, Bernadette, Odile, Grace, Michel, Béatrice, Monsieur Morange, Pierre (S), Manal, Noémie, Agathe, Marie (L), Lucie, Alain, David, Christelle, Marie-Hélène, Evelyne, Phillipe, Teresa, Roland, Claudine, Léa, Sixtine, Pierre (F), Aurélien, Floriane, Noémie, Ania, Clara, Flavia, Marie (F), Dorsaf, Gaïa, Raïda, Soveria, Abire.

A ma famille, Papa, Sylvie, Alexis, Chloé, Mamine, Jean-Pierre, Christine, Bertrand, Flora, Anatole, Garance, Marie, Thomas, Charles, Pauline, Antoine...

Aux patients qui ont participé à ces études et à leur famille.

Je remercie chaleureusement la Fondation pour la Recherche Médicale qui m'a permis de réaliser cette formation à la recherche en finançant mon poste de thèse (identifiant dossier : FDM20150633607).



A Camille et à Lou.

Vous êtes ce qui m'est arrivé de plus beau.

Cette thèse est pour vous.



Madonna Tempi, Raffaello, 1508 (en haut à gauche)
 The Cholmondeley Ladies, artiste inconnu, vers 1600-1610 (en haut à droite)
 Radiant Baby (from Icons series), Keith Haring, 1990 (en bas à gauche)
 Baby Map of the World, Salvador Dalí, 1939 (en bas à droite)

RÉSUMÉ

Les thrombopénies constitutionnelles sont un groupe hétérogène de pathologies encore incomplètement caractérisées. Ces maladies sont reconnues comme une cause significative de saignement chez l'adulte et l'enfant et certaines sont associées à des complications extra-hématologiques ou à d'autres atteintes hématologiques comme une prédisposition aux hémopathies malignes. Ce travail de thèse concerne les thrombopénies constitutionnelles liées aux défauts des facteurs de transcription *FLI1*, *ETV6* et *GATA1*.

Ces pathologies et les variants génétiques associés ont été étudiés à partir de patients suivis en France et dans d'autres pays européens dont le recrutement a été permis par un réseau national (Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires CRPP) et un réseau international (BRIDGE consortium).

Les patients inclus présentent des thrombopénies liées à *FLI1*, *ETV6* et *GATA1* causées par 10 variants génétiques dont 9 n'avaient jamais été décrits. Le phénotype clinique et biologique de ces patients a été rapporté. Nous montrons qu'il existe un déficit sévère en granules denses dans les plaquettes des patients porteurs de variants *FLI1* du fait d'un probable défaut de biogénèse. Ce travail, et d'autres études publiées récemment, ont permis de définir la thrombopénie liée aux variants *ETV6* en tant que nouveau syndrome de prédisposition aux hémopathies malignes. Nous avons mis en évidence que les variants *GATA1* s'associent à une anomalie significative de la fonction plaquettaire. Ce travail a permis d'identifier des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans ces maladies grâce à différents modèles *in vitro*. Les variants *FLI1* s'associent à une diminution d'activité

transcriptionnelle et d'accumulation nucléaire de la protéine et à des anomalies de la différenciation mégacaryocytaire. Les variants *ETV6* s'associent à un défaut d'activité répressive et les mégacaryocytes dérivés des patients montrent un excès de prolifération et un défaut marqué de formation des proplaquettes. Les plaquettes de patients porteurs de variants *GATA1* ont montré une expression anormale de la protéine MYH10, ce qui suggère un défaut de répression du gène *MYH10* au cours de la mégacaryopoïèse. Une analyse *in silico* de données de ChIP-seq a ainsi montré l'existence d'une fixation de GATA1 dans le promoteur et dans un intron de *MYH10* dans le mégacaryocyte.

Ce projet a permis d'apporter des connaissances sur les causes génétiques, le phénotype, le diagnostic, le pronostic et les mécanismes physiopathologiques de ces pathologies constitutionnelles.

ABSTRACT

Constitutional thrombocytopenia is a group of diseases that remains incompletely characterized. These diseases are recognized as a significant cause of bleeding in adults and children, and some are associated with extra-hematological complications or other hematologic defects such as a predisposition to hematological malignancies. This thesis focused on constitutional thrombocytopenia due to defects in transcription factors *FLI1*, *ETV6* and *GATA1*.

These diseases and the associated genetic variants were studied in French and European patients recruited using national (French national reference center for inherited platelet disorders CRPP) and international (BRIDGE consortium) networks.

Patients had *FLI1*, *ETV6* and *GATA1*-related thrombocytopenia caused by 10 genetic variants, of which 9 had never been described. The patients' clinical and biological phenotype has been reported. We showed that the platelets of patients carrying *FLI1* variants harbored a severe dense granule defect probably due a biogenesis defect. Our work, associated with data published by other groups, has defined *ETV6*-related thrombocytopenia as a new hematological malignancy predisposition syndrome. We showed that *GATA1* variants are associated with a significant platelet function defect. This work characterizes pathophysiological mechanisms involved in these diseases using *in vitro* models. *FLI1* variants are associated with a decreased transcriptional activity and a decreased nuclear accumulation of the protein and with abnormal megakaryocyte differentiation. *ETV6* variants led to a decreased repressive activity and the megakaryocytes derived from patients showed increased proliferation and a marked defect in proplatelet formation. The platelets of *GATA1* variant carriers

showed aberrant expression of MYH10 protein suggesting a defective silencing of *MYH10* gene during megakaryopoiesis. Consistently, *in silico* analysis of ChIP-seq data showed that GATA1 binds the promoter and an intronic region of the *MYH10* in megakaryocytes.

This project has provided insights into genetic causes, phenotype, diagnosis, prognosis and pathophysiological mechanisms of these constitutional diseases.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ.....	10
ABSTRACT	12
ABBREVIATIONS	18
LISTE DES FIGURES	19
LISTE DES TABLEAUX.....	22
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
<i>Introduction</i>	<i>24</i>
Les thrombopénies constitutionnelles.....	24
La mégacaryopoïèse	26
1. Description de la mégacaryopoïèse.....	26
2. Régulation de la mégacaryopoïèse	30
<i>Pathologies plaquettaires constitutionnelles associées aux défauts d'un facteur de transcription</i>	<i>32</i>
Les facteurs de transcription et la mégacaryopoïèse	32
1. Rôle général et modèles d'étude	32
2. Thrombopénies constitutionnelles associées à un défaut d'un facteur de transcription ...	35
FLI1	38
1. Famille de facteur de transcription ETS.....	38
2. Structure du gène et de la protéine.....	38
3. Rôle de FLI1 dans la mégacaryopoïèse : modèles murins.....	38
4. Syndrome Paris-Trousseau / Jacobsen.....	40
5. Thrombopénies constitutionnelles associées aux variants du gène <i>FLI1</i>	42
6. FLI1 et oncogenèse	43

ETV6	44
1. Structure du gène et de la protéine.....	44
2. Rôle dans la mégacaryopoïèse	44
3. Rôle dans la leucémogénèse.....	45
GATA1	46
1. Structure et fonction.....	46
2. Pathologies hématologiques constitutionnelles associées aux variants du gène <i>GATA1</i>	46
RUNX1	48
GFI1b	50
MECOM	52
OBJECTIFS DU TRAVAIL	54
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	55
<i>PARTIE 1 Thrombopénie avec déficit en granules denses associée aux variants du gène</i>	
<i>FLI1 : caractéristiques pathogéniques et ultrastructurales</i>	<i>56</i>
Contexte scientifique.....	57
Discussion.....	78
Mode de transmission de la thrombopénie associée aux variants <i>FLI1</i>	78
MYH10 : un biomarqueur plaquettaire des altérations de <i>FLI1</i>	80
<i>FLI1</i> : un facteur de transcription impliqué dans la biogénèse des granules plaquettaires	80
Conclusion	83
<i>PARTIE 2 Thrombopénie constitutionnelle associée aux variants du gène ETV6</i>	<i>84</i>
Etude 1 : Des variants constitutionnels d' <i>ETV6</i> sont à l'origine d'une diminution de la production plaquettaire, d'une dysfonction plaquettaire et d'une augmentation du nombre de cellules CD34 ⁺ circulantes	85
Contexte scientifique.....	86
Discussion.....	108
Les variants <i>ETV6</i> codent des facteurs de transcription dont la fonction est altérée	109
La thrombopénie <i>ETV6</i> : un modèle d'étude de la mégacaryopoïèse	110

<i>ETV6</i> : un nouveau gène de prédisposition aux hémopathies malignes	111
Etude 2 Mécanismes physiopathologiques de la thrombopénie associée aux variants du gène <i>ETV6</i> : approche RNA-seq et ChIP-seq	114
Contexte scientifique.....	115
Méthodes et résultats préliminaires	118
1. Patients	118
2. Culture mégacaryocytaire	120
3. RNA-seq	120
4. ChIP-seq.....	125
Discussion et perspectives	128
Dérégulation de voies de signalisation dans les mégacaryocytes de patients avec variants <i>ETV6</i>	128
Apport attendu du ChIP-seq et de l'analyse combinée RNA-seq / ChIP-seq	130
<i>PARTIE 3 Nouveaux variants du gène GATA1 chez des patients présentant un syndrome hémorragique avec thrombopénie et dysfonction plaquettaire</i>	133
Contexte scientifique.....	134
Méthodes et résultats préliminaires	136
1. Identification de deux nouveaux variants du gène <i>GATA1</i>	136
2. Analyse fonctionnelle des variants.....	139
3. Phénotype clinique et biologique des patients.....	142
4. Défaut de fonction plaquettaire	143
5. Anomalie de l'hématopoïèse.....	147
Discussion et perspectives	156
Le phénotype des patients porteurs de variants du gène <i>GATA1</i> est hétérogène	156
Les variants <i>GATA1</i> sont associés à une dysfonction plaquettaire et à un déficit combiné en granules alpha et denses	157
Rôle de <i>GATA1</i> dans la régulation de <i>MYH10</i> au cours de la différenciation du mégacaryocyte	161
CONCLUSION GENERALE.....	165

RÉFÉRENCES	167
ANNEXE	190
<i>ANNEXE 1 Long-term management of leukocyte adhesion deficiency type III without hematopoietic stem cell transplantation.....</i>	<i>191</i>
<i>ANNEXE 2 Peripartum bleeding management in a patient with CalDAG-GEFI deficiency</i>	<i>203</i>
<i>ANNEXE 3 Extended spectrum of ACTN1 variants causing thrombocytopenia and variable bleeding risk reveals critical rod domain role</i>	<i>207</i>

ABBREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ChIP : immunoprécipitation de chromatine

ChIP-seq : *ChIP sequencing*

ETS : *E26 transformation-specific*

FIB/SEM : *focused ion beam / scanning electron microscopy*

GTP : guanosine triphosphate

HDAC : histone désacétylase

PMA : *phorbol myristate acetate*

RNA-seq : *RNA sequencing*

TRAP-6 : *thrombin receptor activating peptide-6*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différentes étapes de la mégacaryopoïèse et de la formation des plaquettes (Lentaigne <i>et al.</i> , 2016)	26
Figure 2 : Frottis de moelle osseuse humaine (Brass, 2005)	27
Figure 3 : Formation des proplaquettes par le mégacaryocyte (Tablin, 2011)	28
Figure 4 : Expression des principaux marqueurs de différenciation au cours de la mégacaryopoïèse humaine (Chang <i>et al.</i> , 2007).	29
Figure 5 : Cytokines et facteurs de transcription régulant la mégacaryopoïèse (Léon <i>et al.</i> , 2016)	31
Figure 6 : Modèle de régulation de la transcription de l'expression génique par les modules de régulation en cis (Tijssen et Ghevaert, 2013)	33
Figure 7 : Expression relative des facteurs de transcription FLI1, ETV6, GATA1, RUNX1, GFI1B et MECOM dans huit types cellulaires dérivées de la cellule souche hématopoïétique (CSH) dans la moelle osseuse	37
Figure 8 : Représentation schématique de la protéine FLI1	42
Figure 9 : Représentation schématique de la protéine GATA1. Le schéma met en évidence les domaines fonctionnels de la protéine	48
Figure 10 : Représentation schématique des variants constitutionnels de RUNX1 (Schlegelberger et Heller, 2017)	49
Figure 11 : Représentation schématique de la protéine GFI1B (Anguita <i>et al.</i> , 2017)	51
Figure 12 : Représentation schématique de la protéine EVI1 (Niihori <i>et al.</i> , 2015)...	53
Figure 13 : Représentation schématique de la protéine FLI1	78
Figure 14 : Représentation schématique de la protéine ETV6	108
Figure 15 : Arbres généalogiques des familles portant des variants ETV6	118

Figure 16 : Expression d'ETV6 dans les plaquettes du propositus de la famille F3, portant le variant constitutionnel p.F417Lfs*3 ETV6	119
Figure 17 : Expression de CD41 et CD42a à J10 de culture de cellule CD34 ⁺	120
Figure 18 : Analyse comparative du transcriptome des patients porteurs de variants <i>ETV6</i> et de témoins	124
Figure 19 : Contrôle qualité d'un échantillon d'ADN immunoprécipité H3K27ac d'un témoin	127
Figure 20 : Représentation schématique de la protéine GATA1	136
Figure 21 : Arbres généalogiques et chromatogrammes des familles porteuses d'un variant GATA1	137
Figure 22 : Alignement de séquence de la protéine GATA1	138
Figure 23 : Modélisation structurale de l'effet des variants du gène <i>GATA1</i>	139
Figure 24 : Etude de l'effet des variants du gène <i>GATA1</i> sur la localisation subcellulaire de la protéine	141
Figure 25 : Co-immunoprécipitation GATA1-FOG1	142
Figure 26 : Evolution du compte plaquettaire et du volume globulaire moyen en fonction de l'âge	143
Figure 27 : Expression de protéines impliquées dans les voies du collagène et de l'acide arachidonique	145
Figure 28 : Etude des granules plaquettaires en microscopie optique et en microscopie électronique à transmission d'un patient porteur du variant <i>GATA1</i> c.802C>A (p.Leu268Met)	146
Figure 29 : Etude du nombre de granules denses par plaquette par immunofluorescence chez le patient porteur du variant <i>GATA1</i>	147
Figure 30 : Quantification du nombre de cellules souches hématopoïétiques circulantes	148
Figure 31 : Myélogramme du patient F2-II-1 porteur du variant <i>GATA1</i> c.617A>T (p.Asn206Ile)	149
Figure 32 : Etude <i>in vitro</i> de la mégacaryopoïèse	151

Figure 33 : Etude de l'expression de MYH10 dans les plaquettes de la famille F1 avec variant <i>GATA1</i> c.802C>A (p.Leu268Met).....	152
Figure 34 : Analyse de la fixation de GATA1, FLI1 et RUNX1 sur des séquences régulatrices de <i>MYH10</i>	154
Figure 35 : Analyse des sites consensus de fixation à l'ADN des facteurs de transcription GATA1, FLI1 et RUNX1 dans l'enhancer intronique du gène <i>MYH10</i>	155
Figure 36 : Modèle de polyploïdisation du mégacaryocyte induite par la répression de <i>MYH10</i> par la coopération des facteurs de transcription RUNX1, FLI1 et GATA1.	162
Figure 37 : Répression de l'expression du gène MYH10 au cours de la différenciation des cellules HEL induite par le phorbol myristate acetate.....	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des pathologies plaquettaires constitutionnelles associées aux défauts des facteurs de transcription.....	36
Tableau 2 : Pathologies plaquettaires et érythrocytaires constitutionnelles associées aux variants <i>GATA1</i>	47
Tableau 3 : Liste de gènes codant des histones parmi les 40 gènes dont l'expression est la plus augmentée chez les patients porteurs de variants <i>ETV6</i> par rapport aux contrôles.	122
Tableau 4 : Agrégation plaquettaire des patients de la famille F1 porteurs du variant <i>GATA1</i> p.Leu268Met.....	144

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Les plaquettes jouent un rôle clé dans l'hémostase et le maintien de l'intégrité vasculaire. Une diminution de leur nombre (thrombopénie) ou une anomalie de leur fonction (thrombopathie) peut être à l'origine d'une diathèse hémorragique.

Les thrombopénies constitutionnelles

La thrombopénie est définie par un compte plaquettaire inférieur à 150 G/L. Les thrombopénies constitutionnelles sont un groupe hétérogène de pathologies d'origine génétique qui représenteraient environ 5% des thrombopénies après exclusion des thrombopénies secondaires aux traitements cytotoxiques ou aux infections (Cines *et al.*, 2004). Néanmoins, la prévalence des thrombopénies constitutionnelles est probablement sous-estimée et ces maladies sont reconnues comme une cause significative de saignement chez l'adulte et l'enfant (Lambert, 2015). Le risque hémorragique est inversement corrélé au compte plaquettaire, bien que certaines thrombopénies sont associées à une diathèse hémorragique plus sévère que ne le laisserait présumer le compte plaquettaire en raison d'une anomalie de la fonction plaquettaire associée. Par ailleurs, le saignement n'est pas la complication la plus marquante dans l'histoire de la maladie d'une proportion significative de patients atteint de thrombopénies héréditaires (Melazzini *et al.*, 2017). En effet, certaines de ces maladies sont associées à une atteinte extra-hématologique, d'autres sont associées des anomalies d'une autre lignée sanguine, d'autres encore sont associées à une prédisposition aux hémopathies malignes.

L'étude des thrombopénies constitutionnelles revêt différents objectifs. De nombreux gènes ont été impliqués dans les thrombopénies constitutionnelles de manière récente. Ainsi, le phénotype, les corrélations génotype-phénotype et la prise en charge thérapeutique de ces pathologies rares ne sont pas complètement délimités. Cela rend nécessaire des collaborations nationales et internationales afin de rapporter des données sur un nombre de cas le plus important possible. Par ailleurs, environ 50% des thrombopénies présumées constitutionnelles restent inexplicables et le rôle de nouveaux gènes doit donc encore être révélé (Savoia, 2016). Il est également essentiel d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces pathologies dans l'objectif d'identifier des cibles thérapeutiques. Enfin, ces pathologies constituent des modèles permettant de mieux comprendre la mégacaryopoïèse.

Les connaissances sur les causes génétiques de ces pathologies ont significativement progressé au cours des dernières décennies grâce au développement du séquençage à haut débit. En effet, des variants de plus de 30 gènes ont été identifiés comme étant à l'origine de ces pathologies (Noris et Pecci, 2017). Les variants causant les thrombopénies constitutionnelles peuvent altérer chacune de ces étapes de la mégacaryopoïèse (Figure 1).

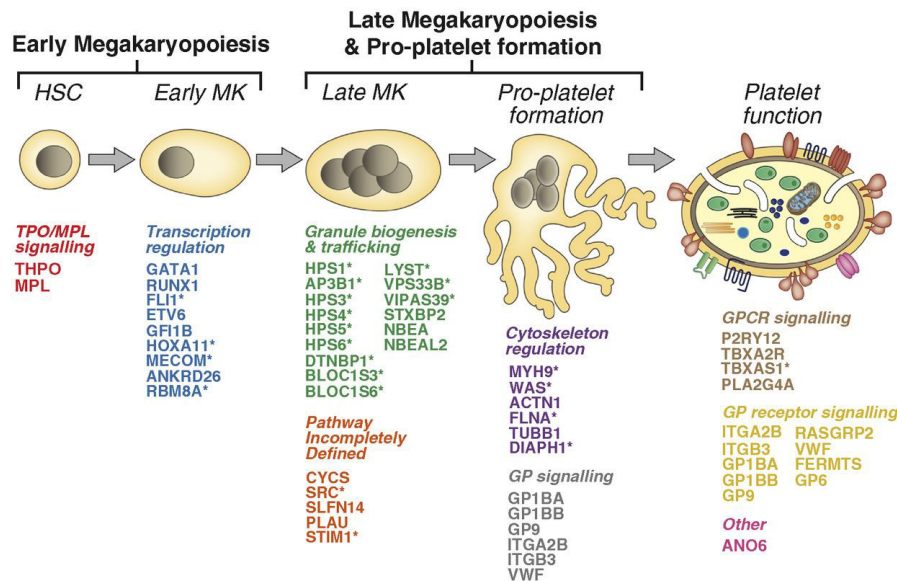


Figure 1 : Représentation des différentes étapes de la mégacaryopoïèse et de la formation des plaquettes (Lentaigne et al., 2016). Les gènes impliqués dans les pathologies plaquettaires sont représentés en fonction de leur effet sur la biologie des mégacaryocytes et des plaquettes. *association à des signes extra-hématologiques. HSC, cellule souche hématopoïétique. MK, mégacaryocyte.

La mégacaryopoïèse

1. Description de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est un processus très hiérarchisé qui comprend l'orientation de la cellule souche hématopoïétique vers la voie mégacaryocytaire, suivie d'étapes de prolifération, de différenciation et de maturation du mégacaryocyte responsable de la production de plaquettes matures. Ces étapes de différenciation et de maturation impliquent 1) une succession d'endomitoses entraînant une accumulation de matériel nucléaire dans le mégacaryocyte, 2) une maturation cytoplasmique et 3) la formation d'extensions cytoplasmiques (proplaquettes) qui vont s'introduire dans les capillaires sinusoides médullaires et permettre la libération des plaquettes (Figure 1). Les endomitoses constituent un phénomène très spécifique à la lignée mégacaryocytaire. Ce phénomène permet au promégacaryocyte diploïde de répliquer son matériel génétique sans effectuer l'anaphase tardive et la cytokinèse (Zimmet et Ravid,

2000). En conséquence, sa ploïdie augmente de 2N jusqu'à 128N dans un noyau de morphologie polylobée (Figure 2).

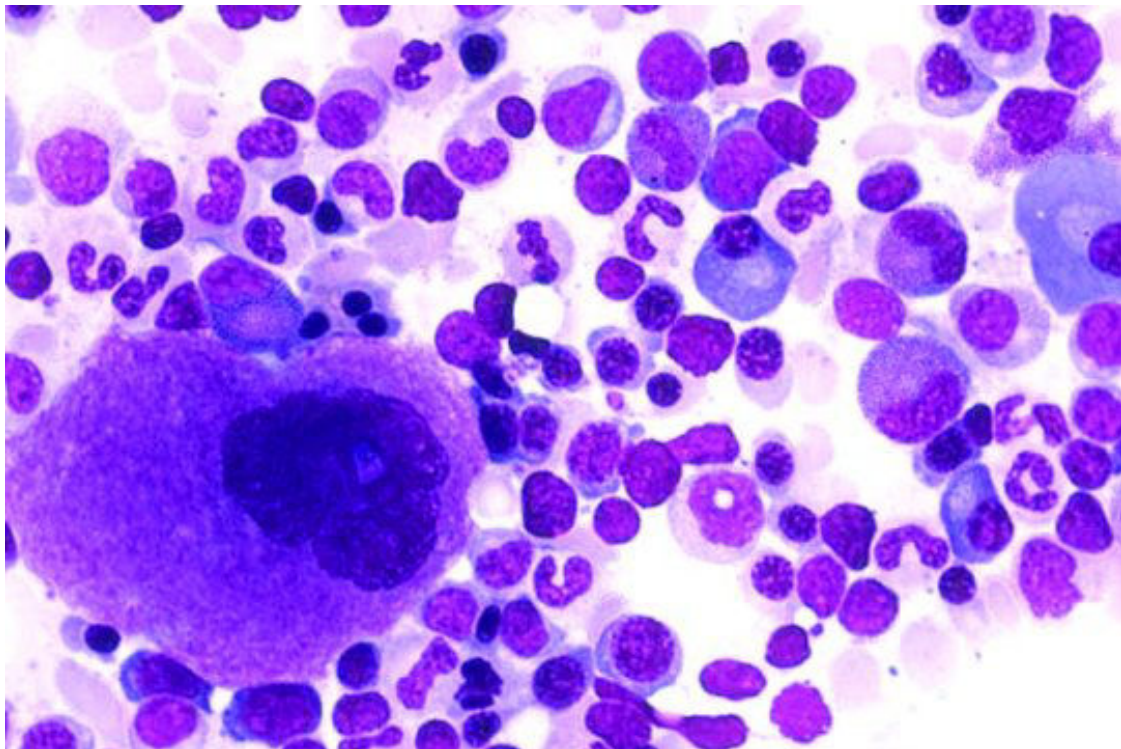


Figure 2 : Frottis de moelle osseuse humaine (Brass, 2005). La cellule de taille importante sur la gauche de l'image est un mégacaryocyte normal présentant un noyau polylobé caractéristique. Coloration May-Grünwald Giemsa. Grossissement x50.

Par ailleurs, les endomitoses permettent une synthèse de protéines et de lipides nécessaire à la formation d'un système de membranes invaginées (Machlus et Italiano, 2013). Ce système complexe de tubules et de citernes est distribué dans l'ensemble du cytoplasme du mégacaryocyte. Il est en continuité avec la membrane plasmique et permettrait de jouer le rôle de réserve de membranes indispensable à la formation des proplaquettes (Schulze *et al.*, 2006). La maturation du mégacaryocyte est également caractérisée par la biosynthèse dans le cytoplasme des granules alpha et des granules denses. Ces granules sont essentiels aux fonctions de la plaquette. Les granules alpha matures contiennent principalement des protéines de la coagulation, des facteurs de croissance et des cytokines. Les granules denses sont de plus petite taille et contiennent des polyphosphates

(adénosine triphosphate, adénosine diphosphate), de la sérotonine, de l'histamine et des quantités importantes d'ions calcium. De nombreuses protéines essentielles à la fonction plaquettaire sont également synthétisées, en particulier les récepteurs de surfaces impliqués dans l'adhésion et l'agrégation.

La dernière étape de la mégacaryopoïèse est la formation par le mégacaryocyte de longues extensions cytoplasmiques appelées proplaquettes qui sont composées de multiples renflements (futures plaquettes) reliés par des pont cytoplasmiques (Figure 3). Les proplaquettes sont étendues dans les capillaires sinusoides médullaires dans lesquels le flux sanguin permettra leur fragmentation et la libération des plaquettes. Sur le plan moléculaire, ce phénomène de formation des proplaquettes rend compte d'un assemblage et d'une réorganisation du cytosquelette d'actine et des microtubules (Tablin, 2011).

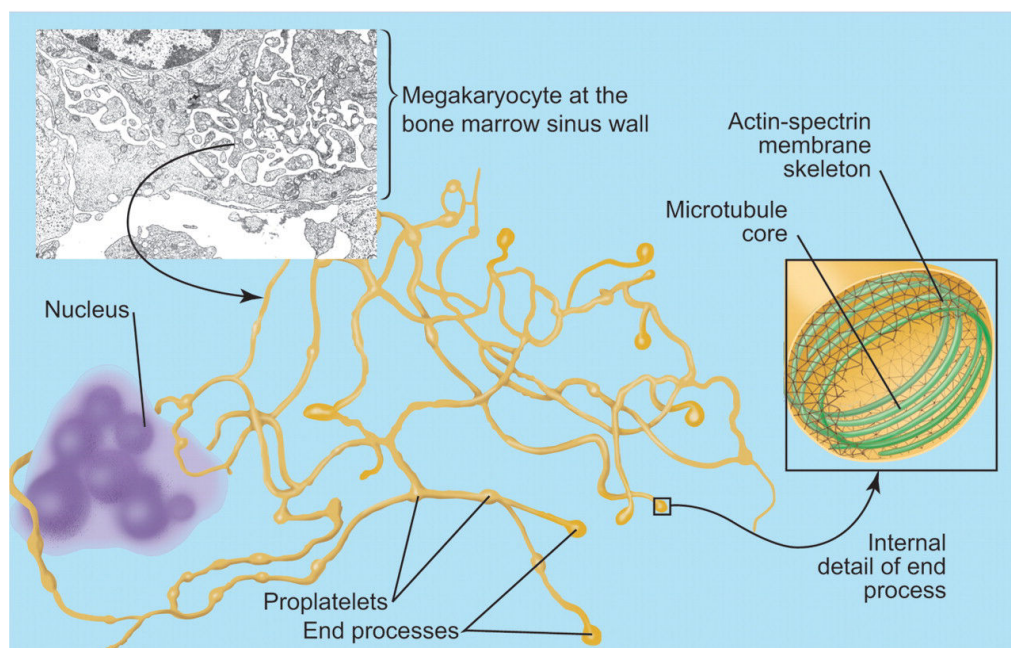


Figure 3 : Formation des proplaquettes par le mégacaryocyte (Tablin, 2011). Les mégacaryocytes étendent les proplaquettes (représentées en jaune) dans les capillaires sinusoides médullaires. Ce phénomène nécessite une réorganisation du cytosquelette (microtubules et filaments d'actine).

La progression de la mégacaryopoïèse est associée à l'expression, à la surface de la membrane plasmique, de protéines essentielles à la fonction de la plaquette mature.

Il s'agit principalement de récepteurs à des facteurs solubles comme l'adénosine diphosphate (P2Y₁, P2Y₁₂), le thromboxane A2 (TP_α), la thrombine (PAR1, PAR4) et l'adrénaline (α_{2A}) ou de récepteurs aux matrices adhésives que sont le collagène (GPVI, α₂β₁), le facteur von Willebrand (GPIb/IX/V), la fibronectine (α₅β₁). Enfin, au cours de sa différenciation, le mégacaryocyte augmente l'expression de l'intégrine α_{IIb}β_{III} (ou GPIIb/IIIa) qui, dans la plaquette mature, est capable d'intégrer les signaux d'activation de la plaquette de lier le fibrinogène, permettant ainsi l'agrégation plaquettaire par des ponts moléculaires plaquette-fibrinogène-plaquette. Certaines de ces protéines membranaires exprimées au cours de la différenciation sont utilisées comme marqueurs de différenciation mégacaryocytaire (Figure 4). En particulier, l'expression de CD34 est un marqueur de la cellule souche hématopoïétique et va s'éteindre au cours de la différenciation en parallèle de l'apparition de marqueurs spécifiques de la lignée mégacaryocytaire comme CD41/CD61 (α_{IIb}β_{III}) ou CD42a (GPIX).

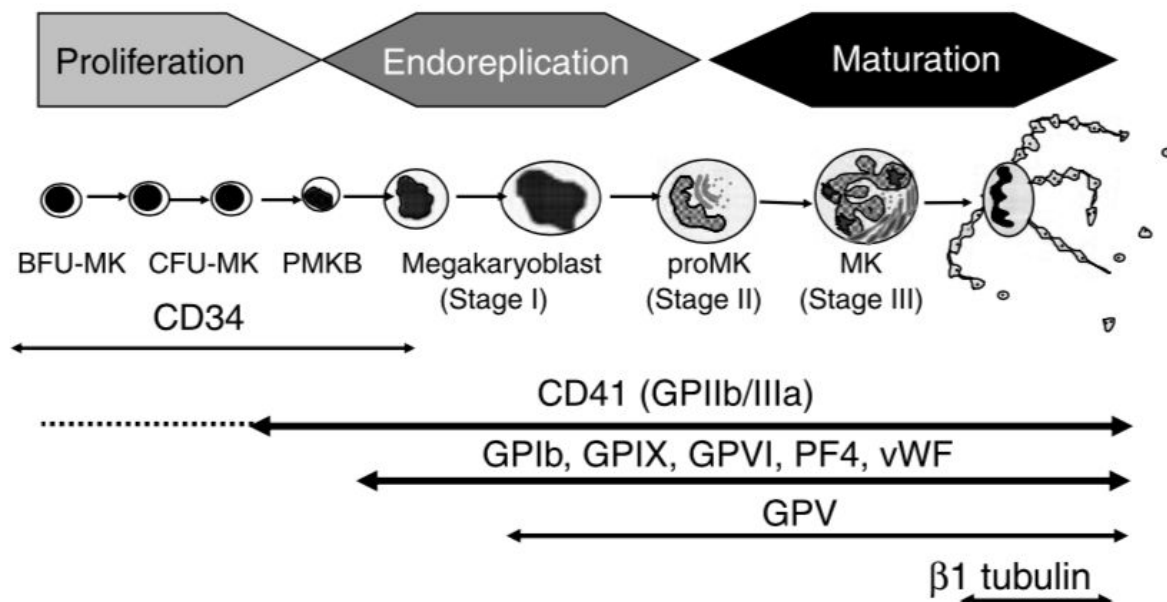


Figure 4 : Expression des principaux marqueurs de différenciation au cours de la mégacaryopoïèse humaine (Chang *et al.*, 2007).

2. Régulation de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est un processus multi-étape finement régulé (Figure 5). Cette régulation est exercée par différents facteurs. De nombreuses cytokines vont favoriser l'engagement et la différenciation du mégacaryocyte. La thrombopoïétine est la cytokine la plus importante de la voie mégacaryocytaire. L'action de cette cytokine est indispensable dès l'engagement des cellules progénitrices dans la voie mégacaryocytaire jusqu'aux dernières étapes de la différenciation. La fixation de la thrombopoïétine sur son récepteur MPL a pour effet l'activation des voies de signalisation STAT3/STAT5, PI3K/AKT et MAPK/ERK (Tong et Lodish, 2004). En pathologie humaine, des variants du gène codant le récepteur MPL sont notamment à l'origine d'une thrombopénie sévère (Ballmaier et Germeshausen, 2011) rendant compte de l'importance de cette cytokine pour la voie mégacaryocytaire.

Les facteurs de transcription exercent également un rôle fondamental dans la régulation de la mégacaryopoïèse. Ce rôle s'exerce à toutes les étapes de prolifération et de différenciation des cellules progénitrices et du mégacaryocyte (Figure 5) et sera détaillé dans la partie suivante.

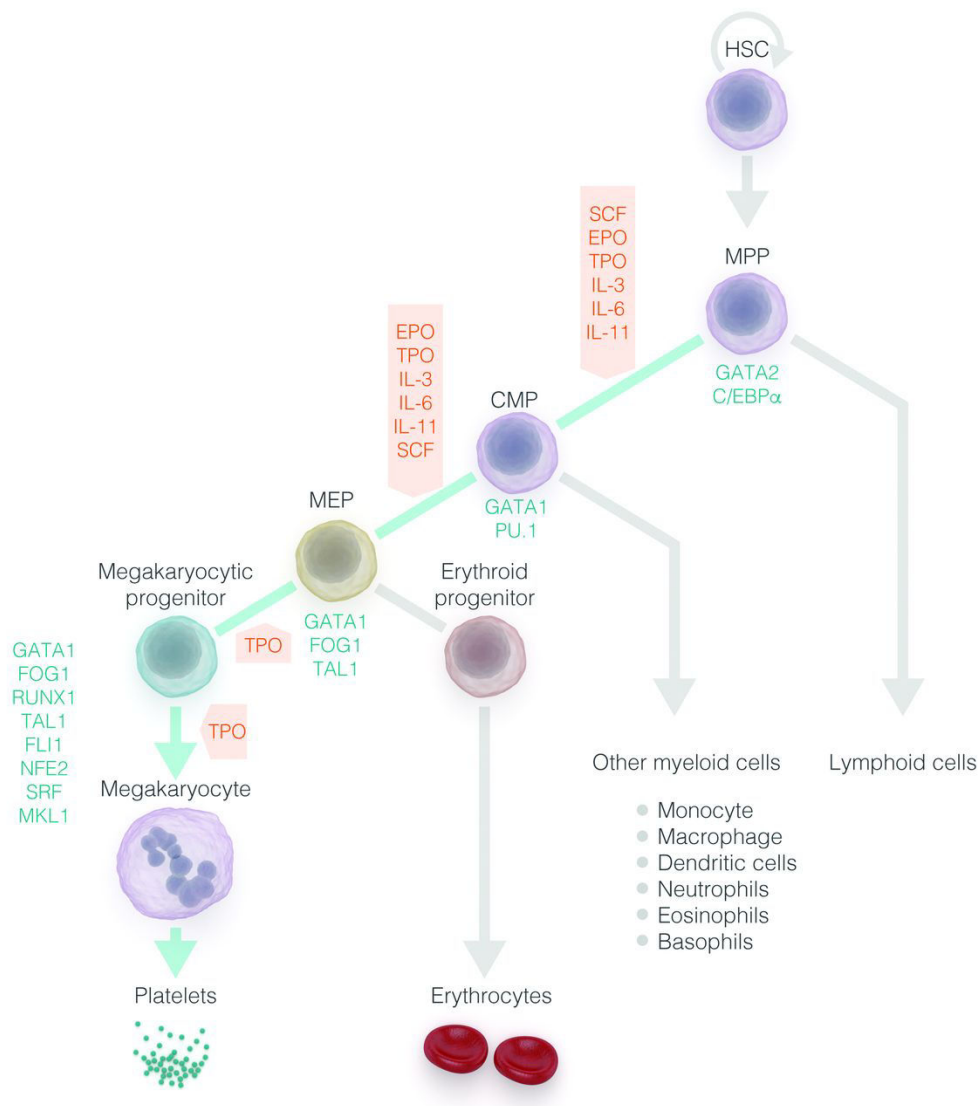


Figure 5 :Cytokines et facteurs de transcription régulant la mégacaryopoïèse (Léon *et al.*, 2016). Les cytokines sont indiquées en rouge et les facteurs de transcription en vert. MPP: progéniteur multipotent; CMP: progéniteur myéloïde commun; MEP: progéniteur mégacaryocyte-érythrocyte. (Dessin de Fabien Pertuy).

Pathologies plaquettaires constitutionnelles associées aux défauts d'un facteur de transcription

Les facteurs de transcription et la mégacaryopoïèse

1. Rôle général et modèles d'étude

Un facteur de transcription est une protéine capable de réguler la transcription de gènes spécifiques *via* sa liaison à des séquences ADN cis-régulatrices. Cette régulation des gènes dans les cellules est fréquemment le fait de réseaux moléculaires complexes. En effet, un locus d'ADN identique peut être lié par des complexes composés de différents facteurs de transcription, ce qui peut induire selon les constituants du complexe, une activation ou une répression transcriptionnelle (Figure 6).

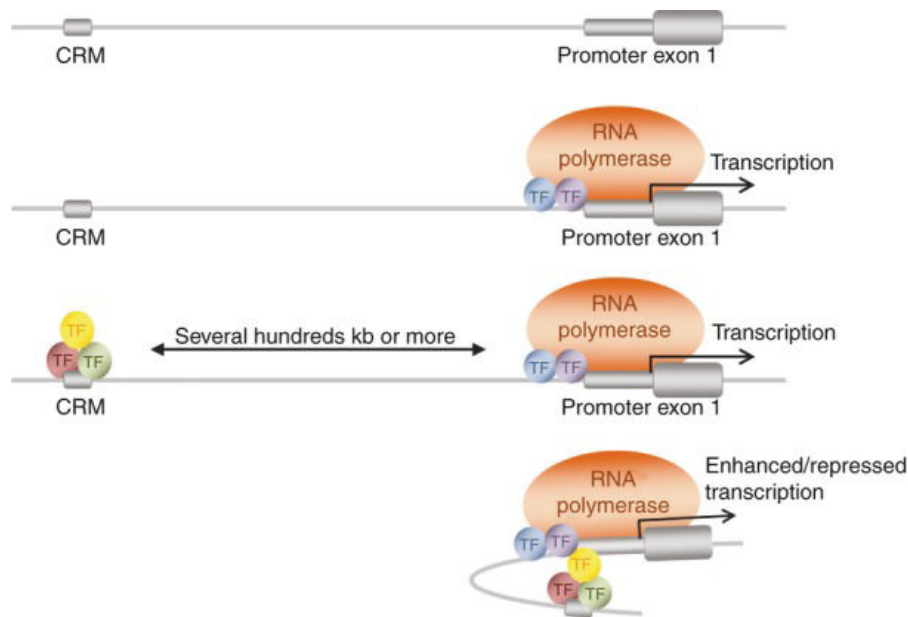


Figure 6 : Modèle de régulation de la transcription de l'expression génique par les modules de régulation en cis (Tijssen et Ghevaert, 2013). CRM : module de régulation en cis. TF : facteur de transcription.

Les facteurs de transcription jouent un rôle clé dans l'engagement de la cellule souche hématopoïétique dans la lignée mégacaryocytaire puis dans la différenciation du mégacaryocyte (Doré et Crispino, 2011). En revanche, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'effet spécifique de chacun de ces facteurs de transcription dans ces processus cellulaires sont moins documentés. L'action de ces facteurs de transcription peut être recherchée par des tests basés sur un seul gène ou déduit à partir de profil d'expression dans des modèles cellulaires *in vitro* ou murins *in vivo*. Récemment, de nouvelles approches basées sur des techniques de séquençage à haut débit (en particulier le ChIP-seq) ont été à l'origine de découvertes intéressantes sur ces réseaux de régulation génique et sur les interactions entre les facteurs de transcription. Par exemple, en étudiant les séquences d'ADN liées par cinq facteurs de transcription clés de la mégacaryopoïèse (GATA1, GATA2, RUNX1, FLI1, and TAL1), Tijssen *et al.* ont mis en évidence que la localisation de ces cinq facteurs de transcription sur des séquences communes est fréquemment retrouvée. Ces sites de liaison communs

étaient pour la plupart proches de gènes codant des protéines connues pour être impliquées dans l'hématopoïèse. L'étude de ces sites de liaison a aussi permis de révéler l'importance de huit gènes (*March2*, *Max*, *Smox*, *Pttg1lp*, *Emilin1*, *Sufu*, *Ncor2*, *Pdzk1ip1l*) dont l'implication dans le développement érythromégacaryocytaire n'était pas connue (Tijssen *et al.*, 2011).

Les connaissances du rôle clé des facteurs de transcription dans la mégacaryopoïèse et la production plaquettaire ont progressé de manière importante ces dernières années. Ces progrès ont été permis par des données provenant de différents modèles. Des méthodes d'étude *in vitro* de la prolifération et de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et des mégacaryocytes ainsi que des modèles de souris sous-exprimant des facteurs de transcription spécifiques ou exprimant des variants de facteurs de transcription ont été développés. Enfin, l'étude des patients présentant des défauts dans les gènes codant des facteurs de transcription à l'origine d'anomalies du compte et/ou de la fonction plaquettaire a permis de mieux comprendre leur rôle dans la formation et la fonction des plaquettes.

Des technologies innovantes comme le système d'édition du génome CRISPR/Cas9 ou la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites ouvrent des perspectives intéressantes (Borst *et al.*, 2017; Pellagatti *et al.*, 2016). Le système CRISPR/Cas9 permet le détournement des systèmes de réparation de l'ADN de la cellule permettant de supprimer un locus spécifique ou de le remplacer par une séquence d'intérêt (comme le même gène contenant un variant pathogène). Ce système peut être utilisé pour modifier le génome de cellules humaines (Cho *et al.*, 2013) mais aussi d'embryons de souris (Wang *et al.*, 2013). La reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes est

particulièrement intéressante dans les cas où les modèles murins ne récapitulent pas parfaitement la pathologie humaine. On peut citer par exemple les modèles murins d'inactivation de *FLI1* et de *RUNX1*, deux gènes associés à des pathologies plaquettaires constitutionnelles, dans lesquelles les souris ne présentent un phénotype anormal que lorsque les deux allèles du gène sont altérés (Matheny *et al.*, 2007; Moussa *et al.*, 2010). Dans ces situations, la reprogrammation de cellules somatiques de patients avec thrombopénies constitutionnelles liées aux variants *FLI1* et *RUNX1* en cellules souches pluripotentes a été un modèle clé pour comprendre certains des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent ces pathologies (Sakurai *et al.*, 2014; Vo *et al.*, 2017). Ce système permet également de limiter l'utilisation de modèles animaux.

2. Thrombopénies constitutionnelles associées à un défaut d'un facteur de transcription

En pathologie humaine, des variants constitutionnels des gènes codant les facteurs de transcription *FLI1*, *ETV6*, *GATA1*, *RUNX1*, *GFI1b* et *MECOM* ont été associés à une thrombopénie et une diathèse hémorragique variable. Les principales caractéristiques phénotypiques des thrombopénies constitutionnelles associées aux défauts d'un facteur de transcription sont présentées dans le Tableau 1. Certaines d'entre elles sont communes. On peut noter que leur transmission est majoritairement autosomique dominante hormis pour la thrombopénie associée aux variants *GATA1* qui elle est de transmission récessive liée à l'X. Une classification opérationnelle des thrombopénies constitutionnelles est basée sur le volume plaquettaire moyen. Le groupe des thrombopénies constitutionnelles associées aux défauts d'un facteur de transcription est principalement associé à un volume plaquettaire moyen normal ou légèrement augmenté. De manière importante,

certains membres de ce groupe sont également associés à une prédisposition aux hémopathies malignes. La seule thrombopénie constitutionnelle avec prédisposition aux hémopathies malignes n'appartenant pas à ce groupe est la thrombopénie liée aux variants *ANKRD26*. D'autres caractéristiques sont variables au sein du groupe, en particulier la présence d'une dysfonction plaquettaire associée qui, quand elle est présente, est fréquemment le reflet d'un déficit en granule denses.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des pathologies plaquettaires constitutionnelles associées aux défauts des facteurs de transcription

Gène (identifiant MIM)	Transmission	Sévérité de la thrombopénie	Volume plaquettaire moyen	Dysfonction plaquettaire associée	Autres symptômes	Hémopathie maligne
<i>FLI1</i> (MIM 147791 et 188025)	AD ou AR	Absente à légère	Normal ou légèrement augmenté	Oui (défaut granules denses et alpha)	Aucun	Non
<i>ETV6</i> (MIM 616216)	AD	Légère à modérée	Normal	Variable (ADP, acide arachidonique)	Excès GR hyperdenses, macrocytose	MDS, LAL, MM, LMMC
<i>GATA1</i> (MIM 300367 et 314050)	XR	Légère à sévère	Normal ou augmenté	Oui (défaut granules denses)	Macrocytose, anémie, myélofibrose	Non
<i>RUNX1</i> (MIM 601399)	AD	Légère à modérée	Normal	Oui (défaut granules denses et alpha)	Aucun	MDS, LAM, LAL, L. Tricho.
<i>GFI1B</i> (MIM 187900)	AD	Absente à modérée	Normal	Oui (défaut granules alpha)	Myélofibrose	Non
<i>MECOM</i> (MIM 616738)	AD	Modérée à sévère	ND	ND	Aplasie médullaire, Atteinte syndromique	ND

La thrombopénie légère, modérée et sévère est définie respectivement par un taux de plaquette de 100-149 G/L, 50-99 G/L et <50 G/L. Abréviations : AD : autosomique dominant ; ADP : Adénosine diphosphate ; AR : autosomique récessif ; GR : globule rouge ; L. Tricho : leucémie aiguë à tricholeucocytes ; LAL : leucémie aiguë lymphoblastique ; LAM : leucémie aiguë myéloblastique ; LMC : leucémie myéloïde chronique ; LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique ; MDS : myélodysplasie ; MM : myélome multiple ; ND : non disponible ; VGM : volume globulaire moyen ; VPM : volume plaquettaire moyen ; XR : récessif lié à l'X.

Ces facteurs de transcription dont les variants sont associés à des thrombopénies constitutionnelles sont exprimés dans la lignée mégacaryocytaire mais également dans de nombreuses autres cellules progénitrices de la lignée hématopoïétique (Figure 7). Cette observation peut expliquer l'atteinte des autres lignées sanguines observées dans ces pathologies. GATA1 est fortement exprimé dans l'érythroblaste ce qui peut rendre compte de l'association des variants constitutionnels de ce gène avec des anomalies de la lignée rouge (macrocytose, anémie, dysérythropoïèse). Les facteurs de transcription ETV6 et RUNX1 sont également exprimés de manière significative dans les cellules souches hématopoïétiques et dans les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes. Cela pourrait rendre compte du fait que les variants constitutionnels *ETV6* et *RUNX1* sont associés à une atteinte de ces lignées à type de prédisposition aux hémopathies malignes en plus d'une atteinte de la lignée plaquettaire. Le caractère prédominant de l'atteinte de la lignée plaquettaire observée chez les patients porteurs de ces variants suggère d'autres mécanismes de régulation, notamment épigénétiques.

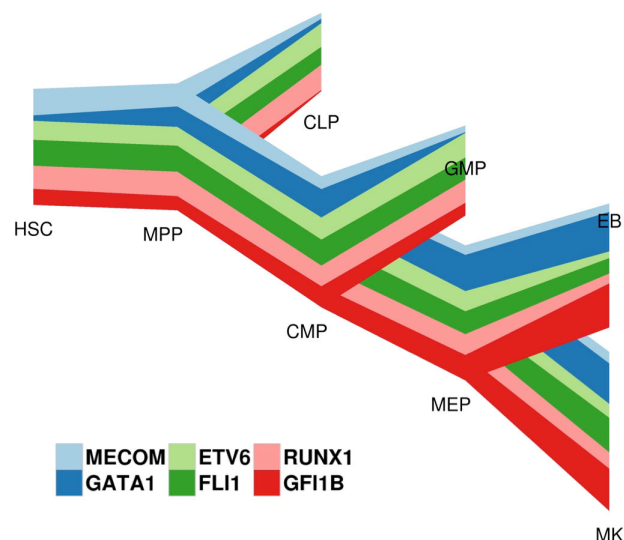


Figure 7 : Expression relative des facteurs de transcription FLI1, ETV6, GATA1, RUNX1, GFI1B et MECOM dans huit types cellulaires dérivées de la cellule souche hématopoïétique (CSH) dans la moelle osseuse.

MPP : Progéniteur multipotent, CMP : Progéniteur myéloïde commun, CLP : Progéniteur lymphoïde commun, GMP : Progéniteur granulomonocytaire; EB : Erythroblaste; MEP : Progéniteur érythromégacaryocytaire, MK : Mégacaryocyte. Ce riverplot a été généré à l'aide des données Blueprint Progenitors et de l'outil en ligne disponible à l'adresse <http://blueprint.haem.cam.ac.uk>. (Chen et al., 2014).

FLI1

1. Famille de facteur de transcription ETS

Le gène *Friend leukemia virus integration 1 (FLI1)* est un membre de la famille ETS des facteurs de transcription comprenant une structure hélice-coude-hélice (domaine ETS) qui se lie à des séquences d'ADN consensus riches en purines GGA(A/T) (ETS binding site) (Nye *et al.*, 1992) situées dans les séquences régulatrices de ses gènes cibles.

2. Structure du gène et de la protéine

FLI1 mesure environ 120 kb et est situé sur le chromosome 11 en position 11q24. Le gène *Fli1* orthologue murin a été initialement identifié comme le site d'insertion du virus de la leucémie murine de Friend (Ben-David *et al.*, 1991). Le gène *FLI1* humain comprends neuf exons et code une protéine de 452 acides aminés. La protéine FLI1 comprend deux domaines fonctionnels clés très conservés au cours de l'évolution : un domaine de transactivation en N-terminal appelé *pointed domain* (PNT) et un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal appelé *ETS domain* (ETS). Deux signaux de localisation nucléaire ont été rapportés (Honsei *et al.*, 2006). Le premier se situe en N-terminal et le second se situe dans le domaine ETS de la protéine.

3. Rôle de FLI1 dans la mégacaryopoïèse : modèles murins

Le proto-oncogène *Fli1* (Friend leukemia virus integration 1) code un facteur de transcription et est principalement exprimé dans les cellules endothéliales et hématopoïétiques. Il joue un rôle important dans la régulation du développement vasculaire et de la mégacaryopoïèse (Hart *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2009; Lemarchandel *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993). Chez la souris, l'inactivation

spécifique de *Fli1* homozygote par mutation nulle (Hart *et al.*, 2000) ou par délétion d'une séquence régulatrice en C-terminal altérant l'expression du gène (Kawada *et al.*, 2001; Spyropoulos *et al.*, 2000) est létale pendant l'embryogénèse entre E11,5 et E12,5. L'examen de ces embryons montre une perte d'intégrité vasculaire avec saignement dans le plexus vasculaire des méninges. Dans ces modèles, le phénotype des souris hétérozygotes pour l'inactivation de *Fli1* est indifférenciable des souris *wild-type*. L'inactivation complète de *Fli1* étant létale dans la période embryonnaire, deux modèles ont permis d'étudier les souris adultes présentant une inactivation de *Fli1*. Le premier était un modèle de souris avec inactivation inducible de *Fli1* à l'âge adulte par un système de recombinaison Cre-LoxP (Starck *et al.*, 2010). Après 8-10 jours d'inactivation de *Fli1*, ces souris transgéniques présentent une diminution du chiffre plaquettaire de 33% avec un défaut important de maturation des mégacaryocytes. Le deuxième modèle utilise une délétion de la séquence régulatrice en C-terminal du gène *Fli1* (Moussa *et al.*, 2010). Cette protéine tronquée s'exprime mais le variant code une protéine dont l'activité transcriptionnelle est diminuée. Les souris homozygotes ont un chiffre plaquettaire trois fois inférieur aux souris témoins. Le nombre de mégacaryocytes dans la moelle est normal, mais il a été à nouveau montré un défaut de maturation. De manière intéressante, il existait un temps de saignement prolongé, un défaut d'agrégation plaquettaire à l'adénosine diphosphate et à la thrombine, et un défaut d'activation plaquettaire mesurée par l'expression plaquettaire du CD62P induite par la thrombine. Ces derniers résultats suggèrent un rôle de *Fli1* dans la fonction plaquettaire normale.

Sur le plan de l'activité transcriptionnelle de *Fli1*, ces modèles murins ont mis en évidence un rôle de cette protéine dans la régulation de gènes essentiels du mégacaryocyte, notamment *Itga2b* (Lemarchandel *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2002;

Zhang *et al.*, 1993), *Gp1ba* (Hashimoto et Ware, 1995), *Gp9* (Bastian *et al.*, 1999), *Mpl* (Deveaux *et al.*, 1996), *Gp6* (Furihata et Kunicki, 2002) et *Gata1* (Seth *et al.*, 1993; Watson *et al.*, 1992).

4. Syndrome Paris-Trousseau / Jacobsen

Chez l'homme, la description d'un phénotype plaquettaire associé à une délétion hémizygote de la partie distale du bras long du chromosome 11 a permis la définition du syndrome de Paris-Trousseau. Ce syndrome peut s'associer à un syndrome polymalformatif associant retard de croissance, atteinte cardiaque, trouble du développement psychomoteur et syndrome dysmorphique. On parle alors de syndrome Jacobsen (Grossfeld *et al.*, 2004). Le syndrome Paris-Trousseau associe un phénotype hémorragique, une macrothombopénie et des plaquettes présentant des granules alpha géants (Breton-Gorius *et al.*, 1995). L'examen des frottis de moelle osseuse des patients retrouve une augmentation du nombre de mégacaryocytes avec présence de micromégacaryocytes. La durée de vie des plaquettes est normale. De plus, 15% des plaquettes de ces patients contiennent des granules alpha géants dont le contenu ne peut pas être libéré après stimulation par la thrombine. Sur le plan moléculaire, les gènes *ETS1* et *FLI1*, qui ont un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes de la lignée mégacaryocytaire, sont inclus dans la délétion responsable du syndrome Paris-Trousseau (Breton-Gorius *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 2000). Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que la délétion hémizygote de ces gènes pourrait jouer un rôle clé dans la pathogénèse du syndrome Paris-Trousseau. Une équipe a étudié les progéniteurs hématopoïétiques présents dans le foie des embryons de souris *Fli1^{-/-}* (Hart *et al.*, 2000). Ils ont mis en évidence une dysmégacaryopoïèse avec augmentation du nombre de mégacaryocytes de petite taille et immatures ainsi que des anomalies de

leur ultrastructure, en particulier une biosynthèse des granules alpha anormale. L'hypothèse d'un rôle majeur de *FLI1* dans la pathogénèse du syndrome de Paris-Trousseau a été confortée par des expériences *in vitro* de restauration de phénotype. En effet, la surexpression du gène *FLI1* sauvage dans des cellules progénitrices issus de patients avec syndrome Paris-Trousseau augmente leur capacité de différenciation en mégacaryocytes matures (augmentation du taux de cellules CD41⁺ CD42⁺) (Raslova *et al.*, 2004). Récemment, Vo *et al.* ont produit des mégacaryocytes issus de la différenciation de cellules souches pluripotentes induites générées chez un patient avec syndrome Paris-Trousseau et issus d'une lignée de cellules souches pluripotentes induites sauvage avec *knockout* hétérozygote de *FLI1* (Vo *et al.*, 2017). Ils ont montré que les phénotypes de ces mégacaryocytes étaient identiques, confirmant à nouveau le lien entre la perte d'un allèle du gène *FLI1* et le syndrome Paris-Trousseau.

Les altérations constitutionnelles du gène *FLI1*, de même que ceux du gène *RUNX1* (un autre gène codant un facteur de transcription régulant la lignée mégacaryocytaire dont il sera question plus loin) ont été associés à la détection de la chaîne lourde de myosine IIB (MYH10) dans les lysats plaquettaires (Antony-Debré *et al.*, 2012). Cette protéine constitue un biomarqueur de ces pathologies. *MYH10* est normalement réprimé par le complexe FLI1-RUNX1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Cette répression est essentielle au phénomène d'endomitose et permet ainsi la polyploïdisation du mégacaryocyte (Lordier *et al.*, 2012).

5. Thrombopénies constitutionnelles associées aux variants du gène *FLI1*

Deux publications récentes ont rapporté des variants constitutionnels du gène *FLI1* associés à une thrombopénie (Stevenson *et al.*, 2015; Stockley *et al.*, 2013). La position de ces variants est indiquée dans la figure 8. On note que tous les variants rapportés dans la littérature altèrent le domaine ETS responsable de la liaison à l'ADN, montrant l'importance de ce domaine dans la fonction de la protéine.

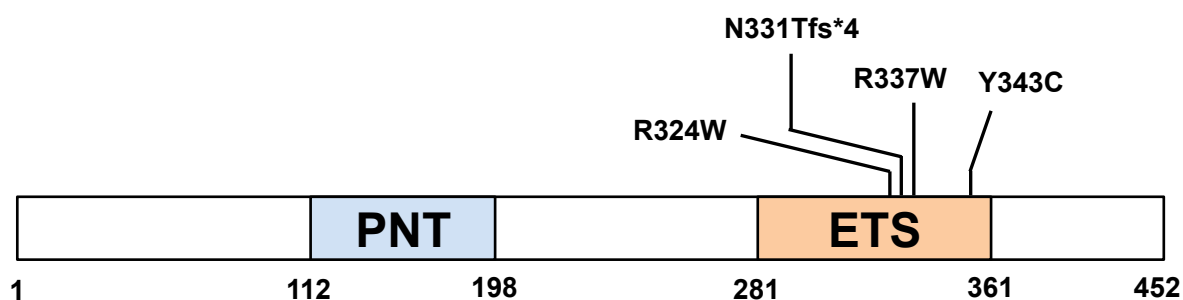


Figure 8 : Représentation schématique de la protéine FLI1. Le schéma met en évidence les domaines fonctionnels de la protéine. Les différents variants constitutionnels rapportés dans la littérature sont indiqués au dessus du schéma de la protéine. PNT: pointed domain; ETS: E26 transformation specific domain.

En ce qui concerne la première publication, les variants ont été mis en évidence par analyse de gènes candidats chez des patients présentant une diathèse hémorragique associée dans la plupart des cas à une thrombopénie légère à modérée. Cette équipe a mis en évidence un défaut de sécrétion d'adénosine triphosphate en réponse à plusieurs agonistes et ont donc évoqué un défaut de sécrétion des granules denses. Par ailleurs, ces patients présentaient des défauts d'agrégation plaquettaire en réponse au collagène et au *thrombin receptor activating peptide-6* (TRAP-6) qui étaient plus apparents aux faibles concentrations d'agonistes. Ils ont montré que les variants altéraient l'activité transcriptionnelle de la protéine par un modèle *in vitro* utilisant un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase en aval du promoteur du gène *GP6*, qui est une cible connue de FLI1. Enfin, ils ont montré que, de même que chez les patients avec syndrome Paris-

Trousseau, le biomarqueur MYH10 était retrouvé dans les plaquettes des patients avec thrombopénie associée aux variants *FLI1*.

En ce qui concerne la deuxième publication, une donnée originale est que les patients présentant le phénotype plaquettaire portaient le variant *FLI1* à l'état homozygote. En étudiant les plaquettes des patients en microscopie électronique, ils ont montré que 1 à 5% d'entre elles contenaient des granules alpha géants, comme retrouvé chez les patients avec syndrome Paris-Trousseau. Enfin, la présence du variant était responsable d'une diminution de l'activation transcriptionnelle des gènes cibles *GP6*, *GP9* et *ITGA2B*.

Ces deux publications ont apporté des données importantes sur le rôle de *FLI1* dans la mégacaryopoïèse.

6. FLI1 et oncogénèse

Une dérégulation de l'activation transcriptionnelle de *FLI1* est un événement favorisant l'oncogénèse. Elle peut se produire lors d'une insertion virale (virus de la leucémie murine de Friend) et entraîner une érythroleucémie chez la souris (Ben-David *et al.*, 1991). Elle peut également s'observer lors de translocation chromosomique avec formation d'une protéine fusion. Par exemple la translocation t(11;22) conduisant à la protéine fusion EWS-FLI1 est une anomalie génomique centrale dans la pathogénèse du sarcome d'Ewing retrouvée chez plus de 90% de ces patients.

ETV6

1. Structure du gène et de la protéine

Le gène suppresseur de tumeur *ETV6* (*ETS variant 6*), anciennement connu sous le nom de *TEL*, est composé de huit exons. Il code un facteur de transcription à activité répressive de 452 acides aminés (Lopez *et al.*, 1999). ETV6 appartient à la famille ETS comme la protéine FLI1, avec qui elle partage donc des similitudes en terme de structure. ETV6 comprend trois domaines très conservés : un domaine N-terminal *pointed domain* (PNT) et un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal appelé *ETS domain* (ETS) séparés par un domaine central. Le domaine PNT est responsable de l'homodimérisation (Lopez *et al.*, 1999) et de l'hétérodimérisation, notamment avec la protéine FLI1 (Kwiatkowski *et al.*, 1998). La région centrale est impliquée dans l'effet inhibiteur de la transcription. Enfin, le domaine ETS est, comme pour la protéine FLI1, responsable de la liaison à l'ADN et comprend un signal de localisation nucléaire (Park *et al.*, 2006).

2. Rôle dans la mégacaryopoïèse

ETV6 est une protéine exprimée de manière quasi ubiquitaire. Son inactivation homozygote chez la souris entraîne une mort embryonnaire à E10,5 par défaut vasculaire sévère (Wang *et al.*, 1997). Ce facteur de transcription est indispensable à la transition entre l'hématopoïèse fœtale et médullaire chez la souris (Wang *et al.*, 1998).

Des données sur le rôle spécifique d'*ETV6* dans la mégacaryopoïèse ont été produites en étudiant des souris dont l'inactivation d'*ETV6* était spécifique de la lignée érythromégacaryocytaire par un système Gata1-Cre-LoxP (Hock *et al.*, 2004).

Les auteurs de la publication n'ont pas mis en évidence d'anémie, ni d'anomalie du nombre ou de la morphologie des précurseurs érythroïdes. En revanche, le compte plaquettaire était réduit de 50%. L'étude de la mégacaryopoïèse a révélé une augmentation importante du nombre de colonies mégacaryocytes ce qui suggère un défaut de maturation terminale. Cette étude a donc mis en évidence un rôle clé d'*ETV6* dans la mégacaryopoïèse.

3. Rôle dans la leucémogénèse

La protéine ETV6 est le produit d'un locus fréquemment impliqué dans les leucémies aigües et les syndromes myélodysplasiques. En effet une cinquantaine de réarrangements d'*ETV6* à type de translocations, insertions et inversions impliquant 30 gènes partenaires ont été mis en évidence (De Braekeleer *et al.*, 2012). On peut notamment citer la translocation t(12;21) (p13;q22) à l'origine de la protéine fusion ETV6-RUNX1 qui est l'anomalie génétique la plus communément retrouvée dans les leucémies aigües lymphoblastiques de l'enfant puisqu'elle concerne environ un quart de ces patients (Golub *et al.*, 1995; Pui *et al.*, 2004). Des variants ponctuels somatiques ont également été retrouvés dans de nombreuses hémopathies malignes (Wang *et al.*, 2014).

GATA1

1. Structure et fonction

Le gène *GATA1*, situé sur le bras court du chromosome X, code un facteur de transcription appartenant à la famille GATA. Ce gène est exprimé dans les mégacaryocytes, dans les cellules de la lignée érythrocytaire, dans les mastocytes et dans les polynucléaires éosinophiles (Crispino et Horwitz, 2017). Le facteur de transcription GATA1 possède un domaine de transactivation en N-terminal et deux domaines en doigt de zinc. Le domaine en doigt de zinc en N-terminal stabilise la liaison à l'ADN sur les sites consensus GATA palindromiques (Trainor *et al.*, 1996) et interagit avec le cofacteur FOG1, cofacteur très important dans la fonction de régulation de la transcription (Tsang *et al.*, 1997). Le domaine en doigt de zinc en C-terminal est responsable de la majeure partie de liaison à l'ADN sur des séquences consensus dont la mieux caractérisée est (T/A)GATA(A/G) (Evans *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1989). GATA1 participe à la régulation de gènes essentiels à la mégacaryopoïèse tels que *GP1BA*, *GP1BB*, *ITGA2B*, *GP9*, *PF4*, *MPL* et *NFE2* (Songdej et Rao, 2017).

2. Pathologies hématologiques constitutionnelles associées aux variants du gène *GATA1*

Des variants constitutionnels de *GATA1* ont été mis en évidence dans des familles d'individus présentant des tableaux qui peuvent être dominés par la thrombopénie (Balduini *et al.*, 2004; Del Vecchio *et al.*, 2005; Freson *et al.*, 2001, 2002; Nichols *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 1977; Tubman *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2002), l'atteinte érythrocytaire (Hollanda *et al.*, 2006; Zucker *et al.*, 2016) ou une dysérythopoïèse / dysmégacaryopoïèse / thrombocytose (Zucker *et al.*, 2016). Les

différents cadres nosologiques liés aux variants *GATA1* sont résumés dans le Tableau 2 (Songdej et Rao, 2017).

Tableau 2 : Pathologies plaquettaires et érythrocytaires constitutionnelles associées aux variants *GATA1*

Pathologie (identifiant MIM)	Variant <i>GATA1</i>	Perturbation de l'interaction <i>GATA1</i> / <i>FOG1</i>	Degré de l'anémie	Degré de la thrombopénie
Thrombopénie ± anémie dysérythropoïétique (MIM 300367)	V205M	Sévère	++	++/+++
	D218Y	Sévère	++	+++
	D218G	Légère	-	+ / +++ / +++
	G208S	Légère	-	++
	G208R	Inconnue	++	+++
Thrombopénie avec β-thalassémie (MIM 314050)	R216Q	- (Perturbation de la liaison à l'ADN)	±	+ (et syndrome des plaquettes grises)
Anémie macrocytaire ; neutropénie ; compte plaquettaire normal (MIM 300835)	Variant d'épissage 332G->C, V74L	-	+ / +++ / ++++ (neutropénie fréquente)	-
Anémie dysérythropoïétique ; dysplasie mégacaryocytaire ; thrombocytose	Variant d'épissage dans la région 5' non traduite	-	+++ (neutropénie rare)	-

Traduction du tableau 2 de l'article de Songdej et Rao, 2017. Anémie : hémoglobine ≥ 10 g/dL (+) ; 7 - 10 g/dL ; Hb <7 g/dL (+++). Thrombopénie : 70 - 90 G/L (+) ; 20 - 70 G/L (++) ; et <20 G/L (+++).

Comme indiqué dans le tableau, il existe un certain degré de corrélation entre le génotype et le phénotype des patients. En effet, la thrombopénie est plus marquée dans les cas où le variant *GATA1* est à l'origine d'un défaut de l'interaction *GATA1*-*FOG1*.

Les positions des variants associés à un défaut plaquettaire sont indiquées dans la figure 9. La plupart des variants constitutionnels de *GATA1* altèrent le domaine en doigt de zinc en N-terminal de la protéine.

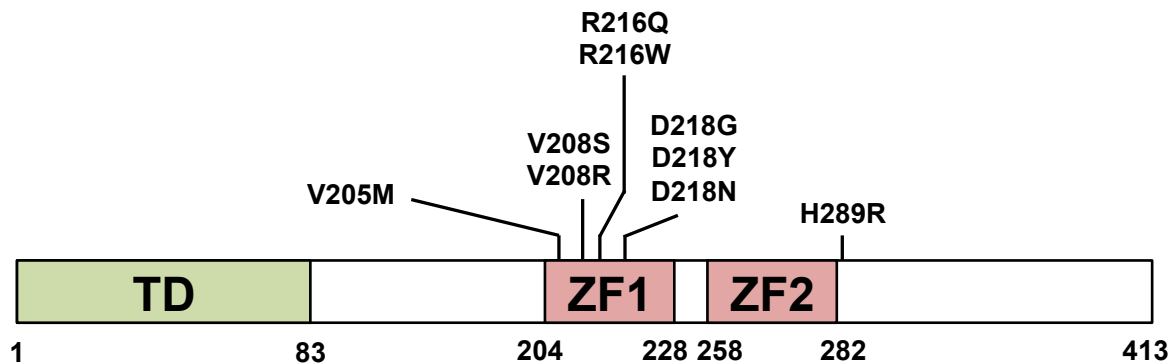


Figure 9 : Représentation schématique de la protéine GATA1. Le schéma met en évidence les domaines fonctionnels de la protéine. Les différents variants constitutionnels rapportés dans la littérature sont indiqués au dessus du schéma de la protéine. TD: domaine de transactivation ; ZF1 et ZF2 : domaine en doigt de zinc 1 et 2.

RUNX1

Le gène *RUNX1*, aussi connu sous le nom d'*AML1* et de *CBFA2*, code une protéine qui agit au sein d'un complexe transcriptionnel appelé *Core Binding Factor*. Ce dernier est composé d'une sous-unité CBF- α pouvant être composé de RUNX1, RUNX2 ou RUNX3 et d'une sous unité CBF- β . RUNX1 comprend un domaine de transactivation en C-terminal et un domaine Runt en N-terminal essentiel à sa fonction. Ce dernier domaine est impliqué à la fois dans la liaison à la sous-unité CBF- β et dans la liaison à l'ADN sur la séquence consensus (C/T)G(C/T)GGT(C/T) (Chuang *et al.*, 2013; Melnikova *et al.*, 1993). L'inactivation de *RUNX1* chez la souris entraîne une mort embryonnaire vers E12. L'étude des embryons retrouve un défaut majeur d'érythropoïèse et de myélopoïèse et des hémorragies dans le système nerveux central (Wang *et al.*, 1996). RUNX1 agit sur de nombreux gènes cibles codant des protéines essentielles à la maturation mégacaryocytaire et à la fonction plaquettaire (*ALOX12*, *PF4*, *MYL9*, *PRKCQ*, *MPL*, *MYH9*, *MYH10*, *NFE2*, *PCTP*,

PLDN, *ANKRD26*) (Songdej et Rao, 2017). Son inactivation inductible à l'âge adulte dans le tissu hématopoïétique chez la souris est à l'origine d'un défaut de maturation des mégacaryocytes avec réduction importante de la polyploïdisation et une augmentation du nombre de progéniteurs hématopoïétiques (Ichikawa *et al.*, 2004).

La présence d'un variant constitutionnel de *RUNX1* est responsable d'une pathologie plaquettaire associée à une prédisposition aux leucémies aiguës myéloblastiques appelée *Familial Platelet Disorder with Predisposition to Acute Myeloid Leukemia* (FPD/AML) (Antony-Debré *et al.*, 2015; Béri-Dexheimer *et al.*, 2008; Bluteau *et al.*, 2012; Buijs *et al.*, 2001; De Rocco *et al.*, 2017; Downton *et al.*, 1985; Ho *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2004) (Figure 10).

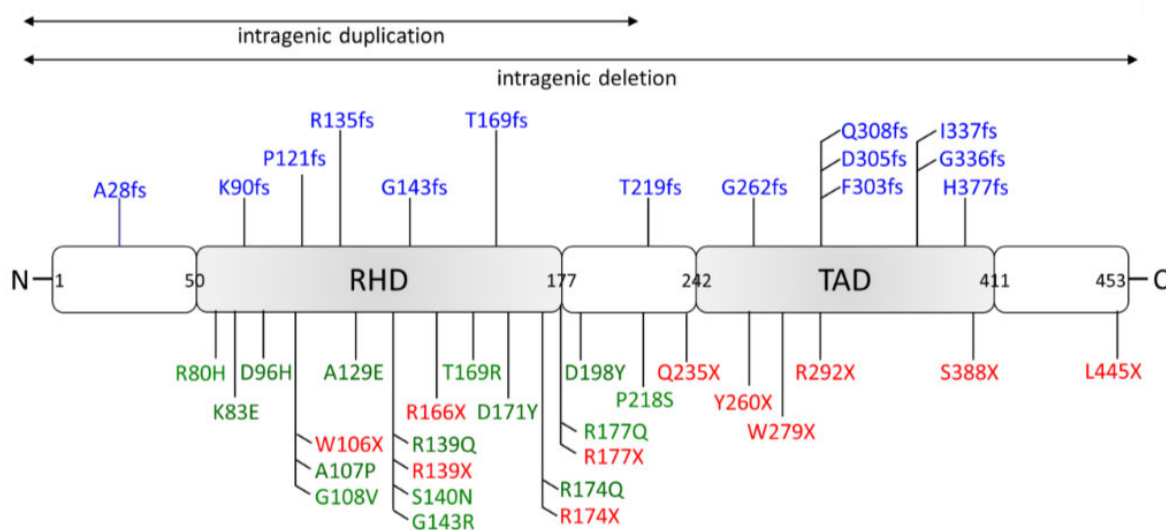


Figure 10 : Représentation schématique des variants constitutionnels de RUNX1 (Schlegelberger et Heller, 2017). La numérotation des variants de *RUNX1* est basée sur la séquence de référence RUNX1b (Uniprot Q01196-1, 453 acides aminés). Les variants de type décalage du cadre de lecture sont représentés en bleu, les variants faux-sens en vert, et les variants non-sens en rouge. RHD, domaine d'homologie Runt (50-177 acides aminés) ; TAD, domaine de transactivation (242-411 acides aminés).

Les individus atteints ont une tendance hémorragique légère à modérée. Cette tendance hémorragique est due en partie à la thrombopénie à volume plaquettaire normal. Il existe une dysmégacaryopoïèse avec défaut de polyploïdisation du mégacaryocyte dû à une diminution de l'expression de MYL9 et MYH9 et à une

anomalie de la répression de *MHY10* (Bluteau *et al.*, 2012). La détection de MYH10 dans les plaquettes a été identifiée comme un biomarqueur des anomalies constitutionnelles de *RUNX1* et *FLI1*. La diathèse hémorragique est également due à un défaut de fonction plaquettaire associé à la thrombopénie. Ce défaut de fonction plaquettaire est variable en fonction des patients et peut concerner la réponse à l'adénosine triphosphate, au collagène, à l'acide arachidonique ou l'adrénaline. Un défaut de granules denses peut expliquer au moins en partie ce défaut fonctionnel (Béri-Dexheimer *et al.*, 2008; Latger-Cannard *et al.*, 2016). La prédisposition aux hémopathies malignes semble plus fréquente en cas de variants *RUNX1* codant une protéine avec effet dominant négatif que ceux associés à une perte de fonction (haploinsuffisance) (Latger-Cannard *et al.*, 2016; Michaud *et al.*, 2002). Certains variants constitutionnels d'un allèle de *RUNX1* sont à l'origine d'une instabilité génomique. Cette instabilité génomique conduit à l'apparition de variants somatiques de nombreux autres gènes associés à la progression de la maladie vers la leucémie aiguë reflétant l'hétérogénéité des variants favorisant la progression de la leucémie aiguë. Enfin, la progression vers la leucémie aiguë est toujours associée à une anomalie acquise sur le deuxième allèle de *RUNX1* (Antony-Debré *et al.*, 2016).

GFI1b

Le gène *GFI1b*, situé sur le chromosome 9, a été initialement identifié comme un locus possédant plus de 95% d'homologie de séquence avec un gène paralogue *GFI1*. Ce dernier constitue un site d'intégration proviral du virus de la leucémie murine de Moloney (Gilks *et al.*, 1993). *GFI1B* code un facteur de transcription à activité répressive essentiel à l'hématopoïèse (Anguita *et al.*, 2017; van der Meer *et al.*, 2010). Il est composé d'un domaine SNAG en N-terminal capable de lier des

complexes protéiques co-régulant la transcription (Grimes *et al.*, 1996) et de six domaines en doigt de zinc dont trois sont directement impliqués dans la liaison à l'ADN (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996). Son inactivation chez la souris est létale au stade embryonnaire (Saleque *et al.*, 2002). L'étude du foie fœtal de ces souris montre un défaut du développement érythrocytaire et mégacaryocytaire. Un autre modèle murin d'inactivation spécifique dans les cellules souches hématopoïétiques a montré que *GFI1B* est essentiel à la rétention de ces cellules dans la niche endostéale (Khandanpour *et al.*, 2010). Dans ce modèle, le nombre de globules rouges et de plaquettes circulants est abaissé.

Des variants constitutionnels du gène *GFI1B* ont été récemment impliqués dans des thrombopénies chez l'homme associée à des anomalies modérées de la lignée érythrocytaire (Chen *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2017; Kitamura *et al.*, 2016; Monteferrario *et al.*, 2014; Stevenson *et al.*, 2013) (Figure 11).



Figure 11 : Représentation schématique de la protéine GFI1B (Anguita *et al.*, 2017). Les domaines de la protéine GFI1 sont indiqués par un croissant vert (domaine SNAG) et des cases orange (domaines en doigt de zinc). Les positions des variants connus de la protéine sont indiquées au dessus de la protéine. Ils s'agit de variants constitutionnels sauf le variant 3 qui est un variant somatique retrouvé dans des cellules blastiques de leucémie aiguë myéloïde (Anguita *et al.*, 2016).

Les patients présentaient une diathèse hémorragique variable (légère à sévère). Une étude des plaquettes de ces patients a montré que certaines d'entre elles présentaient un déficit en granules alpha et un défaut d'agrégation en réponse à différents agonistes (adénosine triphosphate, acide arachidonique, adrénaline et TRAP-6). Les variants testés sur le plan fonctionnel étaient associés à une perte

d'activité répressive de la protéine et étaient porteurs d'un effet dominant négatif. Il a été décrit dans une famille que cette perte d'activité répressive était à l'origine d'une expression ectopique de CD34 à la surface des plaquettes des patients, qui pourrait constituer un biomarqueur de cette pathologie (Kitamura *et al.*, 2016).

MECOM

Le locus correspondant à *MECOM* a initialement été identifié comme un site d'intégration rétrovirale dans des modèles murins (Morishita *et al.*, 1988). Ce gène code les facteurs de transcription EVI1 et MDS1/EVI1, du fait de l'existence de plusieurs sites de démarrage transcriptionnel (Nucifora *et al.*, 1994). La structure d'EVI1 comprend sept domaines en doigt de zinc en N-terminal permettant sa liaison à un motif ADN de séquence proche de celle des sites GATA et trois motifs en doigt de zinc en C-terminal permettant sa liaison à un motif ADN de séquence proche de celle des sites ETS (Bard-Chapeau *et al.*, 2012; Delwel *et al.*, 1993; Funabiki *et al.*, 1994). Chez la souris, au cours de la période embryonnaire, *Mecom* est fortement exprimé dans le système urinaire, l'épithélium bronchique, l'endocarde, les cavités nasales et les membres en développement (Perkins *et al.*, 1991). Chez l'homme, ce gène est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et joue un rôle important dans l'hématopoïèse et dans le renouvellement des cellules souches. Il est également exprimé dans les mégacaryocytes et les plaquettes (Tijssen et Ghevaert, 2013). Chez l'homme, une surexpression de *MECOM* ou des réarrangements chromosomiques impliquant son locus sont retrouvés dans 5 - 10% des leucémies aiguës myéloblastiques et dans des tumeurs solides. Ces altérations sont de mauvais pronostic (Glass *et al.*, 2014; Kataoka et Kurokawa, 2012).

Des variants constitutionnels de *MECOM* associés à une thrombopénie chez l'homme ont été identifiés très récemment par *exome sequencing* et par séquençage ciblé (Niihori *et al.*, 2015) (Figure 12).

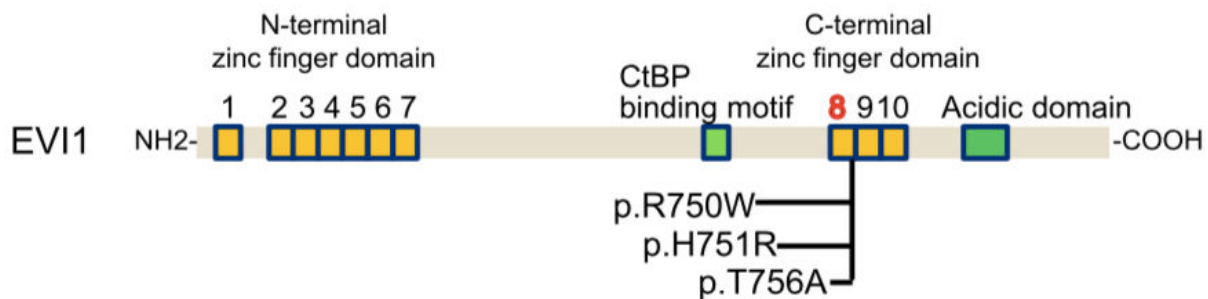


Figure 12 : Représentation schématique de la protéine EVI1 (Niihori *et al.*, 2015). Les cases colorées représentent les domaines fonctionnels de la protéine. Les résidus altérés par les variants constitutionnelles du gène *MECOM* sont localisés sur la protéine. Ces variants sont regroupés dans le 8^{ème} doigt de zinc.
CtBP : C-terminal binding protein

Le tableau clinique présenté par ces patients s'intègre dans un syndrome appelé synostose radio-ulnaire avec thrombopénie amégacaryocytaire (RUSAT) associant une aplasie médullaire constitutionnelle et des anomalies osseuses. Les causes génétiques de ce syndrome sont hétérogènes. Il est également observé chez des patients présentant des délétions chromosomiques emportant les *loci MDS1* et *MECOM* ou des variants du gène *HOXA11* (Nielsen *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2001; Thompson et Nguyen, 2000). Les variants de *MECOM* détectés chez les patients altèrent tous le huitième domaine en doigt de zinc en C-terminal de la protéine. Ces variants sont donc susceptibles de déstabiliser la liaison à l'ADN par le domaine en doigt de zinc. Les auteurs ont montré par un système rapporteur une diminution de l'activité transcriptionnelle des protéines codées par les variants de *MECOM* (Niihori *et al.*, 2015).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les thrombopénies constitutionnelles peuvent être associées à un pronostic défavorable du fait du risque hémorragique ou de leur association à une prédisposition aux hémopathies malignes.

L'anomalie génétique sous-jacente est inconnue chez environ 50% des patients avec thrombopénie présumée constitutionnelle. Cela suggère qu'il s'agit de maladies rares mais dont la prévalence est probablement sous-estimée et que d'autres gènes sont probablement impliqués dans ces pathologies. Par ailleurs, nos connaissances sur le phénotype, la prise en charge et la physiopathologie de ces maladies sont limitées.

Cette thèse concerne les thrombopénies liées aux défauts des facteurs de transcription FLI1, ETV6 et GATA1. Ces pathologies et les variants génétiques associés ont été étudiés à partir de patients suivis en France et dans d'autres pays européens dont le recrutement a été permis par des réseaux nationaux (Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires coordonné à Marseille par le Professeur Marie-Christine Alessi) et internationaux (BRIDGE consortium).

Les objectifs généraux de ce travail sont : 1) identifier de nouveaux gènes impliqués dans les thrombopénies constitutionnelles, 2) décrire le phénotype des patients atteints, 3) caractériser les mécanismes physiopathologiques mis en jeu et 4) développer de nouveaux outils diagnostiques.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

PARTIE 1

Thrombopénie avec déficit en granules denses associée aux variants du gène *FLI1* : caractéristiques pathogéniques et ultrastructurales

Contexte scientifique

Les thrombopénies constitutionnelles sont un groupe de pathologies encore incomplètement caractérisées. Cependant, le pronostic des thrombopénies constitutionnelles est très hétérogène et dépend étroitement du défaut génétique du patient. Le risque hémorragique est dépendant du compte plaquettaire et de la présence éventuelle d'une anomalie de la fonction associée. Il existe également des thrombopénies constitutionnelles associées à des atteintes d'autres organes ou à une prédisposition aux hémopathies malignes. Le fait de pouvoir proposer aux patients atteints de thrombopénies constitutionnelles une médecine de précision dépendra donc en premier lieu de la possibilité de mieux définir ces maladies sur le plan génétique et phénotypique.

En 2013, un groupe anglais a utilisé une technique de séquençage à haut débit pour explorer 13 patients non apparentés présentant un syndrome hémorragique avec thrombopathie à type de défaut de sécrétion des granules denses (Stockley *et al.*, 2013). Ce groupe a rapporté une délétion de 4 paires de bases et deux substitutions du gène codant le facteur de transcription FLI1, responsables des altérations p.Asn331Thrfs*4, p.Arg337Trp et p.Tyr343Cys. Deux des cas index avaient également une thrombopénie légère et l'un d'entre eux présentait un volume plaquettaire augmenté. Le défaut de sécrétion des granules denses était mis en évidence par un défaut de libération d'adénosine triphosphate. Cette publication était la première à rapporter des altérations constitutionnelles ponctuelles du gène *FLI1* en tant que cause de thrombopénie chez l'homme.

Une autre équipe a rapporté une famille dont les enfants étaient porteurs d'un variant du gène *FLI1* à l'état homozygote, à l'origine de la substitution p.Arg324Trp, associé à un phénotype ressemblant au syndrome Paris-Trousseau.

L'objectif initial de notre étude était de déterminer l'étiologie génétique de thrombopénies constitutionnelles autosomiques dominantes inexpliquées chez 27 patients pris en charge au centre d'exploration des pathologies hémorragiques et thrombotiques de l'Hôpital de la Timone à Marseille. Deux nouveaux variants constitutionnels du gène *FLI1* ont été découverts chez trois patients issus de deux familles non apparentées. Nous présentons dans cette étude la stratégie ayant abouti à la découverte des variants, l'étude *in vitro* des variants du gène *FLI1* et le phénotype clinique et plaquettaire de ces trois patients.

EUROPEAN
HEMATOLOGY
ASSOCIATIONFerrata Storti
Foundation

Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with *FLI1* variants: ultrastructural and pathogenic features

Paul Saultier,¹ Léa Vidal,¹ Matthias Canault,¹ Denis Bernot,¹ Céline Falaise,² Catherine Pouymayou,² Jean-Claude Bordet,³ Noémie Saut,^{1,2} Agathe Rostan,^{1,2} Véronique Baccini,^{1,2} Franck Peiretti,¹ Marie Favier,¹ Pauline Lucca,^{4,5,6} Jean-François Deleuze,⁷ Robert Olasso,⁷ Anne Boland,⁷ Pierre Emmanuel Morange,^{1,2} Christian Gachet,^{8,9,10,11} Fabrice Malergue,¹² Sixtine Fauré,¹ Anita Eckly,^{8,9,10,11} David-Alexandre Trégouët,^{4,5,6} Marjorie Poggi^{1*} and Marie-Christine Alessi^{1,2*}

Haematologica 2017
Volume 102(6):1006-1016

¹Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille; ²APHM, CHU Timone, French Reference Center on Inherited Platelet Disorders, Marseille; ³Unité d'Hémostase Biologique, Bron; ⁴ICAN Institute for Cardiometabolism and Nutrition, Paris; ⁵Inserm, UMR_S 1166, Team Genomics and Pathophysiology of Cardiovascular Diseases, Paris; ⁶Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ Paris 06), UMR_S 1166; ⁷Centre National de Génotypage, Institut de Génétique, CEA, Evry; ⁸UMR_S949 INSERM, Strasbourg; ⁹Etablissement Français du Sang (EFS)-Alsace, Strasbourg; ¹⁰Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS); ¹¹Université de Strasbourg and ¹²Beckman Coulter Immunotech, Life Sciences Global Assay and Applications Development, Marseille, France

*MP and M-CA contributed equally to this work

ABSTRACT

Congenital macrothrombocytopenia is a family of rare diseases, of which a significant fraction remains to be genetically characterized. To analyze cases of unexplained thrombocytopenia, 27 individuals from a patient cohort of the Bleeding and Thrombosis Exploration Center of the University Hospital of Marseille were recruited for a high-throughput gene sequencing study. This strategy led to the identification of two novel *FLI1* variants (c.1010G>A and c.1033A>G) responsible for macrothrombocytopenia. The *FLI1* variant carriers' platelets exhibited a defect in aggregation induced by low-dose adenosine diphosphate (ADP), collagen and thrombin receptor-activating peptide (TRAP), a defect in adenosine triphosphate (ATP) secretion, a reduced mepacrine uptake and release and a reduced CD63 expression upon TRAP stimulation. Precise ultrastructural analysis of platelet content was performed using transmission electron microscopy and focused ion beam scanning electron microscopy. Remarkably, dense granules were nearly absent in the carriers' platelets, presumably due to a biogenesis defect. Additionally, 25-29% of the platelets displayed giant α -granules, while a smaller proportion displayed vacuoles (7-9%) and autophagosome-like structures (0-3%). *In vitro* study of megakaryocytes derived from circulating CD34⁺ cells of the carriers revealed a maturation defect and reduced proplatelet formation potential. The study of the *FLI1* variants revealed a significant reduction in protein nuclear accumulation and transcriptional activity properties. Intraplatelet flow cytometry efficiently detected the biomarker MYH10 in *FLI1* variant carriers. Overall, this study provides new insights into the phenotype, pathophysiology and diagnosis of *FLI1* variant-associated thrombocytopenia.

Introduction

Congenital reduced platelet count or impaired platelet function lead to a family of diseases, which are increasingly recognized as a significant cause of bleeding in children and adults.¹ Congenital macrothrombocytopenias (CMTPs) constitute a large subgroup of inherited thrombocytopenia characterized by enlarged platelets.

Correspondence:

paul.saultier@gmail.com

Received: September 6, 2016.

Accepted: February 24, 2017.

Pre-published: March 2, 2017.

doi:10.3324/haematol.2016.153577

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/102/6/10006

©2017 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>,

sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



Several genetic variants have been associated with CMTP, of which the most frequent alter genes that encode platelet surface proteins and megakaryocyte (MK) cytoskeletal proteins.²

However, mounting evidence has shown that several forms of CMTP are caused by variants in genes encoding hematopoietic transcription factors, which lead to altered downstream expression of genes that regulate platelet formation and function.³⁻¹⁰ In 2013, Stockley *et al.* used next-generation sequencing (NGS) to analyze 13 unrelated patients suspected of having an inherited qualitative platelet defect in the UK Genotyping and Phenotyping of Platelets (UK-GAPP) study.⁷ The group reported two substitutions and a 4-bp frameshift deletion in the transcription factor gene *FLI1*. Two of the index cases also had mild thrombocytopenia, and one of them exhibited enlarged platelets. These findings highlight the role of *FLI1* in megakaryopoiesis and platelet function.

To analyze cases of unexplained thrombocytopenia, 27 individuals from the patient cohort of the Bleeding and Thrombosis Exploration Center of the University Hospital of Marseille were recruited for a high-throughput gene sequencing investigation. In the study herein, we report the discovery of two novel *FLI1* dominant variants linked to CMTP in two unrelated pedigrees. We investigated the pathogenesis of *FLI1*-associated thrombocytopenia by analyzing subcellular *FLI1* localization and MK differentiation from hematopoietic progenitors derived from patients. We characterized the genotype-phenotype relationship and described the intraplatelet flow cytometry-based quantification of MYH10, a biomarker of *FLI1* and *RUNX1* alterations. Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) is an imaging approach based on the serial sectioning of entire platelets, which allows a 3D representation of the granules with respect to their shape, content and number. Using this method, we showed a severe dense granule deficiency in platelets of the *FLI1* variant carriers.

Methods

Methods concerning high-throughput gene sequencing, structural model of *FLI1*-DNA interactions, platelet phenotyping,

platelet-rich plasma (PRP) serotonin level, ATP secretion, mepacrine uptake and release, flow cytometric quantification of MYH10 expression (whole blood-based assay), western blot assay, site-directed mutagenesis, luciferase reporter assay, epifluorescence microscopy and *in vitro* MK differentiation and pro-platelet formation are described in the *Online Supplementary Material*.

Recruitment of patients and genetic analysis strategy

Patients were recruited from the cohort of the Bleeding and Thrombosis Exploration Center (University Hospital of Marseille) after informed written consent was obtained, in accordance with protocols approved by the local Institutional Review Board and the Declaration of Helsinki. Two high-throughput sequencing methods were used to identify candidate variants: (A) Whole-exome sequencing performed at the Centre National de Génomique (Evry, France), or (B) sequencing of a 308 gene panel (selected genes associated with platelet diseases; available on request).

Flow-cytometric quantification of MYH10 expression (PRP-based assay)

PRP was fixed in 1% paraformaldehyde phosphate buffered saline (PBS). Next, the fixed PRP was centrifuged at 1000 G for five min. The platelet pellet was suspended in permeabilization buffer (0.5% Triton X-100, 2mM Ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5% bovine serum albumin (BSA) PBS) and labeled with rabbit anti-MYH10 antibody (Cell Signaling; #3404) for one hour. After a washing step, the platelets were incubated with goat anti-rabbit Alexa-488-labeled secondary antibody (Abcam; ab150077) for 30 min in permeabilization buffer. After another washing step, the data were acquired using Navios Cytometer (Beckman Coulter) and analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc.).

Electron microscopy

For ultrastructural analysis, platelets in citrated PRP were diluted and fixed in PBS pH 7.2 containing 1.25% glutaraldehyde for one hour. After centrifugation and two PBS washings, they were post-fixed in 150 mM cacodylate-hydrochloric acid (HCl) buffer containing 1% osmium tetroxide pH 7.4 for 30 min at 4°C. After dehydration in a graded alcohol, embedding in EPON was performed by polymerization at 60°C for 72 hours. Ultrathin sections (~70 nm thick) were mounted on 200 mesh copper grids, contrast-

Table 1. Platelet phenotyping in patients carrying the *FLI1* variants.

Patient ID	FLI1 variant	Age ^a (years)	Platelet counts (x10 ⁹ /l)	MPV ^a (fl)	Serum PAI1 levels (ng/ml)	PRP serotonin levels (□g/10 ⁹ plt)	Platelet aggregation maximal intensity (%)			Platelet glycoprotein MFI ⁱ (a.u.)			
							ADP	Coll*	AA*	αIIbβ3	GPIbα	CD63	P-selectin
Reference ranges ^b			152-402	7.1-9.6	92-283	0.30-1.2	2.5 □M:75-95	78-90	79-94	Base: 20-47	Base: 1.3-5.1	Base: 0.4-1.3	Base: 0.2-0.8
							5.0 □M:78-91			TRAP: 28-60	TRAP: 0.7-2.2	TRAP: 1.3-4.2	TRAP: 1.9-7.4
F1-II2	c.1010 G>A (p.R337Q)	46	154	10.7	430	0.26	NA	NA	NA	Base: 21 TRAP: 30	Base: 1.2 TRAP: 0.9	Base: 0.6 TRAP: 0.8	Base: 0.3 TRAP: 1.7
F1-III1	c.1010 G>A (p.R337Q)	19	131	13.0	443	NA	2.5 □M:31 5.0 □M:81	83	85	Base: 34 TRAP: 42	Base: NA TRAP: NA	Base: 0.7 TRAP: 1	Base: NA TRAP: NA
F2-II4	c.1033 A>G (p.K345E)	52	140	11.1	273	0.22	2.5 □M:58 5.0 □M:76	81	83	Base: 22 TRAP: 30	Base: 2.9 TRAP: 2.9	Base: 0.9 TRAP: 1.3	Base: 0.6 TRAP: 5

^aAge at last evaluation. ^bMPV: mean platelet volume (measured by optical method using ADVIA 120, Siemens). ^cThe reference ranges were defined as the [minimum-maximum] interval of values obtained from healthy individuals in our laboratory. ^dThe collagen and arachidonic acid aggregation assays were performed using agonist concentrations of 3.3 μg/mL and 0.5 mg/mL, respectively. ^ePlatelet glycoprotein expression was measured via flow cytometry at basal conditions and after stimulation using TRAP-14 (50 μM). PAI1: plasminogen activator inhibitor-1; PRP: platelet-rich plasma; plt: platelet; ADP: adenosine diphosphate; Coll: collagen; AA: arachidonic acid; a.u.: arbitrary unit; NA: not available; TRAP: thrombin receptor-activating peptide; MFI: mean fluorescence intensity.

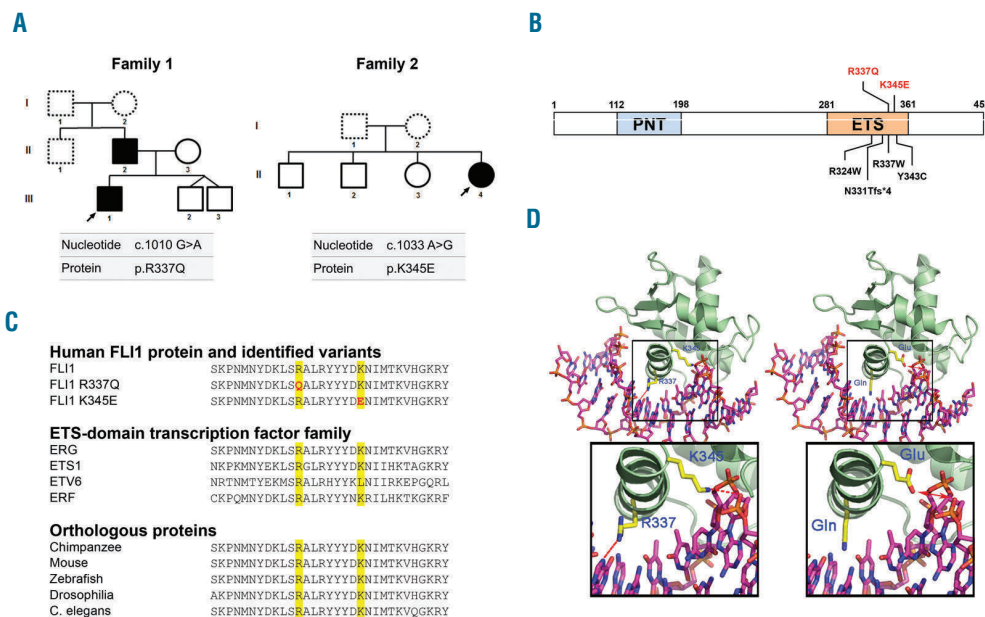


Figure 1. Identification of two novel *FLI1* variants. (A) Pedigrees for the affected families. Squares denote males and circles denote females. Black filled symbols represent family members carrying heterozygous c.1010 G>A and c.1033 A>G *FLI1* variants. Dotted line symbols represent non-tested members. Arrows indicate the probands. (B) Schematic diagram of the *FLI1* protein. The functional N-terminal Pointed domain (PNT), and C-terminal ETS DNA-binding domain (ETS) are depicted. The positions of the alterations in *FLI1* are indicated in red (alterations reported in this study) or black (previously reported alterations).^{7,8} (C) Sequence alignment of the *FLI1* protein (variant NM_002017.3). The variants reported in this study are indicated in red (top). Alignments of various members of the ETS-domain transcription factor family (middle) and different species (bottom) are provided. (D) Diagram of the simulated interactions between *FLI1* and double-stranded DNA (dsDNA). Left: Interaction of native *FLI1* with dsDNA. The *FLI1* dsDNA-interacting domain is represented as a green ribbon. The dsDNA is represented as a stick model (carbons: pink; nitrogen: blue; oxygen: red; phosphate: orange). The interactions of R337 with Guanine 5 atoms N7 and O6 as well as K345 with Adenine 15 atom OP2 (side chain carbons: yellow; nitrogen: blue; oxygen: red) are indicated in red. Right: model of *FLI1* structure with mutated residues p.R337Q and p.K345E. An expanded view of the interaction between altered residues and DNA is shown at the bottom.

ed with uranyl acetate and lead citrate and examined using a JEOL JEM1400 transmission electron microscope equipped with a Gatan Orius 600 camera and Digital Micrograph software (Lyon Bio Image, Centre d'Imagerie Quantitative de Lyon Est, France). Morphometric measurements were done using ImageJ software (National Institutes of Health, USA). Preparations of platelet whole mounts were obtained after brief contact of formvar coated grids on small drops of PRP. Then, grids were rinsed rapidly with distilled water, dried with the edge of a filter paper, waved in the air and examined under the transmission electron microscope. Dense granules were identified and counted as previously described.¹¹ FIB-SEM samples were processed as for transmission electron microscopy (TEM), and examined using a Helios NanoLab microscope (FEI). The 3D models were computed using Amira software.

Statistical analyses

Statistical significance was determined *via* a 2-tailed Mann-Whitney test unless otherwise specified. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Quantitative variables were presented as mean $\pm$ standard error of the mean. Analyses were performed using GraphPad Prism software.

Results

Identification of two novel *FLI1* variants

Two high-throughput sequencing methods were used to identify candidate variants in 27 patients with suspected congenital thrombocytopenia. DNA samples from 12 individuals (three members of four unrelated families)

with unexplained autosomal dominant macrothrombocytopenia were analyzed *via* whole-exome sequencing. In one family (Family F1), this analysis revealed a heterozygous single nucleotide change in *FLI1*. This missense variant, c.1010G>A, encodes an arginine to glutamine change (p.R337Q) in the highly conserved E twenty-six (ETS) DNA-binding domain of *FLI1* (Figure 1A,B). The presence of the variant was confirmed using capillary sequencing. There was a segregation between the *FLI1* variant and a history of thrombocytopenia in all cases for which DNA samples were available. In the three other families, no candidate variant was detected. Next, 15 additional individuals from 14 unrelated families were screened using a 308 gene panel NGS strategy. This screening led to the genetic diagnosis of four patients with macrothrombocytopenia. Aside from the identification of *MYH9*, *ACTN1* and *GP1BA* variants in three unrelated individuals, one patient carried c.1033A>G heterozygous *FLI1* variant, yielding p.K345E substitution (Family F2). In this family, the clinical and genetic status of the proband's father (F2-I1) was unknown and the proband's mother (F2-I2) displayed a normal platelet count, but the *FLI1* gene was not sequenced. This second *FLI1* variant also affected the ETS domain (Figure 1A,B). Sequence alignment of *FLI1* orthologs and paralogs demonstrated that both variants affected amino acid residues in a highly conserved sequence (Figure 1C).

As these variants were located in the ETS domain, a simulation of the protein-DNA interactions was performed. Regarding the p.R337Q variant, glutamine 337

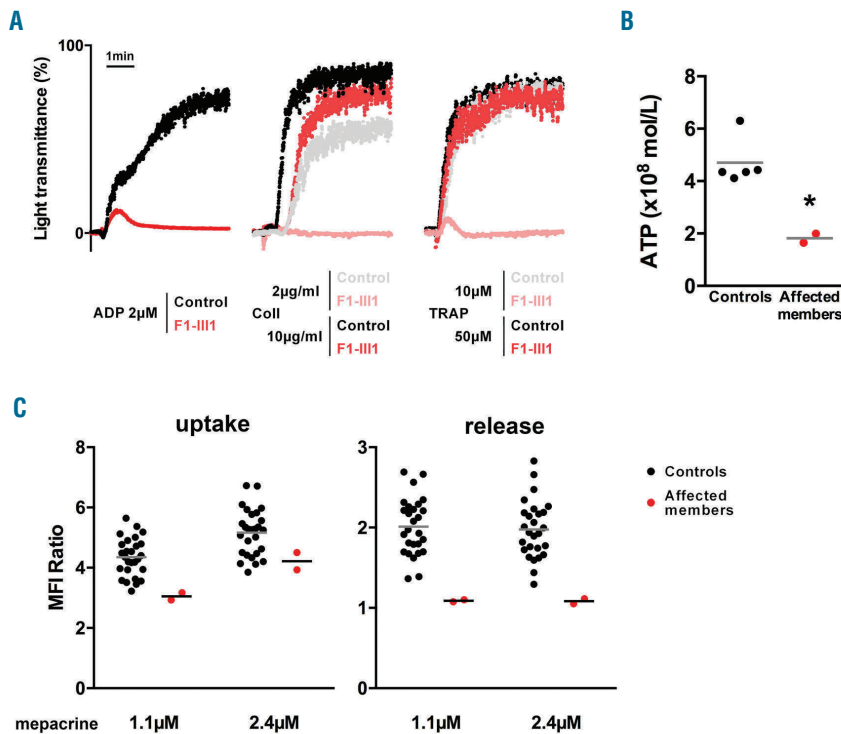


Figure 2. Platelet function analysis. (A) Light transmission aggregometry upon ADP (2 μ M), collagen (2 and 10 μ g/ml) and TRAP-6 (10 and 50 μ M) stimulation in a *FLI1* variant carrier (F1-III1) and in a control who was representative of 20 controls investigated at the same period of time. The PRP platelet count was 268 $\times 10^9$ /l for the patient and 331 $\times 10^9$ /l for the control. (B) Luminometry-based ATP secretion assay. ATP secretion was measured in two *FLI1* variant carriers (F1-II2 and F1-III1) and unrelated controls after 100 μ M TRAP-6 stimulation in 100 μ l of diluted PRP (10^7 platelet / ml). * $P < 0.05$ vs. controls (Mann-Whitney test). (C) Flow cytometric mepacrine uptake and release assay in two *FLI1* variant carriers (F1-II2 and F2-II4) and unrelated controls. The platelets were incubated with 1.1 or 2.4 μ M mepacrine and stimulated with 40 μ M TRAP-14 to evaluate the mepacrine release. The mepacrine uptake was defined as the MFI ratio of platelets incubated with mepacrine to platelets incubated without mepacrine, and the mepacrine release was defined as the MFI ratio of resting platelets to stimulated platelets. ADP: adenosine diphosphate; ATP: adenosine triphosphate; TRAP: thrombin receptor-activating peptide; Coll: collagen; MFI: mean fluorescence intensity.

retained the ability to interact with DNA; however, the putative hydrogen (H)-bonds should be weaker than those established with the positively charged arginine guanidinium moiety. In the p.K345E variant, glutamic acid 345 is negatively charged and likely has a repelling effect on DNA binding (Figure 1D).

Description of the families

The affected members of the first family (F1-II2 and F1-III1) were both males, aged 46 and 19, respectively. They had not experienced significant bleeding (International Society on Thrombosis and Haemostasis Bleeding Assessment Tool (ISTH BAT) score: 1 for both), whereas the female proband in the second family (F2-II4), who was 52 years of age, had displayed excessive bleeding (ISTH BAT score: 16) with predominantly gynecological, obstetrical and oral cavity hemorrhaging. The three affected members did not display any extra hematologic abnormality. The first-line laboratory tests are reported in Table 1. All affected members presented with mild thrombocytopenia (mean value: $142 \pm 7 \times 10^9$ /l). The mean platelet volume (MPV) was elevated (11.6 ± 1.2 fl; reference range 7.1 - 9.6 fl). In these families, coagulation, fibrinolysis and von Willebrand factor levels were normal (data not shown).

Platelet receptor expression and platelet function evaluation

The CD63 expression did not increase significantly upon TRAP stimulation (Table 1). The basal expression of α IIb β 3 was in the normal range among *FLI1* variant carriers (Table 1). The platelet light transmission aggregometry (Figure 2A and Table 1) revealed a significant aggregation defect upon stimulation with different agonists, when used at a low concentration (2 and 2.5 μ M ADP, 2 μ g/ml

collagen, 10 μ M TRAP-6). The use of higher concentrations of agonists (5 μ M ADP, 10 μ g/ml collagen, 50 μ M TRAP-6) induced normal platelet aggregation. The ATP secretion upon TRAP-6 stimulation was 2.5-fold decreased in patients F1-II2 and F1-III1 as compared to controls (Figure 2B). The mepacrine uptake and release upon TRAP-14 stimulation was reduced (Figure 2C). Among *FLI1* variant carriers, the platelet serotonin level was low but the serum plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen level (an α -granule biomarker) was normal or high (Table 1).

Increased MYH10 expression in the platelets of affected members

The expression of MYH10 in platelets has been recently proposed as a biomarker for *RUNX1* and *FLI1* alterations.^{7,8,12} Intraplatelet flow-cytometry showed an almost 4-fold overexpression of MYH10 among the *FLI1* variant carriers as compared to controls, using a PRP-based and a whole blood-based experimental procedure (Figure 3A and Online Supplementary Figure S1, respectively). The MYH10 mean fluorescence intensity (MFI) was expressed as a function of MPV in 13 control individuals (MPV range 7.2 - 11.4 fl) and two *FLI1* patients (MPV 10.7 and 13 fl), demonstrating that the increased MPV could not explain the specific increase in MYH10 MFI observed in the *FLI1* patients (Online Supplementary Figure S1). Western blot analysis confirmed the increased expression of MYH10 in the platelet lysates of the *FLI1* variant carriers (Figure 3B).

Functional assessment of the *FLI1* variants

Western blot analysis did not reveal an alteration in FLI1 protein expression in the platelets of affected members compared with healthy controls (Figure 4A). Accordingly, protein expression of wild-type (WT) and both *FLI1* vari-

ants in transfected cells were equivalent, thereby suggesting that these variants do not influence protein expression or stability (Figure 4B). To investigate the effect of the p.R337Q and p.K345E variants on FLI1 transcriptional activity, we investigated the ability of the recombinant FLI1 variants to regulate transcriptional activity using a dual-luciferase reporter assay. Co-transfection of the reporter plasmid containing the ETS-binding site and a plasmid encoding WT FLI1 resulted in almost 70% inhibition of luciferase activity. There was a loss in the ability of the p.R337Q and p.K345E variants to repress luciferase activity compared with that of WT FLI1 ($P < 0.0001$, Figure 4C). Reduced transcriptional activity was also observed in this model for the FLI1 p.R324Q variant previously reported by Stevenson *et al.*⁸ The co-transfection of WT and variant *FLI1* led to normal transcriptional activity (Figure 4C).

The R337 and K345 residues were predicted to be part of a nuclear localization signal sequence using several prediction tools (cNLS mapper and NLStradamus; *data not*

shown). To examine whether the p.R337Q and p.K345E variants alter the subcellular localization of FLI1 protein, we performed cell fractionation assay and immunofluorescence staining of cells overexpressing WT or variant FLI1. Western blot analysis of subcellular fractions showed increased FLI1 protein level in the cytoplasmic fraction and decreased protein level in the nuclear fraction in cells expressing the p.R337Q and p.K345E FLI1 variants compared with cells expressing the WT protein (Figure 4D). Concordant with the western blot data, fluorescence microscopy showed that WT FLI1 concentrated primarily in cell nuclei. In contrast, both *FLI1* variants exhibited predominant cytoplasmic localization (Figure 4E).

FLI1 variants are associated with reduced CD34⁺-derived megakaryocyte differentiation and proplatelet formation *in vitro*

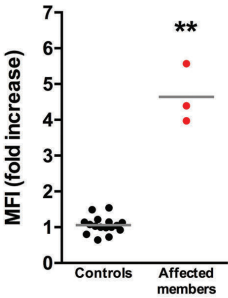
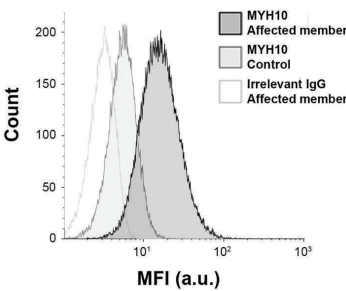
We generated MKs from peripheral blood CD34⁺ cells in the presence of thrombopoietin (TPO) and stem cell factor

Table 2. FIB-SEM analysis of platelet ultrastructure.

Patient ID	FLI1 variants	Platelet volume (fl)	α -granule volume (fl)	Giant α -granule volume (fl)	Proportion of platelets displaying			
					Giant α -granules (%)	Autophagosome-like structures (%)	Glycogen accumulation (%)	Vacuoles (%)
Control		7.6 $\pm$ 0.5	0.018 $\pm$ 0.003	None detected	None detected	None detected	8	None detected
F1-II2	c.1010 G>A (p.R337Q)	12.6 $\pm$ 0.1	0.014 $\pm$ 0.005	0.22 $\pm$ 0.02	25	3	86	9
F2-II4	c.1033 A>G (p.K345E)	12.8 $\pm$ 2.0	0.017 $\pm$ 0.005	0.08 $\pm$ 0.02	29	None detected	51	7

Giant α -granules were defined by a diameter of >400 nm. Values are shown as the mean $\pm$ SEM as quantified for n=38, 52 or 45 randomly selected platelets for control, F1-II2 and F2-II4, respectively.

A



B

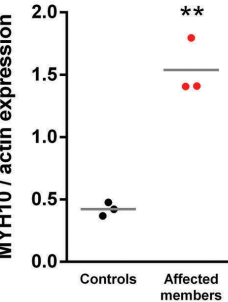
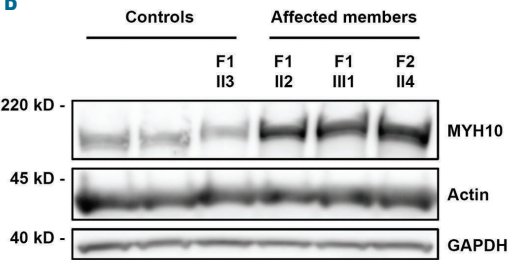


Figure 3. Quantification of platelet MYH10 expression. (A) Flow cytometry-based quantitative detection of intraplatelet MYH10 expression (PRP-based assay). Left: representative overlay of histograms of intraplatelet MYH10 expression in an affected member (F1-II2) and a healthy control. The non-specific staining (irrelevant IgG) is only presented for the affected member, which can be superimposed for that of the control. Right: MYH10 mean fluorescence intensity (MYH10 MFI – irrelevant IgG MFI) in affected members (n=3) or unrelated controls (n=8) from three independent experiments. The results are expressed as fold change relative to corresponding controls; ** $P < 0.01$ vs. controls (Mann-Whitney test). (B) Left: representative western blot analysis of MYH10 expression in platelets from the affected members (F1-II2, F1-III1, F2-II4), one unaffected member (F1-II3) and two unrelated controls. GAPDH and actin were used as a protein loading control. Right: the results of densitometric analysis were normalized to actin and expressed as mean $\pm$ SEM; ** $P < 0.01$ vs. controls (Mann-Whitney test). Three independent experiments were performed. GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IgG: immunoglobulin G; a.u.: arbitrary units.

(SCF) in liquid culture. At day 11, the percentage of mature CD41^{hi}CD42a^{hi} MKs was strikingly reduced, while the percentage of CD41^{low}CD42⁺ and CD41^{CD42}⁺ cells was increased in F1-II2 compared with the control (Figure 5A). The percentage of high-ploidy cells ($\geq 8n$) was

reduced among *FLI1* variant carriers at day 12 (11.9, 8.2 and 5.8% for the control, the F1-II2 and the F1-III1 affected members, respectively) and day 14 of maturation (11.3, 6.2 and 4.5% for the control, the F1-II2 and the F1-III1 affected members, respectively) (Figure 5B). At days 12-

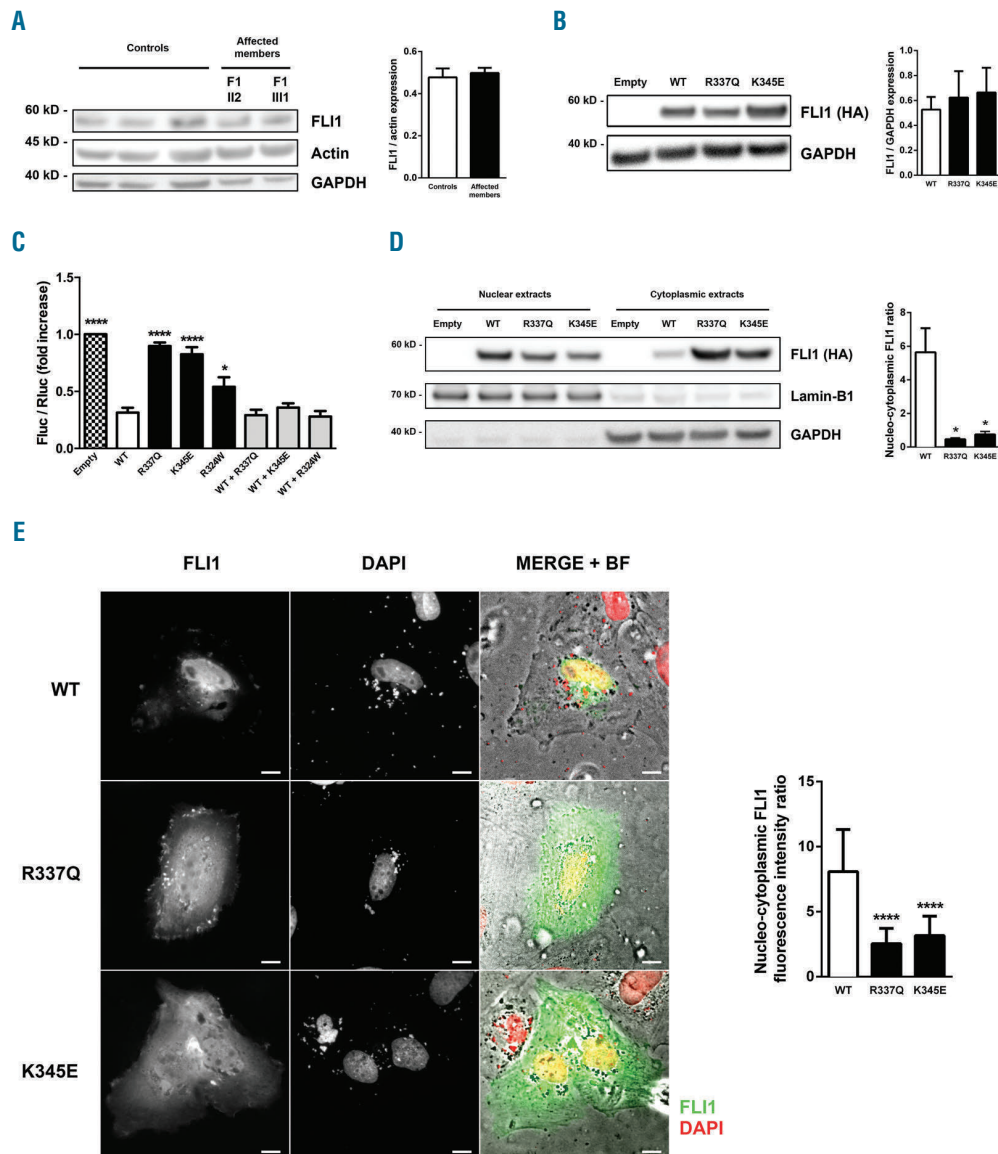


Figure 4. Functional characterization of the *FLI1* variants. (A) Left: representative western blot analysis of FLI1 expression in platelets from the affected members (F1-II2, F1-III1) and three control individuals. GAPDH and actin were used as a protein loading control. Right: the results of the densitometric analysis were normalized to actin and expressed as mean $\pm$ SEM from three independent experiments. (B) Left: representative western blot analysis of FLI1 expression in GripTite 293 MSR cells transfected with an empty vector, wild-type (WT) or variant *FLI1* constructs using an anti-HA antibody. GAPDH was used as a protein loading control. Right: the results of the densitometric analysis are expressed as mean $\pm$ SEM. Three independent experiments were performed. (C) GripTite 293 MSR cells were co-transfected with an empty vector, WT or variant *FLI1* constructs including the c.970C.T *FLI1* variant previously reported by Stevenson *et al.*⁸ (p.R324W) along with the luciferase reporter plasmid containing three tandem copies of the ETS-binding site upstream of the HSV tk promoter (E743tk80Luc) and pGL4.73 Renilla luciferase control vector. Firefly to renilla luminescence ratios (Fluc/Rluc) were calculated to compensate for transfection efficiency and expressed as fold change relative to empty vector. The data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments; * P <0.05, **** P <0.0001 vs. WT (one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test). (D) Western blot analysis of WT and variant FLI1 subcellular localization. GripTite 293 MSR cells were transfected with an empty vector, WT or variant *FLI1* constructs. The lamin-B1 and GAPDH expression were used as nuclear and cytoplasmic markers, respectively. The data are the mean $\pm$ SEM of four independent experiments; * P <0.05 vs. WT (Mann-Whitney test). (E) Left: representative immunofluorescence microscopy images of H9C2 cells transfected with WT or variant *FLI1* constructs visualized using bright field illumination and immunofluorescence after FLI1 and DAPI staining; scale bar, 5 μ m. Right: quantification of the nuclear and cytoplasmic integrated density of fluorescence. The data are expressed as mean $\pm$ SEM of the nucleo-cytoplasmic ratio of fluorescence integrated density from two independent experiments (≥ 30 total cells were assessed for each condition); **** P <0.0001 vs. WT (Mann-Whitney test). GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HA: hemagglutinin; BF: bright field.

13, the percentage of proplatelet (PPT)-forming MKs was significantly reduced in the affected members F1-II2 and F2-II4 compared with three controls ($16 \pm 1\%$ vs. $3 \pm 1\%$, $P < 0.05$, Figure 5C). MKs from patients were smaller and formed very few PPTs, which displayed reduced extensions and branching (Figure 5C).

Platelets from affected members exhibit giant α -granules and an absence of dense granules

May-Grünwald-Giemsa staining of peripheral blood smears of patient F1-II2 revealed enlarged platelets with giant α -granules (Figure 6A). Accordingly, TEM analysis showed the presence of large fused α -granules in the carriers' platelets (Figure 6B). The mean diameter of the α -

granules was significantly increased (Figure 6C). The mean α -granule number per μm^2 of platelet section was slightly reduced in the FLI1 p.R337Q variant carrier but not in the p.K345E variant carrier. We quantified the platelet surface on sections (Figure 6C), which confirmed the increased platelet size associated with *FLI1* variants (Table 1). Whole mount electron microscopy, FIB-SEM and TEM was used to quantify the dense granules, which were nearly absent in carriers' platelets (Figure 6B,C and *Online Supplementary Figure S2*), thereby indicating a dense granule storage pool deficiency. Precise platelet content analysis and 3D reconstruction of the α - and dense granules within platelets was performed using the FIB-SEM technique. Among affected members, the proportion of

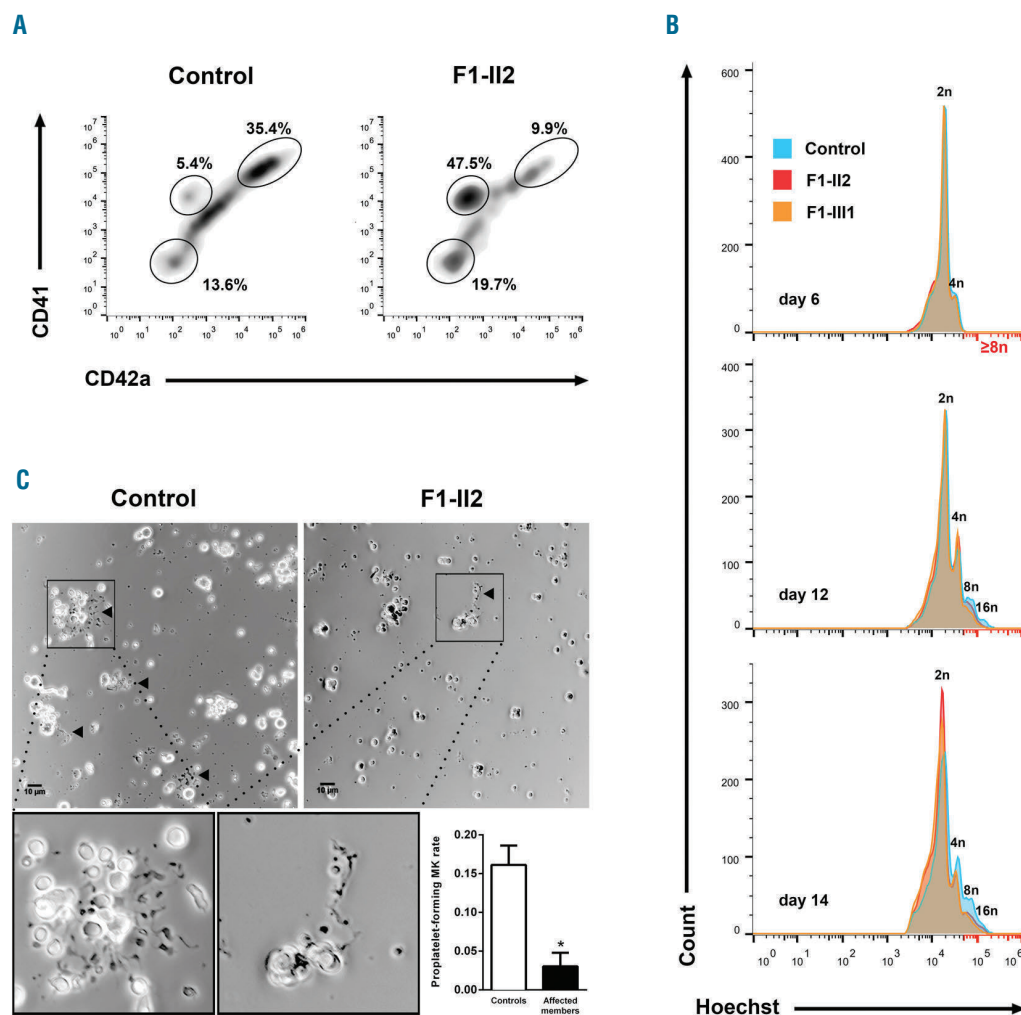


Figure 5. Megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. Circulating CD34⁺ progenitors from affected members or controls were isolated and cultured in the presence of TPO and SCF to induce megakaryocytic commitment. (A) MK differentiation was monitored using flow cytometry. The density plots represent CD41 and CD42a expression in Hoechst⁺ cells from an affected member (F1-II2) and an unrelated control at day 11 of culture. The ellipse gates show the populations CD41⁺CD42a⁺, CD41⁺CD42a⁻ cells and mature CD41⁺CD42a⁺ MKs. (B) Ploidy level was monitored by flow cytometry. The histograms represent frequency distribution of Hoechst levels among the CD34⁺-derived cells from two affected members (F1-II2 and F1-III1) and an unrelated control at day 6, 12 and 14 of culture. (C) Representative microscopic images of proplatelet (PPT) formation after 13 days of culture. An expanded view of PPT formation is shown at the bottom. PPT formation was quantified in two affected members (F1-II2 and F2-II4) and three unrelated controls at culture days 12 and 13 from three independent experiments. The PPT-forming MK are indicated with triangle markers; scale bar, 10 μm . The percentage of PPT-forming MKs was estimated by counting MKs harboring ≥ 1 cytoplasmic process with areas of constriction; ≥ 180 total cells were assessed for each individual. The results are expressed as mean $\pm$ SEM; * $P < 0.05$ (Mann-Whitney test). MK: megakaryocyte.

platelets displaying giant α -granules (diameter > 400nm) was 25-29% (Table 2). The giant α -granules had a mean volume of almost 8-fold that of normal α -granules. While dense granules were easily distinguished through their typical dark central core and spherical geometry in control

platelets (8.6 ± 0.7 dense granules per platelet; $n=12$), they were almost absent within platelets of *FLI1* variant carriers (1.1 ± 0.3 , 1.1 ± 0.2 dense granules per platelet for F1-II2 and F2-II4 affected members, respectively; $n=12$) (Figure 6C). Empty dense granule membrane structures

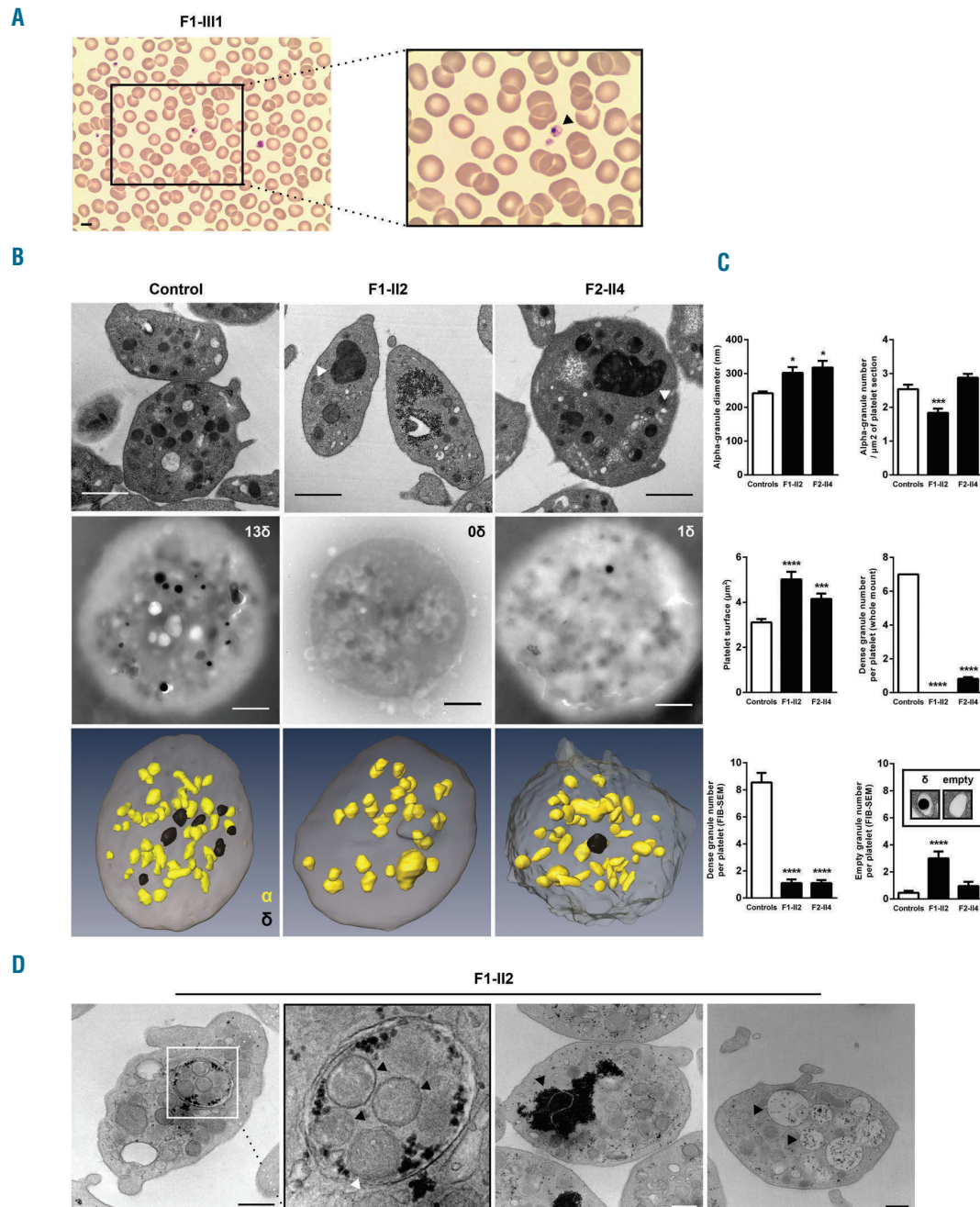


Figure 6. Platelet structure defects associated with *FLI1* variants. (A) Representative May-Grünwald-Giemsa stained blood smears showing enlarged platelets with giant α -granules (patient F1-III3). Scale bar, 5 μ m. (B) Platelet ultrastructural analysis from *FLI1* variant carriers (F1-II2 and F2-II4) and an unrelated control. Representative electron microscopy images of platelets transmission electron microscopy (TEM) ultrathin sections (top) and whole mount (middle). 3D reconstruction of platelet α - and dense granules from focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) images (bottom); Giant α -granules are indicated with triangle markers; δ : dense granule, α : alpha-granule; Scale bar, 1 μ m. (C) Measurement of the α -granules diameter and number / μ m² of platelet section, platelet surface, number of dense granules and number of empty granules. Values are shown as the mean $\pm$ SEM as quantified for ≥ 100 randomly selected platelets for TEM and whole mount and 12 randomly selected platelets for FIB-SEM; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs. controls (Mann-Whitney test). (D) Representative ultrastructural image of double membrane structures resembling autophagosome (far left panel with enlarged view middle left panel; black triangle marker: α -granule; white triangle marker: mitochondrion), area of glycogen accumulation (middle right panel; black triangle marker: glycogen), and vacuoles (far right panel; black triangle marker: vacuole) in the platelet of the affected member F1-II2.

were rarely detected (3 ± 0.5 , 1 ± 0.3 and 0.5 ± 0.2 copies for F1-II2, F2-II4 and control platelets, respectively; $n=12$; Figure 6C). Double membrane structures resembling autophagosomes were detected in 3% of the platelets from the affected member F1-II2 (Table 2; Figure 6D, left panel), while these were absent in the affected member F2-II4. Accumulation of glycogen was found in the cytoplasm of many platelets from the affected members (86% and 51% in F1-II2 and F2-II4 platelets, respectively; Table 2 and Figure 6D, middle right panel) and vacuoles containing glycogen were also observed in 9% and 7% of F1-II2 and F2-II4 platelets, respectively (Table 2 and Figure 6D, far right panel). FIB-SEM image stacks in F1-II2 and a control allowed the 3D observation of the platelet morphological defects associated with *FLI1* variants (Online Supplementary Videos S1 and S2).

Discussion

In the present study, we identified two novel *FLI1* variants in patients from two unrelated families displaying CMTF with marked bleeding diathesis in one of them. The reported *FLI1* variants were associated with impaired megakaryocytic differentiation and PPT formation *in vitro* and with a defect in the protein subcellular localization, thereby providing further insights into the pathophysiology of *FLI1*-associated thrombocytopenia. Remarkably, we demonstrated that dense granules were nearly absent in the carriers' platelets. In addition, we showed that intraplatelet flow cytometry efficiently detected the biomarker MYH10 in *FLI1* variant carriers.

FLI1 belongs to the ETS-domain transcription factor family, in which members bind a specific DNA consensus sequence to control the expression of genes that are essential in the regulation of cellular proliferation, differentiation and programmed cell death.¹⁵ *FLI1* is mainly expressed in hematopoietic and vascular endothelial cells and plays a role in the regulation of essential MK genes.^{7,8,14-23} In humans, a role for *FLI1* in megakaryopoiesis was highlighted by studies of Paris-Trousseau syndrome (PTS)^{24,26} in which the *FLI1* locus is hemizygotously deleted, and more recently by two articles reporting *FLI1* variants associated with congenital thrombocytopenia.^{7,8}

The affected members carried heterozygous variants, with a dominant mode of inheritance in the F1 family. The thrombocytopenia associated with the *FLI1* variants reported by Stockley *et al.*⁷ and the PTS^{24,25} were also shown to be transmitted in a dominant manner. Inversely, Stevenson *et al.* have described a family displaying inherited thrombocytopenia caused by a recessive *FLI1* variant.⁸ We hypothesize that the mode of inheritance could rely on the degree of the protein functional impairment, as suggested by the moderately reduced transcriptional activity of the p.R324W variant, associated with the recessive inheritance pattern. Intriguingly, in mouse models of a targeted null *Fli1* variant, the mice carrying a heterozygous deletion of *Fli1* are phenotypically indistinguishable from the WT mice. We hypothesize that these mouse models do not undergo silencing of one *FLI1* allele during the early stages of megakaryopoiesis, contrary to that observed in humans.²⁶

The bleeding phenotype of F2-II4 was much more severe than that of the affected members of the family F1 (ISTH BAT score 16 vs. 1). An additional bleeding disorder

(affecting coagulation, von Willebrand factor or fibrinolysis) was ruled out. A combination of genetic, environmental and lifestyle factors may interfere in the genotype-phenotype relationship. This difference is not likely to be directly related to platelet count or patient age; however, this could be explained in part by the sex of the patient. Indeed, the individual with a high bleeding score (F2-II4) predominantly suffered from gynecological and obstetrical bleeding. This may reflect the limitation of the ISTH BAT score to evaluate the bleeding risk in males who have not been challenged enough as compared to females.

In PTS, the platelet count seems to be as low as $20 \times 10^9/l$ early in life and subsequently increases to near or low normal levels.^{25,27} Similar to that shown in a previous report of *FLI1* variant carriers,⁷ the older patient in the F1 family exhibited a higher platelet count than the younger one. The platelet counts and the increased MPV of the affected members were consistent with that observed in most PTS cases and *FLI1* variant-associated thrombocytopenia patients.^{7,25} As noted in some PTS patients, the bleeding phenotype of patient F2-II4 was more severe than that expected with a mild thrombocytopenia, thereby suggesting associated abnormal platelet function.^{25,27} In the present study, the affected members exhibited an aggregation defect upon low dose ADP, collagen, and TRAP-6 stimulation, which is a hallmark of dense granule storage pool deficiency. Data concerning aggregation assays has varied widely in the literature. Breton-Gorius *et al.* have reported normal aggregation curves in PTS patients.²⁴ Regarding *FLI1* variant-associated thrombocytopenia, Stevenson *et al.* have reported reduced aggregation to collagen and ADP.⁸ Finally, in a murine model expressing a C-terminal truncated *Fli1* protein, aggregation tests revealed reduced ADP- and thrombin-induced aggregation.²⁸ These discrepancies could be in part due to differences regarding agonist concentrations or sources. Furthermore, storage pool diseases are known to be associated with variable aggregation profiles.²⁹

In the study herein, NGS-based techniques led to the identification of the *FLI1* variants. These strategies require careful interpretation as they lead to the identification of a high number of non-pathogenic variants. However, clinical phenotype and screening laboratory tests are not specific and often fail to yield a specific diagnosis. Identifying biomarkers could facilitate the diagnostic process of inherited platelet disorders. In this regard, platelet-specific expression of MYH10, whose silencing is required for the switch from mitosis to endomitosis during MK maturation,³⁰ has been shown to constitute a biomarker for the inherited platelet disorders associated with *FLI1* and *RUNX1* alterations.^{7,8,12} Platelet MYH10 expression is usually detected *via* western blot. This assay is complex and time-consuming, and the results must be carefully interpreted as control platelets exhibit low expression of MYH10. In this study, we developed a quantitative assay to detect MYH10 overexpression in *FLI1* variant carriers' platelets using intracellular flow cytometry. This test enabled rapid and accurate discrimination between the affected members and controls using only a small volume of PRP or whole blood.

α - and dense granule defects were identified as the main platelet defect in the affected members. It is important to study the mechanisms of this functional impairment, as bleeding diathesis may still occur in *FLI1*-associated thrombocytopenia patients with subnormal or normal

platelet counts.²⁷ We report that up to 29% of the patients' platelets displayed giant α -granules, which is a characteristic feature of PTS^{24,25} and have been previously reported in *FLI1* variant-associated thrombocytopenia,⁸ albeit in a much smaller proportion of platelets (4-15%). This discrepancy can be attributed to differences in the analysis methods. Contrary to classic TEM, FIB-SEM enables evaluation of the whole granule content of a platelet. In the present study, normal or even increased serum PAI-1 levels suggest normal α -granule content and release.³¹ Taken together, these results indicate that the vesicle trafficking or the α -granule proteins packaging but not the storage mechanisms may be impaired. Regarding dense granules, we demonstrated for the first time using electron microscopy (notably FIB-SEM), ATP secretion, mepacrine uptake and release, CD63 expression upon stimulation and serotonin measurement, that dense granules were nearly absent in the carriers' platelets and that empty dense granule membrane structures were rarely detected. This suggests that the platelet dense granule deficiency is due to an impaired biogenesis. A previous study on Jacobsen syndrome, a variant of PTS, has reported a dense granule storage pool deficiency in six patients³² using whole mount electron microscopy, which only allows the evaluation of the electron opaque dense granules content. More recently, Stockley *et al.* showed that the platelet of *FLI1* variants carriers exhibited an ATP secretion defect⁷ but have not evaluated the dense granule content. Interestingly, in a recent study reporting ChIP-seq data in murine MK,³³ FLI1 was shown to interact with *HPS4* and *RAB27B* genes, which are known regulators of dense granules biogenesis.^{34,35} Autophagosome-like structures were noted in 3% of platelets from one affected member. Autophagy is known to be important in both megakaryopoiesis³⁶ and platelet function.³⁷ This observation thus suggests that autophagy may play a role in the pathophysiology of *FLI1*-associated thrombocytopenia. Glycogen accumulations were noted in the platelets of most of the affected members. The significance of this abnormal feature is unclear, although it may suggest that FLI1 plays a role in the regulation of platelet intracellular metabolic processes.

The p.R337Q and p.K345E variants are located within the ETS-domain, similar to the previously reported variants.^{7,8} The pathogenic effect of these novel *FLI1* variants was confirmed by the significant reduction in transcriptional activity, as with all other *FLI1* variants reported in the literature.^{7,8} Furthermore, we show that both p.R337Q and p.K345E variants displayed significantly altered cellular localization with a reduced nuclear accumulation. In a previous study based on directed mutagenesis, these residues were found to be important for the DNA-bound conformation of FLI1 and its nuclear accumulation.³⁸ Additionally, the p.R337A variant abolished ETS DNA-

binding activity.³⁸ Overall, these results suggest that both nuclear accumulation and DNA-binding capacity could interfere with FLI1 regulation of MK-specific genes. Other mechanisms may also cause this impairment, such as abnormal recruitment of co-regulators or altered activation of histone deacetylases or acetylases.³⁹

In vitro, we noted a marked diminution of mature CD41^{hi}CD42a^{hi} MKs, along with an increase in CD41^{low}CD42a⁻ and CD41⁻CD42⁻ cells among *FLI1* variant carriers. Even if we cannot formally exclude an impaired expression of CD41 and CD42a by FLI1 variants, the reduced percentage of high-ploidy cells ($\geq 8n$) confirmed the MK differentiation defect. Furthermore, the platelet from the *FLI1* variant carriers displayed normal expression of CD42a (*data not shown*) and CD41. Consistent with our findings, data from PTS patients has shown that the MK transition from CD42a⁻ to CD42a⁺ was especially sensitive to a reduction in FLI1 dosage.²⁶ In a murine model with complete *Fli1* deficiency, the authors reported that megakaryocytic progenitors displayed an early blockage in MK differentiation.⁴⁰ Additionally, in a murine model expressing a truncated *Fli1* protein lacking the C-terminal transcriptional activation domain, bone marrow cell analysis revealed a 2-fold increase in CD34⁺CD41⁺CD42⁻ cells.²⁸

The study herein provides new insights into the mechanisms that drive *FLI1*-associated thrombocytopenia and highlights its function in normal and pathologic megakaryopoiesis and in platelet granule biogenesis. TEM and FIB-SEM enabled a more detailed description of the ultrastructural features associated with this disease, demonstrating that dense granules were nearly absent in the carriers' platelets. This work also shows that the increased expression of MYH10 in the platelets of *FLI1* variant carriers was efficiently detected by flow cytometry.

Funding

The study was funded by the "Fondation pour la Recherche Médicale" (grant to PS: FDM20150633607) and by the French Foundation for Rare Diseases (grant WES 2012-2004). The authors acknowledge Christian Cambillau (Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 7257, Centre National de la Recherche Scientifique, Marseille, France) for the structural modelling, the members of the French reference center on hereditary platelet disorders (CRPP) for clinical analysis of patients, Monique Verdier, Odile Georgelin and Jean-Yves Rinckel for experimental assistance, Marc Delépine and Céline Baulard for genetic study and Sandra Moore and Delphine Bastelica for revision of the paper. Bioinformatic analysis of the exome data were performed using the C2BIG computing cluster funded by the Region Ile de France, the Pierre and Marie Curie University and the ICAN Institute for Cardiometaolism and Nutrition (ANR-10-IAHU-05). The authors would also like to thank the patients and their families.

References

- Lambert MP. Update on the inherited platelet disorders. *Curr Opin Hematol.* 2015;22(5):460-466.
- Favier R, Raslova H. Progress in understanding the diagnosis and molecular genetics of macrothrombocytopenias. *Br J Haematol.* 2015;170(5):626-639.
- Songdej N, Rao AK. Inherited platelet dysfunction and hematopoietic transcription factor mutations. *Platelets.* 2017;28(1):20-26.
- Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet.* 2000; 24(3):266-270.
- Freson K, Devriendt K, Matthijs G, et al. Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood.* 2001; 98(1):85-92.
- Kitamura K, Okuno Y, Yoshida K, et al. Functional characterization of a novel GFI1B mutation causing congenital macrothrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2016;14(7):1462-1469.
- Stockley J, Morgan NV, Bem D, et al. Enrichment of FLI1 and RUNX1 mutations in families with excessive bleeding and

- platelet dense granule secretion defects. *Blood*. 2013;122(25):4090-4093.
8. Stevenson WS, Rabbolini DJ, Beutler L, et al. Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in FLI1. *Blood*. 2015; 126(17):2027-2030.
 9. Stevenson WS, Morel-Kopp M-C, Chen Q, et al. GFI1B mutation causes a bleeding disorder with abnormal platelet function. *J Thromb Haemost*. 2013;11(11):2039-2047.
 10. Monteferrario D, Bolar NA, Marneth AE, et al. A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *N Engl J Med*. 2014;370(3):245-253.
 11. White JG. Electron opaque structures in human platelets: which are or are not dense bodies? *Platelets*. 2008;19(6):455-466.
 12. Antony-Debré I, Bluteau D, Itzykson R, et al. MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations. *Blood*. 2012;120(13):2719-2722.
 13. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(11):827-837.
 14. Lemarchandel V, Ghysdael J, Mignotte V, Rahuel C, Roméo PH. GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. *Mol Cell Biol*. 1993; 13(1):668-676.
 15. Zhang L, Lemarchandel V, Romeo PH, Ben-David Y, Greer P, Bernstein A. The Fli-1 proto-oncogene, involved in erythroleukemia and Ewing's sarcoma, encodes a transcriptional activator with DNA-binding specificities distinct from other Ets family members. *Oncogene*. 1993;8(6):1621-1630.
 16. Wang X, Crispino JD, Letting DL, Nakazawa M, Poncz M, Blobel GA. Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *EMBO J*. 2002; 21(19):5225-5234.
 17. Hashimoto Y, Ware J. Identification of essential GATA and Ets binding motifs within the promoter of the platelet glycoprotein Ib alpha gene. *J Biol Chem*. 1995;270(41):24532-24539.
 18. Bastian LS, Kwiatkowski BA, Breininger J, Danner S, Roth G. Regulation of the megakaryocytic glycoprotein IX promoter by the oncogenic Ets transcription factor Fli-1. *Blood*. 1999;93(8):2637-2644.
 19. Deveaux S, Filipe A, Lemarchandel V, Ghysdael J, Roméo PH, Mignotte V. Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes. *Blood*. 1996; 87(11):4678-4685.
 20. Furihata K, Kunicki TJ. Characterization of human glycoprotein VI gene 5' regulatory and promoter regions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(10):1733-1739.
 21. Watson DK, Smyth FE, Thompson DM, et al. The ERGB/Fli-1 gene: isolation and characterization of a new member of the family of human ETS transcription factors. *Cell Growth Differ*. 1992;3(10):705-713.
 22. Seth A, Robinson L, Thompson DM, Watson DK, Papas TS. Transactivation of GATA-1 promoter with ETS1, ETS2 and ERGB/Hu-FLI-1 proteins: stabilization of the ETS1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody. *Oncogene*. 1993;8(7):1783-1790.
 23. Pang L, Xue H-H, Szalai G, et al. Maturation stage-specific regulation of megakaryopoiesis by pointed-domain Ets proteins. *Blood*. 2006;108(7):2198-2206.
 24. Breton-Gorius J, Favier R, Guichard J, et al. A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood*. 1995;85(7):1805-1814.
 25. Favier R, Jondeau K, Boutard P, et al. Paris-Trousseau syndrome: clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thromb Haemost*. 2003;90(5):893-897.
 26. Raslova H, Komura E, Le Couédic JP, et al. FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *J Clin Invest*. 2004;114(1):77-84.
 27. Grossfeld PD, Mattina T, Lai Z, et al. The 11q terminal deletion disorder: a prospective study of 110 cases. *Am J Med Genet A*. 2004;129A(1):51-61.
 28. Moussa O, LaRue AC, Abangan RS, et al. Thrombocytopenia in mice lacking the carboxy-terminal regulatory domain of the Ets transcription factor Fli1. *Mol Cell Biol*. 2010;30(21):5194-5206.
 29. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Sixma JJ. Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood*. 1987; 70(3):620-623.
 30. Lordier L, Bluteau D, Jilil A, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun*. 2012;3:717.
 31. Booth NA, Simpson AJ, Croll A, Bennett B, MacGregor IR. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br J Haematol*. 1988;70(3):327-333.
 32. White JG. Platelet storage pool deficiency in Jacobsen syndrome. *Platelets*. 2007; 18(7):522-527.
 33. Zang C, Luyten A, Chen J, Liu XS, Shivdasani RA. NF-E2, FLI1 and RUNX1 collaborate at areas of dynamic chromatin to activate transcription in mature mouse megakaryocytes. *Sci Rep*. 2016;6:30255.
 34. Suzuki T, Li W, Zhang Q, et al. Hermansky-Pudlak syndrome is caused by mutations in HPS4, the human homolog of the mouse light-ear gene. *Nat Genet*. 2002;30(3):321-324.
 35. Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS, Seabra MC. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(14):5872-5877.
 36. Cao Y, Cai J, Zhang S, et al. Loss of autophagy leads to failure in megakaryopoiesis, megakaryocyte differentiation, and thrombopoiesis in mice. *Exp Hematol*. 2015;43(6):488-494.
 37. Feng W, Chang C, Luo D, et al. Dissection of autophagy in human platelets. *Autophagy*. 2014;10(4):642-651.
 38. Hu W, Philips AS, Kwok JC, Eisbacher M, Chong BH. Identification of nuclear import and export signals within Fli-1: roles of the nuclear import signals in Fli-1-dependent activation of megakaryocyte-specific promoters. *Mol Cell Biol*. 2005;25(8):3087-3108.
 39. Sakimura R, Tanaka K, Nakatani F, et al. Antitumor effects of histone deacetylase inhibitor on Ewing's family tumors. *Int J Cancer*. 2005;116(5):784-792.
 40. Hart A, Melet F, Grossfeld P, et al. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity*. 2000; 13(2):167-177.

Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: ultrastructural and pathogenic features

Paul Saultier,¹ Léa Vidal,¹ Matthias Canault,¹ Denis Bernot,¹ Céline Falaise,² Catherine Pouymayou,² Jean-Claude Bordet,³ Noémie Saut,^{1,2} Agathe Rostan,^{1,2} Véronique Baccini,^{1,2} Franck Peiretti,¹ Marie Favier,¹ Pauline Lucca,^{4,5,6} Jean-François Deleuze,⁷ Robert Olaso,⁷ Anne Boland,⁷ Pierre Emmanuel Morange,^{1,2} Christian Gachet,^{8,9,10,11} Fabrice Malergue,¹² Sixtine Fauré,¹ Anita Eckly,^{8,9,10,11} David-Alexandre Trégouët,^{4,5,6} Marjorie Poggi^{1*} and Marie-Christine Alessi^{1,2*}

¹Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille; ²APHM, CHU Timone, French Reference Center on Inherited Platelet Disorders, Marseille; ³Unité d'Hémostase Biologique, Bron; ⁴ICAN Institute for Cardiometabolism and Nutrition, Paris; ⁵Inserm, UMR_S 1166, Team Genomics and Pathophysiology of Cardiovascular Diseases, Paris; ⁶Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ Paris 06), UMR_S 1166; ⁷Centre National de Génotypage, Institut de Génétique, CEA, Evry; ⁸UMR_S949 INSERM, Strasbourg; ⁹Etablissement Français du Sang (EFS)-Alsace, Strasbourg; ¹⁰Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS); ¹¹Université de Strasbourg and ¹²Beckman Coulter Immunotech, Life Sciences Global Assay and Applications Development, Marseille, France

*MP and M-CA contributed equally to this work

©2017 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2016.153577

Received: September 6, 2016.

Accepted: February 24, 2017.

Pre-published: March 2, 2017.

Correspondence: paul.saultier@gmail.com

SUPPLEMENTARY MATERIAL

SUPPLEMENTARY METHODS

High-throughput gene sequencing

Two high-throughput sequencing methods were used to identify candidate variants. Whole Exome Sequencing was performed at the Centre National de Génotypage platform (CNG, Evry, France) on an Illumina HiSeq2000 instrument using the Agilent SureSelect Human All Exon V5 kit. Sequenced reads data were mapped to the human genome reference sequence hg19 using the BWA software.¹ Sequenced data with a number of reads (i.e. depth) lower than 20 were excluded and duplicates were removed using Picard tools (broadinstitute.github.io/picard/). Variant calling was performed using the GATK suite.^{2,9} Detected variants were annotated using the SNPEFF (<http://snpeff.sourceforge.net/>) and SNPSift 0 (<http://snpeff.sourceforge.net/SnpSift.html>) programs. For the gene panel sequencing, the DNA has been enriched for the exons of 308 genes of interest (list available upon request) using Haloplex technology (Agilent technologies). It was then sequenced on a NextSeq500 sequencer (Illumina) by the 2-channel SBS technology, using a mid Output kit. The quality of the sequencing was checked with the "Sequencing analysis viewer 1.8.37" (Illumina). The sequences were then aligned with BWA-MEM (Hg19 version of the genome). Variant calling was done with GATK v3.3.0, and annotated with ANNOVAR³ using VarAFT (<http://varaft.eu/>). We applied the following filters for variant analysis: SNP with frequency <1% (based on ExAC, 1000G and ESP6500 data), located in coding regions or splice junctions, and called deleterious by diverse prediction algorithms (UMD Predictor,⁴ PROVEAN,⁵ Polyphen⁶). Sanger sequencing using a 3500 XL sequencer confirmed the variants.

Structural model of FLI1-DNA interactions

The positions of the variant residues were mapped onto the structure of the FLI1 protein (NP_000432.1). Analysis was performed using modular visualization and modelling with Coot^{7,8} and PyMOL software (The PyMOL Molecular Graphics System; Version 1.5.0.4; Schrödinger LLC).

Platelet phenotyping

The mean platelet volume was analyzed with an optic method (ADVIA 120, Siemens). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared according to standard procedures. The platelet agonists were purchased from Helena Laboratories (ADP and arachidonic acid), Bio/Data Corporation (collagen), American Biochemical & Pharmaceuticals (TRAP-6) or Polypeptide group (TRAP-14) and were used at concentrations given in

Table 1 or Figure 2. Light transmission was recorded on an APACT 4004 optical aggregation system (Labor Bio-Medical Technologies GmbH). For platelet surface glycoprotein expression assay, PRP were incubated in presence or not of the platelet agonist TRAP-14 with the antibodies anti- α IIb β 3-PC5 (clone P2; Beckman Coulter), anti-GPIb α -PC5 (clone HIP1; BD Biosciences), anti-CD63-FITC (clone CLBgran/12; Beckman Coulter) and anti-P-selectin-PC5 (clone CLBThromb/6; Beckman Coulter) for 30 min at 20°C. Scatter signals and fluorescence intensity were analyzed using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter).

PRP serotonin level

For PRP serotonin measurement, the PRP was prepared according standard procedures. For the serotonin measurement, the PRP was frozen at -20 °C and unfrozen, in order to disrupt the platelet membranes. The measurement of serotonin was performed using high performance liquid chromatography with the following parameters: isocratic flow 0.95 ml/min, sensor potential 0.5V, sensitivity 10nA, column temperature 30 $\pm$ 1 °C, analysis time 10 min, injection volume 20 μ l, serotonin retention time 5.2 min, eluant retention time 6.8 min. An automated platelet count of the PRP was performed prior the serotonin measurement in order to normalize the serotonin level to the platelet count. The plasma serotonin level was considered negligible as compared to the intraplatelet serotonin content^{9,10}. The platelet serotonin level was calculated using the following formula: *platelet serotonin level (μ g/ 10^9 platelets) = PRP serotonin level (ng/ml) / PRP platelet count ($\times 10^9$ platelets).*

ATP secretion assay

The platelet ATP secretion was assessed in diluted PRP using the ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit (FF2000; Promega) according to the manufacturer's instructions. The luminescence was measured using a VICTOR X4 luminometer (Perkin Elmer). The PRP was prepared according to standard procedures and diluted to obtain a platelet concentration of 10^7 platelet / ml. The ATP concentration was measured before and after stimulation with 100 μ M TRAP-6 (American Biochemical & Pharmaceuticals).

Mepacrine uptake and release assay

PRP was prepared according to standard procedures and diluted to obtain a platelet concentration of 10^7 platelet / ml. The diluted PRP was incubated with 1.1 or 2.4 μ M mepacrine (Q 3251, Sigma-Aldrich) or in absence of mepacrine for 30 min at 37 °C. Then, the platelets were stimulated or not with 40 μ M TRAP-14 for one minute and immediately analyzed using a Navios Cytometer (Beckman Coulter). The platelets mepacrine uptake was defined as MFI ratio of platelets incubated with mepacrine to platelets incubated without mepacrine and the platelet mepacrine release was defined as the MFI ratio of resting platelets to stimulated platelets as previously described.¹¹

Flow-cytometric quantification of MYH10 expression (whole blood-based assay)

A volume of 50 μ L Fresh EDTA whole blood was treated with a modified procedure of the PerFix EXPOSE kit (Beckman Coulter, For Research Use Only (RUO), not for use in diagnostic procedures). Briefly, the blood was fixed in 4% formaldehyde (buffer R1) for 10 min, then permeabilized and red blood cells lysed (500 μ L buffer R2) for 5 min, centrifuged at 1000G for 5 min. The cell pellet was suspended in 200 μ L staining buffer (R3), and a 20 μ L fraction was labeled with rabbit anti-MYH10 antibody at 10 μ g/mL final concentration (Cell Signaling; #3404 ; RUO) for one hour. After a washing step with 2 mL PBS-BSA 0.2%, the platelets were incubated with goat anti-rabbit PE-labeled secondary antibody 1/200 (Southern Biotech, ref 4050-09S ; RUO) for 30 min in PBS-BSA 0.2%. After another washing step in wash buffer (R4), the cell pellet was suspended in 0.5 mL buffer R4, and data were acquired using a Navios Cytometer (Beckman Coulter), at low speed, and analyzed with FlowJo software (TreeStar).

Western blot assay

To isolate nuclear and cytoplasmic subcellular fractions from protein lysate, GripTite 293 MSR cells (genetically engineered Human Embryonic Kidney 293 cell line, Thermofisher Scientific) were lysed 48h after transfection (PolyJet In Vitro DNA Transfection Reagent, SignaGen Laboratories). Fractionation was performed using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Pierce). Total platelet proteins (washed platelets) and proteins (30 μ g) from the subcellular fractions were separated on NuPAGE gels with MES SDS running buffer (Thermofisher Scientific) and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane. The membranes were blocked and labeled overnight with the following primary antibodies: rabbit anti-FLI1 (Santa-Cruz Biotechnology; sc-356), rabbit anti-HA (Santa-Cruz Biotechnology; sc-805), rabbit anti-MYH10 (Santa-Cruz Biotechnology; sc-376942), rabbit anti-lamin-B1 (Abcam; ab16048), mouse anti-GAPDH (Millipore; MAB374) and rabbit anti-actin (Abcam, ab3280) primary antibodies. The membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody (Biorad). Chemiluminescence signals were obtained using Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent, detected Using CCD Imager Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare) and quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

Site-directed mutagenesis

Directed mutagenesis of the human expression plasmid pCMV3-FLI1-HA (Sino Biological Inc.) was performed using the GeneArt Site-directed Mutagenesis System kit (Thermofischer Scientific) according to the manufacturer instructions. The primer sequences are available upon request. The mutagenesis efficiency was confirmed by sequencing (Beckman Coulter Genomics).

Luciferase reporter assay

Transcriptional regulatory properties of wild-type and variant FLI1 were analyzed using E743tk80Luc plasmid containing the luciferase gene driven by an enhancer / promoter cassette composed of three tandem copies of the Ets Binding Site (E74-binding sites AACCGGAAGTA, found in the *Drosophila* E74 gene promoter) inserted 5' of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter, as previously described.¹² This plasmid was a gift from J. Ghysdael.¹³ GripTite 293 MSR Cells were transfected with the indicated reporter gene constructs (166 ng), the expression plasmid (333 ng) and the pGL473-hRLuc (50 ng) to normalize for transfection efficiency. The luciferase activity was assessed 48h after transfection (Dual-Luciferase Reporter Assay system, Promega).

Epifluorescence microscopy

Forty-eight hours after transfection, H9C2 cells (cell line derived from embryonic BD1X rat heart tissue; ATCC CRL-1446) were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After washing, the cells were permeabilized with 0.3% Triton X100 in PBS for 5 min, blocked using 3% BSA PBS and incubated overnight with rabbit anti-FLI1 antibody (Santa-Cruz Biotechnology; sc-356). Next, the cells were incubated with anti-rabbit Alexa-488-labeled secondary antibody (Abcam; ab150077) and DAPI staining was performed. Finally, after washing steps, the slides were mounted with Fluoromount and examined using an AXIO Imager M1 microscope (Carl Zeiss, Germany).

***In vitro* megakaryocyte differentiation and proplatelet formation**

After Ficoll separation, circulating CD34⁺ cells were purified using positive selection on magnetic beads (Miltenyi-Biotec SAS) and cultured as previously reported¹² in serum-free medium supplemented with 20 ng/mL thrombopoietin (TPO) and 25 ng/mL stem cell factor (SCF) (Thermofisher Scientific). For MK differentiation, cells were incubated at day 11 of culture with anti-CD41-APC and anti-CD42a-PE antibodies (BD Biosciences) and Hoechst-33342 (Sigma-Aldrich). The cells were then analyzed using a Navios cytometer (Beckman Coulter). For proplatelet (PPT) formation, cells were seeded on fibrinogen-coated (20µg/ml) culture slides at day 11 and examined on days 12-13 of culture among 300-500 total cells. PPT-forming MKs were identified as exhibiting cytoplasmic extensions with constriction areas.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25(14):1754–1760.
2. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297–1303.

3. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164.
4. Frédéric MY, Lalande M, Boileau C, et al. UMD-predictor, a new prediction tool for nucleotide substitution pathogenicity -- application to four genes: FBN1, FBN2, TGFB1, and TGFB2. *Hum Mutat.* 2009;30(6):952–959.
5. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS One.* 2012;7(10):e46688.
6. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248–249.
7. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004;60:2126–2132.
8. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66:486–501.
9. Pletscher A. Platelets as models for monoaminergic neurons. *Essays Neurochem Neuropharmacol.* 1978;3:49–101.
10. Rudnick G, Fishkes H, Nelson PJ, Schuldiner S. Evidence for two distinct serotonin transport systems in platelets. *J Biol Chem.* 1980;255(8):3638–3641.
11. Cai H, Mullier F, Frotscher B, et al. Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake/Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):282–291.
12. Poggi M, Canault M, Favier M, et al. Germline variants in ETV6 underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34+ progenitors. *Haematologica.* 2016;
13. Lopez RG, Carron C, Ghysdael J. v-SRC specifically regulates the nucleo-cytoplasmic delocalization of the major isoform of TEL (ETV6). *J Biol Chem.* 2003;278(42):41316–41325.

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Supplementary Figure 1: Expression of MYH10 MFI as a function of mean platelet volume

Intraplatelet flow cytometric quantification of MYH10 in the platelets from 13 control individuals (MPV range 7.2-11.4 fl) and two FLI1 variants carriers F1-II2 and F1-III1 (MPV 10.7 and 13 fl) in whole-blood. The MYH10 MFI was expressed as a function of the mean platelet volume. A linear regression analysis showed a significant correlation between the MYH10 MFI and the mean platelet volume among control individuals (black dots). The control individuals were selected so that a large MPV range was represented among individuals explored in the Bleeding and Thrombosis Exploration Center (University Hospital of Marseille) for a hemostatic defect without thrombocytopenia or platelet dysfunction.

Supplementary Figure 2: Transmission electron microscopic quantification of dense granules

Quantification of dense granules per platelet section using transmission electron microscopy in two FLI1 variants carriers (F1-II2 and F2-II4). Values are shown as the mean $\pm$ SEM as quantified for ≥ 100 randomly selected platelets; **** $p < 0.0001$ vs. controls (Mann-Whitney test).

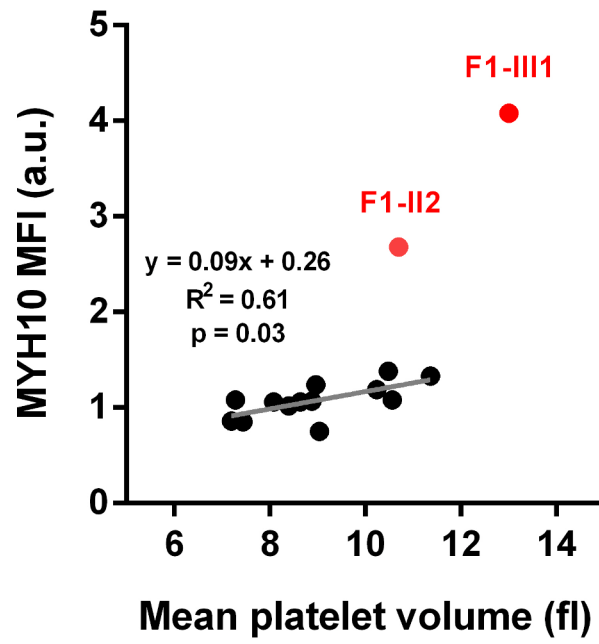
SUPPLEMENTARY VIDEOS LEGENDS

Supplementary Video 1: FIB/SEM acquisition of washed platelets suspension from a healthy control

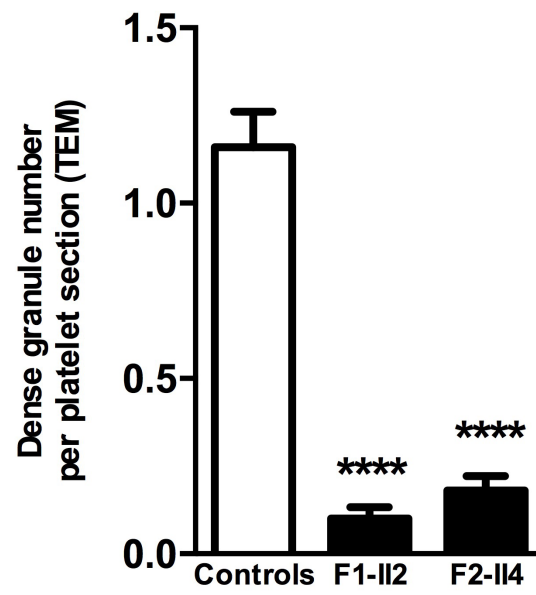
Resin embedded washed platelets from a healthy control were observed using FIB/SEM. The arrows indicate dense granules. The arrowheads indicate empty or abnormal granules.

Supplementary Video 2: FIB/SEM acquisition of washed platelets suspension from F1-II2 (p.R337Q FLI1 variant carrier)

Resin embedded washed platelets from a FLI1 variant carrier (F1-II2; p.R337Q) were observed using FIB/SEM. The arrows indicate dense granules. The arrowheads indicate empty or abnormal granules.



Supplementary Figure 1: Expression of MYH10 MFI as a function of mean platelet volume



Supplementary Figure 2: Transmission electron microscopic quantification of dense granules

Discussion

Cette étude a permis l'identification de deux nouveaux variants constitutionnels de *FLI1* chez des patients issus de deux familles non apparentées présentant une thrombopénie avec une diathèse hémorragique marquée chez l'un d'entre eux (Figure 13).

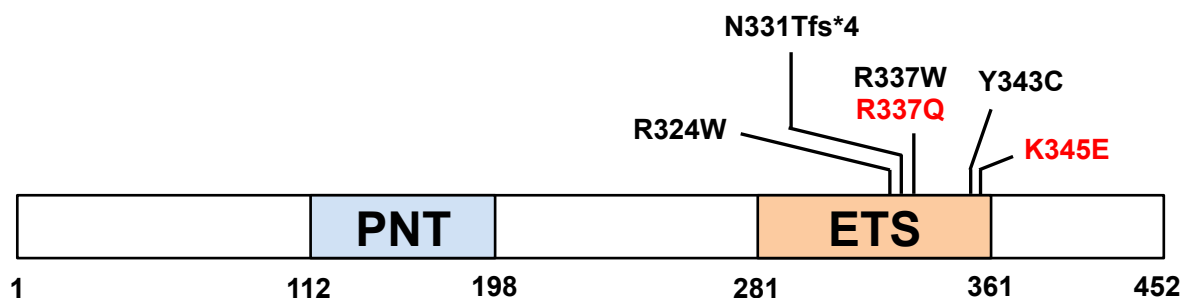


Figure 13 : Représentation schématique de la protéine FLI1. Le schéma met en évidence les domaines fonctionnels de la protéine. Les différents variants constitutionnels rapportés dans la littérature sont annotés en noir. Les variants identifiés au cours de ce travail par notre équipe sont indiqués en rouge. PNT: pointed domain; ETS: E26 transformation specific domain.

Ces variants *FLI1* ont été associés *in vitro* à un défaut de différenciation mégacaryocytaire, de formation des proplaquettes et de la localisation nucléaire de la protéine. Cette étude fournit donc de nouvelles données sur la physiopathologie de la thrombopénie associée à *FLI1*. Nous avons montré que le nombre de granules denses était fortement réduit dans les plaquettes des patients atteints. De plus, nous avons montré que la cytométrie en flux intraplaquettaire pouvait efficacement détecter le biomarqueur MYH10 chez les porteurs de variants *FLI1*, ce qui pourrait constituer une aide dans le diagnostic moléculaire des thrombopénies constitutionnelles.

Mode de transmission de la thrombopénie associée aux variants *FLI1*

Les membres atteints portaient des variants à l'état hétérozygote avec une transmission de la maladie sur un mode dominant dans la famille F1. Le caractère

dominant des variants *FLI1* à l'origine des anomalies p.Asn331Thrfs*4, p.Arg337Trp et p.Tyr343Cys est rapporté par la publication de Stockley *et al.* (Stockley *et al.*, 2013). Au contraire, la publication de Stevenson *et al.* décrit une thrombopénie héréditaire causée par un variant *FLI1*, à l'origine de la substitution p.Arg324Trp, de transmission récessive. Nous émettons l'hypothèse que le mode de transmission pourrait dépendre du degré d'altération fonctionnelle de la protéine, comme suggéré par l'activité transcriptionnelle modérément réduite du variant p.Arg324Trp, associée à une transmission récessive (Stevenson *et al.*, 2015). Étonnamment, dans les modèles murins d'inactivation complète de *Fli1*, les souris hétérozygotes sont phénotypiquement indiscernables des souris sauvages. Seules les souris qui portent les variants de manière bi-alléliques présentent une thrombopénie. Les mécanismes qui sous-tendent cette différence ne sont pas établis. Chez l'homme, une équipe a montré par des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence de pré-ARNm et de *single cell RT-PCR* que l'expression de *FLI1* était monoallélique aux stades précoces de la mégacaryopoïèse (Raslova *et al.*, 2004). Cela a pour conséquence l'abolition complète de l'expression du gène *FLI1* dans une fraction des mégacaryocytes des patients porteurs d'un défaut monoallélique de *FLI1*. Ce phénomène d'expression monoallélique transitoire pourrait rendre compte de la différence entre l'homme et les modèles murins en terme de phénotype chez les hétérozygotes. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en étudiant l'expression allélique de *FLI1* à différents temps de différenciation mégacaryocytaire chez la souris. Ce phénomène, également observé dans la thrombopénie constitutionnelle associée à *RUNX1* (Matheny *et al.*, 2007), constitue une limite des modèles murins dans l'étude du syndrome Paris-Trousseau et de la thrombopénie associée aux variants *FLI1*.

MYH10 : un biomarqueur plaquettaire des altérations de FLI1

Des techniques de séquençage à haut débit ont permis l'identification des variants *FLI1*. Les résultats de ce type de stratégies, en particulier de l'exome sequencing, sont d'interprétation difficile car elles conduisent à l'identification d'un nombre élevé de variants non pathogènes. Par ailleurs, le phénotype clinique et les tests de routine réalisés aux laboratoires peuvent manquer de spécificité et peuvent n'avoir que peu de valeur pour établir un diagnostic. L'identification de biomarqueurs pourrait faciliter le processus diagnostique des troubles plaquettaires héréditaires. À cet égard, l'expression plaquettaire spécifique de MYH10, dont l'extinction est requise pour passer de la mitose à l'endomitose durant la maturation en mégacaryocyte, constitue un biomarqueur des troubles plaquettaires héréditaires associés aux altérations *FLI1* et *RUNX1* (Antony-Debré *et al.*, 2012). L'expression de MYH10 plaquettaire est habituellement détectée par western blot qui est un test relativement complexe et long à réaliser. Dans cette étude, nous avons développé un test quantitatif pour détecter la surexpression de MYH10 dans les plaquettes des porteurs de variants *FLI1* en utilisant la cytométrie en flux intracellulaire. Ce test a permis une discrimination rapide et précise entre les membres atteints et les témoins. Les performances de ce test doivent maintenant être testées dans une cohorte de patients d'effectif plus important ce qui nécessiterait *a minima* une collaboration à niveau national étant donné la rareté des anomalies *FLI1* et *RUNX1* qui représentent moins de 5% des thrombopénies constitutionnelles (Fiore, 2017).

FLI1 : un facteur de transcription impliqué dans la biogénèse des granules plaquettaires

Les défauts des granules alpha et denses ont été identifiés comme le principal défaut plaquettaire chez les membres affectés. Il est important d'étudier les mécanismes de

ces défauts car il est probable qu'ils soient à l'origine de la diathèse hémorragique significative observée chez certains patients avec compte plaquettaire normal ou modérément abaissé (Saultier *et al.*, 2017; Stockley *et al.*, 2013). Nous rapportons que presque un tiers des plaquettes des patients présentaient des granules alpha géants. Il s'agit d'une caractéristique connue du syndrome Paris-Trousseau et de la thrombopénie associée aux variants *FLI1*, mais qui avait été précédemment été décrite comme concernant une proportion beaucoup plus faible de plaquettes (4-15%) (Breton-Gorius *et al.*, 1995; Favier *et al.*, 2003; Stevenson *et al.*, 2015). Contrairement à la microscopie électronique à transmission classique utilisée dans les études précédentes, la technique *focused ion beam / scanning electron microscopy* (FIB/SEM) permet d'évaluer le contenu total en granules d'une plaquette grâce à l'analyse de l'intégralité de son volume. Ces résultats indiquent que le trafic vésiculaire ou le packaging des protéines alpha-granules pourrait être altérés.

Nous avons montré pour la première fois une quasi absence de granules denses dans les plaquettes des patients atteints de thrombopénies constitutionnelles associée aux variants constitutionnels de *FLI1*. Pour cela, un faisceau de techniques a été utilisé : microscopie électronique (notamment FIB / SEM), étude de la sécrétion d'adénosine triphosphate, étude de l'absorption et la libération de la mépacrine, étude de l'expression de CD63 lors de la stimulation et la mesure de la sérotonine. Par ailleurs, des structures membranaires pouvant correspondre à des granules denses vides de contenu n'ont été que rarement détectés. Ceci suggère que le déficit en granules denses des plaquettes est due à un défaut de leur biogenèse. De manière intéressante, dans une étude récente chez la souris rapportant des données de ChIP-seq dans le mégacaryocyte murin (Zang *et al.*, 2016) a montré que *FLI1* interagissait avec les gènes *HPS4* et *RAB27B*, qui codent des régulateurs connus de

la biogénèse des granules denses (Suzuki *et al.*, 2002; Tolmachova *et al.*, 2007). La biogénèse des granules denses pourrait être étudiée dans les modèles murins d'inactivation de *Fli1*. Il serait également possible de développer des lignées cellulaires mégacaryocytaires avec délétion hétérozygote de *FLI1* ou remplacement d'un allèle *FLI1* wild-type par un allèle muté grâce à des techniques d'édition du génome comme CRISPR/Cas9. La lignée cellulaire mégacaryocytaire choisie pourrait avantageusement être la lignée MEG-01 qui a été rapportée comme un modèle utile pour étudier la biogénèse des granules denses (Ambrosio *et al.*, 2012). Différentes approches peuvent être proposées. Il est possible de suivre la biogénèse des granules en imagerie. Pour cela, la microscopie électronique et la microscopie confocale semblent avoir le potentiel d'apporter des données intéressantes avec des possibilités de marquage des structures de la voie des granules denses à différentes étapes de maturation en ciblant des protéines spécifiques comme CD63, mépacrine, LAMP2, MRP4, RAB32 et ou RAB38. La mépacrine marque par exemple d'autant plus intensément les granules denses qu'ils sont matures (Reddington *et al.*, 1987). Des protéines de la famille Rab, RAB32 et RAB38, sont à l'opposé, majoritairement présentes au niveau des granules denses immatures (Ambrosio *et al.*, 2012). La microscopie confocale peut être utilisée sur cellules vivantes, offrant la possibilité d'étudier la formation des granules denses de manière dynamique. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inactivation de *FLI1* sur l'expression des protéines déjà connues pour leur rôle dans la biogénèse des granules denses. Il serait aussi possible d'appliquer des méthodes d'étude sans *a priori* des conséquences de l'inactivation de *FLI1* sur le transcriptome par RNA-seq. Cette dernière approche pourrait permettre d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la biogénèse des granules denses.

Conclusion

La présente étude fournit de nouvelles informations sur les mécanismes qui sous-tendent la thrombopénie associée aux variants *FLI1*. Cette étude met en valeur le rôle de *FLI1* sa fonction dans la mégacaryopoïèse normale et pathologique et dans la biogenèse des granules plaquettaires.

PARTIE 2

Thrombopénie constitutionnelle associée aux variants du gène *ETV6*

Etude 1 :

Des variants constitutionnels d'*ETV6* sont à l'origine d'une diminution de la production plaquettaire, d'une dysfonction plaquettaire et d'une augmentation du nombre de cellules CD34⁺ circulantes

Contexte scientifique

Certains variants génétiques en cause dans les thrombopénies constitutionnelles peuvent être associés à une prédisposition aux hémopathies malignes. Il s'agit des variants du gène *RUNX1* (Ganly *et al.*, 2004; Schlegelberger et Heller, 2017; Song *et al.*, 1999) et des variants de la région 5' non traduite (UTR) du gène *ANKRD26* (Averina *et al.*, 2017; Boutroux *et al.*, 2015; Ferrari *et al.*, 2017; Marconi *et al.*, 2017; Marquez *et al.*, 2014; Noris *et al.*, 2011, 2013; Pippucci *et al.*, 2011). Ces pathologies plaquettaires sont associées à une prédisposition à des hémopathies malignes principalement myéloïdes (leucémies aiguës myéloblastiques, syndromes myélodysplasiques).

ETV6 est un gène suppresseur de tumeur. De nombreuses altérations génomiques somatiques impliquant *ETV6* ont été décrites chez l'homme dans des prélèvements de cancers hématologiques et non hématologiques. Ces altérations sont des anomalies chromosomiques, comme la translocation t(12;21) dans la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant ou des variants ponctuels (De Braekeleer *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Chez la souris, l'inactivation spécifique d'*ETV6* dans les mégacaryocytes a démontré un rôle clé non redondant dans la différenciation de ces cellules et dans la formation des plaquettes.

Le travail présenté ci-après a contribué à impliquer des variants du gène *ETV6* en tant que nouvelle cause de thrombopénie constitutionnelle avec prédisposition aux hémopathies malignes.



EUROPEAN
HEMATOLOGY
ASSOCIATION



Ferrata Storti
Foundation

Haematologica 2017
Volume 102(2):282-294

Germline variants in *ETV6* underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34⁺ progenitors

Marjorie Poggi,^{1,*} Matthias Canault,^{1,*} Marie Favier,^{1,2,*} Ernest Turro,^{3,4,*} Paul Saultier,¹ Dorsaf Ghalloussi,¹ Veronique Baccini,¹ Lea Vidal,¹ Anna Mezzapesa,¹ Nadjim Chelghoum,⁵ Badreddine Mohand-Oumoussa,⁵ Céline Falaise,⁶ Rémi Favier,⁷ Willem H. Ouwehand,^{3,8} Mathieu Fiore,^{6,9} Franck Peiretti,¹ Pierre Emmanuel Morange,^{1,6} Noémie Saut,^{1,6} Denis Bernot,¹ Andreas Greinacher,¹⁰ NIHR BioResource,¹¹ Alan T. Nurden,¹² Paquita Nurden,^{6,12} Kathleen Freson,^{13,*} David-Alexandre Trégouët,^{14,15,16,*} Hana Raslova^{2*} and Marie-Christine Alessi^{1,6,*}

¹Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille, France; ²Inserm U1170, Gustave Roussy, University Paris Sud, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer 94805 Villejuif, France; ³Department of Haematology and National Health Service Blood & Transplant, Cambridge University, UK; ⁴MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK; ⁵Post-Genomic Platform of Pitié-Salpêtrière (P3S), Pierre and Marie Curie University, F-75013 Paris, France; ⁶French Reference Center on Inherited Platelet Disorders, Marseille, France; ⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France; ⁸Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK; ⁹Laboratoire d'hématologie, CHU de Bordeaux, Pessac, France; ¹⁰Institute for Immunology and Transfusion Medicine, University Medicine Greifswald, Germany; ¹¹NIHR BioResource - Rare Diseases, Cambridge University Hospitals, Cambridge Biomedical Campus, UK; ¹²LIRYC, Plateforme Technologique et d'Innovation Biomédicale, Hôpital Xavier Arnoz, Pessac, France; ¹³Department of Cardiovascular Sciences, Center for Molecular and Vascular Biology, KU Leuven, Belgium; ¹⁴ICAN Institute of Cardiometabolism and Nutrition, F-75013 Paris, France; ¹⁵Inserm, UMR_S 1166, Team Genomics and Pathophysiology of Cardiovascular Diseases, F-75013 Paris, France and ¹⁶Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ Paris 06), UMR_S 1166, F-75013 Paris, France

*MP, MC, MF, ET, KF, D-A T, HR and M-C A contributed equally to this work.

ABSTRACT

Variants in *ETV6*, which encodes a transcription repressor of the E26 transformation-specific family, have recently been reported to be responsible for inherited thrombocytopenia and hematologic malignancy. We sequenced the DNA from cases with unexplained dominant thrombocytopenia and identified six likely pathogenic variants in *ETV6*, of which five are novel. We observed low repressive activity of all tested *ETV6* variants, and variants located in the E26 transformation-specific binding domain (encoding p.A377T, p.Y401N) led to reduced binding to corepressors. We also observed a large expansion of megakaryocyte colony-forming units derived from variant carriers and reduced proplatelet formation with abnormal cytoskeletal organization. The defect in proplatelet formation was also observed in control CD34⁺ cell-derived megakaryocytes transduced with lentiviral particles encoding mutant *ETV6*. Reduced expression levels of key regulators of the actin cytoskeleton CDC42 and RHOA were measured. Moreover, changes in the actin structures are typically accompanied by a rounder platelet shape with a highly heterogeneous size, decreased platelet arachidonic response, and spreading and retarded clot retraction in *ETV6* deficient platelets. Elevated numbers of circulating CD34⁺ cells were found in p.P214L and p.Y401N carriers, and two patients from different families suffered from refractory anemia with excess blasts, while one patient from a third family was successfully treated for acute myeloid leukemia. Overall, our study provides novel insights into the role of *ETV6* as a driver of cytoskeletal regulatory gene expression during platelet production, and the impact of variants resulting in platelets with altered size, shape and function and potentially also in changes in circulating progenitor levels.

Correspondence:

marie-christine.alessi@univ-amu.fr

Received: April 18, 2016.

Accepted: September 22, 2016.

Pre-published: September 23, 2016.

doi:10.3324/haematol.2016.147694

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/102/2/282

©2017 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights reserved to the Ferrata Storti Foundation. Copies of articles are allowed for personal or internal use. Permission in writing from the publisher is required for any other use.



Introduction

The genetic determinants of non syndromic autosomal dominant (AD) thrombocytopenia with normal platelet size remain largely unknown, yet it is important to identify such variants because they may predispose carriers to hematological malignancy. Germline variants in *RUNX1* cause a familial platelet disorder with an increased risk of acute myeloid leukemia (FPD/AML), while variants in the 5' untranslated region (UTR) of *ANKRD26* have also been shown to predispose individuals to hematologic malignancies. Recently, germline variants in *ETV6* (TEL) have been reported to underlie AD thrombocytopenia with predisposition to leukemia.¹⁻³ *ETV6*, which was initially identified as encoding a tumor suppressor in humans, is often found fused with partner genes in samples from human leukemia of myeloid and lymphoid origin.⁴ Somatic *ETV6* variants have also been found in solid tumors, T-cell leukemias and myelodysplastic syndromes, hence the widespread interest in this gene.^{5,6} *ETV6* encodes an E26 transformation-specific (Ets) family transcriptional repressor. It can bind DNA *via* a highly conserved Ets DNA-binding consensus site located at the C-terminus. The N-terminal domain (pointed domain) is necessary for homotypic dimerization and interaction with the Ets family protein FLI.^{7,8} The central region is involved in repressive complex recruitment (including SMRT, Sin3A and NCOR)⁹ and autoinhibitory activity.¹⁰

ETV6 plays an important role in hematopoiesis. In mice, *ETV6* is essential for hematopoietic transition from the fetal liver to the bone marrow (BM).¹¹ Conditional disruption of the *ETV6* gene has shown that *ETV6* plays a unique, non redundant role in megakaryocytopoiesis. Data concerning *ETV6* involvement in megakaryocytopoiesis in humans remains scarce, however, a recent study has shown that patients expressing a mutated form of *ETV6* displayed abnormal megakaryocyte (MK) development with a likely impact on platelet production.¹

We have assessed the biological impact of six likely pathogenic variants in *ETV6*, of which five are novel. We describe in detail how variants in *ETV6* lead to increased megakaryocyte proliferation and various cytoskeleton-related platelet defects that include altered platelet shape, reduced Rho GTPase expression in platelets, decreased proplatelet (PPT) formation and reduced platelet spreading. Additionally, we show that patients exhibit elevated levels of circulating CD34⁺ progenitors and a predisposition to myelodysplastic syndrome and leukemia.

Methods

Platelets and circulating CD34⁺-cells analysis

Blood samples were collected after informed written consent, in accordance with our local Institutional Review Boards and the Declaration of Helsinki. Platelet-rich plasma (PRP), washed platelets and circulating CD34⁺ cells were prepared according to standard procedures. For electron microscopy (EM), platelets were fixed in glutaraldehyde and processed as previously described.¹² For platelet spreading, fibronectin-adherent platelets were stained with Alexa Fluor 488 phalloidin (filamentous (F)-actin) and Alexa Fluor 594 DNase I (globular (G)-actin). Filopodia and lamellipodia were manually quantified. For clot retraction, coagulation of PRP was triggered using thrombin, and clots were allowed to retract. Images were recorded using a CoolSNAP CCD camera and analyzed to evaluate the reduction of the initial clot surface (ImageJ).

The platelet survival assay was based on the method of Thakur and colleagues.¹³

High-throughput and Sanger sequencing

DNA samples from 957 patients enrolled in the BRIDGE-BPD project were subjected to whole-genome or whole-exome sequencing, and the results were used for variant calling as described previously.^{14,15} DNA samples from eight patients in the French cohort were subjected to whole-exome sequencing or Sanger sequencing at the *ETV6* locus. Sequence analysis was carried out using Chromas X software, and aligned using Multalin.¹⁶

Site-directed mutagenesis and luciferase assays

ETV6 cDNA was ligated into a pcDNA3 expression vector, and mutagenesis was performed using the GENEART® Site-directed Mutagenesis System kit (Life technologies).¹⁷ Transcriptional regulatory properties of wild-type (WT) and mutant *ETV6* (mut*ETV6*) as well as *ETV6* corepressor binding,¹⁸ were determined by using the luciferase reporter systems in transfected GripTite™ 293 macrophage scavenger receptor (MSR) cells.

Immunoassays

Immunoblots were performed with antibodies directed against human *ETV6*; SMRT, RHOA (Santa Cruz Biotechnology), CDC42, RAC1 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Millipore) and MYH10 (Cell Signaling Technology) antibodies. Chemiluminescence signals were detected and quantified (CCD camera-based ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare). Levels of thrombopoietin (TPO) and stromal cell-derived factor 1α (SDF1α) were quantified *via* ELISA (Abcam). For the co-immunoprecipitation assays, whole cell extracts were prepared in NP-40 buffer and pre-cleared with protein A/G magnetic beads (Millipore). Immunoprecipitation of the cell extracts with anti-*ETV6*-coated beads was carried out overnight.

Megakaryocyte differentiation and quantification of proplatelet-bearing megakaryocytes

CD34⁺ cells were grown in serum-free medium supplemented with TPO and stem cell factor (SCF) (Life Technologies).¹⁹ At culture day 10, we assessed ploidy in the Hoechst⁺CD41⁺CD42a⁺ cell population²⁰ (Navios, BD Biosciences). Proplatelets were quantified between day 11 and 15. Microtubule and F-actin organization was determined in megakaryocytes adhering to fibrinogen with fluorescently labeled polyclonal rabbit anti-tubulin antibody (Sigma-Aldrich) and phalloidin (Life Technologies).

Lentiviral particle production and CD34⁺ cell transduction

Lentiviral particles were prepared as previously described.^{21,22} CD34⁺ cells were infected twice. After 8 hours, the cells were washed and cultured in serum-free medium.

Clonogenic progenitor assays

CD34⁺ cells were plated in human methylcellulose medium H4434 (STEMCELL Technologies), supplemented with erythropoietin (EPO), interleukin-3 (IL-3), SCF, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), interleukin-6 (IL-6) and TPO to quantify erythroid (burst forming unit-erythroid (BFU-E), colony-forming unit-erythroid (CFU-E), granulocytic/macrophage (CFU-GM), mixed (CFU-GEMM) and megakaryocyte (CFU-MK)) progenitors at day 12.²³

Statistical analyses

Analyses were performed using GraphPad Prism software. Statistical significance was determined *via* a two-tailed Mann-Whitney test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Identification of affected families

Screening of patients with thrombocytopenia for rare non-synonymous variants in *ETV6* revealed six families with patients carrying one of six possibly pathogenic variants. The variants encode p.P214L, which has been previ-

ously reported,³ and the novel substitutions p.I358M, p.A377T, p.R396G, p.Y401N and p.Y401H (Figure 1A). Family studies by Sanger sequencing showed segregation between the *ETV6* variant and thrombocytopenia in all cases for which DNA samples were available (Figure 1B). Henceforth, we refer to the likely pathogenic variants described above as *mutETV6*.

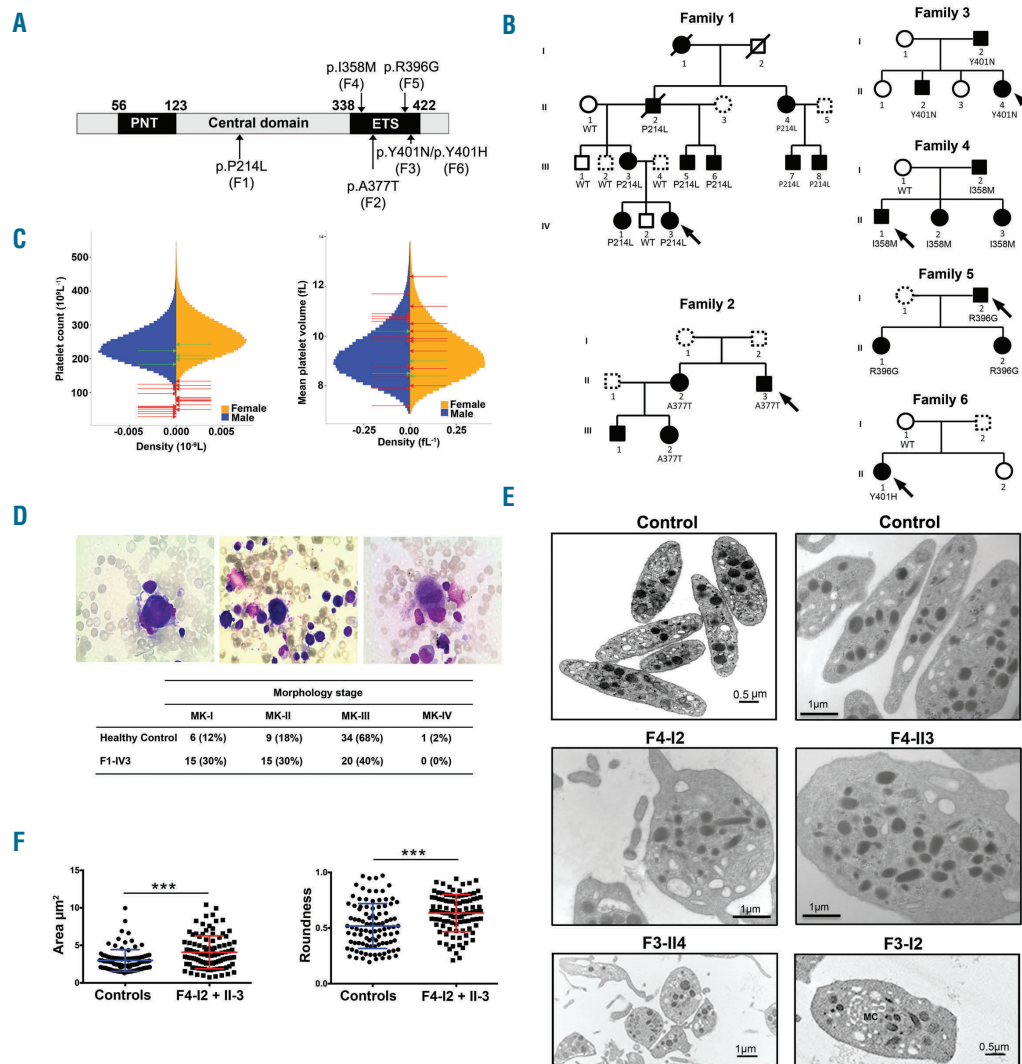


Figure 1. Identification of variants in *ETV6* underlying AD thrombocytopenia, megakaryocyte and platelet characteristics. (A) Schematic representation of the different domains of the *ETV6* protein. The N-terminal domain (PNT), central domain and C-terminal domain containing a DNA-binding domain (ETS) are depicted. Arrows indicate the location of the *ETV6* variants and the corresponding family is mentioned in brackets. (B) Pedigrees for the affected families. Squares denote males, circles denote females and slashes represent deceased family members. Black filled symbols represent thrombocytopenic family members and dotted line symbols represent non-tested members. The families F1, F2, F3, F4, F5 and F6 carried the *ETV6* p.P214L, p.A377T, p.Y401N, p.I358M, p.R396G and p.Y401H variants, respectively, which segregated with thrombocytopenia. See Table 1 for blood cell count values. (C) Sex-stratified histograms of platelet count and mean platelet volume measurements, obtained using a Coulter hematology analyzer, from 480,001 UK Biobank volunteers, after adjustment for technical artifacts. The red arrows superimposed upon the histograms indicate the sex and values for patients with a deleterious variant in *ETV6*. The green arrows indicate the sex and values for relatives homozygous for the corresponding wild-type allele. (D) BM smears (May-Grünwald-Giemsa staining) from family F1 propositus (F1-IV3). Left: a relatively immature MK with reduced cytoplasm. Middle: a micromegakaryocyte without granules, with immature cytoplasm (basophilic) and nucleus. Signs of impaired proplatelet formation can be observed. Right: a mature MK of reduced size with a hypolobulated nucleus. Table 1 indicates the % of MKs at each stage of maturation in the BM samples from family F1 proposita (F1-IV3) and a healthy control. (E) Ultrastructural aspects of platelets from patients F3-I2 and F3-II4, F4-I2 and F4-II3 and unrelated healthy controls. Upper panel: aspect of healthy platelets; middle panel: series of mostly rounder platelets from patients F4-I2 and F4-II3, lower panel: a series of platelets emphasizing anisocytosis in patient F3-II4 and a platelet from patient F3-I2 with abnormal membrane complex (MC). Note the heterogeneous presence of α -granules with an occasional granule of increased size. (F) The platelet area and roundness was quantified. Perfect round platelets would have a value of 1. Values are the means and SD as quantified for 50 randomly selected platelets per subject using two-tailed unpaired t-test with Welch's correction. *** $P < 0.0001$. WT: wild-type; MK: megakaryocyte; PNT: pointed; ETS: ETV6 transformation-specific.

Description of the families

Our study included six families with *mutETV6* variants. The proband of the first family (F1-IV3) was a 7-year-old girl who was admitted for emergency care due to the suspicion of acute leukemia with asthenia, weakness, paleness, severe thrombocytopenia ($44 \times 10^9/L$) and anemia (hemoglobin: 50 g/L). BM examination unequivocally dismissed a diagnosis of leukemia, and the anemia was attributed to an iron deficiency subsequent to repeated episodes of severe epistaxis. The patient underwent a red blood cell transfusion, and the anemia was progressively corrected *via* iron supplementation. However, the platelet

count remained low ($50 \times 10^9/L$). Clinical examination of the parents and two siblings did not reveal any particular bleeding tendency. However, the patient's mother (F1-III3) had undergone a splenectomy at the age of 17 because of chronic thrombocytopenia, and she exhibited subnormal platelet counts ($116\text{--}210 \times 10^9/L$) at the time of examination. To gain further insight into the possibility of inherited thrombocytopenia, we screened the extended family for platelet counts. An AD form of thrombocytopenia was evidenced (Figure 1B), with normal mean platelet volume (MPV) compared with a large population of blood donors (Figure 1C). Of note, fourteen out of twenty-three carriers

Table 1. Hematological parameters in the six studied family members.

Family-Individuals	Sex	ETV6 genotype	Current age	Red cell count	Hyperdense Red blood cells	Hemoglobin	Mean corpuscular hemoglobin concentration	Mean corpuscular volume	Platelet count	Mean platelet volume	Absolute neutrophil count	Absolute lymphocyte count	Absolute monocyte count
Normal range				4.0-5.0x $10^{12}/L$	0.0-2.5 %	115-160 g/L	310-350 g/L	80-100 fL	150-400x $10^9/L$	7.0-9.0 fL	2.0-7.5x $10^9/L$	1.5-4.0x $10^9/L$	0.2-2.0x $10^9/L$
F1-III1	F	WT	70	5.0	1.1	155	343	89	242	8.4	2.4	1.2	0.3
F1-II2	M	P214L	69	3.3	4.3	117	350	101	44	7.2	1.3	1.0	0.2
F1-II4	F	P214L	69	4.5	1.1	144	342	94	64	8.0	3.6	0.8	0.3
F1-III1	M	WT	53	4.6	1.5	130	340	84	224	10.2	4.3	1.6	0.3
F1-III3	F	P214L	43	4.0	0.6	125	323	95	116-210	12.4	2.9	1.5	0.5
F1-III5	M	P214L	27	4.3	5.0	140	359	92	55	8.8	3.9	1.0	0.5
F1-III6	M	P214L	18	4.8	6.4	152	353	89	51	8.4	3.1	1.4	0.5
F1-III7	M	P214L	43	4.5	ND	147	ND	94	58	10.6	4.6	0.8	0.6
F1-III8	M	P214L	27	5.0	2.6	169	354	92	38	7.9	2.7	1.8	0.5
F1-IV1	F	P214L	13	4.2	2.0	130	337	91	85	8.7	2.3	1.7	0.2
F1-IV2	M	WT	11	5.0	1.7	138	338	81	184	8.5	2.0	2.1	0.2
F1-IV3	F	P214L	8	4.3	5.7	131	354	83	50	10.2	1.6	1.5	0.2
F2-II2	F	A377T	28	4.9	ND	162	342	97	84	9.0	4.0	2.0	0.4
F2-II3	M	A377T	24	4.8	ND	167	343	102	60	7.9	3.2	1.2	0.5
F2-III1	M	ND	7	4.4	ND	125	330	87	85	7.7	1.6	2.8	0.5
F2-III2	F	A377T	2	4.6	ND	122	325	81	111	8.7	1.0	4.1	0.8
F3-I1	F	ND	54	5.2	1.2	131	347	88	280	9.3	3.2	1.5	0.3
F3-I2	M	Y401N	56	5.0	2.0	160	360	86	125	9.8	4.4	2.3	0.5
F3-II1	F	ND	29	4.8	1.1	130	347	79	285	10.4	7.5	5.0	0.6
F3-II2	M	Y401N	21	4.7	1.3	147	350	88	112	10.0	2.1	1.8	0.3
F3-II3	F	ND	22	4.9	0.5	139	352	80	389	9.6	3.1	1.6	0.4
F3-II4	F	Y401N	16	4.4	1.3	145	350	87	80	9.4	2.5	1.5	0.3
F4-I1	F	WT	55	3.9	ND	120	348	88	209	9	3.1	4.9	0.2
F4-I2	M	I358M	56	4.6	ND	149	353	91	57	11.7	2.6	1.6	0.5
F4-III*	M	I358M	24	3.0	ND	125	349	92	29	10.7	1.5	2.1	0.5
F4-II2	F	I358M	30	4.3	ND	142	351	95	134	10.5	2.5	1.5	0.7
F4-II3	F	I358M	27	4.1	ND	142	351	98	121	9.8	2.8	1.9	0.7
F5-I2	M	R396G	59	ND	ND	140	ND	ND	58	10.8	ND	3.5	ND
F5-II1	F	R396G	26	ND	ND	133	ND	ND	76	11.2	ND	4.0	ND
F5-II2	F	R396G	20	ND	ND	109	ND	ND	75	9.9	ND	3.9	ND
F6-I1	F	WT	ND	4.4	ND	137	ND	ND	199	ND	ND	ND	ND
F6-II1	F	Y401H	ND	3.9	ND	132	ND	100	77	ND	ND	ND	ND
F6-II2	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	159	ND	ND	ND	ND

*in remission (2 years after chemotherapy). Bold values are outside the normal range. F: female; M: male; ND: not done; WT: wild-type.

exhibit MPV >9 fL (Table 1). Plasma TPO levels were decreased in affected F1 members (n=4): 160 ± 9 pg/mL vs. controls (n=8): 296 ± 39 pg/mL, $P=0.02$. May-Grünwald-Giemsa staining of BM smears of patient F1-IV3 showed that megakaryocytes were present, although a high pro-

portion were of medium size, in the early stages of maturation and tended to be hypolobulated (Figure 1D). The 7-year-old patient's grandfather (F1-II2) was diagnosed with refractory anemia with excess blasts type 2 (RAEB-2) at the age of 70. Individuals from the second and third fami-

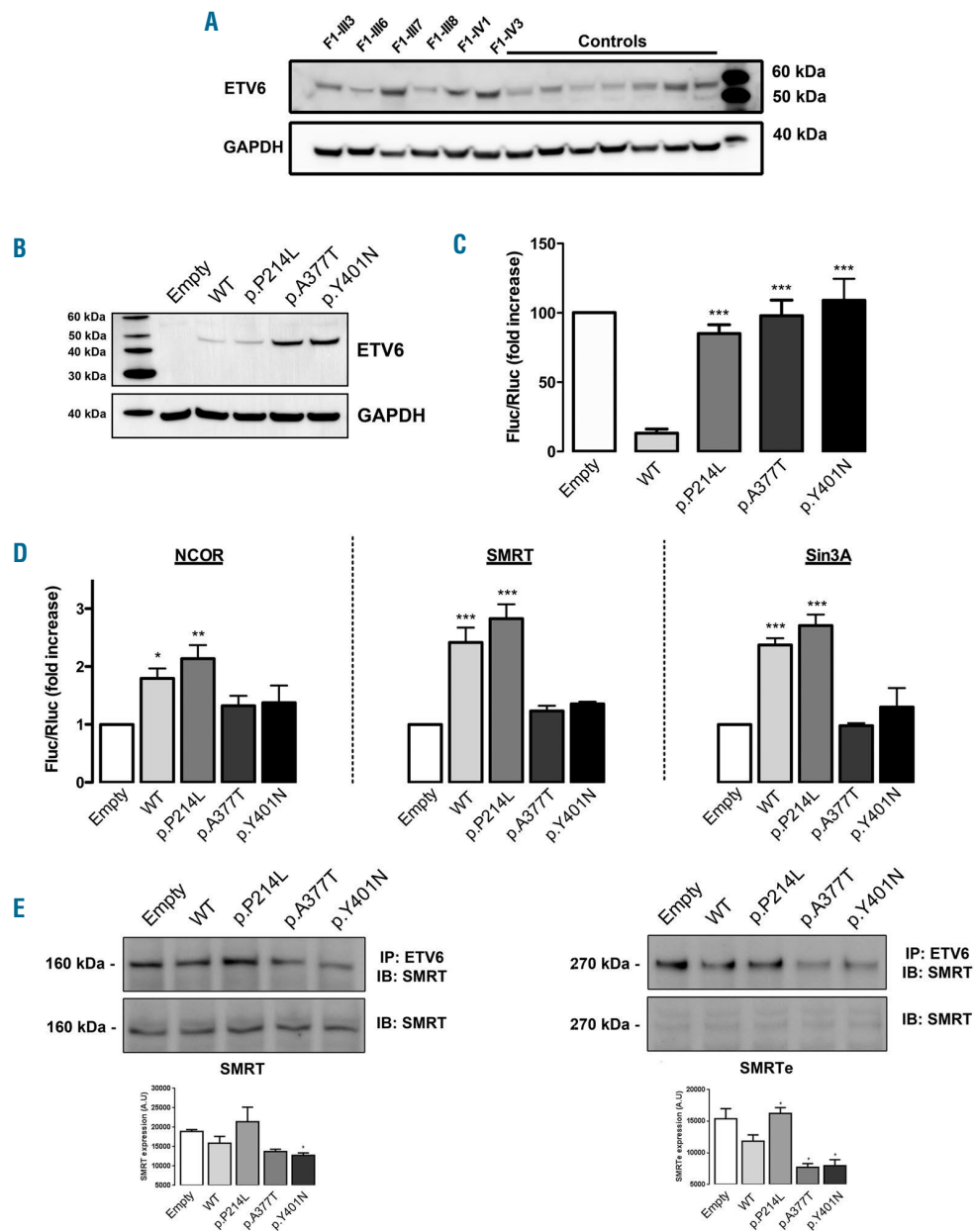


Figure 2. Effect of the variants on repressive activity and corepressor recruitment. (A) Western blot analysis of ETV6 expression in platelets of 6 affected F1 members and 7 external controls. GAPDH was used as a protein loading control. (B-C) GripTite™ 293 MSR cells were co-transfected with the luciferase reporter plasmid containing 3 tandem copies of the Ets Binding Site (EBS) upstream of HSV-Tk (E743tk80Luc), pCDNA3.1 expression vector (empty, WT or mutETV6) or pGL473 Renilla luciferase control vector. (B) Western blot analysis of ETV6 expression in whole cell lysates of GripTite™ 293 MSR transfected with WT ETV6 or mutETV6 expression vectors. GAPDH was used as a protein loading control. The data are representative of 4 to 8 independent experiments. (C) The firefly to renilla luminescence ratios (Fluc/Rluc) were calculated to compensate for transfection efficiency. The data represent the mean $\pm$ SEM of 4 to 8 independent experiments, student's *t*-test *** $P<0.001$ (each condition was compared with WT). (D) Effects of the ETV6 variants on corepressor recruitment. Mammalian two-hybrid analysis of the protein interactions between WT NCOR, SMRT or Sin3A (expressed using the GAL4 DNA-binding domain (DBD) plasmid) and WT ETV6 or mutETV6 (expressed using the GAL4-VP16 activation domain vector). The results are expressed as mean $\pm$ SEM of 3 to 8 independent experiments, student's *t*-test * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. (E) Immunoprecipitation of endogenous corepressor SMRT and ETV6 from GripTite™ 293 MSR cells transfected with WT and mutETV6. Immunoprecipitation was performed on cell lysates with ETV6 antibody. The total cell lysates (lower panel) and immunoprecipitates (upper panel) were analyzed via immunoblotting with anti-SMRT antibody. Quantification of band intensity for SMRT and SMRT-extended (SMRTe) is shown below the western blot. The results are expressed as mean $\pm$ SEM, student's *t*-test, * $P<0.05$ vs. WT. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; WT: wild-type; A.U.: arbitrary unit; IP: immunoprecipitation; IB: immunoblot.

lies had platelet counts between 60 and 125 × 10⁹/L (Table 1). BM from F2-II3 displayed a delay in granulocyte maturation and dyserythropoiesis (*data not shown*). Peripheral blood smears revealed platelet anisocytosis (*data not shown*), as confirmed by EM (Figure 1E), which further highlighted the presence of occasional hypogranular platelets with a poorly organized open canalicular system. Patient F2-I1 presented with refractory anemia with excess blasts (RAEB) and required BM transplantation. The proband (F4-II1) from pedigree 4 was referred with AML type M0 at the age of 8 years, and suffered from epistaxis, ecchymosis and infections. After 2 years of chemotherapy treatment, the BM showed no blasts and the peripheral blood counts normalized, except for a persistent low platelet count (Table 1). BM studies showed the presence of many hypobulbated small megakaryocytes (*data not shown*). Thrombocytopenia was also present in his father and two sisters without any bleeding problems (Table 1). EM investigation of platelets from affected members F4-I2 and F4-II3 showed the presence of both larger and smaller platelets that, significantly, were of round shape rather than of discoid shape (Figure 1E,F; $P < 0.0001$). These platelets had normal dense and α -granules numbers, but some α -granules were elongated (*data not shown*). Pedigree 5 was referred for genetic testing of AD thrombocytopenia in a father with very mild bleeding problems (proband F5-I2), and his 2 asymptomatic daughters (Figure 1B). BM investigation in F5-II2 showed the presence of dysmegakaryopoiesis with almost no mature megakaryocytes (*data not shown*). A mother (F6-I1) and daughter (proband F6-II1) from pedigree 6 (Figure 1B) were diagnosed with platelet dense storage pool deficiency (SPD), with platelet aggregation defects and abnormal dense granules. Thrombocytopenia was only recorded for the daughter, who suffered from severe menorrhagia and had an increased bleeding tendency with bruising and nosebleeds. The mother had a normal platelet count and did not carry the ETV6 variant. No clinical information or DNA was available from the father. Therefore, the ETV6 variant in F6-II1 could be present as a *de novo* or somatic variant. SPD in the mother and daughter was likely to be caused by another additional genetic factor. Indeed, in contrast to the obvious platelet aggregation and

secretion defects for these two patients, such abnormalities were not present in the other five families, except for a decreased aggregation response to arachidonic acid as the only consistent finding in every family (*Online Supplementary Table S1*). Consistent with normal dense granules found by EM (Figure 1E), adenosine triphosphate (ATP) secretion and mepacrine uptake and release were normal (*Online Supplementary Table S1*). Flow cytometry analysis of key platelet surface receptors (α IIb β 3, glycoprotein (GP) Iba, GPIa, GPIV, CD63 and CD62P) was also normal (*Online Supplementary Table S2*).

A platelet survival assay was performed on patient F3-II4 (*Online Supplementary Table S3*), and revealed decreased platelet lifespan (4.6 days) without significant splenic or hepatic sequestration. Notably, this patient had not undergone platelet transfusion. Patient F1-III3 underwent a ¹¹¹In-oxine platelet survival assessment (autologous transfusion) in 1981 prior to a splenectomy, which revealed short platelet half-life (24 h vs. 3.5 days in the control) and hepatic and splenic platelet sequestration, with predominant sequestration in the liver (*data not shown*). Patient F1-III3 was assessed for anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies on several occasions (National Center of Blood Transfusion, Marseille, France), but all results were negative (*data not shown*).

Variants in ETV6 lead to a functional defect in transcriptional activity

Western blot analysis showed that ETV6 protein expression was not reduced in platelets from the patients, nor in GripTite™ 293 MSR cells transfected with the ETV6 variants (Figure 2A,B). To investigate the transcriptional regulatory properties of mutETV6 compared with WT ETV6, we analyzed repressive activity. Cotransfection of the reporter plasmid along with expression of a plasmid encoding WT ETV6 resulted in an almost 90% inhibition of luciferase activity. The substitution of WT ETV6 with any of the mutETV6 variants led to a significant reduction in repressive activity (85% to 100%) (Figure 2C).

To evaluate whether this reduction in repressive activity perhaps resulted from variations in nuclear corepressor complex recruitment, we investigated the interaction of ETV6 with NCOR, SMRT and Sin3A using a mammalian

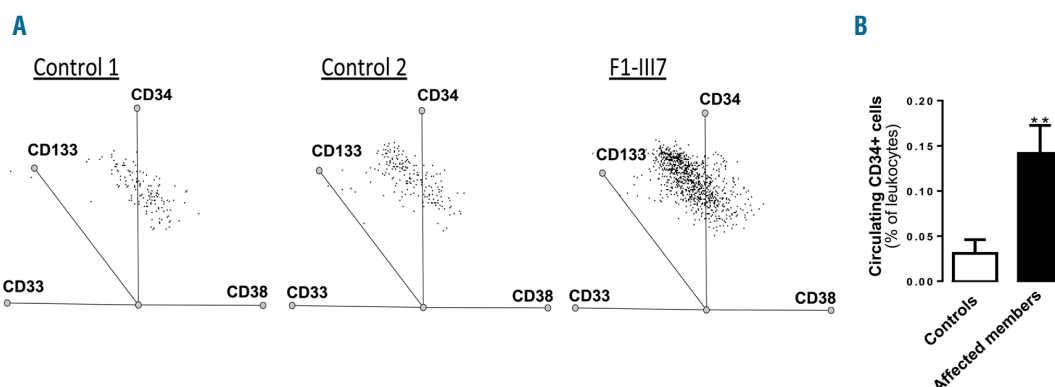


Figure 3. Increased numbers of circulating CD34 positive cells in variant carriers. Flow cytometry analysis of CD34⁺ cells. (A) Representative CD34⁺/CD38⁻ dot plot of cells from 2 controls and 1 patient (F1-III7). (B) Histograms show the percentage of CD34⁺ cells in 8 controls and 5 affected family members (F1-III3, F1-III7, F1-III8, F1-IV1, F1-IV3) (mean ± SEM, student's t-test, ** $P < 0.01$).

two-hybrid assay. p.P214L ETV6 interacted with NCOR, SMRT and Sin3A, whereas p.A377T and p.Y401N ETV6 did not (Figure 2D). Immunoprecipitation assays showed that the p.A377T and p.Y401N variants reduced ETV6 binding to SMRT and SMRTe (Figure 2E)

Increased numbers of circulating CD34 positive cells in affected family members

F1 carriers (F1-III3, F1-III7, F1-III8, F1-IV1 and F1-IV3) exhibited a 4- to 6-fold increase in circulating CD34⁺/CD38⁺ cells compared with healthy donors (Figure 3A,B). Similarly, F3-II2 and F3-II4 exhibited a 5- and 3-fold increase in circulating CD34⁺ cells compared with controls (0.16% and 0.09%, respectively, *vs.* 0.035%). The expression levels of immature cell markers CD133 and CD117 did not differ between F1 members and controls.

Expression of the myeloid lineage marker CD33 contrasted with the absence of megakaryocyte lineage markers CD123, CD41, CD61 and CD42b (*data not shown*). Additionally, plasma levels of SDF1 α did not vary between patients (F1: 1966 $\pm$ 95 pg/mL; n=8) and controls (2068 $\pm$ 75 pg/mL; n=9).

Variants in ETV6 cause megakaryocyte hyperplasia but reduced proplatelet formation in vitro

The percentage of CD41⁺CD42a⁺ megakaryocytes derived from CD34⁺ (gated on Hoechst⁺ cells) was significantly higher in mutETV6 carriers (Figure 4A,B). No significant difference in mean ploidy was detected between patients and healthy donors (Figure 4C). Accordingly, the number of CD34⁺-derived CFU-GM/G/M colonies was higher in patients compared with controls (Figure 4D).

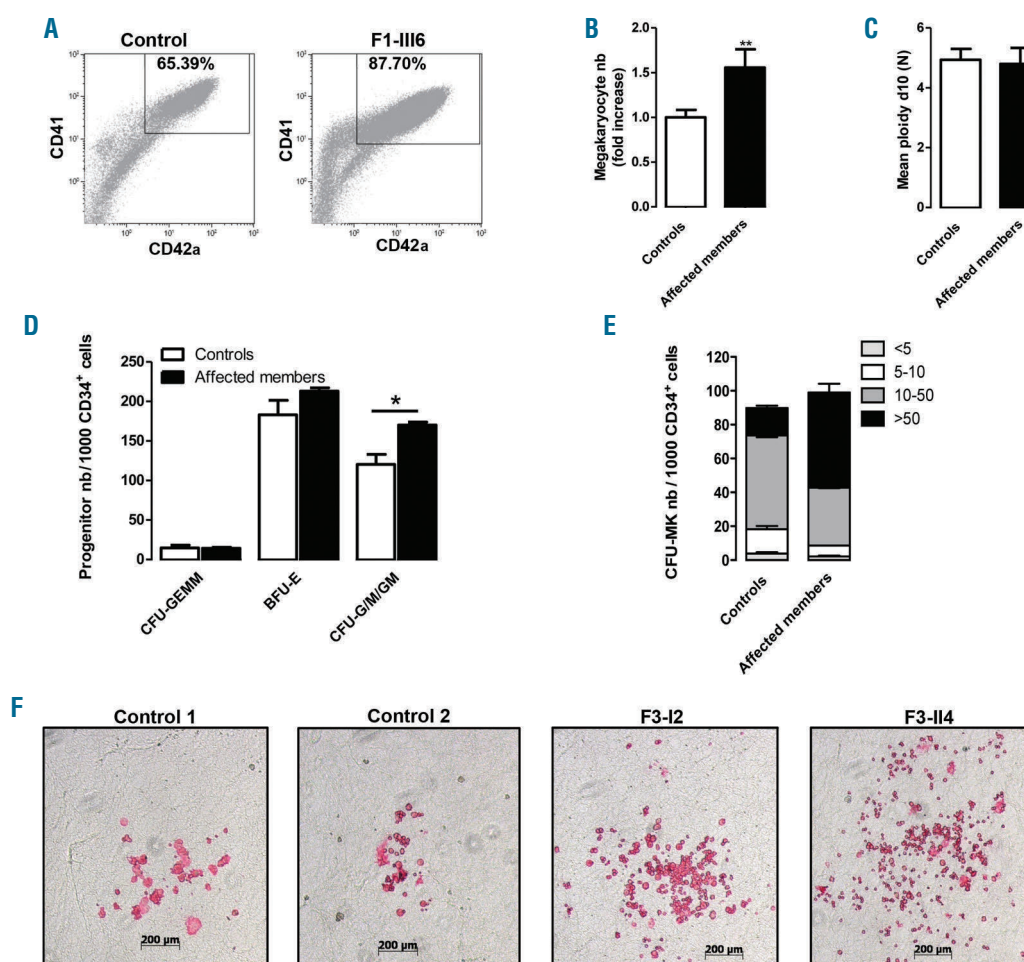


Figure 4. Megakaryocyte differentiation and colony-forming cell potential. (A-C) *In vitro* megakaryocyte (MK) differentiation in control or patient peripheral blood CD34⁺ cells, the cells were analyzed at culture day 10. (A) The data show a representative dot plot of CD41 and CD42a expression in Hoechst⁺ cells from a control individual and F1-III6. The gate represents mature MKs. (B) The histogram represents the MK (CD41⁺CD42a⁺Hoechst⁺) numbers (nb) in the affected family members (n=9) expressed as fold increase over healthy controls (n=10), student's *t*-test, ***P*<0.01. (C) The ploidy level (N) was analyzed for CD41⁺CD42a⁺ MKs, and mean ploidy was calculated using the percentage of cells with 2N, 4N, 8N, 16N and 32N. (D) Methylcellulose assay. The histograms present the number of erythroid (BFU-E), granulo-monocyte (CFU-G/M/GM) and mixed (CFU-GEMM) progenitors from two patients of family F3 with the p.Y401N variant (F3-II2 and F3-II4) and two independent controls. Mean $\pm$ SEM, student's *t*-test, **P*<0.05. (E) Fibrin clot culture. The histograms present the number of MK progenitors (CFU-MK) from two independent controls and two patients (F3-II2 and F3-II4). The CFU-MKs are divided into four categories: <5 MKs per colony, 5-10 MKs per colony, 10-50 MKs per colony or >50 MKs per colony. Error bars represent $\pm$ SD of triplicate experiments. (F) Representative pictures of CFU-MKs after CD41 immunostaining. Control 1 and Control 2 represent 2 independent controls, and F3-II2 and F3-II4 are two affected patients. CFU-GEMM: colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte; BFU-E: burst forming unit-erythroid; CFU-G/M/GM: colony-forming unit-granulocytes, macrophages, granulocyte-macrophages; CFU-MK: colony-forming unit-megakaryocyte.

The number of megakaryocyte progenitors (CFU-MK) from patients F3-II2 and F3-II4 did not differ from controls, although the size of CFU-MKs was significantly increased in the two patients (Figure 4E,F), thereby suggesting an increased proliferation of megakaryocyte precursors in the presence of mutETV6.

Proplatelet-bearing megakaryocytes derived from controls showed multiple branched thin extensions, swellings and tips. In contrast, megakaryocytes from patients formed very few proplatelets with a reduced number of thicker extensions. Although there was no swelling, tips were of increased size (Figure 5A). A 2- to 15-fold decrease in the percentage of proplatelet-bearing megakaryocytes

was observed in carriers of the p.P214L (F1-III3, F1-III7 and F1-IV3) and p.Y401N (F3-II2 and F3-II4) variants (Figure 5B). β -tubulin and F-actin staining confirmed the megakaryocyte-proplatelet extension defect together with a reduced concentration of both actin filaments and microtubules in the residual larger megakaryocyte cell body (Figure 5C). Additionally, β -tubulin failed to accumulate normally in the few extension tips observed in mutETV6 megakaryocytes compared with controls.

To confirm that mutETV6 leads to a defect in proplatelet formation, CD34⁺ cells from healthy donors were transduced with lentivirus containing ETV6 sequences encoding the WT or the p.P214L mutant. Non-transduced cells

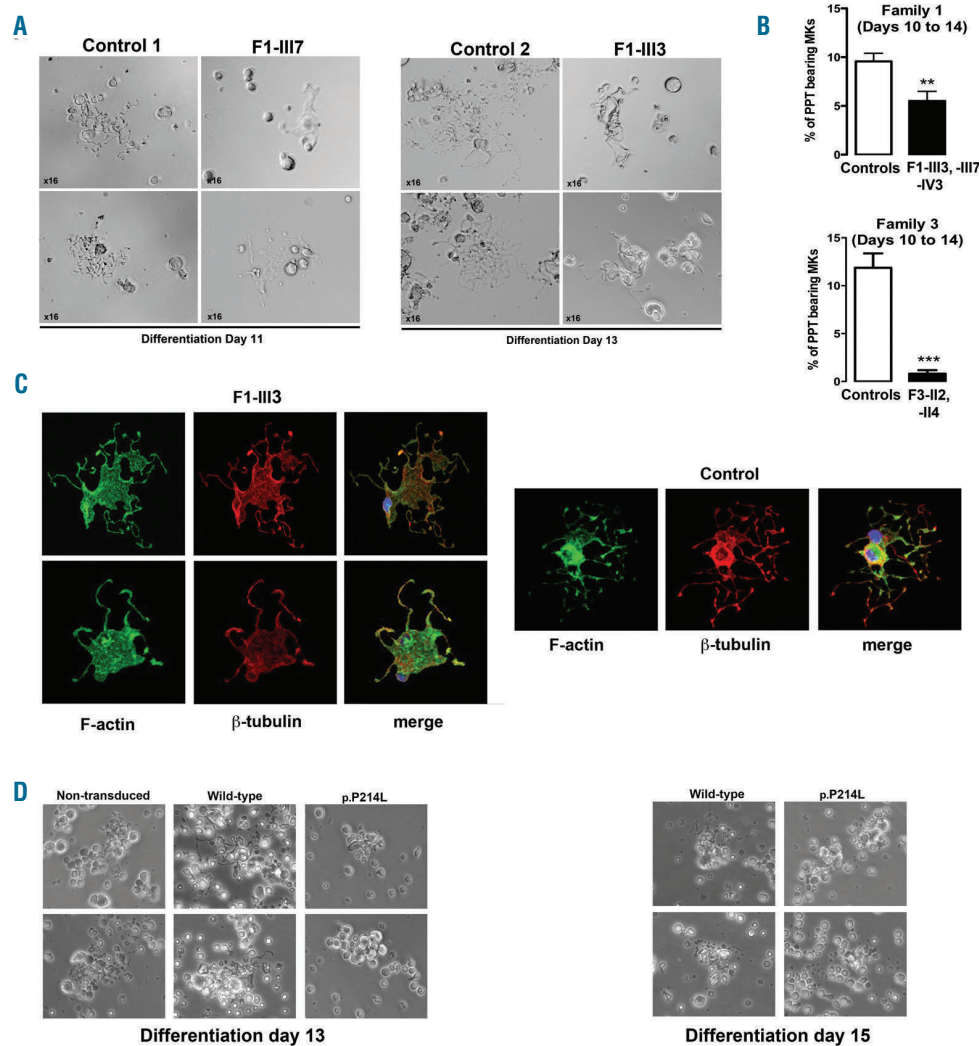


Figure 5. ETV6 variants lead to defective proplatelet formation. (A-B) *In vitro* MK differentiation induced from control or patient peripheral blood CD34⁺ progenitors in the presence of TPO and SCF. (A) Representative microscopic images of PPT formation in control (n=2) and patient (F1-III7, F1-III3) MKs after 11 or 13 days of culture. (B) The histograms show the percentage of PPT-bearing MKs from members of 2 families (F1-III3, F1-IV3, F1-III7, F3-II2, F3-II4) and 5 independent controls evaluated (3 to 5 evaluations) between culture days 10 to 15. The percentage of PPT-forming MKs was estimated by counting MKs exhibiting ≥ 1 cytoplasmic processes with areas of constriction. Double-blinded researchers quantified a total of 300-500 cells. The results are expressed as mean $\pm$ SEM, student's *t*-test ***P*<0.01 and ****P*<0.001. (C) F-actin and β -tubulin staining on PPT-forming MKs from F1-III3 and a control individual, adhering to fibrinogen. Confocal images were acquired at day 12 of culture (x60). (D) *In vitro* MK differentiation was induced from control peripheral blood CD34⁺ progenitors transduced with WT or mutETV6 (family F1, c.641C>T, p.P214L) lentiviral particles in the presence of TPO and SCF. Microscopic images of PPT formation were acquired at days 13 and 15 of culture. PPT: proplatelet; MKs: megakaryocytes; F-actin: filamentous actin.

were also included as control. After 13 and 15 days of culture in the presence of TPO and SCF, cells transduced with *mutETV6* lentivirus did not form proplatelets, in contrast to non-transduced cells or those transduced with WT *ETV6* (Figure 5D).

***mutETV6* does not alter MYH10 expression but was associated with decreased expression and activity of the key regulators of the actin cytoskeleton CDC42 and RHOA**

To assess potential cooperation between the *ETV6*, *RUNX1* and *FLI1* pathways we examined MYH10 protein

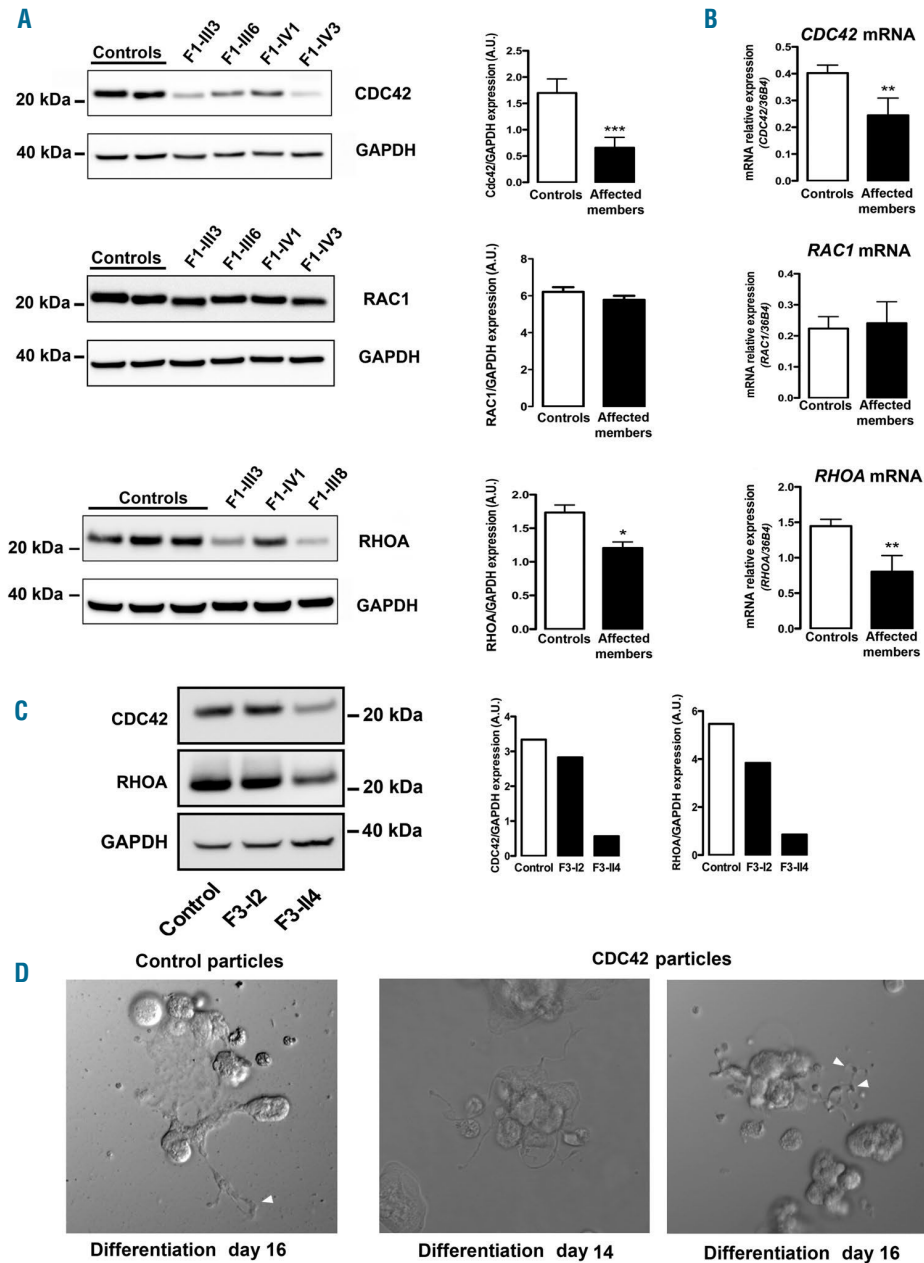


Figure 6. Rho GTPase expression analysis. (A) Western blot analysis and quantification of CDC42, RAC1 and RHOA expression in platelet lysates from healthy controls (n=7 for CDC42, n=4 for RAC1, n=4 for RHOA) and affected members from F1 (n=6 for CDC42, n=4 for RAC1 and n=5 for RHOA). GAPDH was used as a protein loading control. The results are expressed as mean $\pm$ SEM, student's *t*-test **P*<0.05 and ****P*<0.001. (B) Quantification of CDC42, RAC1 and RHOA mRNA levels in CD34⁺-derived megakaryocytes (MKs) from healthy controls (n=10) and affected family members from F1 (n=6) and F3 (n=2). mRNA expression levels were measured via reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and expression levels were normalized to housekeeping 36b4 RNA. The results are expressed as mean $\pm$ SEM, student's *t*-test, ***P*<0.005. (C) Western blot analysis and quantification of CDC42, RHOA and GAPDH expression in platelets from two affected members of the F3 family (F3-I2 and F3-II4) and a healthy control. (D) *In vitro* MK differentiation was induced from F1-III7 CD34⁺ progenitors transduced with control or CDC42 lentiviral particles in the presence of TPO and SCF. Microscopic images of proplatelet (PPT) formation were acquired at days 14 and 16 of culture. The arrows indicate thinner PPT extensions and swellings in the presence of CDC42. Extensions were enlarged in the control. mRNA: messenger RNA; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; A.U: arbitrary unit.

expression levels in patient platelets. We did not detect increased MYH10 levels in platelets from ETV6 patients (F1-III6 and F1-III8), which contrasted with *RUNX1* and *FLI1* defects²⁴ (Online Supplementary Figures S1A and S1B).

Proplatelet formation is dependent on massive reorganization of the actin cytoskeleton. Rho GTPase family members (e.g., CDC42, RAC1 and RHOA) are key regulators of actin cytoskeleton dynamics in platelets²⁵ and megakaryocytes. p.P214L (n=5) and p.Y401N (n=2) variants led to significantly reduced platelet expression levels of CDC42 and RHOA, without affecting RAC1 expression (Figure 6A). Likewise, CDC42 and RHOA messenger ribonucleic acid (mRNA) levels were decreased in

megakaryocytes from F1 and F3, while RAC1 mRNA levels remained unaffected (Figure 6B). Notably, patient F3-12, with 112×10^9 platelets/L, exhibited only slightly decreased levels of CDC42 and RHOA in platelets (Figure 6C) compared with other affected members. CDC42 and RHOA levels significantly correlated with platelet count (n=6 from F1 and F3) ($P=0.03$ and $r=0.84$ for CDC42; $P=0.008$ and $r=0.92$ for RHOA). To confirm the specificity of this effect, we quantified CDC42 protein levels in *FLI1* deficient patients with thrombocytopenia (n=2) (122 and $131 \times 10^9/L$). None of these patients exhibited reduced levels of CDC42 (Online Supplementary Figure S1C).

Overexpression of CDC42 in CD34⁺-derived megakary-

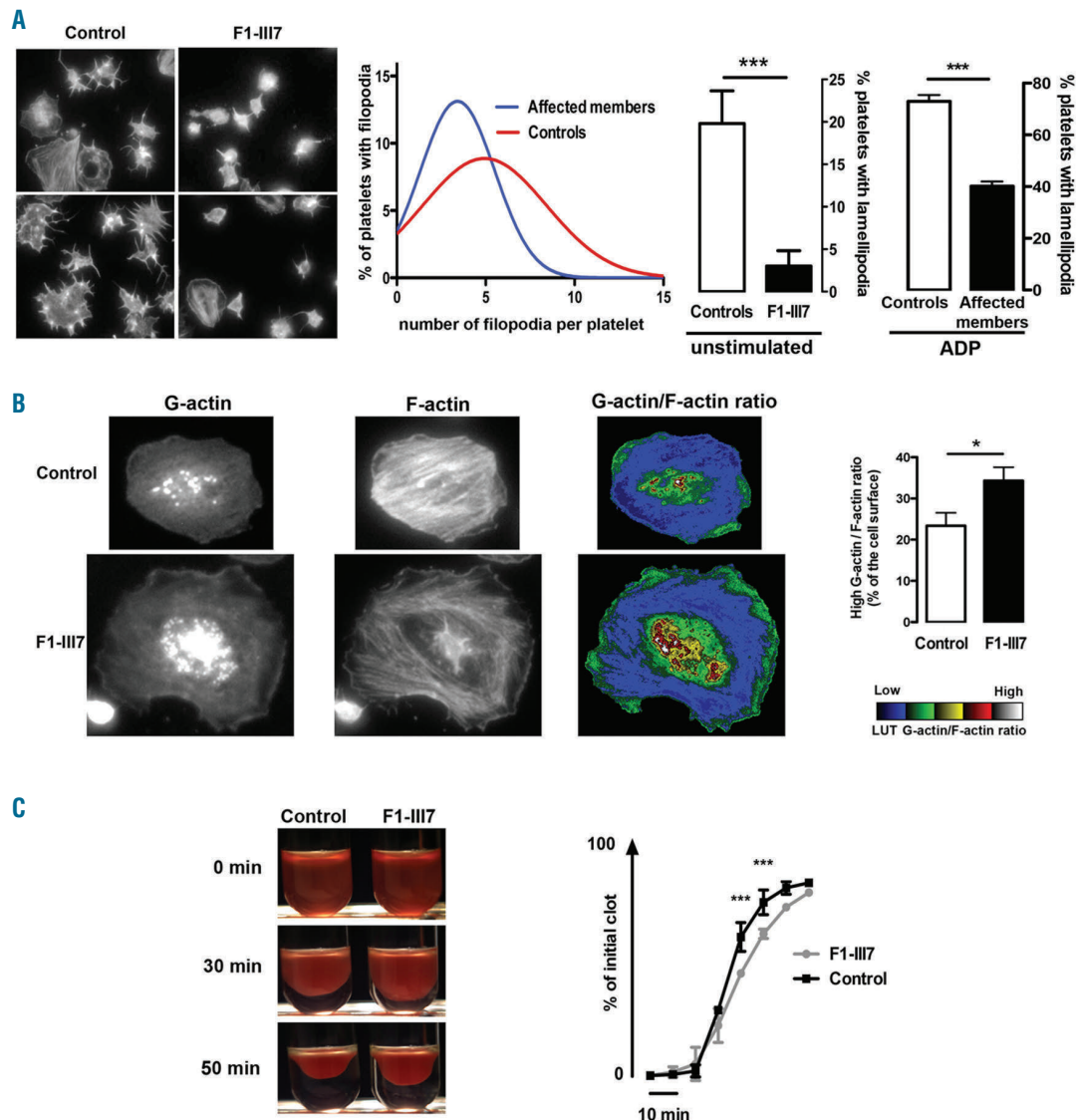


Figure 7. Platelet spreading and clot retraction. (A) Left: Representative images of unstimulated platelets spread over immobilized fibronectin. Middle: filopodia formation was quantified according to the number of extensions per unstimulated platelet derived from affected individuals (F1-III3, F1-III7) and healthy controls (n=2). Right: Quantification of lamellipodia-forming cells, at resting and ADP-stimulated conditions, from affected members (F1-III7, F1-III8) and healthy controls (n=2). The data are expressed as mean $\pm$ SEM of 5 different view fields. Student's t-test, $***P<0.001$. (B) Actin polymerization quantification in spread unstimulated platelets. Left: representative images of G-actin, F-actin and the G-actin/F-actin ratio in control platelets and the rare spread platelets detected in F1-III7. Platelets were spread over fibronectin and stimulated with ADP. Right: quantification of the area with the high G-actin/F-actin ratio. Quantification of the ratio was performed according to the look-up table as the percentage of the platelet surface (n=20 different cells; mean $\pm$ SEM. Student's t-test $*P<0.05$). (C) Clot retraction. Left: representative images at 0, 30 and 50 minutes. Right: quantification of the extent of clot retraction expressed as percentage of the initial clot (mean $\pm$ SEM, n=2 for F1-III7 and n=4 for controls. Two-way ANOVA, $***P<0.001$). F-actin: filamentous actin; G-actin: globular-actin; ADP: adenosine diphosphate; LUT: look-up table.

ocytes from patients (F1-III3, F1-III7, F1-III8) did not fully reverse the phenotype, although it did improve the proplatelet-bearing megakaryocyte phenotype. Transduced cells produced thinner extensions and swellings, which were not observed in control transduced cells (Figure 6D).

***mutETV6* alters platelet spreading**

The reduced expression of CDC42 and RHOA suggests that ETV6 is involved in cytoskeletal reorganization, and thus does not only have an important role in platelet shape (EM showed more round platelets) and proplatelet formation, but also in regulating platelet spreading. We assessed whether the p.P214L transition in ETV6 affects the spreading of platelets over immobilized fibronectin and clot retraction. Platelets showed a reduced capacity to form filopodia and lamellipodia, under unstimulated and adenosine diphosphate (ADP)-stimulated conditions, respectively (Figure 7A). The G/F actin ratio was significantly higher in the rare patient platelets that spread (Figure 7B). Furthermore, reduced clot retraction velocity was noticeable in the *mutETV6* (F1-III7) (Figure 7C).

Discussion

Herein, we presented six families with AD thrombocytopenia associated with germline variants in *ETV6*. CD34⁺-derived megakaryocytes from *mutETV6* carriers showed a reduced ability to form proplatelets. The variants in the Ets domain impaired interaction with the corepressors NCOR, SMRT and Sin3A. Patient platelets were more round and had a reduced capacity to form filopodia and lamellipodia, which was associated with reduced expression levels of cytoskeletal regulators CDC42 and RHOA. Additionally, *mutETV6* carriers displayed increased numbers of circulating CD34⁺ progenitor cells, which may contribute to a predisposition to hematologic malignancy.

Loss of ETV6 function has been reported to contribute to leukemia, predominantly due to somatic variants and fusion transcripts.³ Four amino acid substitutions described in this study are listed in the Catalog Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC). The p.P214L, p.R396G and p.A377T variants were present in digestive tract tumors,²⁶ while p.Y401C has been associated with AML.²⁷ More recently, germline *ETV6* variants have also been found to predispose to cancer. Eleven patients carrying *mutETV6* (p.P214L, p.R399C, p.R369Q, p.L349P, p.N385fs or p.W380R) developed acute lymphocytic leukemia or myelodysplastic syndrome.^{1-3,28} Two affected members of the families F1 and F2 had myelodysplasia with RAEB and one member of the F4 family was successfully treated with chemotherapy for AML-M0.

Variants reduced the repressive activity of ETV6 without altering ETV6 protein expression levels in platelets. The alteration of ETV6 repressive activity can be explained by the modification of ETV6 cellular localization, as p.P214L and four other variants affecting the ETS domain lead to ETV6 sequestration in the cytoplasm in both HeLa transfected cells and cultured megakaryocytes.¹⁻³ However, three of these variants only partially prevented nuclear localization, thereby indicating other possible mechanisms. The p.A377T and p.Y401N variants prevented corepressor complex recruitment. These substitutions are located in the ETV6 Ets second and third

α -helix, contiguous to amino acids involved in key hydrophobic contacts with the H5 helix of the C-terminal inhibitory domain (aa 426-436),²⁹ thus possibly affecting ETV6 DNA-binding ability. In immunoprecipitation assays, overexpression of WT or p.P214L ETV6 did not modify the interaction between SMRT and ETV6, while p.A377T and p.Y401N ETV6 significantly reduced this interaction. Overall, this suggests that variants in the Ets DNA-binding domain exert a dominant negative effect.

ETV6 has been shown to drive megakaryocyte differentiation of hematopoietic stem cells.³⁰ From the literature, and supported by BM studies in F4-II1 and F5-II2, ETV6 defects seem to result in an increased percentage of small megakaryocytes.¹ Our megakaryocyte colony assays confirmed an increased proliferation of early megakaryocyte progenitors, characterized by an increased production of CD41⁺CD42a⁺ megakaryocytes compared to control conditions. This may explain the reduced TPO levels observed in the affected members of family F1. Accordingly, the loss of ETV6 in the erythro-megakaryocytic lineage in mice also results in large, highly proliferative early megakaryocytes and mild thrombocytopenia. We cannot exclude that ETV6-driven deregulation of megakaryocyte proliferation may take place in hematopoietic progenitors, thereby promoting oncogenic transformation. Altogether, these data do not support the concept that signaling between the ETV6 and RUNX1/FLI1/ANKRD26 pathways is involved in the underlying mechanism, as variants in these genes were associated with a decreased or normal megakaryocyte colony formation.^{19,31,32} Furthermore, MYH10 expression levels remained low in patients with *mutETV6*, which indicates unaltered RUNX1 and FLI1 function.²⁴

Despite the increased early megakaryocyte proliferation potential, CD34⁺-derived megakaryocytes from patients with *mutETV6* showed a reduced capacity to form proplatelets. These altered megakaryocyte features suggest that a defect in cytoskeletal reorganization during proplatelet formation likely causes thrombocytopenia in patients. Sequencing of platelet RNA from patients with p.P214L ETV6 revealed a considerable reduction in the levels of several cytoskeletal transcripts.¹ Furthermore, Palmi *et al.*³³ showed that the ETV6-RUNX1 fusion protein, which is associated with a loss of ETV6 repressive activity,^{34,35} alters the expression of genes regulating cytoskeletal organization. In particular, the ETV6-RUNX1 fusion protein led to reduced expression of CDC42. The mechanism by which the loss of ETV6 repressive activity results in reduced CDC42 and RHOA expression remains to be resolved.

CDC42 is an important mediator of platelet and megakaryocyte cytoskeleton reorganization.³⁶ Therefore, we hypothesize that ETV6 repressive activity is a key regulator of megakaryocyte cytoskeleton remodeling, driven via Rho GTPases in *mutETV6* carriers. *mutETV6* was associated with a decrease in CDC42 and RHOA expression levels in platelets without affecting RAC1 expression. Additionally, *mutETV6* platelets showed defects in functions classically associated with CDC42 (i.e., filopodia formation) and RHOA (i.e., lamellipodia formation and clot retraction).³⁶ EM also showed platelets of variable sizes and having a more circular instead of discoid shape. RNA sequencing previously performed on *mutETV6* transfected cells, patient platelets and leukemia cells did not reveal any modification in Rho GTPase mRNA levels,^{1,3} which

may be due to variations in the models applied. Indeed, Rho GTPase mRNA levels were evaluated in CD34⁺-derived megakaryocytes, and the reduced mRNA levels were confirmed at the protein level in patient platelets. Moreover, we observed a correlation between platelet count and CDC42 and RHOA expression levels, thereby suggesting a relationship between thrombocytopenia severity and Rho GTPase levels. Key regulators of the actin cytoskeleton CDC42 and RHOA have already been shown to be associated with thrombocytopenia, due to defects in cytoskeleton organization.³⁷⁻⁴¹ In affected individuals, we found abnormal tubulin organization in pro-platelet-forming megakaryocytes and altered actin polymerization in platelets. Rescue experiments with CDC42 lentiviral particles were not able to fully reverse the phenotype, although the cells produced thinner extensions and swellings, which were barely observed in control cells.

In mice, Cdc42 or RhoA deficiency causes increased platelet clearance.^{37,38} Such an observation was noted in two patients: one young girl who never received platelets (F3-II4), and a patient for whom splenectomy improved the platelet count (F1-III3). This suggests that ETV6 mutations are linked to several defects with reduced platelet formation and survival, although this latter mechanism requires further confirmation.

Individuals carrying a germline ETV6 variant showed increased numbers of circulating CD34⁺/CD133⁺ cells. The phenotype of these stem cells did not differ between patients and controls. This increase has to be considered as a helpful marker of the ETV6-related thrombocytopenia. It may not be attributed to excessive proliferation, as Zhang *et al.* showed reduced proliferation of CD34⁺ cells expressing WT or mutETV6.⁵ Interestingly, the defect in CDC42 expression may also account for increased hematopoietic progenitor mobilization, as chemical inhibition of CDC42 in mice efficiently improved progenitor

recruitment in the peripheral blood. Altered interaction between mutated progenitors and the BM microenvironment, as reported in the case of the ETV6-RUNX1 fusion protein, may also be involved.³³ Further investigations are required to more precisely delineate the role that ETV6 plays in stem cell progenitor mobilization.

In conclusion, we identified six variants in ETV6, of which five are novel, associated with dominant thrombocytopenia. Our study provides novel insights into the role that ETV6 plays in platelet function, morphology and formation that seem to be driven by changes in the cytoskeleton and potentially also in circulating CD34⁺ progenitor levels.

Funding

Bioinformatics analyzes benefit from the C2BIG computing centre funded by the Région Ile de France and UPMC. This work was partially supported by the ICAN Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ANR-10-IAHU-05), the Ligue nationale contre le cancer (Labeled team H Raslova), and the "Fondation pour la Recherche Médicale FRM" (grant to PS FDM20150633607). We thank Dr. J. Ghysdael and Dr. F. Guidez for providing the plasmid constructs, Laboratory of Pr. D. Raoult (URMITE), microscopy unit (P. Weber), Dr Paola Ballerini (Hopital Trousseau) for genotyping; Dr. JC. Bordet for transmission electron microscopy; Dr C Chomienne and C Dosquet for the platelet survival assay; M Crest for experimental help, the French Reference Center on Hereditary Platelet Disorders (CRPP) for patients' clinical exploration. For the F2-F6 families, study makes use of whole genome sequencing data and analysis approaches generated by the NIHR BioResource - Rare Disease BRIDGE Consortium. The NIHR BioResource - Rare Diseases is funded by the National Institute for Health Research of England (NIHR; award number RG65966). KF is supported by the Fund for Scientific Research-Flanders (FWO-Vlaanderen, Belgium, G.0B17.13N) and by the Research Council of the University of Leuven (BOF KU Leuven, Belgium, OT/14/098).

References

- Noetzi L, Lo RW, Lee-Sherick AB, et al. Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2015;47(5):535-538.
- Topka S, Vijai J, Walsh MF, et al. Germline ETV6 mutations confer susceptibility to acute lymphoblastic leukemia and thrombocytopenia. *PLoS Genet.* 2015; 11(6):e1005262.
- Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet.* 2015;47(2):180-185.
- Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet.* 1998;32:495-519.
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2496-2506.
- Van Vlierberghe P, Ambesi-Impombato A, Perez-Garcia A, et al. ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias. *J Exp Med.* 2011;208(13):2571-2579.
- Kwiatkowski BA, Bastian LS, Bauer TR, Jr., Tsai S, Zielinska-Kwiatkowska AG, Hickstein DD. The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17525-17530.
- Chakrabarti SR, Sood R, Ganguly S, Bohlander S, Shen Z, Nucifora G. Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(13):7467-7472.
- Wang L, Hiebert SW. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene.* 2001;20(28):3716-3725.
- Green SM, Coyne HJ, 3rd, McIntosh LP, Graves BJ. DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association. *J Biol Chem.* 2010;285(24):18496-18504.
- Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev.* 1998;12(15):2392-2402.
- Nurden P, Debili N, Vainchenker W, et al. Impaired megakaryocytopoiesis in type 2B von Willebrand disease with severe thrombocytopenia. *Blood.* 2006;108(8):2587-2595.
- Thakur ML, Walsh L, Malech HL, Gottschalk A. Indium-111-labeled human platelets: improved method, efficacy, and evaluation. *J Nucl Med.* 1981;22(4):381-385.
- Westbury SK, Turro E, Greene D, et al. Human phenotype ontology annotation and cluster analysis to unravel genetic defects in 707 cases with unexplained bleeding and platelet disorders. *Genome Med.* 2015;7(1):36.
- Turro E, Greene D, Wijgaerts A, et al. A dominant gain-of-function mutation in universal tyrosine kinase SRC causes thrombocytopenia, myelofibrosis, bleeding, and bone pathologies. *Sci Transl Med.* 2016;8(328):328ra330.
- Barton GJ, Sternberg MJ. A strategy for the rapid multiple alignment of protein sequences. Confidence levels from tertiary structure comparisons. *J Mol Biol.*

- 1987;198(2):327-337.
17. Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem.* 1999;274(42):30132-30138.
18. Guidez F, Petrie K, Ford AM, et al. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood.* 2000;96(7):2557-2561.
19. Bluteau D, Balduini A, Balayn N, et al. Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J Clin Invest.* 2014;124(2):580-591.
20. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun.* 2012;3:717.
21. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996;272(5259):263-267.
22. Raslova H, Komura E, Le Couedic JP, et al. FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *J Clin Invest.* 2004;114(1):77-84.
23. Klimchenko O, Mori M, Distefano A, et al. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood.* 2009;114(8):1506-1517.
24. Antony-Debre I, Bluteau D, Itzykson R, et al. MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations. *Blood.* 2012;120(13):2719-2722.
25. Goggs R, Williams CM, Mellor H, Poole AW. Platelet Rho GTPases-a focus on novel players, roles and relationships. *Biochem J.* 2015;466(3):431-442.
26. Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature.* 2012;488(7413):660-664.
27. Dolnik A, Engelmann JC, Scharfenberger-Schmeer M, et al. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. *Blood.* 2012;120(18):e83-92.
28. Melazzini F, Palombo F, Balduini A, et al. Clinical and pathogenetic features of ETV6 related thrombocytopenia with predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2016.
29. Coyne HJ, 3rd, De S, Okon M, et al. Autoinhibition of ETV6 (TEL) DNA binding: appended helices sterically block the ETS domain. *J Mol Biol.* 2012;421(1):67-84.
30. Sakurai T, Yamada T, Kihara-Negishi F, et al. Effects of overexpression of the Ets family transcription factor TEL on cell growth and differentiation of K562 cells. *Int J Oncol.* 2003;22(6):1327-1333.
31. Bluteau D, Glembofsky AC, Raimbault A, et al. Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood.* 2012;120(13):2708-2718.
32. Breton-Gorius J, Favier R, Guichard J, et al. A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood.* 1995;85(7):1805-1814.
33. Palmi C, Fazio G, Savino AM, et al. Cytoskeletal regulatory gene expression and migratory properties of B cell progenitors are affected by the ETV6-RUNX1 rearrangement. *Mol Cancer Res.* 2014;12:1796-1806.
34. Song H, Kim JH, Rho JK, Park SY, Kim CG, Choe SY. Functional characterization of TEL/AML1 fusion protein in the regulation of human CR1 gene promoter. *Mol Cells.* 1999;9(5):560-563.
35. Rho JK, Kim JH, Yu J, Choe SY. Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(1):91-95.
36. Aslan JE, McCarty OJ. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):35-46.
37. Pleines I, Eckly A, Elvers M, et al. Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets. *Blood.* 2010;115(16):3364-3373.
38. Pleines I, Hagedorn I, Gupta S, et al. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood.* 2012;119(4):1054-1063.
39. Suzuki A, Shin JW, Wang Y, et al. RhoA is essential for maintaining normal megakaryocyte ploidy and platelet generation. *PLoS One.* 2013;8(7):e69315.
40. Pleines I, Dutting S, Cherpokova D, et al. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42. *Blood.* 2013;122(18):3178-3187.
41. Chen C, Song X, Ma S, et al. Cdc42 inhibitor ML141 enhances G-CSF-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization. *Int J Hematol.* 2015;101(1):5-12.

Germline variants in *ETV6* underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34⁺ progenitors

Marjorie Poggi,^{1,*} Matthias Canault,^{1,*} Marie Favier,^{1,2,*} Ernest Turro,^{3,4,*} Paul Saultier,¹ Dorsaf Ghalloussi,¹ Veronique Baccini,¹ Lea Vidal,¹ Anna Mezzapesa,¹ Nadjim Chelghoum,⁵ Badreddine Mohand-Oumoussa,⁵ Céline Falaise,⁶ Rémi Favier,⁷ Willem H. Ouwehand,^{3,8} Mathieu Fiore,^{6,9} Franck Peiretti,¹ Pierre Emmanuel Morange,^{1,6} Noémie Saut,^{1,6} Denis Bernot,¹ Andreas Greinacher,¹⁰ NIHR BioResource,¹¹ Alan T. Nurden,¹² Paquita Nurden,^{6,12} Kathleen Freson,^{13,*} David-Alexandre Tréguët,^{14,15,16,*} Hana Raslova^{2,*} and Marie-Christine Alessi^{1,6,*}

¹Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille, France; ²Inserm U1170, Gustave Roussy, University Paris Sud, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer 94805 Villejuif, France; ³Department of Haematology and National Health Service Blood & Transplant, Cambridge University, UK; ⁴MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK; ⁵Post-Genomic Platform of Pitié-Salpêtrière (P3S), Pierre and Marie Curie University, F-75013 Paris, France; ⁶French Reference-Center on Inherited Platelet Disorders, Marseille, France; ⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France; ⁸Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK; ⁹Laboratoire d'hématologie, CHU de Bordeaux, Pessac, France; ¹⁰Institute for Immunology and Transfusion Medicine, University Medicine Greifswald, Germany; ¹¹NIHR BioResource - Rare Diseases, Cambridge University Hospitals, Cambridge Biomedical Campus, UK; ¹²LIRYC, Plateforme Technologique et d'Innovation Biomédicale, Hôpital Xavier Arnoz, Pessac, France; ¹³Department of Cardiovascular Sciences, Center for Molecular and Vascular Biology, KU Leuven, Belgium; ¹⁴ICAN Institute of Cardiometabolism and Nutrition, F-75013 Paris, France; ¹⁵Inserm, UMR_S 1166, Team Genomics and Pathophysiology of Cardiovascular Diseases, F-75013 Paris, France and ¹⁶Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ Paris 06), UMR_S 1166, F-75013 Paris, France

*MP, MC, MF, ET, KF, D-A T, HR and M-C A contributed equally to this work.

©2017 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2016.147694

Received: April 18, 2016.

Accepted: September 22, 2016.

Pre-published: September 23, 2016.

Correspondence: marie-christine.alessi@univ-amu.fr

Supplemental methods

Exome sequencing and sequencing validation in the F1 family

Whole-exome sequencing was performed on genomic DNA, as previously described¹, from 6 members of F1: the index case (F1-IV3), 2 unaffected members (F1-II1 and F1-IV2) and 3 affected members (F1-II2, F1-III3 and F1-III8). Direct Sanger sequencing confirmed the genotype among all family members (Big Dye Terminator kit V3; Life Technologies). Sequences were subsequently analyzed (Chromas X software) and aligned (Multalin: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Antibodies

Immunoblots were performed using goat polyclonal anti-ETV6 (N19, #sc8546, Santa Cruz), mouse monoclonal anti-SMRT (1212, #sc32298, Santa Cruz), rabbit polyclonal anti-RhoA (119, #sc179, Santa Cruz), rabbit polyclonal anti-MYH10 (#3404, Cell Signaling Technology), mouse monoclonal anti-Cdc42 (#05-542, Millipore), mouse monoclonal anti-Rac1 (23A8, #05-389, Millipore) and mouse monoclonal anti-GAPDH (6C5, MAB374, Millipore) antibodies.

Real-Time PCR

cDNA was synthesized using MMLV-reverse transcriptase from 10 ng of total RNA. Real-time PCR were performed using a LightCycler 480 (Roche) and Eva Green MasterMix (Euromedex). Relative levels of mRNA were measured using the comparative CT method. Primer sequences are available upon request.

Quantification of circulating CD34⁺ hematopoietic progenitors in the blood

Before labeling, 2 mL of each blood sample was subjected to red blood cell lysis. Equivalent numbers of cells were incubated for 15 minutes at 20°C with the appropriate monoclonal antibody cocktails: CD133-PhycoErythrin (BD Biosciences), CD19-FITC, CD34-AlloPhyco Cyanin/Alexa Fluor750, CD3-Pacific Blue, CD45-Krome Orange, CD33-PE/Cyanin7, CD38-AlloPhyco Cyanin, CD41-PE/Cyanin5, CD42b-PE/Cyanin5, CD61-FITC and CD123-PE (Beckman Coulter). Progenitors were characterized by CD34/CD133/CD33/CD38 co-expression; cells were gated on the CD34⁺ and SS^{low}/CD45^{low} population and excluded co-expression of lymphoid markers (Navios, Beckman Coulter).

Glycoprotein surface expression on platelets

PRPs were incubated in the presence or absence of platelet agonist ADP (10 μ M) or TRAP (50 μ M) with antibodies against $\alpha_{IIb}\beta_3$ (clone P2), the active form of $\alpha_{IIb}\beta_3$ (clone PAC-1; BD), glycoprotein (GP) Ib α , Ia, IV, CD63 (clone CLB-grad12; Beckman Coulter) and CD62P (clone CLB-Thromb/6) for 30 min at 20°C. Scatter signals and fluorescence intensity were analyzed using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter).

Platelet survival assay

The platelet survival assay was based on the method of Thakur *et al.*². Autologous platelets were washed and incubated with 3 MBq of ¹¹¹In-oxine for 10 min at 37° C. The platelets were then washed

and suspended in autologous platelet-poor plasma. An aliquot was withdrawn for platelet count and measurement of labeling efficiency. The remainder of the labeled platelets was used for intravenous administration. Successive blood samples were collected at 15 minutes as well as 2, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours post-injection for platelet count and radioactivity quantification. An exponential model was used to calculate platelet survival time according to the International Committee for Standardization in Hematology (ICSH).³ The platelet recovery and platelet production rates were calculated based on platelet survival time, initial platelet recovery and platelet count.

Platelet spreading analysis

Non-stimulated or ADP-stimulated (10 μ M) washed platelets (10^7 platelets/ml) were allowed to adhere (45 min, 37°C) to fibronectin-coated coverslips (20 μ g/ml; Sigma-Aldrich). Fixed platelets were stained with Alexa 488-phalloidin (F-actin) and Alexa 594-DNAse I (G-actin). Images were recorded (Axio-Imager M1 microscope with an AxioCam MRm camera; Carl Zeiss) and analyzed (ImageJ software). Filopodia and lamellipodia were manually quantified in five different view fields. The G-actin/F-actin ratio was evaluated on 20 different platelets. For each pixel, the G-actin fluorescence intensity was divided by the corresponding F-actin signal. A 5-ramps look-up table was applied to the ratio image. The surface of high G-actin/F-actin ratio corresponded to the platelet area with a signal above the LUT threshold, defined as ≥ 3 . Measurements were made on unprocessed images obtained using the same staining conditions, microscope objective and settings, and camera exposure time.

Clot retraction

PRPs were diluted in Tyrode's buffer with red blood cells. Coagulation was triggered using thrombin (1.25 U/mL), and clots were allowed to retract (1h, 37°C). Images were recorded using a CoolSNAP CCD-camera and analyzed to evaluate the reduction (%) of the initial clot surface (ImageJ software).

Co-immunoprecipitation assay

Whole cell extracts were prepared in 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.05% Nonidet P-40, with EDTA-free protease cocktail inhibitor. The cell lysates were pre-cleared with protein A/G magnetic beads (Millipore) for 2 hours at 4°C. The immunoprecipitation was carried out overnight at 4°C via incubation of cell extracts (500 μ g protein) with anti-ETV6-coated beads. Immunoprecipitates were washed five times with lysis buffer, suspended in SDS sample buffer and boiled for 5 min at 95 °C. The bound proteins were assessed for SMRT expression (Santa Cruz) via western blotting.

Cell transfection and luciferase assays

Transcriptional regulatory properties of wtETV6 and mutETV6 were analyzed using p(E74)₃tk80Luc plasmid containing the luciferase gene driven by an enhancer/promoter cassette composed of three tandem copies of the Ets Binding Site (E74-binding sites AACCGGAAGTA, found in the Drosophila E74 gene promoter) inserted 5' of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter. This plasmid was a gift from J Ghysdael⁴. GripTite™ 293 MSR Cells were transfected with the indicated reporter gene constructs (166 ng), the expression plasmid (333 ng) and pGL473-hRLuc

(50 ng) to normalize transfection efficiency. Luciferase activity was assayed 48 hours after transfection (Dual-Luciferase® Reporter Assay system, Promega).

Mammalian two-hybrid experiments. GripTite™ 293 MSR cells were co-transfected with GAL4(UAS)₅-TkLUC reporter plasmid (166 ng); GAL4(DBD)-N-CoR, GAL4(DBD)-SMRT, or GAL4(DBD)-mSin3A expression vector (or an empty vector, pGALO) (166 ng); expression vector pVP16-wtETV6 or pVP16-mutETV6 (166 ng) and pGL4-hRLuc (50 ng) to normalize transfection efficiency⁵. Luciferase activity was assayed 48 hours after transfection.

Ploidy analysis

At culture day 10, Hoechst 33342 (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) was added to the medium of cultured MKs for 1 hour at 37°C. The cells were then stained with directly coupled monoclonal antibodies: anti-CD41-allophycocyanin and anti-CD42a-phycoerythrin (BD Pharmingen) for 10 minutes at 4°C. Ploidy was measured on the CD41⁺CD42⁺ cell population by means of a flow cytometer (Navios BD Biosciences) and calculated as previously described.⁶

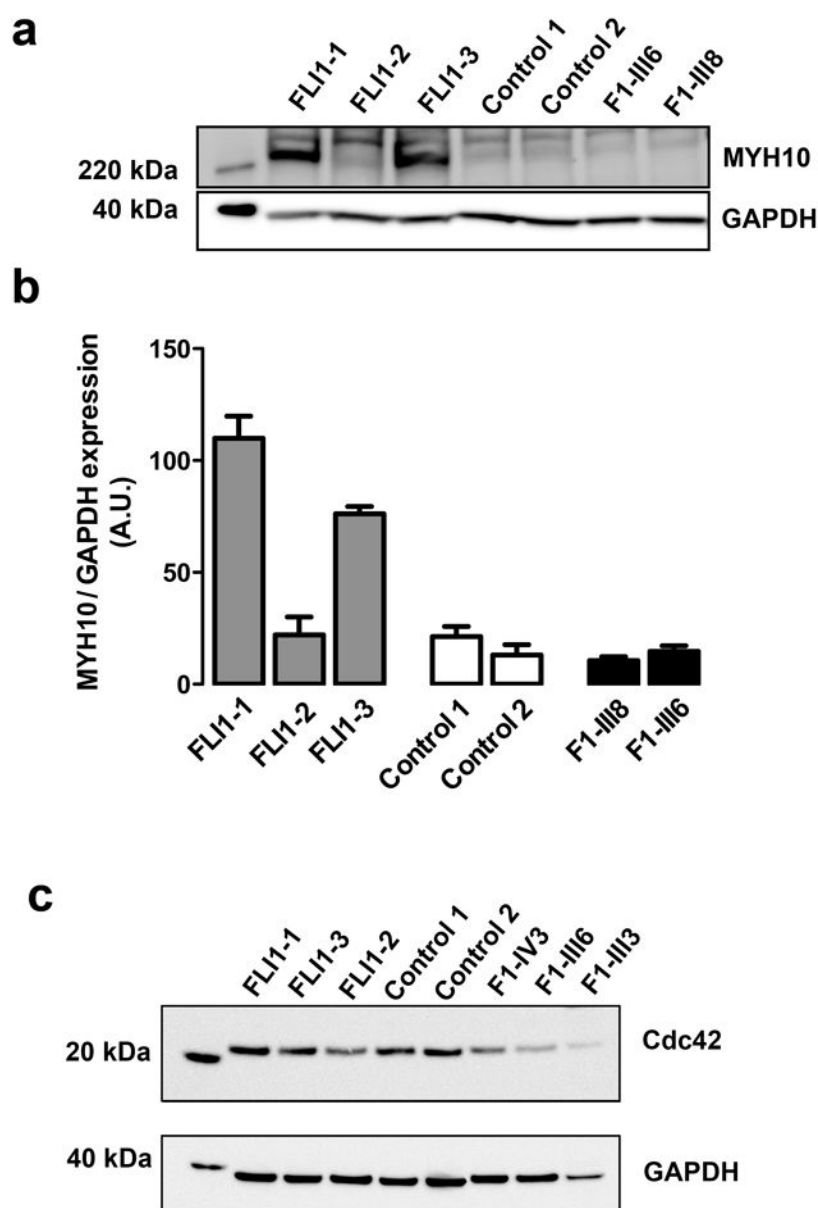
Quantification of proplatelet-bearing MKs

PPT-forming MKs were quantified on 300-500 total cells between days 11 and 15 of culture. PPT-bearing MKs exhibited cytoplasmic extensions with constriction areas (3 separate culture wells for each individual and condition). Microtubule and F-actin organization was determined on MKs (12 days) adhering to fibrinogen with fluorescently labeled anti-tubulin antibody (Sigma-Aldrich) and phalloidin (Life Technologies).

Lentiviral particle production and CD34⁺ cell transduction

Wild-type (wt) and p.P214L ETV6 DNA were subcloned into a third generation of HIV-derived lentiviral vector pRRLsin-PGK-IRES2-eGFP-WPRE (Genethon), and lentiviral stocks were prepared as previously described.^{7, 8} CDC42 DNA was subcloned into pRRLsin-PGK-IRES-ZsGreenGFP-WPRE, and lentiviral particles were produced by Vect'UB (Plateforme de Vectorologie, Bordeaux, France). CD34⁺ cells (3.5 to 5x10⁴) were infected twice with lentiviral particles. After 8 hours, the cells were washed and cultured in serum-free medium supplemented with TPO (100 ng/ml) and SCF (250 ng/ml).

Supplemental figure 1



Supplementary Figure 1: Effect of ETV6 mutations on MYH10 levels.

Western blot analysis (**a**) and quantification of MYH10 (**b**) and Cdc42 (**c**) expression in platelets of affected members (F1-III3, F1-III6, F1-III8, F1-IV3), 2 healthy controls and members of family affected by a FLI1 mutation: 2 carriers of the mutation (FLI1-1, FLI1-3) and 1 non-carrier (FLI1-2). GAPDH was used as a protein loading control. First lane corresponds to the protein ladder. The results are expressed as mean $\pm$ SEM, $n=2$.

Supplemental Table 1: Summarized results of platelet aggregation, ATP secretion and dense granule defects by electron microscopy or a mepacrine uptake assay. Human Phenotype Ontology (HPO) phenotyping was used as described (PMID: 25949529) to present the functional platelet laboratory results. As the different laboratories have used different type of aggregometers, concentrations of agonists and dense granule studies, the HPO methodology allows standard platelet function phenotyping of laboratory data. As expected, platelet aggregation performed with platelet rich plasma containing $< 120 \times 10^3$ platelets/ μ L plasma is highly variable and was not included in the analysis.

	Impaired ADP-induced platelet aggregation	Impaired epinephrine-induced platelet aggregation	Impaired collagen-induced platelet aggregation	Impaired arachidonic acid-induced platelet aggregation	Impaired ristocetin-induced platelet aggregation	Impaired thrombin-induced platelet aggregation	Impaired thromboxan A2 analog-induced platelet aggregation	Abnormal platelet ATP dense granule secretion	Abnormal dense granule
F1-III3	Yes	No	No	Yes	Yes	ND	ND	ND	No
F2-II3	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No
F3-II4	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No	No
F4-I2	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No
F4-II2	No	Yes	No	Yes	ND	No	No	No	No
F4-II3	No	Yes	No	Yes	ND	No	No	No	No
F5-I2	No	No	No	Yes	No	ND	No	No	No
F5-II1	No	No	No	No	No	ND	ND	No	No
F6-I1 (WT)	No	No	No	No	ND	No	No	Yes	Yes
F6-II1	Yes	Yes	Yes	Yes	ND	ND	No	No	Yes

ND: not done

Supplemental Table 2: Flow Cytometric Analysis of Platelet-Membrane Glycoproteins

Baseline	α IIb β 3 (P2)	α IIb β 3 (Pac1)	GPIb	GPIa	GPIV	CD63	CD62P
MFI Normal range	23-40	2.8-6.9	21-40	1.8-6.9	6.0-16	0.3-0.9	1.1-4.3
F1-II2	29	2.1	23	2.2	5.9	0.2	2.0
F1-III3	37	3.3	35	3.4	5.4	1.6	1.9
F1-III5	30	2.9	18	3.0	5.1	0.4	2.2
F1-IV3	22	2.3	21	2.8	7.0	0.6	2.9

ADP (10 μ M)	α IIb β 3 (P2)	α IIb β 3 (Pac1)	GPIb	GPIa	GPIV	GP53	CD62P
MFI Normal range	23-45	5.4-16	5-21	2.2-6.7	6.7-19	0.4-1.2	3.2-16
F1-II2	32	3.1	9.8	ND	ND	0.3	3.2
F1-III3	45	20	16	ND	ND	2.1	8.5
F1-III5	22	17	4.8	ND	ND	0.6	6.8
F1-IV3	24	12	8.3	ND	ND	0.7	7.9

TRAP (50 μ M)	α IIb β 3 (P2)	α IIb β 3 (Pac1)	GPIb	GPIa	GPIV	GP53	CD62P
MFI Normal range	29-55	3.5-9	10-27	2.0-6.5	7.2-18	0.5-3.6	5-12
F1-II2	37	2.4	10	ND	ND	0.5	5.1
F1-III3	47	9.4	18	ND	ND	3.4	12
F1-III5	30	5.5	12	ND	ND	1.1	9.7
F1-IV3	33	3.4	13	ND	ND	1.3	8.7

ND: not done

Supplemental Table 3: Platelet kinetic parameters for patient F3-II4

	Parameter value	Reference value
Platelet survival time (days)	4.6	8 - 10
Platelet recovery (% per day)	15	10 - 15
Platelet production rate	0.8 N	NA
Platelet sequestration	Absence	NA

The platelet count at the day of analysis was 128×10^9 /L. The injected dose was 2.2 MBq. N: reference value of the laboratory.

References

1. Canault M, Ghalloussi D, Grosdidier C, et al. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. *J Exp Med*. 2014; 211(7): 1349-1362.
2. Thakur ML, Walsh L, Malech HL and Gottschalk A. Indium-111-labeled human platelets: improved method, efficacy, and evaluation. *J Nucl Med*. 1981; 22(4): 381-385.
3. Recommended method for indium-111 platelet survival studies. International Committee for Standardization in Hematology. Panel on Diagnostic Applications of Radionuclides. *J Nucl Med*. 1988; 29(4): 564-566.
4. Lopez RG, Carron C, Oury C, et al. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem*. 1999; 274(42): 30132-30138.
5. Guidez F, Petrie K, Ford AM, et al. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood*. 2000; 96(7): 2557-2561.
6. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun*. 2012; 3(717).
7. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996; 272(5259): 263-267.
8. Raslova H, Komura E, Le Couedic JP, et al. FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *J Clin Invest*. 2004; 114(1): 77-84.

Discussion

Cette étude a permis à notre équipe de participer à la découverte des premiers variants constitutionnels du gène *ETV6* associés à une thrombopénie et à une prédisposition aux leucémies aiguës et aux syndromes myélodysplasiques. Les positions des variants identifiés par notre laboratoire (Poggi *et al.*, 2017) ou d'autres équipes (Melazzini *et al.*, 2016; Noetzli *et al.*, 2015; Topka *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) sont indiquées dans la figure 14. Ces variants altèrent très majoritairement le domaine ETS qui permet la fixation à l'ADN et qui contient le signal de localisation nucléaire (Park *et al.*, 2006; Sharrocks, 2001).

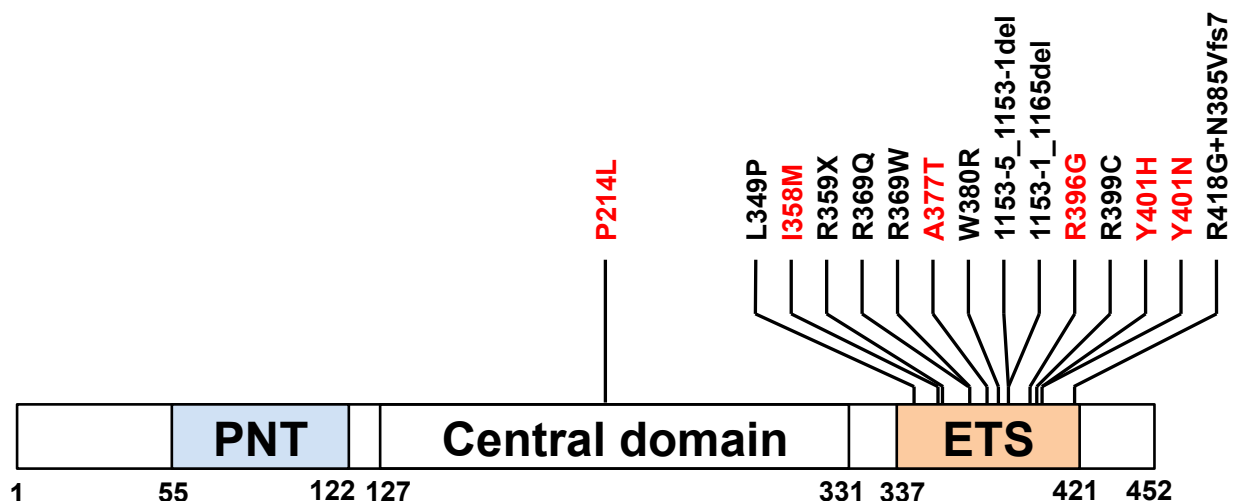


Figure 14 : Représentation schématique de la protéine ETV6. Le schéma met en évidence les domaines fonctionnels de la protéine. Les différents variants constitutionnels rapportés dans la littérature sont annotés en noir. Les variants identifiés par notre équipe sont indiqués en rouge. PNT: pointed domain; ETS: E26 transformation specific domain.

Les variants ETV6 codent des facteurs de transcription dont la fonction est altérée

Les variants ETV6 étudiés n'entraînent pas de défaut d'expression de la protéine. Cependant, tous entraînent une diminution de l'activité répressive de la protéine. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer cette diminution d'activité répressive. Tout d'abord, elle peut être expliquée par une anomalie de la localisation nucléaire des protéines codées par les variants *ETV6*. Ce défaut a été rapporté par les trois équipes qui l'ont étudié mais l'intensité du défaut de localisation reste controversé pour certains variants, en particulier p.Pro214Leu (Noetzli *et al.*, 2015; Topka *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Cette perte de fonction peut aussi être due à un défaut de liaison à l'ADN, comme montré pour les variants p.Arg369Gln et p.Arg399Cys qui altèrent le domaine de fixation à l'ADN (Zhang *et al.*, 2015). Il peut également s'agir d'un défaut de recrutement de co-répresseurs comme SMRT, SIN3A et NCOR associé à certains variants *ETV6* (Poggi *et al.*, 2017). Il est également montré qu'ETV6 peut réguler, directement ou indirectement, des histone désacétylases (Wang et Hiebert, 2001). Des mécanismes de régulation épigénétique pourraient donc participer à la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ETV6 et feront l'objet de l'étude suivante. Il est probable que ces mécanismes ne s'excluent pas mutuellement. Les conséquences moléculaires de l'altération de la fonction répressive d'ETV6 sont encore mal connues. Il serait particulièrement intéressant d'étudier sans *a priori* l'effet d'un variant *ETV6* sur le transcriptome, par RNA-seq par exemple, ce qui fera également partie de la prochaine étude concernant les variants *ETV6*.

La thrombopénie ETV6 : un modèle d'étude de la mégacaryopoïèse

Des anomalies de la mégacaryopoïèse *in vitro* ont été mises en évidence. Les mégacaryocytes dérivés des cellules CD34⁺ circulantes des patients présentaient un excès de prolifération. Ce résultat est en accord avec des données issues de modèles murins et avec les données obtenues dans des cellules hématopoïétiques progénitrices transfectées avec des variants *ETV6* (Hock *et al.*, 2004; Noetzli *et al.*, 2015).

Malgré l'augmentation de leur potentiel de prolifération précoce, les mégacaryocytes dérivés de cellules souches hématopoïétiques circulantes de patients porteurs d'un variant *ETV6* ont montré une capacité réduite à former des proplaquettes. Cela suggère qu'un défaut de réorganisation du cytosquelette au cours de la formation de plaquettes rendrait principalement compte de la thrombopénie des patients. Cette hypothèse est soutenue par la modification importante de l'expression de l'expression de protéines du cytosquelette dans l'ARN plaquettaire d'un patient porteur d'un variant *ETV6* (Noetzli *et al.*, 2015). Cependant les mécanismes moléculaires qui sous tendent ce défaut d'organisation du cytosquelette reste mal connus. La protéine ETV6-RUNX1 modifie l'expression des gènes régulant l'organisation du cytosquelette et en particulier celle de *CDC42* qui code un régulateur clé du cytosquelette plaquettaire et mégacaryocytaire. Son expression dans les plaquettes des patients ETV6 était diminuée mais la restauration du phénotype par des particules lentivirales *CDC42* était incomplète, bien que les mégacaryocytes aient produit des extensions plus minces et des renflements. Cela suggère l'existence d'autres mécanismes. Il est possible que l'augmentation concomitante de l'expression de *RHOA* (également sous-exprimé dans les plaquettes des patients) soit indispensable pour restaurer le phénotype ce que nous

pourrons tester par une double transduction lentivirale. D'autre part, des approches par RNA-seq sur les mégacaryocytes des patients permettront de rechercher sans *a priori* des dérégulations d'autres gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette.

Les inhibiteurs d'histone désacétylases sont une classe thérapeutique déjà en cours d'utilisation ou en cours de développement dans de nombreux types de cancers hématologiques ou solides. Une complication majeure de ces traitements est la survenue de thrombopénie (Mottamal *et al.*, 2015). De manière intéressante, un modèle murin étudiant un inhibiteur d'histone désacétylase (HDAC) a montré des similitudes entre la thrombopénie induite par ces traitements et la thrombopénie liée aux variants *ETV6* (Bishton *et al.*, 2011). En effet, les mégacaryocytes de ces souris présentaient un défaut de formation des proplaquettes et une diminution de l'expression de protéines régulant le cytosquelette en particulier CDC42. Nous émettons donc l'hypothèse que des mécanismes épigénétiques sont impliqués dans le défaut de formation des plaquettes induit par les variants *ETV6*. Des expériences de ChIP-seq nous permettront de répondre à cette question.

***ETV6* : un nouveau gène de prédisposition aux hémopathies malignes**

ETV6 est un gène suppresseur de tumeur altéré de manière somatique dans de nombreuses hémopathies malignes (De Braekeleer *et al.*, 2012). Ce travail et d'autres études publiées récemment ont permis de définir les variants *ETV6* comme un nouveau syndrome de prédisposition aux hémopathies malignes. Le lien entre *ETV6* et les hémopathies malignes est consolidé par la découverte qu'indépendamment de la présence d'une thrombopénie, environ 1% des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant sont associées à des variants constitutionnels pathogènes de ce gène (Duployez *et al.*, 2017; Moriyama *et al.*, 2015). Ces résultats

remettent en question le modèle selon lequel les leucémies aiguës lymphoblastiques seraient principalement liées à des altérations génétiques somatiques et indiquent que des facteurs génétiques constitutionnels pourraient jouer un rôle important.

Chez les patients porteurs d'un variant *ETV6*, la pénétrance de la survenue d'une hémopathie maligne est incomplète. Il serait important de pouvoir évaluer le risque de transformation leucémique chez ces patients afin de pouvoir mieux apprécier le pronostic de cette pathologie liée à *ETV6*. Cependant, cette évaluation est difficile pour plusieurs raisons. D'une part, il s'agit d'une maladie rare avec moins de 80 patients décrits dans la littérature. D'autre part, l'évaluation du risque peut ensuite souffrir de nombreux biais, en particulier de sélection ou d'observation. Plusieurs méthodes de recrutement ont été utilisées. Les variants constitutionnels du gène *ETV6* ont été recherchés chez des patients présentant l'association thrombopénie familiale et hémopathies malignes (Noetzli *et al.*, 2015; Topka *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015), ou chez des patients présentant une thrombopénie inexpliquée (Melazzini *et al.*, 2016; Poggi *et al.*, 2017). L'évaluation du risque ne peut donc être envisagée que dans ce dernier type d'étude et serait de 13-25% ce qui serait supérieur au risque d'environ 10% associé aux variants *ANKRD26* (Balduini *et al.*, 2018) mais inférieur au risque de 30-40% associé aux variants *RUNX1* (Owen *et al.*, 2008).

Sur un plan moléculaire, la majorité des variants semblent être associés à un défaut d'activité répressive avec effet dominant négatif. Les protéines variantes présentent un défaut de localisation nucléaire (Noetzli *et al.*, 2015; Topka *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) également observé pour la protéine de fusion *ETV6-RUNX1* (Rho *et al.*, 2002). Il est démontré que la formation d'homodimère *ETV6-ETV6* est essentielle à sa fonction répressive (Green *et al.*, 2010). La formation de dimères [*ETV6* variant] - [*ETV6* sauvage] observées par expérience de pull-down (Noetzli *et al.*, 2015) pourrait

alors empêcher la protéine ETV6 sauvage d'être transportée dans le noyau du mégacaryocyte ce qui entrainerait une perte de fonction du produit de l'allèle normal d'*ETV6*. Cette perte de la localisation nucléaire pourrait donc constituer un mécanisme essentiel de la perte de la fonction suppressive de tumeur. La diminution importante de l'activité répressive d'*ETV6* qui en résulte pourrait en effet altérer l'expression de gènes impliqués dans la croissance et la mort cellulaire, l'inflammation, la réparation de l'ADN ou le métabolisme énergétique.

La pénétrance incomplète de la survenue des hémopathies malignes suggère que des altérations génétiques somatiques additionnelles sont nécessaires à la leucémogénèse. En étudiant les cellules blastiques leucémiques par séquençage à haut débit ou ciblé, des investigateurs ont rapporté l'existence d'altérations somatiques dans un certain nombre de gènes connus pour être impliqués dans la leucémogénèse, comme des variants *RUNX1* et *KRAS* dans un cas de myélodysplasie ou une fusion *PAX5-SHB* dans un cas de leucémie aiguë lymphoblastique (Kirkpatrick *et al.*, 2015). Cependant, les rôles respectifs dans la leucémogénèse et les interactions des variants constitutionnels et des variants somatiques additionnels d'*ETV6* reste encore mal définis.

En conclusion, nous avons identifié six variants constitutionnels d'*ETV6*, dont cinq nouveaux, associés à une thrombopénie et à une prédisposition aux hémopathies malignes. Notre étude fournit des informations importantes sur le rôle joué par ETV6 dans la mégacaryopoïèse et la formation des plaquettes suggérant un rôle de ce facteur de transcription dans la réorganisation du cytosquelette.

Etude 2

**Mécanismes physiopathologiques de la
thrombopénie associée aux variants du
gène *ETV6* : approche RNA-seq et ChIP-seq**

Contexte scientifique

En utilisant la technique du séquençage de l'exome, nous avons récemment identifié six variants du gène *ETV6* dans des familles françaises et européennes non apparentées associés à une thrombopénie avec une prédisposition aux hémopathies malignes (Poggi *et al.*, 2017). Par le concours de plusieurs équipes internationales, 15 variants d'*ETV6* au total ont été identifiés récemment, permettant de décrire cette nouvelle thrombopénie constitutionnelle avec prédisposition aux hémopathies malignes. Malgré la description très récente de cette pathologie (2015-2016), 14 cas différents sont déjà identifiés en France contre seulement huit cas de variants *RUNX1* et 22 cas de variants *ANKRD26* alors que ces variants ont été rapportés pour la première fois en 1985 et 2011, respectivement (Pippucci *et al.*, 2011; Song *et al.*, 1999). En outre, un séquençage ciblé d'*ETV6* chez 4405 enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique non sélectionnés a permis d'identifier 31 variants constitutionnels *ETV6* (soit environ 1% des cas) (Moriyama *et al.*, 2015). Ainsi, la thrombopénie constitutionnelle associée aux variants *ETV6* apparaît être relativement fréquente avec un risque de transformation leucémique non négligeable.

Nos travaux précédents concernant cette pathologie ont décrit une prolifération accrue des mégacaryocytes avec un défaut important de formation des proplaquettes. Nous avons également mis en évidence des défauts plaquettaires liés au cytosquelette avec une expression réduite de Rho-GTPase dans les plaquettes et des défauts d'étalement des plaquettes.

La compréhension de ces défauts et l'identification des gènes exprimés de manière différentielle dans les cellules témoins et porteuses d'un variant *ETV6* permettront de

mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la mégacaryopoïèse, la production et la fonction plaquettaire et pourraient être à la base de nouvelles stratégies pour le traitement de la thrombopénie constitutionnelle liées aux variant *ETV6* et à d'autres maladies apparentées.

Tous les variants *ETV6* identifiés dans les familles avec thrombopénie constitutionnelle et prédisposition aux hémopathies malignes altèrent le domaine ETS de fixation à l'ADN excepté le variant p.Pro214Leu qui altère le domaine central. Tous les variants réduisent l'activité répressive de la protéine ce qui peut reposer sur différents mécanismes dont les contributions respectives ne sont pas clairement établies. Tout d'abord, les variants *ETV6* peuvent entraîner une séquestration de protéine dans le cytoplasme. Cependant, l'intensité du défaut de localisation reste controversé pour certains variants, en particulier p.Pro214Leu (Noetzli *et al.*, 2015; Topka *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Cette perte de fonction peut aussi être due à un défaut de liaison à l'ADN (Zhang *et al.*, 2015). L'activité de répression transcriptionnelle a été imputée au *Pointed domain* et au domaine central. La répression médiée par le *Pointed domain* dépend de l'interaction avec L3MBTL1 (homologue humain de la protéine tumorale cérébrale maligne Lethal3 chez la drosophile). Cette protéine est un membre du groupe *Polycomb* constitué de facteurs chromatinien connus pour exercer une répression transcriptionnelle de leurs gènes cibles au cours du développement (Boccuni *et al.*, 2003). Il s'agit donc d'un mécanisme impliqué dans l'activité répressive d'*ETV6* sur la transcription par un mécanisme indépendant des HDAC. En revanche, la répression par le domaine central est médiée par la liaison de divers corépresseurs, notamment SMRT, mSin3A, N-CoR, qui recrutent par la suite des histones désacétylases permettant de participer à la répression transcriptionnelle (Guidez *et al.*, 2000). En effet, *ETV6*

participe au recrutement des HDAC3 et HDAC9 (Petrie *et al.*, 2003; Wang et Hiebert, 2001). Par ailleurs, l'inhibition des HDAC induit une thrombopénie (Mottamal *et al.*, 2015) et un modèle murin étudiant des inhibiteurs d'HDAC a montré qu'ils sont à l'origine d'un défaut de formation des proplaquettes et une diminution de l'expression de protéines régulant le cytosquelette (CDC42, RAC1, RHOA) (Bishton *et al.*, 2011), comme observé dans la thrombopénie liée aux variants *ETV6*. Il a également été suggéré qu'un inhibiteur d'HDAC pourrait inhiber la formation de proplaquettes en augmentant le taux de tubuline acétylée (Iancu-Rubin *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent qu'*ETV6* pourrait jouer un rôle dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes et qu'une dérégulation épigénétique pourrait être un mécanisme physiopathologique clé dans la thrombopénie constitutionnelle liée aux variants *ETV6*.

Le but de ce travail est de comprendre les mécanismes transcriptionnels et épigénétiques reliant les variants constitutionnels d'*ETV6* à la thrombopénie associée à la prédisposition aux hémopathies malignes. Nous déterminerons les gènes cibles d'*ETV6* variants et sauvage dans les mégacaryocytes et nous déterminerons les modifications épigénétiques induites par les variants *ETV6*.

Afin de répondre aux objectifs de l'étude, une combinaison d'approches RNA-seq et ChIP-seq sera utilisée. La combinaison des deux approches nous permettra de comprendre quels gènes sont directement régulés par *ETV6*, quelles sont les conséquences transcriptionnelles à long terme et donc cellulaires de l'inactivation d'*ETV6*, quelles sont les modifications des histones impliquées dans la pathologie, et quels réseaux de régulation génique sont responsables de la thrombopénie et de la prédisposition aux hémopathies malignes.

Méthodes et résultats préliminaires

1. Patients

Trois familles non apparentées dont les membres atteints présentent une thrombopénie constitutionnelle liée à un variant *ETV6* sont incluses dans l'étude (Figure 15).

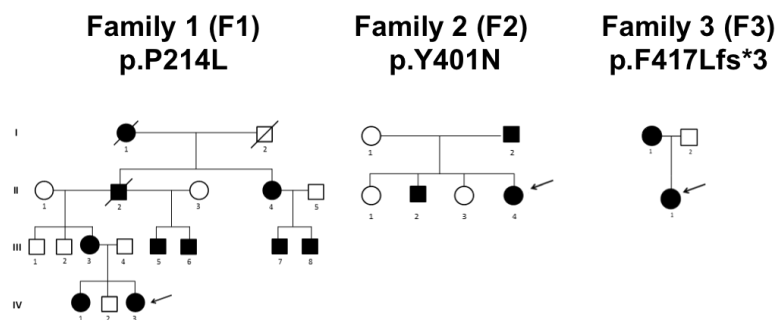


Figure 15 : Arbres généalogiques des familles portant des variants *ETV6*. Les carrés représentent les hommes et les cercles représentent les femmes. Les symboles noirs représentent les membres de la famille présentant une thrombopénie. Les flèches indiquent les *propositi*.

Deux des familles étudiées (F1 et F2) ont déjà été précédemment décrites par notre équipe (Poggi *et al.*, 2017). Les membres atteints de ces familles portent les variants faux-sens p.Pro214Leu dans le domaine central (F1) et p.Tyr401Asn dans le domaine ETS (F2). La patiente de la famille F3 porte un variant non décrit c.1251delC (p.Phe417Leufs*3) induisant un décalage du cadre de lecture avec codon stop prématuré. Ce variant est associé à une forte diminution de l'expression d'*ETV6* (Figure 16).

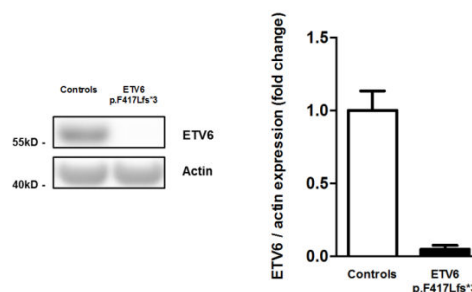


Figure 16 : Expression d'ETV6 dans les plaquettes du propositus de la famille F3, portant le variant constitutionnel p.F417Lfs*3 ETV6. L'expression de la protéine ETV6 a été étudiée dans les plaquettes de la patiente F3-II-1 qui porte le variant p.F417Lfs*3 et les plaquettes d'un témoin. Les plaquettes ont été lavées dans du tampon HEPES-Tyrode selon une procédure standard puis lysées à une concentration de $1 \times 10^6/\mu\text{L}$ dans du tampon Mg2+ Lysis/Wash Buffer (Millipore). Les protéines plaquettaires totales (30 μg) ont été séparées dans des gels NuPAGE avec du tampon MES SDS (Thermofisher Scientific) et transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène. Les membranes ont été saturées et marquées pendant la nuit avec l'anticorps primaires anti-ETV6 (Santa-Cruz Biotechnology, sc-8546) puis anti-actine (Abcam, ab3280). Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (Biorad). Les signaux de chimiluminescence ont été obtenus en utilisant le réactif de substrat chimiluminescent Novex ECL, détectés à l'aide de la caméra Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare). Les tailles attendues d'ETV6 et de l'actine sont de 57 et 43 kDa. Les données de l'analyse densitométrique du signal ETV6 normalisé par rapport au signal de l'actine sont présentées sur la partie droite de la figure (ImageJ, National Institutes of Health, USA).

Les patients des familles F1, F2 et F3 sont suivis dans les Centres de Référence des Pathologies Plaquettaire de Marseille et Paris. Quatre patients avec variants *ETV6* (F1-III-7, F1-III-8, F2-II-4 et F3-II-1) et quatre témoins étaient inclus dans l'étude RNA-seq. Deux patients avec variants *ETV6* (F1-III-2 et F3-II-1) et un témoin ont été inclus dans l'étude ChIP-seq.

2. Culture mégacaryocytaire

Les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ des patients et des témoins ont été isolées à partir de 80 mL de sang périphérique par tri magnétique grâce à des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD34 (CD34 MicroBead Kit, Miltenyi Biotec). Les cellules CD34⁺ triées ont été mises en culture dans du milieu sans sérum StemSpan™ SFEM II (STEMCELL Technologies) supplémenté par un mélange de cytokines et de facteurs de croissance (TPO, SCF, interleukine 6 et interleukine 9) induisant une différenciation mégacaryocytaire (StemSpan™ Megakaryocyte Expansion Supplement, STEMCELL Technologies). Après 10 jours de culture, la différenciation mégacaryocytaire a été contrôlée en cytométrie de flux après marquage CD41-APC et CD42a-PE (Figure 17).

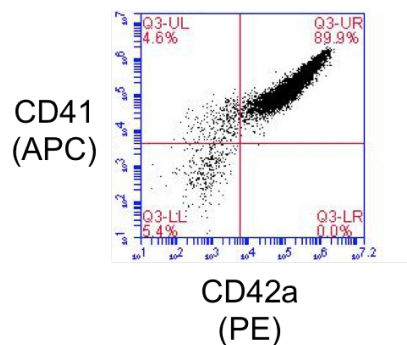


Figure 17 : Expression de CD41 et CD42a à J10 de culture de cellule CD34⁺. Au dixième jour de culture, un volume de 10 µL de la suspension cellulaire de culture a été incubé pendant 15 minutes à 20°C avec les anticorps anti-CD41-AlloPhycoCyanine et anti-CD42a-PhycoErythrin (BD Biosciences) dilués au 1/10^{ème}. Les données sont acquises après lavage sur un cytomètre Accuri C6 (BD Biosciences).

3. RNA-seq

L'ARN des mégacaryocytes a été extrait au moyen du kit NucleoSpin XS-kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co). Le contrôle de la qualité de l'ARN, la préparation des bibliothèques, le séquençage et l'analyse biostatistique ont été réalisés par Eurofin Genomics (Paris, France). Pour l'analyse biostatistique, le *package* edgeR du logiciel R a été utilisé pour analyser l'expression différentielle entre les groupes patients et témoins (Robinson *et al.*, 2010). Un modèle de Poisson surdispersé est utilisé pour

tenir compte à la fois de la variabilité biologique et technique à l'intérieur et entre les groupes. Les méthodes empiriques de Bayes sont utilisées pour modérer le degré de surdispersion entre les transcrits, améliorant la fiabilité de l'inférence.

L'analyse des résultats est en cours. Le profil d'expression du groupe des patients avec variants *ETV6* a été comparé au groupe des témoins. Parmi les gènes dont l'expression est la plus modifiée par le variant, on note la représentation importante de gènes codant des histones constitutives du noyau du nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4) et la présence de l'histone de liaison H1. Le Tableau 3 présente la liste de 22 gènes codant des histones parmi les 40 gènes dont l'expression est la plus augmentée chez les patients porteurs de variants *ETV6* par rapport aux témoins.

Tableau 3 : Liste de gènes codant des histones parmi les 40 gènes dont l'expression est la plus augmentée chez les patients porteurs de variants *ETV6* par rapport aux contrôles.

Gène (geneID)	Log(FC)	P-value
HIST1H3J(8356), histone cluster 1 H3j	2,9	3,6E-04
HIST1H2AB(8335), histone cluster 1 H2ab	2,8	3,9E-04
HIST1H1D(3007), histone cluster 1 H1d	2,8	1,2E-03
HIST1H4I(8294), histone cluster 1 H4i	2,6	2,0E-03
HIST1H3C(8352), histone cluster 1 H3c	2,5	3,9E-03
HIST2H3D(653604), histone cluster 2 H3d	2,5	1,6E-03
HIST1H3F(8968), histone cluster 1 H3f	2,5	3,0E-03
HIST1H2BH(8345), histone cluster 1 H2bh	2,5	1,1E-03
HIST1H3G(8355), histone cluster 1 H3g	2,5	7,2E-03
HIST1H2BF(8343), histone cluster 1 H2bf	2,5	5,8E-05
HIST1H3A(8350), histone cluster 1 H3a	2,5	2,6E-04
HIST1H2BO(8348), histone cluster 1 H2bo	2,4	3,9E-04
HIST1H2BE(8344), histone cluster 1 H2be	2,4	1,9E-03
HIST2H2BE(8349), histone cluster 2 H2be	2,4	1,5E-04
HIST1H4K(8362), histone cluster 1 H4k	2,4	6,5E-05
HIST1H1B(3009), histone cluster 1 H1b	2,4	8,6E-04
HIST1H2AI(8329), histone cluster 1 H2ai	2,3	8,1E-04
HIST1H4F(8361), histone cluster 1 H4f	2,3	4,0E-04
HIST1H2BD(3017), histone cluster 1 H2bd	2,3	3,8E-04
HIST1H2BI(8346), histone cluster 1 H2bi	2,3	7,6E-03
HIST1H2BJ(8970), histone cluster 1 H2bj	2,3	6,1E-05
HIST2H2BF(440689), histone cluster 2 H2bf	2,3	1,8E-03

Classement par ordre décroissant d'augmentation d'expression chez les patients porteurs de variants *ETV6* par rapport aux témoins. FC : ratio de l'expression du gène chez les témoins sur l'expression du gène chez les malades. Les gènes codant une histone variante sont indiqué en gras.

Le logiciel Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems) a été utilisé pour identifier sans *a priori* des voies de signalisation influencées par les différences d'expression génique induites par les variants *ETV6* (Figure 18). Plusieurs voies de signalisation sont significativement modifiées par la présence des variants comme la voie de signalisation FLT3, la voie ERK/MAPK, la voie PEDF, la voie de l'hormone de croissance, la voie PTEN, la voie de signalisation impliquant la protéine 14-3-3, la voie TEC kinase, la voie mTOR, la voie des intégrines, la voie phospholipase C, la voie de la réaction de phase aigüe, la voie de la vitamine C ou la voie du VEGF. La plupart de ces voies sont altérées dans le sens d'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans ces voies chez les patients avec variants *ETV6*. Cela est probablement dû au fait qu'*ETV6* exerce principalement une activité transcriptionnelle répressive et que cette dernière est altérée par la présence des variants.

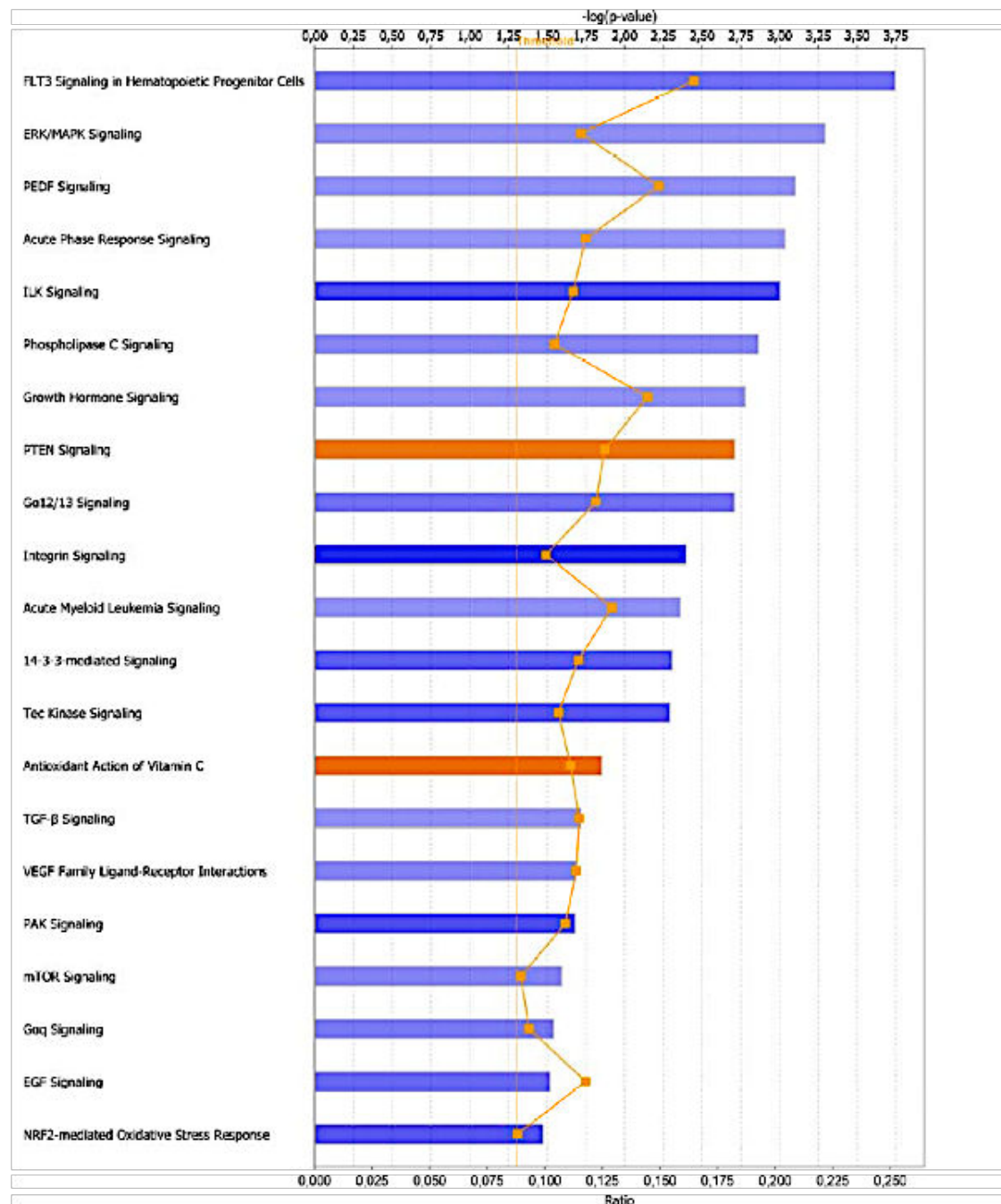


Figure 18 : Analyse comparative du transcriptome des patients porteurs de variants *ETV6* et de témoins.

Les variants *ETV6* sont associés à une expression différentielle des ARNm impliqués dans les voies de signalisation indiquées à chaque ligne. Pour chaque voie de signalisation, la significativité statistique de la différence observée, représentée par la valeur $-\log(p\text{-value})$, est indiquée en abscisse. Le seuil de significativité des p -values ajustées (test exact de Fisher) a été défini à 0,1. La couleur des barres indique les voies hyperactivées (barres bleues) ou hypoactivées (barres oranges) chez les patients par rapport aux témoins. La valeur du z -score, reflétant l'importance de la différence d'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation, est représentée par l'intensité de la couleur bleue ou orange. Pour chaque voie de signalisation, le rapport entre le nombre de gène de la voie dont l'expression est altérée dans notre jeu de données divisé par le nombre total de gènes correspondant à cette voie est indiqué par des carrés oranges reliés par une ligne (ratio).

4. ChIP-seq

Le ChIP-seq est une méthode de choix pour identifier les cibles des facteurs de transcription ainsi que les modifications des histones. Le facteur de transcription ETV6 est susceptible d'agir sur des gènes cibles de manière directe ou indirecte en régulant d'autres membres de complexes de régulation transcriptionnelle comme les HDAC. Nous émettons l'hypothèse que les variants *ETV6* peuvent affecter la liaison de la protéine à ses partenaires, en particulier les HDAC et que ce défaut de recrutement des HDAC pourrait être responsable du changement de son activité répressive.

Nous avons réalisé, en collaboration avec l'équipe de Michel Pucéat (Centre de génétique médicale de Marseille (MMG), INSERM UMR S910 Marseille, France) les expériences de ChIP-seq à partir de mégacaryocytes dérivés de cellules souches hématopoïétiques circulantes des patients porteurs des variants *ETV6* ou de témoins. L'immunoprécipitation de la chromatine est réalisée selon la méthode publiée par Jebeiani *et al.* (Jebeiani *et al.*, 2016). A J10 de la culture, les mégacaryocytes sont fixés par du paraformaldéhyde 1%, pour permettre un *crosslinking* des protéines interagissant avec l'ADN sur ce dernier. La réaction de fixation est arrêtée en ajoutant de la glycine à une concentration finale de 125 mM. Après lavage au PBS, les culots sont suspendus dans une solution de perméabilisation composée de PIPES 5 mM pH 8, KCl 85 mM, NP-40 0,5% et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Après une incubation de 10 minutes sur roue, le prélèvement est centrifugé à 3000 G pendant cinq minutes à 4°C. Le culot (noyaux) est suspendu dans une solution de sonication composée de SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl pH8 50 mM et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Après une incubation de 10 minutes sur roue, la chromatine est soniquée par 5 cycles de 15 secondes de

sonication suivi de 2 minutes de pause (Sonicator 3000, Misonix). Enfin, l'échantillon est centrifugé à 8000 G pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant, contenant la chromatine soniquée, est incubé sur la nuit avec des billes magnétiques protéine G couplées à un anticorps permettant la précipitation d'ETV6 (anticorps de chèvre anti-ETV6, SC8546, Santa Cruz Biotechnology), de l'histone H3K27 acétylée (anticorps de lapin anti-H3K27ac, Ab4729, Abcam) ou de l'histone H3K4 monométhylée (anticorps de lapin anti-H3K4me1, C15410194, Diagenode) dans 2 mL de tampon de ChIP (NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, NP40 0,5%, Triton-X100 1%). Les deux modifications post-traductionnelles d'histone H3K27ac et H3K4me1 marquent des éléments activateurs de la transcription. Leur étude combinée permet de distinguer les éléments à l'état actifs (marqués H3K27ac) des éléments à l'état inactif ou à l'équilibre (marqués H3K4me1 seul) (Creyghton *et al.*, 2010). Après lavage dans le tampon de ChIP, la chromatine immunoprécipitée est séparée de l'anticorps couplé aux billes magnétiques par une incubation de 20 minutes à 80°C dans 150 µL de tampon d'élution (SDS 1%, NaHCO₃ 100 mM), puis incubé toute la nuit à 65°C en présence de NaCl 200 mM afin d'effectuer la séparation entre les protéines chromatinienne et l'ADN (*reverse crosslinking*). Le lendemain, l'échantillon est incubé deux heures à 55°C après ajout de protéinase K (250 µg/mL), de RNase A (125 µg/ml) et d'EDTA (12,5 mM). Enfin, l'ADN était purifié à l'aide billes magnétiques SPRI (*solid phase reversible immobilization*) (2,5 fois le volume de l'échantillon). L'ADN double brin purifié est quantifié en utilisant un fluorimètre après marquage au SYBR Green et sa qualité est contrôlée par le Bioanalyseur 2100 (Agilent) sur une puce à ADN à haute sensibilité.

La Figure 19 présente un rapport de contrôle qualité d'un échantillon d'ADN immunoprécipité. La taille moyenne des fragments d'ADN de cet échantillon est de 269 paires de bases ce qui permet d'effectuer les étapes de préparation des librairiers du séquençage qui sont en cours actuellement chez la société Integragen (Evry, France).

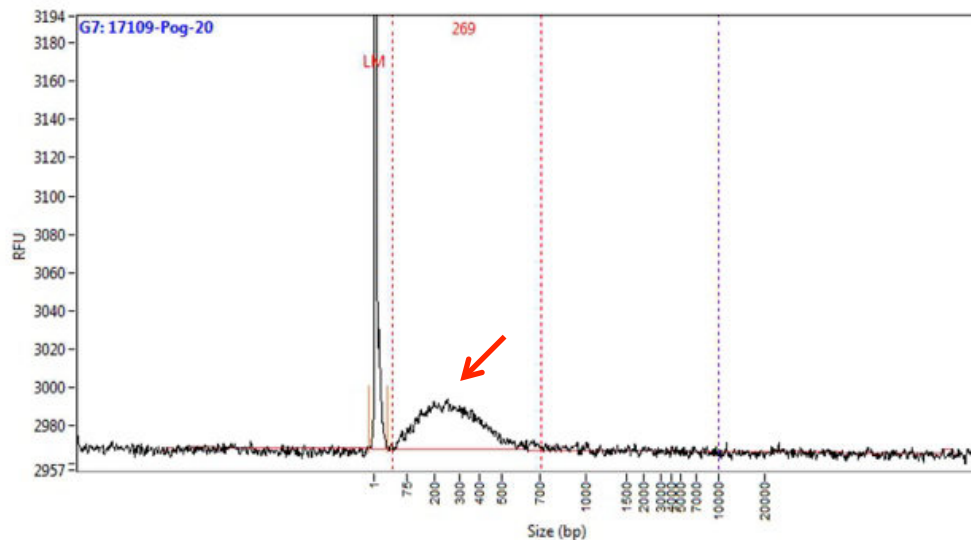


Figure 19 : Contrôle qualité d'un échantillon d'ADN immunoprécipité H3K27ac d'un témoin. La courbe représente l'intensité du signal dans le gel (correspondant à la quantité d'ADN) en fonction de la taille des fragments d'ADN. La taille attendue des fragments d'ADN pour la préparation des librairies et le séquençage doit être d'environ 200 paires de bases (bp). Le premier pic correspond à un marqueur de charge. Le signal correspondant à l'échantillon est indiqué par la flèche rouge.

Discussion et perspectives

Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la thrombopénie constitutionnelle liée aux variants *ETV6* ne sont pas clairement établis. Des données de la littérature suggèrent qu'*ETV6* pourrait jouer un rôle dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Cette étude a pour objectif d'évaluer quels gènes sont directement régulés par *ETV6*, quelles sont les conséquences transcriptionnelles de l'inactivation d'*ETV6*, quelles sont les modifications des histones impliquées dans la pathologie et quels réseaux de régulation génique sont responsables de la thrombopénie. Pour répondre à ces objectifs, une approche combinant RNA-seq et ChIP-seq est menée.

Dérégulation de voies de signalisation dans les mégacaryocytes de patients avec variants *ETV6*

L'analyse préliminaire du RNA-seq a montré que certaines voies de signalisation dérégulées sont impliquées dans la prolifération et l'oncogenèse (signalisation FLT3, voie ERK/MAPK, voie PEDF, voie de l'hormone de croissance, voie PTEN, voie impliquant la protéine 14-3-3, voie TEC kinase, voie mTOR). Ce résultat suggère que l'hyperactivation de ces voies de signalisation est impliquée dans le défaut de mégacaryopoïèse à l'origine de la thrombopénie en augmentant les capacités prolifératives du mégacaryocyte. Elle pourrait être également impliquée dans la prédisposition aux hémopathies malignes associée aux variants constitutionnels d'*ETV6*. D'autres voies de signalisation dérégulées sont impliqués dans les fonctions plaquettaires (voie des intégrines, voie phospholipase C) et peuvent être en lien avec les anomalies de la fonction plaquettaire observée chez certains patients. Des voies de l'inflammation sont altérées (signalisation de la réaction de phase aiguë, voie de

la vitamine C) indiquant que ce mécanisme pourrait également jouer un rôle dans cette pathologie.

Bluteau *et al.* ont montré que la voie de signalisation ERK/MAPK était hyperactivée dans les mégacaryocytes de patients atteints de thrombopénie associée aux variants *ANKRD26* (Bluteau *et al.*, 2014). Ils montrent que cette anomalie est responsable d'un défaut de formation des proplaquettes par les mégacaryocytes des patients. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de cette voie de signalisation (inhibiteur de MEK) restaure la capacité de ces mégacaryocytes à former des proplaquettes. De manière intéressante, nos résultats préliminaires indiquent que cette voie de signalisation est également hyperactivée dans les mégacaryocytes des patients porteurs de variants *ETV6*, qui présentent également une diminution significative de la formation des proplaquettes. Dans le cas de ces deux thrombopénies constitutionnelles, l'hyperactivation de la voie ERK/MAPK pourrait constituer une cible thérapeutique. Plusieurs inhibiteurs de MEK, comme le trametinib ou le cobimetinib sont en cours d'utilisation ou en développement en cancérologie (Zhao et Adjei, 2014). L'effet de ces inhibiteurs pharmacologiques pourrait être étudié *in vitro* dans des mégacaryocytes primaires dérivés des patients porteurs de variants *ETV6*, ou dans des mégacaryocytes dérivés de cellules somatiques de ces patients reprogrammées en cellules souches pluripotentes induites. L'effet de ces inhibiteurs pourrait également être testé *in vivo* dans des modèles précliniques de cette pathologie comme la souris *ETV6* P214L générée par la technologie CRISPR/Cas9 (Noetzli *et al.*, 2017).

L'expression d'un nombre important de sous-unités d'histones était augmentée chez les patients porteurs de variants *ETV6*. Cela renforce l'hypothèse de l'existence d'une dérégulation génique d'origine épigénétique dans la physiopathologie de la

thrombopénie associée aux variants *ETV6*, via un déséquilibre de l'expression des sous-unités d'histones. Feser *et al.* ont montré qu'une augmentation de l'expression des histones entraînait une augmentation de la durée de vie cellulaire dans un modèle de levure (Feser *et al.*, 2010). Ces auteurs proposent que l'augmentation du *pool* d'histones solubles libres faciliterait l'échange d'histones nécessaire à l'assemblage et au désassemblage dynamique de la chromatine. Le taux supérieur d'échange d'histones qui en résulterait accélérerait l'élimination de l'ADN des protéines histones endommagées et modifiées de manière post-traductionnelles. Il est possible que l'augmentation de l'expression des histones observées dans les mégacaryocytes des patients porteurs de variants *ETV6* soit en partie responsable de l'augmentation de la prolifération et du défaut de maturation observée. Nous testerons expérimentalement cette hypothèse en évaluant l'effet de la surexpression d'histones constitutives du noyau du nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4) sur la prolifération et la différenciation de mégacaryocytes témoins. Dans les mégacaryocytes des patients ou dans des modèles cellulaires ou murins de la thrombopénie associée aux variants *ETV6*, nous observerons l'effet de la diminution de l'expression des histones par répression de l'expression de la protéine chaperonne d'histone ASF1A (Loyola et Almouzni, 2004).

Apport attendu du ChIP-seq et de l'analyse combinée RNA-seq / ChIP-seq

L'identification des cibles des facteurs de transcription dans le mégacaryocyte est difficile et a été principalement réalisée dans des modèles cellulaires ou murins en utilisant des expériences basées sur un seul gène cible potentiel. Le ChIP-seq permettra d'identifier les cibles directes d'*ETV6* dans le mégacaryocyte. Cela permettra de mieux comprendre le rôle de ce facteur de transcription clé de la mégacaryopoïèse. Cette approche pourra être envisagée à différent temps de

différenciation afin de permettre de disposer de données dynamiques de la fonction de ce facteur de transcription.

Nous émettons l'hypothèse qu'en diminuant l'activité d'ETV6, les variants portés par les patients entraînent une altération de l'expression génique d'origine épigénétique. Notre stratégie de ChIP-seq permettra d'étudier l'effet de la présence d'un variant *ETV6* sur la localisation des éléments de régulation positive de la transcription à l'état actif (marqués H3K27ac) et inactif ou à l'équilibre (marqués H3K4me1 seul) dans le génome du mégacaryocyte. En collaboration avec deux équipes spécialisées dans l'analyse bioinformatique de ces données (Centre de génétique médicale de Marseille (MMG), INSERM UMR S910 et IBDM, CNRS UMR7288, Marseille, France), nous allons intégrer les résultats de ChIP-seq et de RNA-seq. Les gènes dépourvus de site de liaison à ETV6 pourront être attribués à des changements liés aux variants *ETV6* de manière indirecte. Après avoir identifié les cibles directes d'ETV6, nous utiliserons les données pour identifier le réseau de régulation génique responsable de la thrombopénie, grâce à plusieurs *pipelines* d'analyse notamment AnnoMiner permettant de rechercher des événements de co-liaison avec d'autres régulateurs transcriptionnels. De plus, nous rechercherons la liaison d'ETV6 dans des ensembles de gènes dont l'expression aura été montrée anormale en RNA-seq. Ainsi, nous serons en mesure d'identifier de nouveaux acteurs de la régulation des gènes impliqués dans cette thrombopénie constitutionnelle.

Enfin, nous effectuerons une analyse de réseau pour identifier le réseau responsable de la thrombopénie constitutionnelle liée aux variants *ETV6*. En combinant les informations des réseaux d'interactions protéiques avec les données RNA-seq et ChIP-seq, nous serons en mesure de générer un réseau dit de focalisation de la

maladie, ce qui nous aidera à identifier les voies dérégulées dans cette maladie et permettra une meilleure compréhension des mécanismes impliqués.

La manipulation de l'équilibre entre l'acétylation et la désacétylation des histones par les inhibiteurs ou activateurs d'HDAC ou d'histone acétyltransférase sera un outil utile pour étudier le rôle d'ETV6 sauvage ou variant dans les modifications épigénétiques. L'induction ou la restauration du phénotype par des "épi-médicaments" seront analysées dans des mégacaryocytes dérivés des patients.

PARTIE 3

Nouveaux variants du gène *GATA1* chez des patients présentant un syndrome hémorragique avec thrombopénie et dysfonction plaquettaire

Contexte scientifique

Comme les autres cellules du sang, les plaquettes dérivent des cellules souches hématopoïétiques (Woolthuis et Park, 2016). Une succession d'étapes finement régulées permet le développement de progéniteurs de plus en plus différenciés jusqu'au mégacaryocyte mature qui sera à l'origine des plaquettes. Les endomitoses, définies par la survenue de réplifications successives de l'ADN sans division cellulaire, sont responsables de la polyploïdisation du mégacaryocyte. Ce dernier augmente son contenu en ADN dans un noyau polylobé jusqu'à une ploïdie modale de 16N mais pouvant atteindre 128N (Zimmet et Ravid, 2000). Il s'agit d'un phénomène à la fois indispensable et très spécifique à la maturation du mégacaryocyte supposé permettre une augmentation de la synthèse protéique destinée à la fonction plaquettaire (Machlus et Italiano, 2013). Les endomitoses sont dues à l'absence de survenue des étapes terminales de la cytokinèse. Le gène *MYH10* code une chaîne de myosine non musculaire qui se localise spécifiquement au niveau de l'anneau contractile d'actomyosine permettant la cytokinèse. La répression de l'expression de ce gène au cours de la mégacaryopoïèse par le facteur de transcription RUNX1 est indispensable à la polyploïdisation (Lordier *et al.*, 2012). Chez les patients porteurs de variants *RUNX1* ou de *FLI1*, la protéine MYH10 est détectable dans les plaquettes suggérant la coopération de ces deux facteurs de transcription dans la répression physiologique du gène *MYH10* (Antony-Debré *et al.*, 2012; Saultier *et al.*, 2017; Stevenson *et al.*, 2013; Stockley *et al.*, 2013). Cette hypothèse est confortée par le fait que les pathologies plaquettaires constitutionnelles dues aux variants de *RUNX1* et *FLI1* s'associent à des défauts de polyploïdisation (Bluteau *et al.*, 2012; Saultier *et al.*, 2017).

Dans un effort d'identification des causes génétiques de thrombopénies présumées constitutionnelles non caractérisées, deux variants non connus du gène *GATA1* ont été mis en évidence dans deux familles non apparentées suivies au Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires à Marseille. Ces variants c.802C>A (p.Leu268Met) et c.617A>T (p.Asn206Ile) altèrent chacun un des deux domaines en doigt de zinc de la protéine. De manière intéressante, les mégacaryocytes de plusieurs modèles murins déficients en *GATA1* présentent un défaut de polyploïdisation (Meinders *et al.*, 2016; Muntean *et al.*, 2007; Vyas *et al.*, 1999). Cette similarité avec la thrombopénie associée aux variants *RUNX1* et *FLI1* pourrait indiquer un rôle de *GATA1* dans la répression transcriptionnelle de *MYH10* au cours de la différenciation mégacaryocytaire.

L'objectif de cette étude est de décrire le phénotype des patients porteurs de ces nouveaux variants *GATA1*, de caractériser l'effet de ces variants sur la fonction de la protéine et d'étudier le rôle potentiel de *GATA1* dans la régulation de l'expression de *MYH10*.

Méthodes et résultats préliminaires

1. Identification de deux nouveaux variants du gène *GATA1*

Entre 2014 et 2017, 105 patients avec thrombopénie de cause génétique indéterminée, suivis au Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires à Marseille ont bénéficié d'un séquençage à haut débit d'un panel de 308 gènes associés à des pathologies plaquettaires constitutionnelles ou jouant un rôle dans la physiologie mégacaryocytaire et plaquettaire. Cette stratégie de séquençage a été décrite précédemment (Saultier *et al.*, 2017). L'analyse des variants inclut les filtres suivants: fréquence <1% dans les bases de données ExAC et 1000 Genomes, situés dans des régions codantes ou des zones d'épissage.

Deux nouveaux variants du gène *GATA1* ont été mis en évidence : c.617A>T (p.Asn206Ile) et c.802C>A (p.Leu268Met). Ces variants altèrent respectivement le doigt de zinc en C-terminal et le doigt de zinc en N-terminal de la protéine (Figure 20). Ces deux variants étaient confirmée par un séquençage par méthode Sanger et prédits comme étant délétères par plusieurs algorithmes de prédiction (UMD Predictor, PROVEAN, Polyphen).

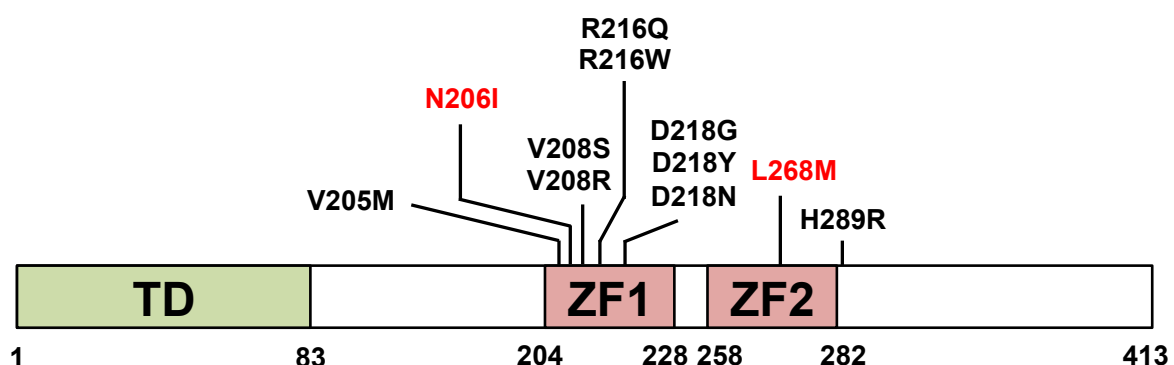


Figure 20 : Représentation schématique de la protéine GATA1. Le schéma met en évidence les domaines fonctionnels de la protéine. Les différents variants constitutionnels rapportés dans la littérature sont annotés en noir. Les variants identifiés au cours de ce travail par notre équipe sont annotés en rouge. TD: domaine de transactivation ; ZF1 et ZF2 : domaine en doigt de zinc 1 et 2.

Les variants du gène *GATA1* ont été mis en évidence dans deux familles non apparentées (Figure 21).

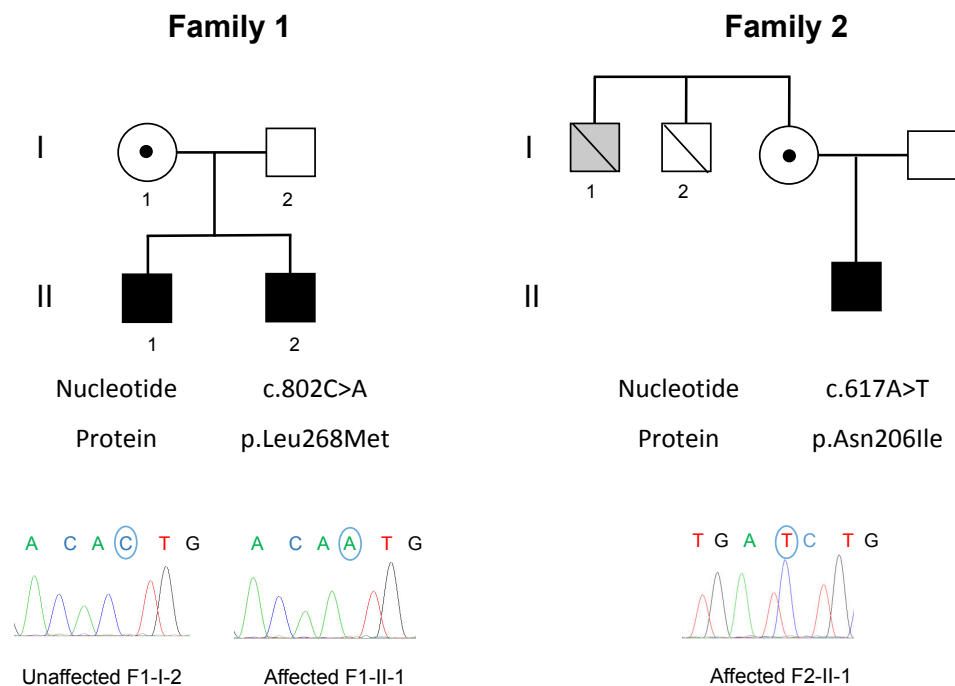


Figure 21 : Arbres généalogiques et chromatogrammes des familles porteuses d'un variant *GATA1*. Les carrés représentent des hommes et les cercles représentent des femmes. Les symboles noirs représentent les membres des familles thrombopéniques et porteurs des variants *GATA1*. Le symbole gris représente un membre thrombopénique mais dont le génotype est inconnu. Les variants du gène *GATA1* et leurs effets respectifs prédits sur la protéine *GATA1* sont indiqués sous les arbres généalogiques. Les chromatogrammes disponibles issus du séquençage ciblé de contrôle de *GATA1* par méthode Sanger sont présentés en dessous.

Les résidus altérés par les variants sont très conservés au sein des protéines orthologues et paralogues (Figure 22).

Human GATA1 protein and identified variants

WT	PLPPCEARECVNCGATATPLWRRDRTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKKRLIVSKRAGTQCTNCQTTTTTLWRRN
Asn206Ile	PLPPCEARECVNCGATATPLWRRDRTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKKRLIVSKRAGTQCTNCQTTTTTLWRRN
Leu268Met	PLPPCEARECVNCGATATPLWRRDRTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKKRLIVSKRAGTQCTNCQTTTTTLWRRN

Orthologous proteins

Mouse	PLAPCEARECVNCGATATPLWRRDRTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKKRMIVSKRAGTQCTNCQTTTTTLWRRN
Rat	PLAPCEARECVNCGATATPLWRRDRTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKKRMIVSKRAGTQCTNCQTTTTTLWRRN
Chicken	GPPPCEARECVNCGATATPLWRRDGTGHYLCNACGLYHRLNGQNRPLIRPKKRLIVSKRAGTVCSNCQSTSTTLWRRS
Zebrafish	RLSPPEARECVNCGATATPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKKRLIVSKRAGTQCANCHTSTTLWRRN

GATA family

GATA1	PLPPCEARECVNCGATATPLWRRDRTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKKRLIVSKRAGTQCTNCQTTTTTLWRR
GATA2	ARSCSEGRCVNCGATATPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIKPKRRLSAARRAGTCCANCQTTTTTLWRR
GATA3	ARS-STGRECVNCGATSTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIKPKRRLSAARRAGTSCANCQTTTTTLWRR
GATA4	DD-FSEGRCVNCGAMSTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGINRPLIKPKRRLSASRRVGLSCANCQTTTTTLWRR
GATA5	EEFPGEGRCVNCGALSTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGVNRPLVRPQKRLSSRRAGLCCCTNCHTTNTTLWRR
GATA6	ED-LSESRECVNCGSIQTPLWRRDGTGHYLCNACGLYSKMNGLSRPLIKPKQKRVPSRRGLSCANCHTTTTTLWRR

Figure 22 : Alignement de séquence de la protéine GATA1. Les variants rapportés dans cette étude sont indiqués en rouge (en haut). La figure montre les alignements avec les protéines GATA1 orthologues et avec les autres protéines membres de la famille GATA.

Une analyse structurale, réalisé par Johannes van Agthoven (Harvard Medical School / Massachusetts General Hospital), a permis de modéliser l'effet des variants de *GATA1*. Les structures GATA1-ADN (code PDB 3VD6) et GATA1-FOG-1 (code PDB 1YOJ), et les modèles de variants p.Leu268Met et p.Asn206Ile ont été affichés en utilisant PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System; Version 1.5.0.4; Schrödinger LLC). Comme montré dans la structure rayons X de GATA1 en complexe avec un double brin d'ADN, le résidu Leu268 est situé à l'interface avec la séquence de liaison consensus TGATAA (Figure 23A). Comme suggéré par simulation d'un variant p.Leu268Met (Fig. Encadré A), Met268 ne semble pas introduire d'obstacle stérique, mais entraine une augmentation du caractère hydrophobe du résidu en interaction avec une différence d'environ 0,5 kcal/mol entre leucine et méthionine (Guy, 1985). Ce phénomène est susceptible d'interférer avec la nature hydrophile de l'ADN et de perturber l'interaction entre GATA1 et son site de liaison GATA.

Au contraire le résidu Asn206 est situé à distance du site de liaison avec le fragment d'ADN (Figure 23B). Dans la structure RMN du complexe GATA1-FOG1, le résidu Asn206 est situé à l'interface entre les deux protéines. La modélisation du variant p.Asn206Ile montre un obstacle stérique avec le résidu Tyr30 de FOG1 pouvant déstabiliser le complexe GATA1-FOG1.

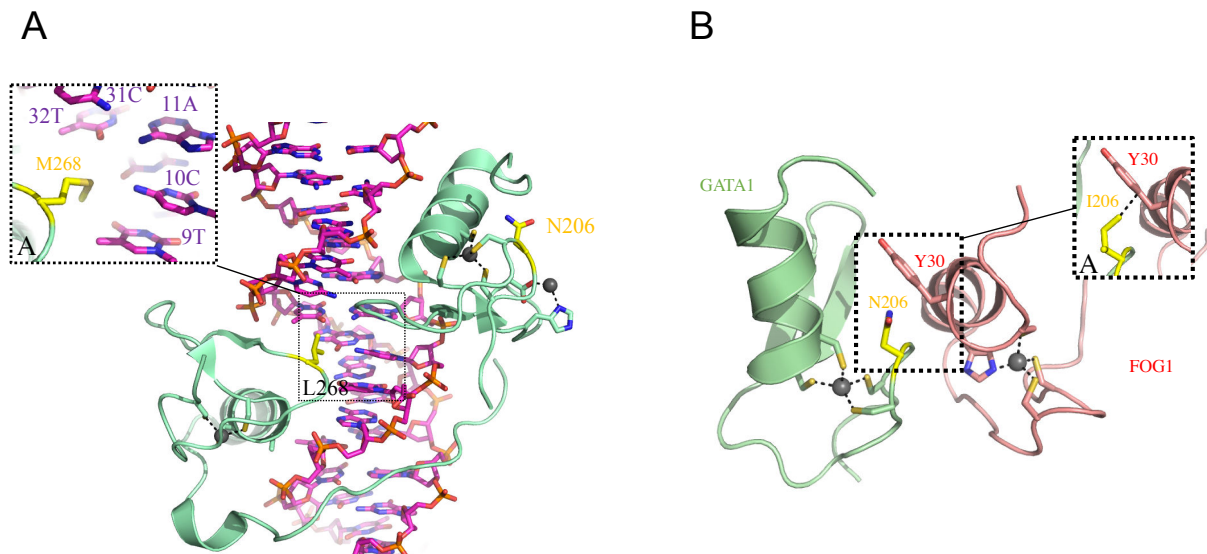


Figure 23 : Modélisation structurale de l'effet des variants du gène *GATA1*. (A) Structure en doigt de zinc de *GATA1* liés au site de liaison palindromique à l'ADN (code PDB: 3VD6). La protéine *GATA1* est représentée en vert avec les résidus clés Leu268 et Asn206 en bâtonnets jaunes, et le fragment d'ADN en bâtonnets magenta. Les sphères grises représentent les ions Zn^{2+} avec les résidus de coordination en bâtons. L'encart montre la précédente structure superposée à la même structure avec un modèle du variant p.Leu268Met. (B) Conformère de plus faible énergie de la structure RMN du doigt de zinc de *GATA1* lié à FOG1 (code PDB: 1Y0J). Le diagramme montre *GATA1* en vert avec le résidu clé Asn206 en bâton jaune et FOG1 en rouge. Les ions Zn^{2+} sont dans des sphères grises avec une représentation en bâtons des résidus de coordination. L'encart montre 1Y0J superposé à la même structure avec modèle du variant p.Asn206Ile. Les tirets représentent un conflit atomique entre Ile206 (*GATA1*) et Tyr30 (FOG1) avec des distances interatomiques $< 2,5$ Å.

2. Analyse fonctionnelle des variants

Afin de rechercher l'effet des variants *GATA1* sur l'expression de la protéine, nous avons recherché l'expression de *GATA1* dans des lysats plaquettaires par Western-Blot. Aucun signal spécifique n'a été détecté ni chez les malades, ni chez les témoins (données non montrées). Une recherche de l'expression de *GATA1* dans d'autres cellules (lymphocytes circulants, mégacaryocytes) va être réalisée.

Pour analyser *in vitro* les conséquences des variants *GATA1*, nous avons développé des vecteurs d'expression contenant l'ADNc *GATA1* en introduisant les variants découverts au cours de notre étude et d'autres déjà décrits dans la littérature par mutagenèse dirigée grâce au kit GeneArt Site-directed Mutagenesis System (ThermoFischer Scientific). Le vecteur d'expression initial pCDNA3-*cMYC-GATA1* contenant la séquence *GATA1* sauvage a été construit en clonant la séquence codante de *GATA1* contenue dans le vecteur pPacGATA1 (don de Jeffrey W. Taub et Yubin Ge, Wayne State University) (Caldwell *et al.*, 2013) dans le vecteur d'expression pCDNA3-*cMYC*.

Les variants des facteurs de transcription associés à des thrombopénies constitutionnelles peuvent entraîner des défauts de localisation nucléaire de la protéine, ce qui peut être au moins en partie responsable du défaut de l'activité transcriptionnelle de la protéine (Noetzli *et al.*, 2015; Saultier *et al.*, 2017; Topka *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Pour examiner si les variants de *GATA1* altèrent la localisation subcellulaire de la protéine *GATA1*, nous avons étudié par immunofluorescence des cardiomyocytes de rat H9C2 surexprimant la protéine *GATA1* sauvage ou variante. La microscopie à fluorescence a montré que la protéine *GATA1* sauvage se concentre exclusivement dans le noyau et que cette localisation nucléaire n'est pas altérée par la présence des variants (Figure 24).

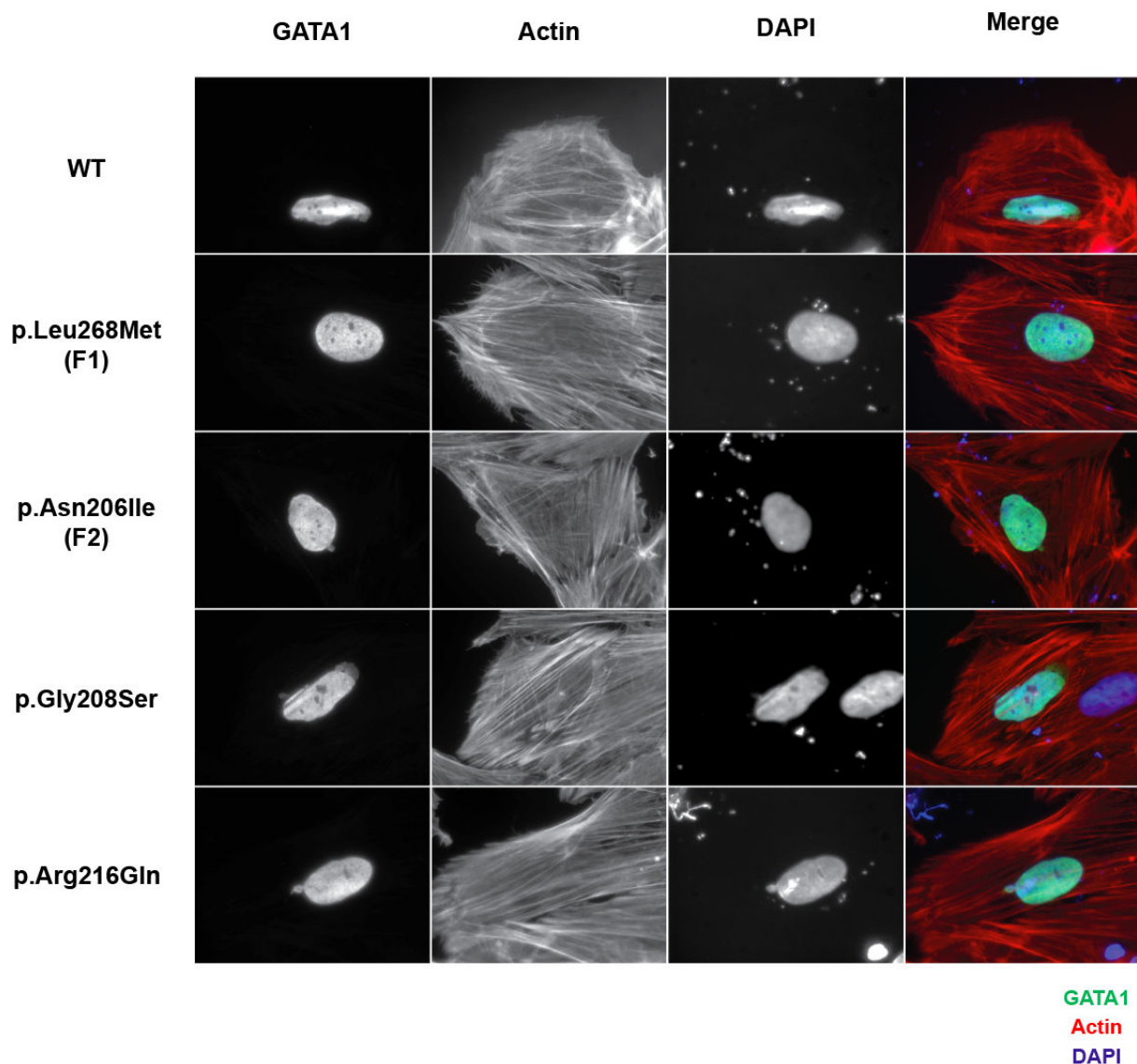


Figure 24 : Etude de l'effet des variants du gène *GATA1* sur la localisation subcellulaire de la protéine. Les cellules ont été transfectées par les vecteurs d'expression pCDNA3-cMYC-*GATA1* sauvage ou variant. Les variants *GATA1* correspondent à ceux mis en évidence dans les familles identifiées dans cette étude (F1 et F2) ou aux variants précédemment rapportés p.Gly208Ser (Mehaffey *et al.*, 2001) et p.Arg216Gln (Balduini *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2002). Trente-six heures après la transfection, les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde 1%, saturées par une solution de PBS avec 1% d'albumine de serum bovin et perméabilisées par une solution de PBS triton 0,3%. Les cellules ont ensuite été marquées par un anticorps primaire de souris anti cMYC (9E10, sc-40, Santa Cruz Biotechnology) suivi, après une étape de lavage, d'une incubation avec une solution d'anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome A488. L'actine a été marquée par de la phalloïdine Rhodamine (PHDR1, Cytoskeleton, Inc) et l'ADN a été marqué par du DAPI contenu dans le milieu de montage DAPI Fluoromount-G® Mounting Medium (SouthernBiotech). Les images ont été acquises grâce à un microscope AXIO Imager M1 (Carl Zeiss) avec un objectif à immersion au grossissement X100.

FOG1 est un des partenaires clés de GATA1 et joue un rôle important dans l'activité transcriptionnelle de GATA1 (Tsang *et al.*, 1997). Une étude de la liaison GATA1 FOG1 a été réalisée (Figure 25). En accord avec la modélisation structurale, le variant p.Asn206Ile s'associe à un défaut marqué de liaison à FOG1 contrairement au variant p.Leu268Met.

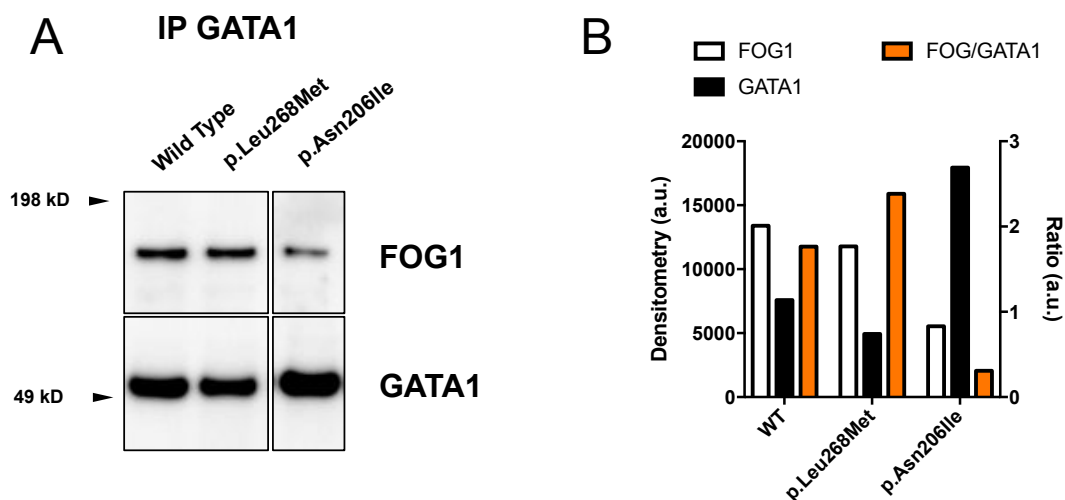


Figure 25 : Co-immunoprécipitation GATA1-FOG1. (A) Etude de l'interaction GATA1-FOG1 par western blot. Un vecteur d'expression contenant l'ADNc de GATA1 de type sauvage ou variant p.Leu268Met et p.Asn206Ile avec étiquette MYC ont été transfectés dans des cellules HEK293 MSR avec un vecteur contenant l'ADNc de FOG1 avec étiquette HaloTag®. FOG1 lié à GATA1 a été détecté par immunoprécipitation avec un anticorps de lapin anti-MYC (étiquette de GATA1 ; sc-789, Santa Cruz Biotechnology) couplé à des billes magnétiques couplés à la protéine G (PureProteome Protein G Magnetic Beads, Millipore) suivie d'une analyse par western-blot de l'immunoprécipitat révéler avec des anticorps de souris anti-HaloTag® (étiquette de FOG1 ; G9211 ; Promega) et anti-cMYC (étiquette de GATA1 ; 9E10 ; sc-40, Santa Cruz Biotechnology) (B) Résultats de l'analyse densitométrique du western blot. La quantification du signal FOG1 normalisé par rapport à la quantité de GATA1 immunoprécipité est présentée en orange.

3. Phénotype clinique et biologique des patients

La symptomatologie était principalement constituée de saignements cutanéo-muqueux spontanés marqués avec un purpura pétéchial et des ecchymoses fréquentes. Chez le patient F2-II-2, des avulsions dentaires et une appendicectomie ont été réalisées sans complication hémorragique sous couvert de transfusions plaquettaires. La mère des patients de la première famille (F1-I-1) portant le variant à l'état monoallélique présente des hématomes spontanés isolés sans thrombopénie.

La thrombopénie était normocytaire et sa cinétique d'apparition était variable. Elle était initialement absente puis d'aggravation progressive jusqu'à une thrombopénie modérée (50-100 G/L) chez les patients de la famille F1 porteurs du variant GATA1 p.Leu268Met (Figure 26) ou d'emblée sévère (15 G/L) et présente dès le diagnostic à l'âge de 18 mois chez le patient de la famille F2 porteur du variant GATA1 p.Asn206Ile. Une atteinte de la lignée érythrocytaire se manifeste également dans la famille F1 par une augmentation progressive du volume globulaire moyen sans anémie (Figure 26). Il n'existait pas d'atteinte de la lignée érythrocytaire décelable sur l'hémogramme du patient de la Famille F2.

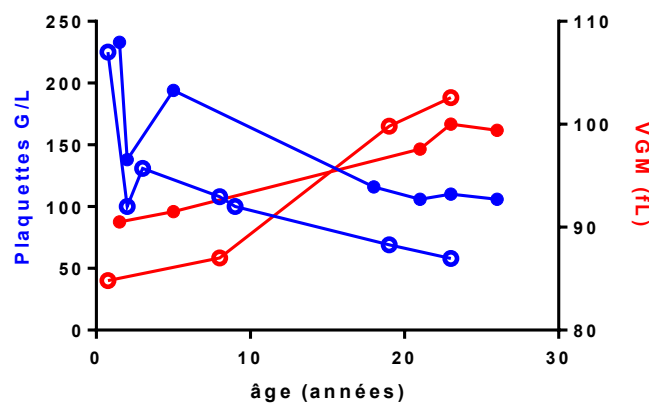


Figure 26 : Evolution du compte plaquettaire et du volume globulaire moyen en fonction de l'âge. Le compte plaquettaire est représenté par les courbes bleues et le volume globulaire moyen (VGM) est représenté par les courbes rouges. Les symboles pleins indiquent le patient F1-II-1 et les cercles indiquent le patient F1-II-2.

4. Défaut de fonction plaquettaire

Au début de la prise en charge des patients de la famille F1, ces derniers présentaient une diathèse hémorragique notable alors que leur compte plaquettaire était normal. Cela est évocateur d'un trouble de la fonction plaquettaire. L'agrégation a été étudiée par agrégométrie chez les deux patients de la famille F1. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4. Il existe un défaut très marqué d'agrégation en réponse à l'activation au collagène, un défaut d'agrégation en réponse à la

stimulation par l'acide arachidonique et un défaut plus variable de réponse à la stimulation à l'adénosine diphosphate.

Tableau 4 : Agrégation plaquettaire des patients de la famille F1 porteurs du variant *GATA1* p.Leu268Met

Patient	Age (years)	Platelet count (whole blood / PRP)	Platelet aggregation maximal intensity		
			ADP	Collagen	Arachidonic acid
Control 1		NA / 200 x 10 ⁹ /l	2.5µM: 77% 1µM: 77%	0.72µg/ml: 60% 0.36µg/ml: 60%	0.5mg/ml: 77%
F1-II-1	2.2	138 / 220 x 10 ⁹ /l	2.5µM: 70% 1µM: 34%	0.72µg/ml: 0% 0.36µg/ml: 0%	0.5mg/ml: 19%
Control 2		NA / 350 x 10 ⁹ /l	2.5µM: 68% 1µM: 45%	0.72µg/ml: 63% 0.36µg/ml: 57%	0.5mg/ml: 69%
F1-II-2	0.8	225 / 338 x 10 ⁹ /l	2.5µM: 23% 1µM: 8%	0.72µg/ml: 0% 0.36µg/ml: 0%	0.5mg/ml: 11%

ADP : adénosine diphosphate ; NA : non disponible.

L'expression de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ à la surface des patients avec variant *GATA1* p.Leu268Met était normale (étude des glycoprotéines plaquettaires en cytométrie de flux) (données non présentées).

Les variants des facteurs de transcription impliqués dans la mégacaryopoïèse peuvent être à l'origine d'un défaut d'expression de protéines impliquées dans les voies d'activation plaquettaires (Songdej et Rao, 2017). Du fait que le défaut d'agrégation plaquettaire de la famille F1 prédomine sur les réponses au collagène et à l'acide arachidonique, nous avons recherché par western-blot dans des lysats plaquettaires si le variant GATA1 p.Leu268Met s'associe à une anomalie de l'expression de protéines impliquées dans ces voies (Figure 27). Le variant p.Leu268Met ne s'associait pas à un défaut d'expression des protéines étudiées de la voie du collagène (GPVI, SYK et PLC γ 2) ni de la voie de l'acide arachidonique (COX1 et TBXAS1).

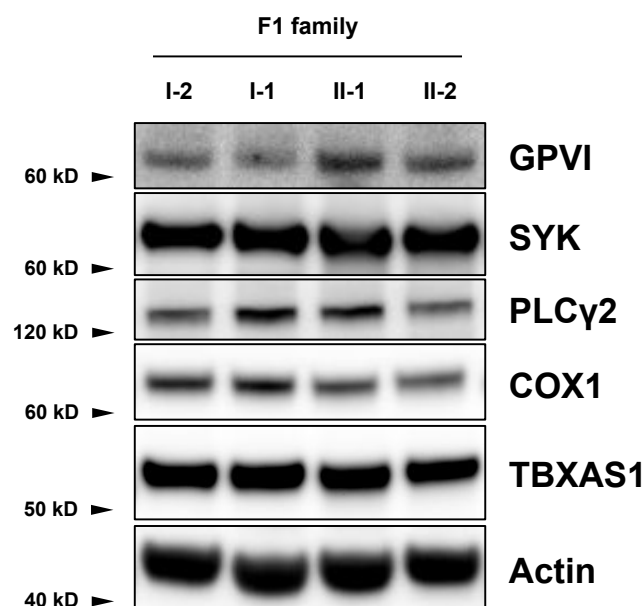


Figure 27 : Expression de protéines impliquées dans les voies du collagène et de l'acide arachidonique.

L'expression des protéines impliquées dans la voie du collagène (GPVI, SYK et PLC γ 2) et de l'acide arachidonique (COX, TBXAS1) a été étudiée dans les plaquettes d'individus porteurs ou non du variant de la famille F1. Les plaquettes des patients ont été lavées dans du tampon HEPES-Tyrodé selon une procédure standard puis lysées à une concentration de $1 \times 10^6/\mu\text{L}$ dans du tampon Mg $^{2+}$ Lysis/Wash Buffer (Millipore). Les protéines plaquettaires totales (30 μg) ont été séparées dans des gels NuPAGE avec du tampon MES SDS (ThermoFisher Scientific) et transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène. Les membranes ont été saturées et marquées pendant la nuit avec les anticorps primaires suivants: anti-GPVI (Santa-Cruz Biotechnology, sc-356), anti-SYK (Santa-Cruz Biotechnology, sc-805), anti- PLC γ 2 (Santa- Cruz Biotechnology, sc-376942), anti-COX1 (Abcam, ab16048), anti-TBXAS1 (Cayman Chemical, 160715) et anti-actine (Abcam, ab3280). Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (Biorad). Les signaux de chimiluminescence ont été obtenus en utilisant le réactif de substrat chimiluminescent Novex ECL, détectés à l'aide de la caméra Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare). Les tailles attendues de GPVI, SYK, PLC γ 2, COX et actine sont respectivement de 70, 70, 155, 72, 55 et 43 kDa. Individu I-2 : père non porteur du variant ; Individu I-1 : mère porteuse du variant à l'état hétérozygote ; individus II-1 et II-2 : enfants porteurs du variant à l'état homozygote.

Dans le cadre de l'exploration du défaut de fonction plaquettaire, une étude des granules plaquettaires des patients avec variants GATA1 a été réalisée. L'étude du frottis sanguin du patient F1-II-2 retrouve la présence de plaquettes hypogranulaires (« plaquettes grises ») liées à un déficit en granules alpha (Figure 28A). Ce défaut a été confirmé en microscopie électronique (Figure 28B). En plus du défaut de granules alpha, il existe également un déficit en granules denses. Ce défaut a été montré par l'examen en microscopie électronique de préparation de type *whole mount* (Figure 28C). Soixante-cinq pour cent des plaquettes étaient dépourvues de granules denses avec en moyenne $0,6 \pm 1$ granule par plaquette.

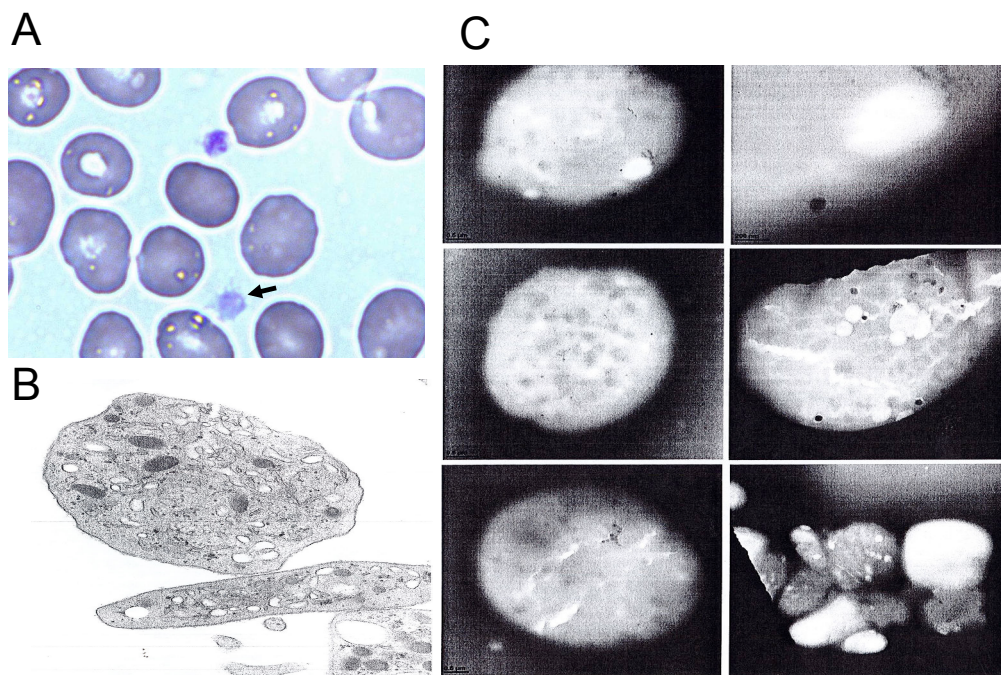


Figure 28 : Etude des granules plaquettaires en microscopie optique et en microscopie électronique à transmission d'un patient porteur du variant GATA1 c.802C>A (p.Leu268Met). (A) Image représentative en microscopie optique d'un frottis sanguin après coloration en May-Grünwald Giemsa. (B) Images représentatives en microscopie électronique à transmission de sections ultrafines et (C) de *whole mount*. Pour la microscopie électronique, les plaquettes présentes dans du plasma riche en plaquette (PRP) citraté ont été diluées et fixées dans du PBS pH 7,2 contenant 1,25% de glutaraldéhyde pendant une heure. Après centrifugation et deux lavages au PBS, les plaquettes ont été post-fixées dans du tampon cacodylate-acide chlorhydrique (HCl) 150 mM contenant 1% de tétroxyde d'osmium à pH 7,4 pendant 30 minutes à 4°C. Après déshydratation dans un gradient d'alcool, l'enrobage dans une résine EPON a été effectué par polymérisation à 60°C pendant 72 heures. Des sections ultrafines (~70 nm d'épaisseur) ont été montées sur grilles, contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb, examinées avec un microscope électronique à transmission JEOL JEM1400 équipé d'une caméra Gatan Orius 600 et analysés à l'aide du logiciel Digital Micrograph (imagerie quantitative de Lyon Est, France). Des mesures morphométriques ont été effectuées en utilisant le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA). Des préparations de type *whole mount* ont été obtenues après un bref contact de grilles revêtues de formvar sur de petites gouttes de PRP. Ensuite, les grilles ont été rincées rapidement avec de l'eau distillée, séchées avec le bord d'un papier filtre, agitées à l'air et examinées au microscope électronique à transmission. Les granules denses ont été identifiés et comptés comme décrit précédemment (White, 2008).

Ce défaut en granule dense a également été montré chez le patient F2-II-1 par décompte des granules dense en microscopie à fluorescence après marquage à la mépacrine (Figure 29). Ce test a montré que 72% des plaquettes de ce patient sont dépourvues de granules denses.

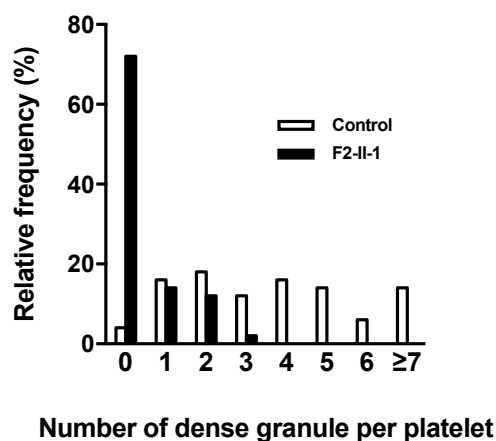


Figure 29 : Etude du nombre de granules denses par plaquette par immunofluorescence chez le patient porteur du variant *GATA1*. Le compte du nombre de granules denses est effectué par microscopie à fluorescence après marquage du plasma riche en plaquette par le marqueur de granules denses fluorescent mépacrine (Q3251, Sigma). Les granules denses de 100 plaquettes ont été comptées chez le patient et chez un témoin.

5. Anomalie de l'hématopoïèse

GATA1 est une protéine importante dans la régulation de la mégacaryopoïèse et de l'érythroïèse. Elle joue également un rôle important dans la cellule souche hématopoïétique notamment en régulant le point de branchement à l'origine des progéniteurs érythromyéloïdes et myélolymphoïdes (Arinobu *et al.*, 2007). Les variants du gène *ETV6*, sont à l'origine d'une thrombopénie constitutionnelle et d'une augmentation du nombre de cellules souches hématopoïétiques circulantes (Poggi *et al.*, 2017).

Une quantification par cytométrie de flux a montré que leur nombre était également augmenté chez le patient *GATA1* F2-II-1, représentant respectivement 0,24% et 0,0036% des leucocytes chez le patient et les témoins (Figure 30).

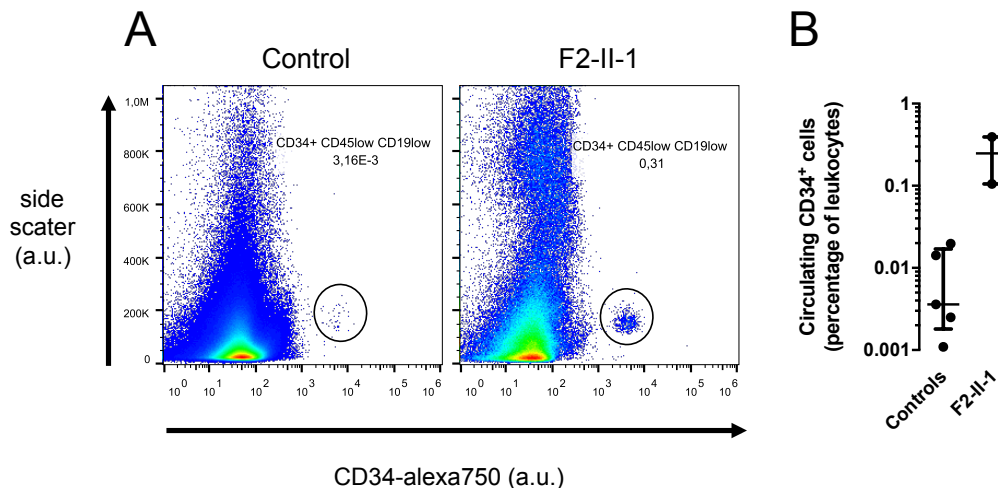


Figure 30 : Quantification du nombre de cellules souches hématopoïétiques circulantes. Un volume de 2 mL de sang était soumis à une lyse des globules rouges. Des nombres équivalents de cellules ont été incubés pendant 15 minutes à 20°C avec le cocktail d'anticorps monoclonaux suivant: CD45-Krome Orange, CD19-Fluorescein isothiocyanate, CD34-AlloPhycoCyanin / Alexa Fluor750, CD33-Phyco Erythrin / Cyanin7, CD38-AlloPhyco Cyanine (Beckman Coulter). (A) Les cellules CD34⁺ sont sélectionnées dans la population de cellules CD19^{low} CD45^{low}. Les progéniteurs sont caractérisés par une co-expression de CD34 / CD33 / CD38. Les données sont acquises sur un cytomètre Navios (Beckman Coulter). L'analyse est réalisée grâce au logiciel FlowJo (TreeStar). (B) quantification du pourcentage de cellules CD34⁺ par rapport au total des cellules CD19^{low} CD45^{low}. Les données contrôles représentent cinq individus différents. Les données du patient F2-II-1 porteur du variant *GATA1* représentent deux expériences indépendantes sur le même patient réalisées à 15 mois d'intervalle. Médiane $\pm$ écart interquartile.

L'étude du myélogramme du patient F2-II-1 porteur du variant *GATA1* p.Asn206Ile est présenté en Figure 31. Il existe des signes de dysérythropoïèse avec la présence d'une érythroblastose et d'anomalies nucléaires des érythroblastes matures à type de karyorrhaxis. Cet examen a montré la présence d'un excès de mégacaryocytes hypolobulaires dans la moelle. Ce défaut est évocateur d'une augmentation de la prolifération des précurseurs mégacaryocytaires associés à un défaut de maturation comportant un défaut de polyploïdisation.

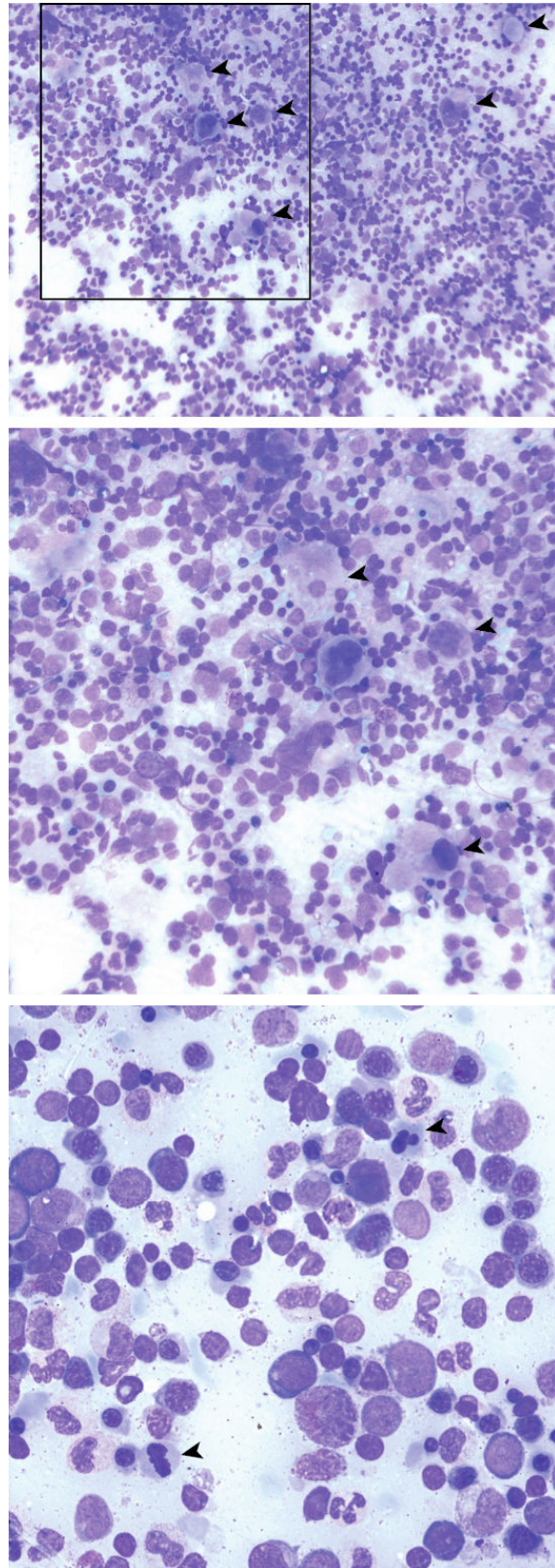


Figure 31 : Myélogramme du patient F2-II-1 porteur du variant *GATA1* c.617A>T (p.Asn206Ile). Les images ont été acquises après coloration au May-Grünwald Giemsa. Haut (grossissement 10X) : moelle riche avec nombreux mégacaryocytes (flèche). Milieu (grossissement 20X) : Visualisation d'une portion de l'image du haut (cadre) à plus fort grossissement. Les mégacaryocytes hypolobés sont indiqués par des flèches. Bas : L'image est évocatrice d'une érythroblastose avec visualisation d'anomalies nucléaires des érythroblastes matures à type de karyorrhexis (flèche).

La différenciation mégacaryocytaire a été étudiée *in vitro*, par culture de mégacaryocytes dérivés de cellules souches hématopoïétiques circulantes CD34⁺ du patient porteur du variant GATA1 p.Asn206Ile. La méthode est décrite dans l'étude précédente. Nous montrons qu'il existe un défaut de ploïdie à J9 de la culture (Figure 32A). En effet, la fréquence relative des mégacaryocytes de ploïdie 2n, 4n, 8n et 16n était respectivement de 54-58%, 23-27%, 4-8% et 1-2% chez les témoins *versus* 66%, 18%, 0% et 0% chez le patient porteur du variant GATA1. Une analyse de l'expression des récepteurs de surface CD41 et CD42a en cytométrie de flux à J9 et J11 de la culture a retrouvé un défaut important d'expression du CD41 et du CD42a (Figure 32B). Enfin, nous avons observé que les mégacaryocytes présentaient une augmentation importante de leur capacité proliférative (non quantifiée) et une diminution significative de leur taille mesurée à J11 (Figure 32C).

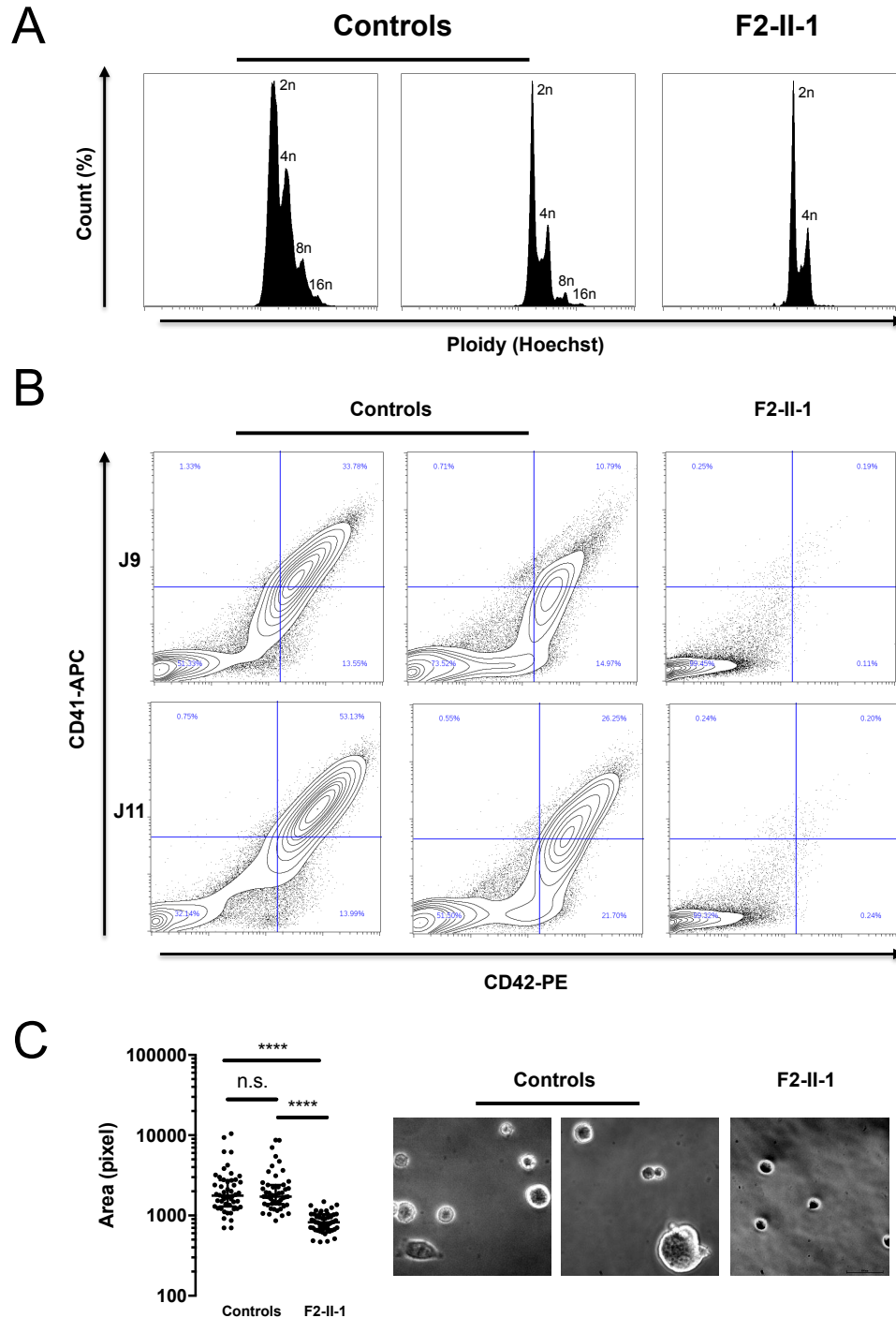


Figure 32 : Etude *in vitro* de la mégacaryopoïèse. Les cellules en cultures ont été marquées à l'Hoechst 33342 (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes à 37°C, puis avec des anticorps monoclonaux directement couplés: anti-CD41-allophycocyanine et anti-CD42a-phycoérythrine (BD Pharmingen) pendant 10 minutes à température ambiante (A) La ploïdie a été mesurée par étude du marquage Hoechst 33342 en cytométrie en flux à J9 de la culture. (B) l'expression membranaire des marqueurs mégacaryocytaires CD41 et du CD42a a été mesurée à J9 et à J11 de la culture. Les données ont été acquises au moyen d'un cytomètre en flux Navios (BD Biosciences). (C) Les images des cellules en culture ont été acquises à J11 grâce au microscope inversé Eclipse TS100 (Nikon) (grossissement de X20, échelle 100 µm). La surface de 50 cellules a été quantifiée pour chaque individu grâce au logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA). Le graphique représente les mesures individuelles accompagnées de la médiane ± écart interquartile. Les différences entre les groupes ont été calculées par un test de Kruskal-Wallis suivi de tests de comparaisons multiples de Dunn grâce au logiciel GraphPad Prism.

Du fait du rôle important de la régulation de l'expression du gène *MYH10* dans la polyploïdisation, l'expression de MYH10 dans les plaquettes des patients de la famille F1 a été étudiée par *western blot* (Figure 33). Comme observé chez les patients porteurs de variants *FLI1* ou *RUNX1*, il existe une augmentation de l'expression de MYH10 dans les plaquettes des membres de la famille F1 porteurs des variants de *GATA1* ce qui suggère un défaut de répression de ce gène au cours de la mégacaryopoïèse.

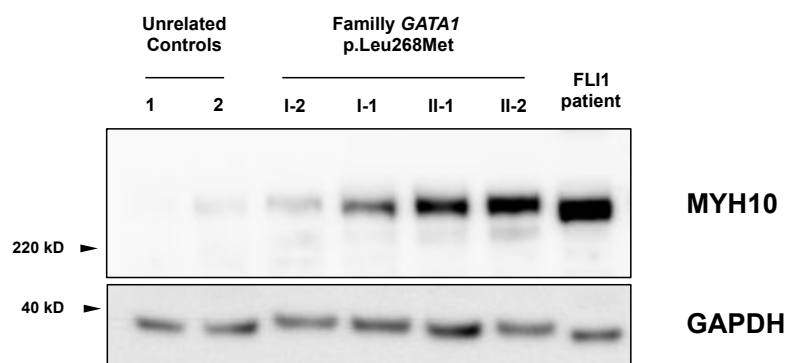


Figure 33 : Etude de l'expression de MYH10 dans les plaquettes de la famille F1 avec variant *GATA1* c.802C>A (p.Leu268Met). L'expression de MYH10 a été étudiée dans les plaquettes d'individus contrôles (contrôles négatifs), dans les plaquettes de membres porteurs ou non du variant *GATA1* de la famille F1. Les plaquettes d'un individu porteur d'un variant *FLI1* p.Arg337Gln sont utilisées comme contrôle positif (Saultier *et al.*, 2017). La méthode du *western blot* est décrite dans la légende de la figure 27. Les anticorps primaires de lapin anti-MYH10 3404S (Cell Signaling Technology) et de souris anti-GAPDH (Millipore, MAB374) ont été utilisés. Les tailles attendues de MYH10 et GAPDH sont respectivement de 230 et 38 kDa. Individu I-2 : père non porteur du variant ; Individu I-1 : mère porteuse du variant à l'état hétérozygote ; individus II-1 et II-2 : enfants porteurs du variant à l'état homozygote.

Des données de la littérature indiquent que les facteurs de transcription RUNX1 et FLI1 jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de *MYH10* dans les mégacaryocytes (Antony-Debré *et al.*, 2012; Lordier *et al.*, 2012; Stevenson *et al.*, 2015; Stockley *et al.*, 2013). Nous avons étudié la fixation de GATA1, de FLI1 et de RUNX1 sur des séquences correspondant au gène *MYH10* ou à des séquences flanquantes en analysant *in silico* des données de ChIP-seq de ces facteurs de transcription dans des mégacaryocytes disponibles dans la base de donnée NCBI GEO (Tijssen *et al.*, 2011) (Figure 34). Cette analyse montre que GATA1, FLI1 et RUNX1 co-occupent un probable *enhancer* intronique situé dans le 8^{ème} intron du

gène *MYH10*. Par ailleurs, GATA1 et RUNX1 se fixent également sur un site commun situé dans le promoteur du gène. Ces données suggèrent que le facteur de transcription GATA1 joue un rôle important dans la régulation de l'expression de MYH10 dans le mégacaryocyte.

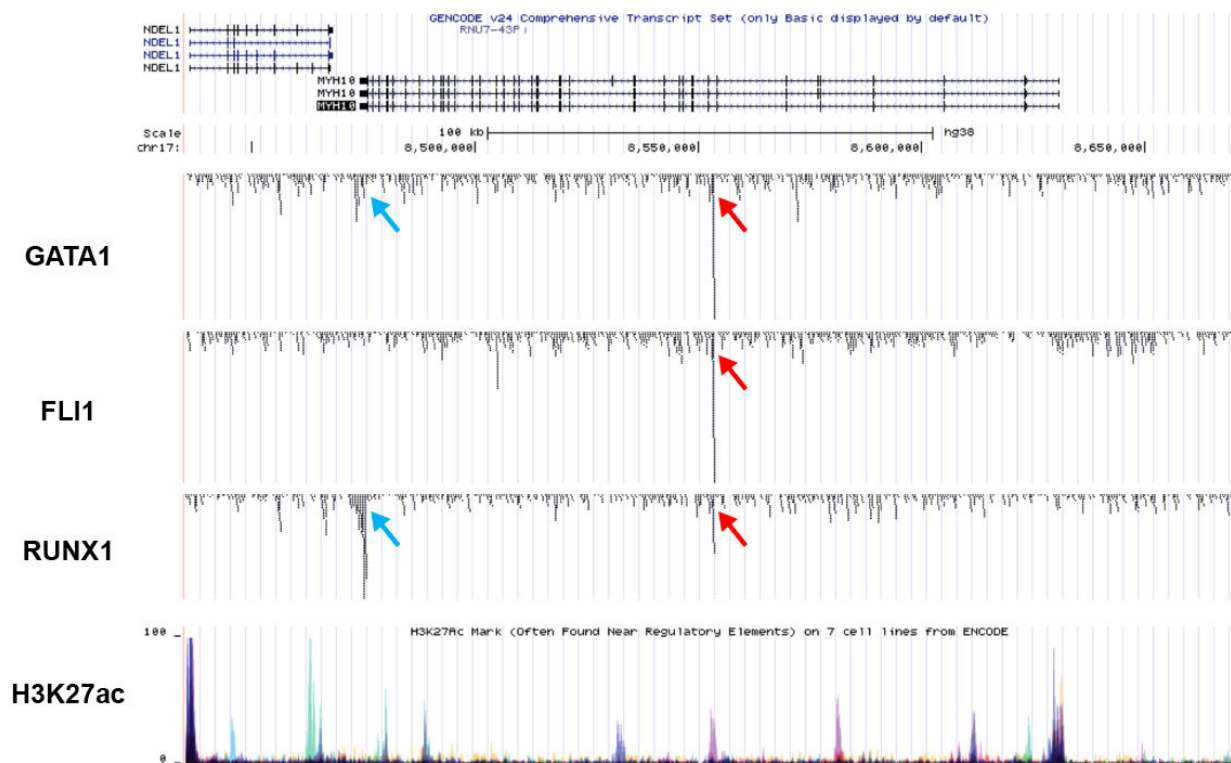


Figure 34 : Analyse de la fixation de GATA1, FLI1 et RUNX1 sur des séquences régulatrices de *MYH10*. L'analyse *in silico* des données de ChIP-seq a été réalisée en utilisant le navigateur de génome de l'Université de Californie, Santa Cruz (UCSC) (référence GRCh38/hg38). Les données sont présentées en fonction de leurs positions par rapport au gène *MYH10* et son promoteur, situés sur le chromosome 17. La position d'une partie du gène d'amont *NDEL1* est également présentée. Les données de ChIP-seq des facteurs de transcription GATA1, FLI1 et RUNX1 ont été acquises par Tijssen et al. (Tijssen *et al.*, 2011) et rendues accessibles dans la base de données NCI GEO sous l'identifiant GSE24674 (Edgar *et al.*, 2002). La figure montre des pics de liaison de GATA1, FLI1 et RUNX1 dans une zone située dans l'intron 8 du gène *MYH10* (flèches rouges) et des pics de liaison de GATA1 et RUNX1 dans le promoteur de *MYH10* (flèches bleues). La partie inférieure de la figure montre la correspondance de ces pics avec les marques chromatiniques H3K27 acétylées (H3K27ac) correspondant à des éléments de régulation de l'expression génique mis en évidence dans sept lignées cellulaires (GM12878, H1-hESC, HSMM, HUVEC, K562, NHEK et NHLF). Ces données H3K27ac ont été produites par le laboratoire Bernstein du *Broad Institute* dans le cadre du projet ENCODE (ENCODE Project Consortium, 2012).

L'analyse de la séquence de l'enhancer intronique potentiel retrouve des sites consensus de fixation à l'ADN de GATA1, FLI1 et RUNX1 (Figure 35).

DNA range chr17:8553047-8553739 (hg38)

TGGGGCCACCAAAGTAAATTAATTCTGTATGTGTC**AGATAG**CCCTGAATTTTAAGTCAGA
 CTATCCCACACATCCTCCACGTCTGGTGAAAGACACACTCATATGAATCATGCTCTGAC
 ACACCTATATGAAGAAAGCTGAAGTGCAGATTCATTCTCCTGTCATTTTCAAGTATTTT
 CAGATTTTGCTGGCTGTGAGTCCATTTGGAGGCATAAAATACTGTTCTTAACCAGAAAA
 TCATGGTCTGTCCCTTGAA**GGAT**AGAAATAATGTATTT**CTATCA**CTGGAGATTATTCTA
 TTAAGTACCCGAAAAGTGTCTAT**CTATCT**TTCTAATTGGCACA**CTATCA**TTTCAAGTATCAT
 TTCTATTTTATTACATCTATACTCAAATGTGTTTTACCTGGGTATATATGTGCATACAC
 ATATATAAACCTTCTTATGGCCATTCTATGCAGGTGACATTTCTTAGGACTATTCTATG
 TACTTGACATTTTATTTTTTCTCCAGCTTTATTCTACTTAACACTAATTGAGATTACT
 TTAAGTCTGTAATCTTATAA**GGAT**GTTTTCAATGATTACATGCTCATCCTTCTAATATC
 AGAAGTAGATGGTAAAAAGTGGGCTAACAGCAATAGGGGGAGGGCAACTGCATTCATCT
 GAATGTCCTATATCACACAAACAC**TGTGG**CACTCTCCACTTCCC

GATA1 binding sites:

(A/T) GATA (A/G)

(T/C) TATC (T/A)

FLI1 (ETS) binding sites:

GGA (A/T)

RUNX1 binding sites:

TGTGG

Figure 35 : Analyse des sites consensus de fixation à l'ADN des facteurs de transcription GATA1, FLI1 et RUNX1 dans l'enhancer intronique du gène MYH10. La séquence présentée mesure 692 paires de bases et correspond à la zone de fixation commune de GATA1, FLI1 et RUNX1 dans le 8^{ème} intron du gène MYH10 identifiée par analyse *in silico* des données de ChIP-seq montrées en Figure 34. Le génome de référence et les coordonnées de la séquence sur le chromosome 17 sont indiqués en haut de la figure.

Discussion et perspectives

Cette étude rapporte deux familles non apparentées dans lesquelles des individus présentent une thrombopénie associée à deux nouveaux variants constitutionnels du gène *GATA1*. Un de ces variants (c.802C>A ; p.Leu268Met) se situe dans une séquence codant le domaine fonctionnel de type doigt de zinc en C-terminal dont l'altération n'avait jamais été décrite dans la thrombopénie *GATA1*. Nous avons décrit la stratégie ayant conduit au diagnostic génétique et le phénotype des patients. Des expériences *in vitro* ont permis de décrire des défauts fonctionnels associés aux variants *GATA1*. Enfin, cette étude suggère un rôle de *GATA1* dans la régulation de l'expression du gène *MYH10* au cours de la mégacaryopoïèse.

Le phénotype des patients porteurs de variants du gène *GATA1* est hétérogène

Le gène *GATA1* est associé à des anomalies variables des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire. Les patients rapportés dans cette étude présentent un compte plaquettaire hétérogène allant d'une absence de thrombopénie à une thrombopénie sévère. L'évolution du compte plaquettaire était également variable dans le temps dans une des familles décrites pour laquelle la thrombopénie et l'atteinte de la lignée érythrocytaire s'aggravent progressivement. L'atteinte de la lignée érythrocytaire à type de dysérythropoïèse ou de macrocytose était également variable selon les variants en cause. Cette hétérogénéité est retrouvée dans la littérature où des variants constitutionnels de *GATA1* ont été mis en évidence dans des familles d'individus présentant des tableaux qui étaient dominés soit par l'atteinte plaquettaire (Balduini *et al.*, 2004; Del Vecchio *et al.*, 2005; Freson *et al.*, 2001, 2002; Nichols *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 1977; Tubman *et al.*, 2007; Yu *et al.*,

2002), soit par l'atteinte érythrocytaire (Hollanda *et al.*, 2006; Zucker *et al.*, 2016) avec une sévérité très variable. Les mécanismes qui sous-tendent cette hétérogénéité ne sont pas clairement établis. Elle pourrait être expliquée en partie par le degré d'altération fonctionnelle de GATA1 causée par le variant ou la localisation de ce dernier sur la protéine. Il semble que le degré de perturbation de l'interaction GATA1-FOG1 soit corrélée à la sévérité du phénotype (Songdej et Rao, 2017). Le patient de notre étude porteur du variant diminuant l'interaction avec FOG1 est en effet celui dont le phénotype est le plus sévère avec une thrombopénie sévère dès le diagnostic. Il est probable que d'autres facteurs, notamment génétiques ou épigénétiques, puissent participer à la modulation du phénotype. Il est essentiel de poursuivre la publication des études de cette pathologie rare et de mettre en place des registres ou des études de cohorte afin de permettre d'affiner les corrélations génotype-phénotype dans le but de pouvoir proposer des prises en charge personnalisées à ces patients.

Les variants *GATA1* sont associés à une dysfonction plaquettaire et à un déficit combiné en granules alpha et denses

Les patients présentent une dysfonction plaquettaire prédominant sur les réponses au collagène et à l'acide arachidonique. Les données d'agrégations plaquettaires sont assez hétérogènes dans la littérature. En accord avec nos résultats, d'autres équipes ont rapporté une agrégation diminuée en réponse au collagène chez des patients porteurs des variants GATA1 p.Arg216Gln (collagène 1 µg/mL), p.Asp218Gly (collagène 2µg/mL) ou d'un variant d'épissage de l'exon 2 (collagène 1 µg/mL) (Freson *et al.*, 2001; Hollanda *et al.*, 2006; Hughan *et al.*, 2005). En revanche, d'autres équipes ont rapporté des anomalies du changement de forme des plaquettes mais une agrégation normale en réponse au collagène chez des patients

GATA1 p.Arg306Gln (collagène 4 µg/mL) et p.Asp218Gly (concentration de collagène utilisée non décrite) (Balduini *et al.*, 2004; Hermans *et al.*, 2014). Les facteurs expliquant ces différences ne sont pas clairement établis. Elles pourraient être dues aux différences de concentrations de collagène utilisées. En effet, les faibles doses d'agonistes sont plus dépendantes de la sécrétion granulaire. Il pourrait également s'agir d'un effet lié à la différence de variant *GATA1* ou à l'utilisation d'agonistes de provenance différente.

Ces défauts d'agrégation chez les patients porteurs de variants *GATA1* sont plus marqués en réponse aux doses faibles d'agonistes et peuvent s'expliquer en partie par l'absence de sécrétion granulaire qui permet l'amplification de l'activation plaquettaire. Une étude des plaquettes avec variant *GATA1* p.Gly208Ser en microscopie électronique a retrouvé un déficit en granule alpha mais pas de déficit en granules denses, bien que ces derniers étaient de taille diminuée (White *et al.*, 2007). Une autre étude en microscopie électronique a montré un déficit combiné en granules alpha et en granules denses associé au variant c.332G>C (Hollanda *et al.*, 2006). Nous avons également montré par différentes approches (marquage mépacrine, microscopie électronique) que les patients des deux familles étudiées présentaient un défaut combiné en granules alpha et granules denses. Ces différences pourraient s'expliquer par un effet variable sur l'expression de protéines impliquées dans la biogénèse des granules denses selon la position du variant de *GATA1*. Le déficit en granules denses sera confirmé, chez les patients de notre étude, par d'autres techniques comme la mesure de la sécrétion plaquettaire d'ATP.

Une étude a récemment élucidé le mécanisme moléculaire responsable du déficit en granule alpha dans la thrombopénie *GATA1* en démontrant que *GATA1* régule, via

un *long-distance enhancer*, l'expression du gène NBEAL2 qui code une protéine essentielle à la biogénèse des granules alpha (Wijgaerts *et al.*, 2017).

Le déficit sévère en granules denses plaquettaires est associé à des variants dans les gènes codants d'autres facteurs de transcription clés de la mégacaryopoïèse, en particulier RUNX1 et FLI1 (Saultier *et al.*, 2017; Stockley *et al.*, 2013) suggérant que la biogénèse des granules denses nécessite la coopération de plusieurs facteurs de transcription dans le mégacaryocyte. Des approches utilisant les technologies de séquençage à haut débit pourraient permettre de rechercher sans *a priori* des variants constitutionnels additionnels et d'identifier des anomalies dans les profils d'expression des gènes ou des mécanismes de régulation épigénétiques pouvant rendre compte du défaut de granules denses.

Une étude du profil d'expression d'un patient porteur d'un variant RUNX1 (Sun *et al.*, 2007) a permis de montrer que le déficit en granules denses étaient en partie dû à une dérégulation du gène *PLDN* (Mao *et al.*, 2017). Par ailleurs, une étude portant sur les données de ChIP-seq dans le mégacaryocyte murin a montré que FLI1 interagissait avec les gènes *HPS4* et *RAB27B* (Zang *et al.*, 2016). Une autre étude de ChIP-seq dans les mégacaryocytes humains a permis d'identifier une liaison de RUNX1 dans des séquences régulatrices de *HPS3*, *HPS4* et *HPS5*, une liaison de FLI1 dans *AP3B1* et *HPS5* et une liaison de GATA1 dans *RAB27B* (Tijssen *et al.*, 2011). Ces gènes sont tous des régulateurs connus de la biogénèse des granules denses (Sharda et Flaumenhaft, 2018).

D'autres mécanismes que le déficit en granules plaquettaires peuvent potentiellement expliquer la dysfonction plaquettaire. Chez la souris déficiente en GATA1, l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène est réduite (Hughan *et al.*, 2005; Meinders *et al.*, 2016). Ces auteurs suggèrent que ce défaut pourrait

s'expliquer par une diminution de l'expression de la GPVI à la surface des plaquettes (Hughan *et al.*, 2005) ou par une expression quasiment normale de GPVI mais avec diminution de l'expression de SYK, qui est une tyrosine kinase permettant la transduction du signe d'activation plaquettaire de la voie du collagène (Meinders *et al.*, 2016). La différence entre ces deux résultats pourrait s'expliquer par l'utilisation de modèles murins différents sur le plan génétique. Le premier est basé sur la délétion d'une région régulatrice en aval du gène *Gata1* (Hughan *et al.*, 2005). Le second est basé sur une délétion spécifique du gène *Gata1* dans la lignée mégacaryocytaire.

Chez l'homme, nous montrons que malgré l'absence d'aggrégation au collagène, il ne semble pas exister de diminution d'expression dans les plaquettes des protéines étudiées dans la voie du collagène: GPVI, SYK et PLC γ 2. Chez un patient porteur du variant *GATA1* p.Arg216Gln, l'expression de GPVI à la surface des plaquettes mesurée en cytométrie de flux était légèrement diminuée (2624 récepteurs par plaquette pour des valeurs de référence de 2823 - 4637) (Hughan *et al.*, 2005). Nous mesurerons prochainement l'expression de la GPVI à la surface des plaquettes des patients de notre étude. Il semble néanmoins peu probable que le défaut d'expression de GPVI ou de SIK soit responsable du défaut important d'aggrégation au collagène chez l'homme. Ces résultats semblent indiquer que les modèles de souris déficientes en *GATA1* ne récapitulent pas parfaitement la thrombopénie causée par les variants *GATA1* chez l'homme. Cela peut être dû à la différence de défaut génétique de *GATA1* ou à des différences liées à l'espèce. L'étude de Hughan *et al.* a montré qu'il existait un défaut de phosphorylation des protéines de la voie du collagène PLC γ 2, Syk, and LAT dans le modèle murin de déficience en *Gata1* et chez le patient porteur du variant *GATA1* p.Arg216Gln (Hughan *et al.*,

2005). Il est possible que le défaut d'agrégation observé chez les patients de notre étude soit en partie dû à ce défaut de phosphorylation, ce qui sera évalué prochainement.

Rôle de GATA1 dans la régulation de MYH10 au cours de la différenciation du mégacaryocyte

La polyploïdisation, qui est un processus important dans la maturation du mégacaryocyte, nécessite la répression de l'expression du gène *MYH10* (Lordier *et al.*, 2012). Chez les patients porteurs de variants *RUNX1* ou de *FLI1*, la protéine MYH10 est détectable dans les plaquettes suggérant la coopération de ces deux facteurs de transcription dans la répression du gène *MYH10* au cours de la mégacaryopoïèse (Antony-Debré *et al.*, 2012; Saultier *et al.*, 2017; Stevenson *et al.*, 2013; Stockley *et al.*, 2013). Nous avons montré que les variants constitutionnels de *GATA1* s'associent à un défaut important de maturation et de polyploïdisation des mégacaryocytes et que les plaquettes des patients porteurs de ces variants surexpriment la protéine MYH10. Ce résultat suggère que la présence du variant de *GATA1* empêche la répression du gène *MYH10* au cours de la mégacaryopoïèse. Par ailleurs, nous montrons que GATA1, FLI1 et RUNX1 co-occupent deux sites communs constituant probablement une zone promotrice et un *enhancer* du gène *MYH10*. Ces résultats suggèrent l'existence d'une coopération entre ces trois facteurs de transcription au cours de la mégacaryopoïèse permettant la répression de MYH10 et la polyploïdisation (Figure 36).

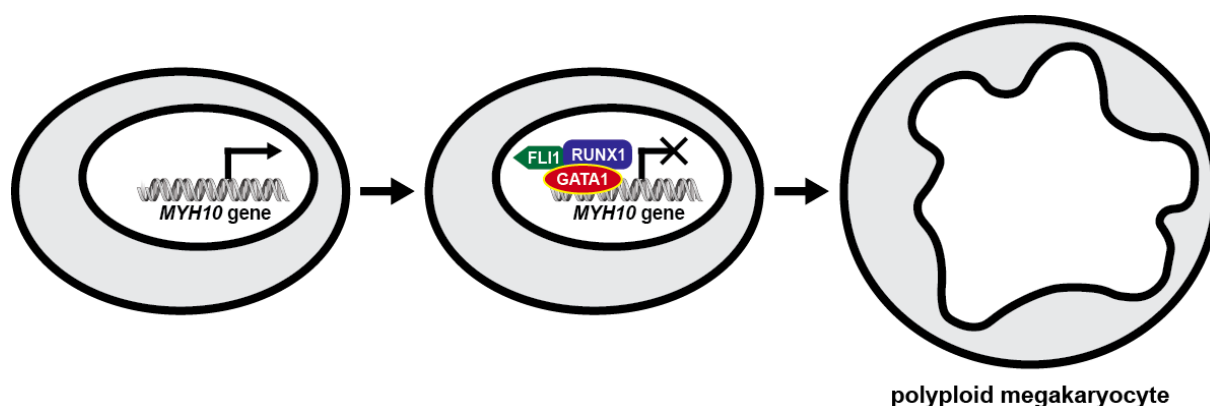


Figure 36 : Modèle de polypléidisation du mégacaryocyte induite par la répression de *MYH10* par la coopération des facteurs de transcription RUNX1, FLI1 et GATA1.

L'occupation de séquences régulatrices communes par ces facteurs de transcription peut être due à une liaison directe sur des séquences ADN consensus proches. Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence de l'existence de sites consensus de fixation à l'ADN dans les zones de co-occupation. Il est également possible que des interactions directes protéine-protéine puissent jouer un rôle important dans la constitution de ce complexe sur ce probable enhancer intronique.

Nous rechercherons une liaison directe entre GATA1, RUNX1 et FLI1 par coimmunoprécipitation dans des cellules HEK293 MSR surexprimant ces facteurs de transcription. Nous évaluerons l'effet des variants de *GATA1* dans ce modèle.

Pour rechercher une liaison directe de GATA1 sur la zone promotrice et sur la séquence régulatrice intronique, nous avons développé des plasmides comportant, en amont d'un gène rapporteur luciférase, les séquences de fixation dans le promoteur et le 8^{ème} intron de *MYH10* déterminées grâce aux données de ChIP-seq. Ce système nous permettra de déterminer si la présence de GATA1 sauvage modifie l'expression du gène rapporteur et si une mutation des sites de fixation (A/T)GATA(A/G) dans ces séquences régulatrices modifie l'expression du gène rapporteur. Cela permettra de conforter l'hypothèse d'une régulation de l'expression de *MYH10* par GATA1.

Nous rechercherons une modification de l'expression du gène rapporteur et une anomalie de la répression de MYH10 dans le modèle de différenciation des cellules HEL en présence des variants de GATA1 retrouvé dans les familles rapportées dans notre étude. Nous disposons d'un modèle de lignée cellulaire HEL dans lequel la différenciation induite par le phorbol myristate acetate (PMA) est à l'origine d'une répression de MYH10 (Figure 37).

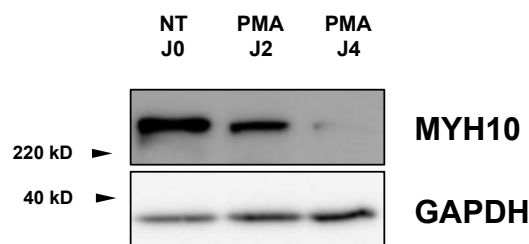


Figure 37 : Répression de l'expression du gène MYH10 au cours de la différenciation des cellules HEL induite par le phorbol myristate acetate. L'expression de MYH10 est mesurée par western blot dans des cellules HEL non traitées (NT) ou traitées par 2 à 4 jours de phorbol myristate acetate (PMA) 100 nM.

La littérature et des expériences préliminaires que nous avons réalisées montrent que les cellules HEL expriment GATA1 à l'état basal (Wechsler *et al.*, 2002). Nous utiliserons la technologie CRISPR/Cas9 pour établir une lignée HEL avec suppression de l'expression de GATA1. Cette lignée nous permettra d'évaluer l'effet de l'absence de GATA1 sur la répression de MYH10 au cours de la différenciation induite par le PMA. Nous effectuerons des expériences de restauration du phénotype en surexprimant les formes sauvage ou variante de *GATA1* dans cette lignée HEL déficiente en GATA1.

Au total, ce projet permettra de montrer le rôle de GATA1 dans la régulation de l'expression de *MYH10* au cours de la différenciation mégacaryocytaire et d'impliquer l'anomalie de régulation de l'expression de *MYH10* en tant que nouveau mécanisme physiopathologique dans la thrombopénie liée aux variants *GATA1*.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse concerne les thrombopénies constitutionnelles liées aux défauts des facteurs de transcription *FLI1*, *ETV6* et *GATA1*.

Les patients inclus présentent des thrombopénies liées à *FLI1*, *ETV6* et *GATA1* causées par 10 variants génétiques dont 9 n'avaient jamais été décrits. La description du phénotype des patients a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les corrélations génotypes-phénotypes et sur le pronostic de ces maladies.

Nous montrons qu'il existe un déficit sévère en granules denses dans les plaquettes des patients porteurs de variants *FLI1* du fait d'un probable défaut de biogénèse. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la biogénèse des granules denses sont encore incomplètement connus et la thrombopénie associée aux variants *FLI1* constitue un modèle d'intérêt pour l'étudier. Des approches utilisant les technologies de séquençage à haut débit permettront d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires sans *a priori*.

Ce travail a permis de définir la thrombopénie liée aux variants *ETV6* en tant que nouveau syndrome de prédisposition aux hémopathies malignes. Les variants *ETV6* s'associent à un défaut d'activité répressive et les mégacaryocytes dérivés des patients montrent un excès de prolifération et un défaut marqué de formation des proplaquettes. L'augmentation de la prolifération des mégacaryocytes est associée à une hyperactivation de voies de signalisation favorisant la prolifération et pourrait être causé par un excès d'expression de protéines d'histone identifiées en RNA-seq. Une hyperactivation de la voie ERK/MAPK pourrait être responsable du défaut de

formation des proplaquettes comme observé dans la thrombopénie associée aux variants ANKRD26. La probable contribution de mécanismes épigénétiques sera évaluée par ChIP-seq.

Les plaquettes de patients porteurs de variants *GATA1* présente une expression anormale de la protéine MYH10, ce qui indique que ces variants s'associent à un défaut de répression du gène *MYH10* au cours de la mégacaryopoïèse. Une analyse *in silico* de données de ChIP-seq suggère l'existence d'une coopération de GATA1, FLI1 et RUNX1 dans la régulation de l'expression de *MYH10* via son promoteur et un élément régulateur intronique.

La caractérisation des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans ces maladies, pourrait permettre de proposer des repositionnements de médicaments (inhibiteur de MEK, molécules modificatrices d'histone) ou de développer de nouveaux traitements innovants pour traiter les patients atteints par ces pathologies constitutionnelles rares.

Ce projet a permis d'apporter des connaissances sur les causes génétiques, le phénotype, le diagnostic, le pronostic et les mécanismes qui sous-tendent ces pathologies constitutionnelles. Ce travail met en lumière l'importance des collaborations nationales et internationales et des liens entre l'hôpital et le laboratoire de recherche pour étudier ces pathologies constitutionnelles plaquettaires au bénéfice des patients qui en sont atteints.

RÉFÉRENCES

Ambrosio, A. L., Boyle, J. A. et Di Pietro, S. M. (2012) Mechanism of platelet dense granule biogenesis: study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system. *Blood*, vol. 120, n°19, p. 4072-4081.

Anguita, E., Candel, F. J., Chaparro, A. et Roldán-Etcheverry, J. J. (2017) Transcription Factor GFI1B in Health and Disease. *Frontiers in Oncology*, vol. 7, p. 54.

Anguita, E., Gupta, R., Olariu, V., Valk, P. J., Peterson, C., Delwel, R. et Enver, T. (2016) A somatic mutation of GFI1B identified in leukemia alters cell fate via a SPI1 (PU.1) centered genetic regulatory network. *Developmental Biology*, vol. 411, n°2, p. 277-286.

Antony-Debré, I., Bluteau, D., Itzykson, R., Baccini, V., Renneville, A., Boehlen, F., Morabito, M., Droin, N., Deswarte, C., Chang, Y., Leverger, G., Solary, E., Vainchenker, W., Favier, R. et Raslova, H. (2012) MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations. *Blood*, vol. 120, n°13, p. 2719-2722.

Antony-Debré, I., Duployez, N., Bucci, M., Geffroy, S., Micol, J.-B., Renneville, A., Boissel, N., Dhédin, N., Réa, D., Nelken, B., Berthon, C., Leblanc, T., Mozziconacci, M.-J., Favier, R., Heller, P. G., Abdel-Wahab, O., Raslova, H., Latger-Cannard, V. et Preudhomme, C. (2016) Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia*, vol. 30, n°4, p. 999-1002.

Antony-Debré, I., Manchev, V. T., Balayn, N., Bluteau, D., Tomowiak, C., Legrand, C., Langlois, T., Bawa, O., Tosca, L., Tachdjian, G., Leheup, B., Debili, N., Plo, I., Mills, J. A., French, D. L., Weiss, M. J., Solary, E., Favier, R., Vainchenker, W. et Raslova, H. (2015) Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood*, vol. 125, n°6, p. 930-940.

Arinobu, Y., Mizuno, S., Chong, Y., Shigematsu, H., Iino, T., Iwasaki, H., Graf, T., Mayfield, R., Chan, S., Kastner, P. et Akashi, K. (2007) Reciprocal activation of

GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell*, vol. 1, n°4, p. 416-427.

Averina, M., Jensvoll, H., Strand, H. et Sovershaev, M. (2017) A novel ANKRD26 gene variant causing inherited thrombocytopenia in a family of Finnish origin: Another brick in the wall? *Thrombosis Research*, vol. 151, p. 41-43.

Balduini, A., Raslova, H., Di Buduo, C. A., Donada, A., Ballmaier, M., Germeshausen, M. et Balduini, C. L. (2018) Clinic, pathogenic mechanisms and drug testing of two inherited thrombocytopenias, ANKRD26- and MYH9-related diseases. *European Journal of Medical Genetics*.

Balduini, C. L., Pecci, A., Loffredo, G., Izzo, P., Noris, P., Grosso, M., Bergamaschi, G., Rosti, V., Magrini, U., Ceresa, I. F., Conti, V., Poggi, V. et Savoia, A. (2004) Effects of the R216Q mutation of GATA-1 on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis. *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 91, n°1, p. 129-140.

Ballmaier, M. et Germeshausen, M. (2011) Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 37, n°6, p. 673-681.

Bard-Chapeau, E. A., Jeyakani, J., Kok, C. H., Muller, J., Chua, B. Q., Gunaratne, J., Batagov, A., Jenjaroenpun, P., Kuznetsov, V. A., Wei, C.-L., D'Andrea, R. J., Bourque, G., Jenkins, N. A. et Copeland, N. G. (2012) Ecotopic viral integration site 1 (EVI1) regulates multiple cellular processes important for cancer and is a synergistic partner for FOS protein in invasive tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, n°6, p. 2168-2173.

Bastian, L. S., Kwiatkowski, B. A., Breininger, J., Danner, S. et Roth, G. (1999) Regulation of the megakaryocytic glycoprotein IX promoter by the oncogenic Ets transcription factor Fli-1. *Blood*, vol. 93, n°8, p. 2637-2644.

Ben-David, Y., Giddens, E. B., Letwin, K. et Bernstein, A. (1991) Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes & Development*, vol. 5, n°6, p. 908-918.

Béri-Dexheimer, M., Latger-Cannard, V., Philippe, C., Bonnet, C., Chambon, P., Roth, V., Grégoire, M.-J., Bordigoni, P., Lecompte, T., Leheup, B. et Jonveaux, P.

(2008) Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *European journal of human genetics: EJHG*, vol. 16, n°8, p. 1014-1018.

Bishton, M. J., Harrison, S. J., Martin, B. P., McLaughlin, N., James, C., Josefsson, E. C., Henley, K. J., Kile, B. T., Prince, H. M. et Johnstone, R. W. (2011) Deciphering the molecular and biologic processes that mediate histone deacetylase inhibitor-induced thrombocytopenia. *Blood*, vol. 117, n°13, p. 3658-3668.

Bluteau, D., Balduini, A., Balayn, N., Currao, M., Nurden, P., Deswarte, C., Leverger, G., Noris, P., Perrotta, S., Solary, E., Vainchenker, W., Debili, N., Favier, R. et Raslova, H. (2014) Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 124, n°2, p. 580-591.

Bluteau, D., Glembotsky, A. C., Raimbault, A., Balayn, N., Gilles, L., Rameau, P., Nurden, P., Alessi, M. C., Debili, N., Vainchenker, W., Heller, P. G., Favier, R. et Raslova, H. (2012) Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood*, vol. 120, n°13, p. 2708-2718.

Boccuni, P., MacGrogan, D., Scandura, J. M. et Nimer, S. D. (2003) The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n°17, p. 15412-15420.

Borst, S., Sim, X., Poncz, M., French, D. L. et Gadue, P. (2017) Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Megakaryocytes and Platelets for Disease Modeling and Clinical Use. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.

Boutroux, H., Petit, A., Auvrignon, A., Lapillonne, H., Ballerini, P., Favier, R. et Leverger, G. (2015) Childhood diagnosis of genetic thrombocytopenia with mutation in the ankyrine repeat domain 26 gene. *European Journal of Pediatrics*, vol. 174, n°10, p. 1399-1403.

Brass, L. F. (2005) Did dinosaurs have megakaryocytes? New ideas about platelets and their progenitors. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, n°12, p. 3329-3331.

Breton-Gorius, J., Favier, R., Guichard, J., Cherif, D., Berger, R., Debili, N., Vainchenker, W. et Douay, L. (1995) A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood*, vol. 85, n°7, p. 1805-1814.

Buijs, A., Poddighe, P., van Wijk, R., van Solinge, W., Borst, E., Verdonck, L., Hagenbeek, A., Pearson, P. et Lokhorst, H. (2001) A novel CBFA2 single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Blood*, vol. 98, n°9, p. 2856-2858.

Caldwell, J. T., Edwards, H., Dombkowski, A. A., Buck, S. A., Matherly, L. H., Ge, Y. et Taub, J. W. (2013) Overexpression of GATA1 confers resistance to chemotherapy in acute megakaryocytic Leukemia. *PloS One*, vol. 8, n°7, p. e68601.

Chang, Y., Bluteau, D., Debili, N. et Vainchenker, W. (2007) From hematopoietic stem cells to platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, vol. 5 Suppl 1, p. 318-327.

Chen, L., Kostadima, M., Martens, J. H. A., Canu, G., Garcia, S. P., Turro, E., Downes, K., Macaulay, I. C., Bielczyk-Maczynska, E., Coe, S., Farrow, S., Poudel, P., Burden, F., Jansen, S. B. G., Astle, W. J., Attwood, A., Bariana, T., de Bono, B., Breschi, A., Chambers, J. C., Consortium, B., Choudry, F. A., Clarke, L., Coupland, P., van der Ent, M., Erber, W. N., Jansen, J. H., Favier, R., Fenech, M. E., Foad, N., Freson, K., van Geet, C., Gomez, K., Guigo, R., Hampshire, D., Kelly, A. M., Kerstens, H. H. D., Kooner, J. S., Laffan, M., Lentaigne, C., Labalette, C., Martin, T., Meacham, S., Mumford, A., Nürnberg, S., Palumbo, E., van der Reijden, B. A., Richardson, D., Sammut, S. J., Slodkiewicz, G., Tamuri, A. U., Vasquez, L., Voss, K., Watt, S., Westbury, S., Flicek, P., Loos, R., Goldman, N., Bertone, P., Read, R. J., Richardson, S., Cvejic, A., Soranzo, N., Ouwehand, W. H., Stunnenberg, H. G., Frontini, M. et Rendon, A. (2014) Transcriptional diversity during lineage commitment of human blood progenitors. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 345, n°6204, p. 1251033.

Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. et Kim, J.-S. (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, vol. 31, n°3, p. 230-232.

Chuang, L. S. H., Ito, K. et Ito, Y. (2013) RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. *International Journal of Cancer*, vol. 132, n°6, p.

1260-1271.

Cines, D. B., Bussel, J. B., McMillan, R. B. et Zehnder, J. L. (2004) Congenital and acquired thrombocytopenia. Hematology. American Society of Hematology. Education Program, p. 390-406.

Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Frampton, G. M., Sharp, P. A., Boyer, L. A., Young, R. A. et Jaenisch, R. (2010) Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, n°50, p. 21931-21936.

Crispino, J. D. et Horwitz, M. S. (2017) GATA factor mutations in hematologic disease. Blood, vol. 129, n°15, p. 2103-2110.

De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Le Bris, M.-J., Basinko, A. et De Braekeleer, M. (2012) ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review. Leukemia Research, vol. 36, n°8, p. 945-961.

De Rocco, D., Melazzini, F., Marconi, C., Pecci, A., Bottega, R., Gnan, C., Palombo, F., Giordano, P., Susanna Coccioli, M., Glembotsky, A. C., Heller, P. G., Seri, M., Savoia, A. et Noris, P. (2017) Mutations of RUNX1 in families with inherited thrombocytopenia. American Journal of Hematology.

Del Vecchio, G. C., Giordani, L., De Santis, A. et De Mattia, D. (2005) Dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia due to a novel mutation in GATA-1. Acta Haematologica, vol. 114, n°2, p. 113-116.

Delwel, R., Funabiki, T., Kreider, B. L., Morishita, K. et Ihle, J. N. (1993) Four of the seven zinc fingers of the Evi-1 myeloid-transforming gene are required for sequence-specific binding to GA(C/T)AAGA(T/C)AAGATAA. Molecular and Cellular Biology, vol. 13, n°7, p. 4291-4300.

Deveaux, S., Filipe, A., Lemarchandel, V., Ghysdael, J., Roméo, P. H. et Mignotte, V. (1996) Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes. Blood, vol. 87, n°11, p. 4678-4685.

Doré, L. C. et Crispino, J. D. (2011) Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. Blood, vol. 118, n°2, p. 231.

Dowton, S. B., Beardsley, D., Jamison, D., Blattner, S. et Li, F. P. (1985) Studies of a familial platelet disorder. *Blood*, vol. 65, n°3, p. 557-563.

Duployez, N., Abou Chahla, W., Lejeune, S., Marceau-Renaut, A., Letizia, G., Boyer, T., Geffroy, S., Peyrouze, P., Grardel, N., Nelken, B., Michel, G., Bertrand, Y. et Preudhomme, C. (2017) Detection of a new heterozygous germline ETV6 mutation in a case with hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL). *European Journal of Haematology*.

Edgar, R., Domrachev, M. et Lash, A. E. (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, n°1, p. 207-210.

ENCODE Project Consortium (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, vol. 489, n°7414, p. 57-74.

Evans, T., Reitman, M. et Felsenfeld, G. (1988) An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, n°16, p. 5976-5980.

Favier, R., Jondeau, K., Boutard, P., Grossfeld, P., Reinert, P., Jones, C., Bertoni, F. et Cramer, E. M. (2003) Paris-Trousseau syndrome: clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 90, n°5, p. 893-897.

Ferrari, S., Lombardi, A. M., Putti, M. C., Bertomoro, A., Cortella, I., Barzon, I., Girolami, A. et Fabris, F. (2017) Spectrum of 5'UTR mutations in ANKRD26 gene in patients with inherited thrombocytopenia: c.-140C>G mutation is more frequent than expected. *Platelets*, vol. 28, n°6, p. 621-624.

Ferreira, C. R., Chen, D., Abraham, S. M., Adams, D. R., Simon, K. L., Malicdan, M. C., Markello, T. C., Gunay-Aygun, M. et Gahl, W. A. (2017) Combined alpha-delta platelet storage pool deficiency is associated with mutations in GFI1B. *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 120, n°3, p. 288-294.

Feser, J., Truong, D., Das, C., Carson, J. J., Kieft, J., Harkness, T. et Tyler, J. K. (2010) Elevated histone expression promotes life span extension. *Molecular Cell*, vol. 39, n°5, p. 724-735.

Fiore, M. (2017) Abstracts of the XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis, vol. 1, n°S1, p. 1-1451.

Freson, K., Devriendt, K., Matthijs, G., Van Hoof, A., De Vos, R., Thys, C., Minner, K., Hoylaerts, M. F., Vermynen, J. et Van Geet, C. (2001) Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. Blood, vol. 98, n°1, p. 85-92.

Freson, K., Matthijs, G., Thys, C., Mariën, P., Hoylaerts, M. F., Vermynen, J. et Van Geet, C. (2002) Different substitutions at residue D218 of the X-linked transcription factor GATA1 lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation. Human Molecular Genetics, vol. 11, n°2, p. 147-152.

Funabiki, T., Kreider, B. L. et Ihle, J. N. (1994) The carboxyl domain of zinc fingers of the Evi-1 myeloid transforming gene binds a consensus sequence of GAAGATGAG. Oncogene, vol. 9, n°6, p. 1575-1581.

Furihata, K. et Kunicki, T. J. (2002) Characterization of human glycoprotein VI gene 5' regulatory and promoter regions. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 22, n°10, p. 1733-1739.

Ganly, P., Walker, L. C. et Morris, C. M. (2004) Familial mutations of the transcription factor RUNX1 (AML1, CBFA2) predispose to acute myeloid leukemia. Leukemia & Lymphoma, vol. 45, n°1, p. 1-10.

Gilks, C. B., Bear, S. E., Grimes, H. L. et Tschlis, P. N. (1993) Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. Molecular and Cellular Biology, vol. 13, n°3, p. 1759-1768.

Glass, C., Wilson, M., Gonzalez, R., Zhang, Y. et Perkins, A. S. (2014) The role of EVI1 in myeloid malignancies. Blood Cells, Molecules & Diseases, vol. 53, n°1-2, p. 67-76.

Golub, T. R., Barker, G. F., Bohlander, S. K., Hiebert, S. W., Ward, D. C., Bray-Ward, P., Morgan, E., Raimondi, S. C., Rowley, J. D. et Gilliland, D. G. (1995) Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, n°11, p. 4917-4921.

Green, S. M., Coyne, H. J., McIntosh, L. P. et Graves, B. J. (2010) DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association. The Journal of Biological Chemistry, vol. 285, n°24, p. 18496-18504.

Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B. et Tschlis, P. N. (1996) The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. Molecular and Cellular Biology, vol. 16, n°11, p. 6263-6272.

Grossfeld, P. D., Mattina, T., Lai, Z., Favier, R., Jones, K. L., Cotter, F. et Jones, C. (2004) The 11q terminal deletion disorder: a prospective study of 110 cases. American Journal of Medical Genetics. Part A, vol. 129A, n°1, p. 51-61.

Guidez, F., Petrie, K., Ford, A. M., Lu, H., Bennett, C. A., MacGregor, A., Hannemann, J., Ito, Y., Ghysdael, J., Greaves, M., Wiedemann, L. M. et Zelent, A. (2000) Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. Blood, vol. 96, n°7, p. 2557-2561.

Guy, H. R. (1985) Amino acid side-chain partition energies and distribution of residues in soluble proteins. Biophysical Journal, vol. 47, n°1, p. 61-70.

Hart, A., Melet, F., Grossfeld, P., Chien, K., Jones, C., Tunnacliffe, A., Favier, R. et Bernstein, A. (2000) Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. Immunity, vol. 13, n°2, p. 167-177.

Hashimoto, Y. et Ware, J. (1995) Identification of essential GATA and Ets binding motifs within the promoter of the platelet glycoprotein Ib alpha gene. The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, n°41, p. 24532-24539.

Hermans, C., De Waele, L., Van Geet, C. et Freson, K. (2014) Novel GATA1 mutation in residue D218 leads to macrothrombocytopenia and clinical bleeding problems. Platelets, vol. 25, n°4, p. 305-307.

Ho, C. Y., Otterud, B., Legare, R. D., Varvil, T., Saxena, R., DeHart, D. B., Kohler, S. E., Aster, J. C., Downton, S. B., Li, F. P., Leppert, M. et Gilliland, D. G. (1996) Linkage

of a familial platelet disorder with a propensity to develop myeloid malignancies to human chromosome 21q22.1-22.2. *Blood*, vol. 87, n°12, p. 5218-5224.

Hock, H., Meade, E., Medeiros, S., Schindler, J. W., Valk, P. J. M., Fujiwara, Y. et Orkin, S. H. (2004) Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes & Development*, vol. 18, n°19, p. 2336-2341.

Hollanda, L. M., Lima, C. S. P., Cunha, A. F., Albuquerque, D. M., Vassallo, J., Ozelo, M. C., Joazeiro, P. P., Saad, S. T. O. et Costa, F. F. (2006) An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nature Genetics*, vol. 38, n°7, p. 807-812.

Honsei, N., Ikuta, T., Kawana, K., Kaneko, Y. et Kawajiri, K. (2006) Participation of nuclear localization signal 2 in the 3'-ETS domain of FLI1 in nuclear translocation of various chimeric EWS-FLI1 oncoproteins in Ewing tumor. *International Journal of Oncology*, vol. 29, n°3, p. 689-693.

Huang, H., Yu, M., Akie, T. E., Moran, T. B., Woo, A. J., Tu, N., Waldon, Z., Lin, Y. Y., Steen, H. et Cantor, A. B. (2009) Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 29, n°15, p. 4103-4115.

Hughan, S. C., Senis, Y., Best, D., Thomas, A., Frampton, J., Vyas, P. et Watson, S. P. (2005) Selective impairment of platelet activation to collagen in the absence of GATA1. *Blood*, vol. 105, n°11, p. 4369-4376.

Iancu-Rubin, C., Gajzer, D., Mosoyan, G., Feller, F., Mascarenhas, J. et Hoffman, R. (2012) Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation. *Experimental Hematology*, vol. 40, n°7, p. 564-574.

Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M. et Hirai, H. (2004) AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Medicine*, vol. 10, n°3, p. 299-304.

Jebeniani, I., Leschik, J. et Puceat, M. (2016) Epigenetic Regulation of Cardiac Differentiation of Embryonic Stem Cells and Tissues. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n°112.

Kataoka, K. et Kurokawa, M. (2012) Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis. *Cancer Science*, vol. 103, n°8, p. 1371-1377.

Kawada, H., Ito, T., Pharr, P. N., Spyropoulos, D. D., Watson, D. K. et Ogawa, M. (2001) Defective megakaryopoiesis and abnormal erythroid development in Fli-1 gene-targeted mice. *International Journal of Hematology*, vol. 73, n°4, p. 463-468.

Khandanpour, C., Sharif-Askari, E., Vassen, L., Gaudreau, M.-C., Zhu, J., Paul, W. E., Okayama, T., Kosan, C. et Mörröy, T. (2010) Evidence that growth factor independence 1b regulates dormancy and peripheral blood mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood*, vol. 116, n°24, p. 5149-5161.

Kirkpatrick, G., Noetzli, L., Di Paola, J. et Porter, C. C. (2015) ETV6 mutations define a new cancer predisposition syndrome. *Oncotarget*, vol. 6, n°19, p. 16830-16831.

Kitamura, K., Okuno, Y., Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Muramatsu, H., Kobayashi, R., Furukawa, K., Miyano, S., Kojima, S., Ogawa, S. et Kunishima, S. (2016) Functional characterization of a novel GFI1B mutation causing congenital macrothrombocytopenia. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, vol. 14, n°7, p. 1462-1469.

Kwiatkowski, B. A., Bastian, L. S., Bauer, T. R., Tsai, S., Zielinska-Kwiatkowska, A. G. et Hickstein, D. D. (1998) The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, n°28, p. 17525-17530.

Lambert, M. P. (2015) Update on the inherited platelet disorders. *Current Opinion in Hematology*, vol. 22, n°5, p. 460-466.

Latger-Cannard, V., Philippe, C., Bouquet, A., Baccini, V., Alessi, M.-C., Ankri, A., Bauters, A., Bayart, S., Cornillet-Lefebvre, P., Daliphard, S., Mozziconacci, M.-J., Renneville, A., Ballerini, P., Leverger, G., Sobol, H., Jonveaux, P., Preudhomme, C., Nurden, P., Lecompte, T. et Favier, R. (2016) Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol. 11, p. 49.

Lemarchandel, V., Ghysdael, J., Mignotte, V., Rahuel, C. et Roméo, P. H. (1993) GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression.

Molecular and Cellular Biology, vol. 13, n°1, p. 668-676.

Lentaigne, C., Freson, K., Laffan, M. A., Turro, E., Ouwehand, W. H. et BRIDGE-BPD Consortium and the ThromboGenomics Consortium (2016) Inherited platelet disorders: toward DNA-based diagnosis. *Blood*, vol. 127, n°23, p. 2814-2823.

Léon, C., Dupuis, A., Gachet, C. et Lanza, F. (2016) The contribution of mouse models to the understanding of constitutional thrombocytopenia. *Haematologica*, vol. 101, n°8, p. 896-908.

Lopez, R. G., Carron, C., Oury, C., Gardellin, P., Bernard, O. et Ghysdael, J. (1999) TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n°42, p. 30132-30138.

Lordier, L., Bluteau, D., Jalil, A., Legrand, C., Pan, J., Rameau, P., Jouni, D., Bluteau, O., Mercher, T., Leon, C., Gachet, C., Debili, N., Vainchenker, W., Raslova, H. et Chang, Y. (2012) RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nature Communications*, vol. 3, p. 717.

Loyola, A. et Almouzni, G. (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1677, n°1-3, p. 3-11.

Machlus, K. R. et Italiano, J. E. (2013) The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *The Journal of Cell Biology*, vol. 201, n°6, p. 785-796.

Mao, G. F., Goldfinger, L. E., Fan, D. C., Lambert, M. P., Jalagadugula, G., Freishtat, R. et Rao, A. K. (2017) Dysregulation of PLDN (pallidin) is a mechanism for platelet dense granule deficiency in RUNX1 haploinsufficiency. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, vol. 15, n°4, p. 792-801.

Marconi, C., Canobbio, I., Bozzi, V., Pippucci, T., Simonetti, G., Melazzini, F., Angori, S., Martinelli, G., Saglio, G., Torti, M., Pastan, I., Seri, M. et Pecci, A. (2017) 5'UTR point substitutions and N-terminal truncating mutations of ANKRD26 in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 10, n°1, p. 18.

Marquez, R., Hantel, A., Lorenz, R., Neistadt, B., Wong, J., Churpek, J. E., Mardini, N. A., Shaukat, I., Gurbuxani, S., Miller, J. L. et Godley, L. A. (2014) A new family with a germline ANKRD26 mutation and predisposition to myeloid malignancies.

Leukemia & Lymphoma, vol. 55, n°12, p. 2945-2946.

Martin, D. I., Tsai, S. F. et Orkin, S. H. (1989) Increased gamma-globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature*, vol. 338, n°6214, p. 435-438.

Matheny, C. J., Speck, M. E., Cushing, P. R., Zhou, Y., Corpora, T., Regan, M., Newman, M., Roudaia, L., Speck, C. L., Gu, T.-L., Griffey, S. M., Bushweller, J. H. et Speck, N. A. (2007) Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *The EMBO journal*, vol. 26, n°4, p. 1163-1175.

Mehaffey, M. G., Newton, A. L., Gandhi, M. J., Crossley, M. et Drachman, J. G. (2001) X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. *Blood*, vol. 98, n°9, p. 2681-2688.

Meinders, M., Hoogenboezem, M., Scheenstra, M. R., De Cuyper, I. M., Papadopoulos, P., Németh, T., Mócsai, A., van den Berg, T. K., Kuijpers, T. W. et Gutiérrez, L. (2016) Repercussion of Megakaryocyte-Specific Gata1 Loss on Megakaryopoiesis and the Hematopoietic Precursor Compartment. *PloS One*, vol. 11, n°5, p. e0154342.

Melazzini, F., Palombo, F., Balduini, A., De Rocco, D., Marconi, C., Noris, P., Gnan, C., Pippucci, T., Bozzi, V., Faleschini, M., Barozzi, S., Doubek, M., Di Buduo, C. A., Stano Kozubik, K., Radova, L., Loffredo, G., Pospisilova, S., Alfano, C., Seri, M., Balduini, C. L., Pecci, A. et Savoia, A. (2016) Clinical and pathogenetic features of ETV6 related thrombocytopenia with predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*.

Melazzini, F., Zaninetti, C. et Balduini, C. L. (2017) Bleeding is not the main clinical issue in many patients with inherited thrombocytopaenias. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*.

Melnikova, I. N., Crute, B. E., Wang, S. et Speck, N. A. (1993) Sequence specificity of the core-binding factor. *Journal of Virology*, vol. 67, n°4, p. 2408-2411.

Michaud, J., Wu, F., Osato, M., Cottles, G. M., Yanagida, M., Asou, N., Shigesada, K., Ito, Y., Benson, K. F., Raskind, W. H., Rossier, C., Antonarakis, S. E., Israels, S., McNicol, A., Weiss, H., Horwitz, M. et Scott, H. S. (2002) In vitro analyses of known

and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*, vol. 99, n°4, p. 1364-1372.

Monteferrario, D., Bolar, N. A., Marneth, A. E., Hebeda, K. M., Bergevoet, S. M., Veenstra, H., Laros-van Gorkom, B. A. P., MacKenzie, M. A., Khandanpour, C., Botezatu, L., Fransen, E., Van Camp, G., Duijnhouwer, A. L., Salemink, S., Willemsen, B., Huls, G., Preijers, F., Van Heerde, W., Jansen, J. H., Kempers, M. J. E., Loeys, B. L., Van Laer, L. et Van der Reijden, B. A. (2014) A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *The New England Journal of Medicine*, vol. 370, n°3, p. 245-253.

Morishita, K., Parker, D. S., Mucenski, M. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. et Ihle, J. N. (1988) Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell*, vol. 54, n°6, p. 831-840.

Moriyama, T., Metzger, M. L., Wu, G., Nishii, R., Qian, M., Devidas, M., Yang, W., Cheng, C., Cao, X., Quinn, E., Raimondi, S., Gastier-Foster, J. M., Raetz, E., Larsen, E., Martin, P. L., Bowman, W. P., Winick, N., Komada, Y., Wang, S., Edmonson, M., Xu, H., Mardis, E., Fulton, R., Pui, C.-H., Mullighan, C., Evans, W. E., Zhang, J., Hunger, S. P., Relling, M. V., Nichols, K. E., Loh, M. L. et Yang, J. J. (2015) Germline genetic variation in ETV6 and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. *The Lancet. Oncology*, vol. 16, n°16, p. 1659-1666.

Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L. et Wang, G. (2015) Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 20, n°3, p. 3898-3941.

Moussa, O., LaRue, A. C., Abangan, R. S., Williams, C. R., Zhang, X. K., Masuya, M., Gong, Y. Z., Spyropoulos, D. D., Ogawa, M., Gilkeson, G. et Watson, D. K. (2010) Thrombocytopenia in mice lacking the carboxy-terminal regulatory domain of the Ets transcription factor Fli1. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 30, n°21, p. 5194-5206.

Muntean, A. G., Pang, L., Poncz, M., Dowdy, S. F., Blobel, G. A. et Crispino, J. D. (2007) Cyclin D-Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization. *Blood*, vol. 109, n°12, p. 5199-5207.

Nichols, K. E., Crispino, J. D., Poncz, M., White, J. G., Orkin, S. H., Maris, J. M. et Weiss, M. J. (2000) Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nature Genetics*, vol. 24, n°3, p. 266-270.

Nielsen, M., Vermont, C. L., Aten, E., Ruivenkamp, C. A. L., van Herrewegen, F., Santen, G. W. E. et Breuning, M. H. (2012) Deletion of the 3q26 region including the EVI1 and MDS1 genes in a neonate with congenital thrombocytopenia and subsequent aplastic anaemia. *Journal of Medical Genetics*, vol. 49, n°9, p. 598-600.

Niihori, T., Ouchi-Uchiyama, M., Sasahara, Y., Kaneko, T., Hashii, Y., Irie, M., Sato, A., Saito-Nanjo, Y., Funayama, R., Nagashima, T., Inoue, S.-I., Nakayama, K., Ozono, K., Kure, S., Matsubara, Y., Imaizumi, M. et Aoki, Y. (2015) Mutations in MECOM, Encoding Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *American Journal of Human Genetics*, vol. 97, n°6, p. 848-854.

Noetzli, L., Lo, R. W., Lee-Sherick, A. B., Callaghan, M., Noris, P., Savoia, A., Rajpurkar, M., Jones, K., Gowan, K., Balduini, C. L., Pecci, A., Gnan, C., De Rocco, D., Doubek, M., Li, L., Lu, L., Leung, R., Landolt-Marticorena, C., Hunger, S., Heller, P., Gutierrez-Hartmann, A., Xiayuan, L., Pluthero, F. G., Rowley, J. W., Weyrich, A. S., Kahr, W. H. A., Porter, C. C. et Di Paola, J. (2015) Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, vol. 47, n°5, p. 535-538.

Noetzli, L., Rowley, J. W., Davizon-Castillo, P., Kirkpatrick, G., Ashworth, K. J., Aguila, S., Porter, C. C., Pietras, E. M., Weyrich, A. S. et Paola, J. D. (2017) A CRISPR-Cas9 Generated Etv6 mutant Mouse Exhibits Decreased Platelet Counts and Functional Platelet Defects. *Blood*, vol. 130, n°Suppl 1, p. 1035-1035.

Noris, P., Favier, R., Alessi, M.-C., Geddis, A. E., Kunishima, S., Heller, P. G., Giordano, P., Niederhoffer, K. Y., Bussel, J. B., Podda, G. M., Vianelli, N., Kersseboom, R., Pecci, A., Gnan, C., Marconi, C., Auvrignon, A., Cohen, W., Yu, J. C., Iguchi, A., Miller Imahiyerobo, A., Boehlen, F., Ghalloussi, D., De Rocco, D., Magini, P., Civaschi, E., Biino, G., Seri, M., Savoia, A. et Balduini, C. L. (2013) ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood*, vol. 122, n°11, p. 1987-1989.

Noris, P. et Pecci, A. (2017) Hereditary thrombocytopenias: a growing list of

disorders. Hematology. American Society of Hematology. Education Program, vol. 2017, n°1, p. 385-399.

Noris, P., Perrotta, S., Seri, M., Pecci, A., Gnan, C., Loffredo, G., Pujol-Moix, N., Zecca, M., Scognamiglio, F., De Rocco, D., Punzo, F., Melazzini, F., Scianguetta, S., Casale, M., Marconi, C., Pippucci, T., Amendola, G., Notarangelo, L. D., Klersy, C., Civaschi, E., Balduini, C. L. et Savoia, A. (2011) Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. Blood, vol. 117, n°24, p. 6673-6680.

Nucifora, G., Begy, C. R., Kobayashi, H., Roulston, D., Claxton, D., Pedersen-Bjergaard, J., Parganas, E., Ihle, J. N. et Rowley, J. D. (1994) Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, n°9, p. 4004-4008.

Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D. et Graves, B. J. (1992) Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. Genes & Development, vol. 6, n°6, p. 975-990.

Owen, C., Barnett, M. et Fitzgibbon, J. (2008) Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia--a review. British Journal of Haematology, vol. 140, n°2, p. 123-132.

Park, H., Seo, Y., Kim, J. I., Kim, W. et Choe, S. Y. (2006) Identification of the nuclear localization motif in the ETV6 (TEL) protein. Cancer Genetics and Cytogenetics, vol. 167, n°2, p. 117-121.

Pellagatti, A., Dolatshad, H., Yip, B. H., Valletta, S. et Boulton, J. (2016) Application of genome editing technologies to the study and treatment of hematological disease. Advances in Biological Regulation, vol. 60, p. 122-134.

Pereira, J., Bento, C., Manco, L., Gonzalez, A., Vagace, J. et Ribeiro, M. L. (2016) Congenital dyserythropoietic anemia associated to a GATA1 mutation aggravated by pyruvate kinase deficiency. Annals of Hematology, vol. 95, n°9, p. 1551-1553.

Perkins, A. S., Mercer, J. A., Jenkins, N. A. et Copeland, N. G. (1991) Patterns of Evi-1 expression in embryonic and adult tissues suggest that Evi-1 plays an important regulatory role in mouse development. Development (Cambridge,

England), vol. 111, n°2, p. 479-487.

Petrie, K., Guidez, F., Howell, L., Healy, L., Waxman, S., Greaves, M. et Zelent, A. (2003) The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n°18, p. 16059-16072.

Pippucci, T., Savoia, A., Perrotta, S., Pujol-Moix, N., Noris, P., Castegnaro, G., Pecci, A., Gnan, C., Punzo, F., Marconi, C., Gherardi, S., Loffredo, G., De Rocco, D., Scianguetta, S., Barozzi, S., Magini, P., Bozzi, V., Dezzani, L., Di Stazio, M., Ferraro, M., Perini, G., Seri, M. et Balduini, C. L. (2011) Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2. *American Journal of Human Genetics*, vol. 88, n°1, p. 115-120.

Poggi, M., Canault, M., Favier, M., Turro, E., Saultier, P., Ghalloussi, D., Baccini, V., Vidal, L., Mezzapesa, A., Chelghoum, N., Mohand-Oumoussa, B., Falaise, C., Favier, R., Ouwehand, W. H., Fiore, M., Peiretti, F., Morange, P. E., Saut, N., Bernot, D., Greinacher, A., BioResource, N., Nurden, A. T., Nurden, P., Freson, K., Trégouët, D.-A., Raslova, H. et Alessi, M.-C. (2017) Germline variants in ETV6 underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34+ progenitors. *Haematologica*, vol. 102, n°2, p. 282-294.

Pui, C.-H., Relling, M. V. et Downing, J. R. (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, vol. 350, n°15, p. 1535-1548.

Raslova, H., Komura, E., Le Couédic, J. P., Larbret, F., Debili, N., Feunteun, J., Danos, O., Albagli, O., Vainchenker, W. et Favier, R. (2004) FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, n°1, p. 77-84.

Reddington, M., Novak, E. K., Hurley, E., Medda, C., McGarry, M. P. et Swank, R. T. (1987) Immature dense granules in platelets from mice with platelet storage pool disease. *Blood*, vol. 69, n°5, p. 1300-1306.

Rho, J. K., Kim, J. H., Yu, J. et Choe, S. Y. (2002) Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 297, n°1, p. 91-95.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J. et Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* (Oxford, England), vol. 26, n°1, p. 139-140.

Sakurai, M., Kunimoto, H., Watanabe, N., Fukuchi, Y., Yuasa, S., Yamazaki, S., Nishimura, T., Sadahira, K., Fukuda, K., Okano, H., Nakauchi, H., Morita, Y., Matsumura, I., Kudo, K., Ito, E., Ebihara, Y., Tsuji, K., Harada, Y., Harada, H., Okamoto, S. et Nakajima, H. (2014) Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia*, vol. 28, n°12, p. 2344-2354.

Saleque, S., Cameron, S. et Orkin, S. H. (2002) The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes & Development*, vol. 16, n°3, p. 301-306.

Saultier, P., Vidal, L., Canault, M., Bernot, D., Falaise, C., Pouymayou, C., Bordet, J.-C., Saut, N., Rostan, A., Baccini, V., Peiretti, F., Favier, M., Lucca, P., Deleuze, J.-F., Olasso, R., Boland, A., Morange, P. E., Gachet, C., Malergue, F., Fauré, S., Eckly, A., Trégouët, D.-A., Poggi, M. et Alessi, M.-C. (2017) Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: ultrastructural and pathogenic features. *Haematologica*, vol. 102, n°6, p. 1006-1016.

Savoia, A. (2016) Molecular basis of inherited thrombocytopenias: an update. *Current Opinion in Hematology*.

Schlegelberger, B. et Heller, P. G. (2017) RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Seminars in Hematology*, vol. 54, n°2, p. 75-80.

Schulze, H., Korpai, M., Hurov, J., Kim, S.-W., Zhang, J., Cantley, L. C., Graf, T. et Shivdasani, R. A. (2006) Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, vol. 107, n°10, p. 3868-3875.

Seth, A., Robinson, L., Thompson, D. M., Watson, D. K. et Papas, T. S. (1993) Transactivation of GATA-1 promoter with ETS1, ETS2 and ERG/Hu-FLI-1 proteins: stabilization of the ETS1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody. *Oncogene*, vol. 8, n°7, p. 1783-1790.

Sharda, A. et Flaumenhaft, R. (2018) The life cycle of platelet granules. *F1000Research*, vol. 7, p. 236.

Sharrocks, A. D. (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 2, n°11, p. 827-837.

Song, W. J., Sullivan, M. G., Legare, R. D., Hutchings, S., Tan, X., Kufrin, D., Ratajczak, J., Resende, I. C., Haworth, C., Hock, R., Loh, M., Felix, C., Roy, D. C., Busque, L., Kurnit, D., Willman, C., Gewirtz, A. M., Speck, N. A., Bushweller, J. H., Li, F. P., Gardiner, K., Poncz, M., Maris, J. M. et Gilliland, D. G. (1999) Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature Genetics*, vol. 23, n°2, p. 166-175.

Songdej, N. et Rao, A. K. (2017) Hematopoietic Transcription Factors Mutations - Important Players in Inherited Platelet Defects. *Blood*.

Spyropoulos, D. D., Pharr, P. N., Lavenburg, K. R., Jackers, P., Papas, T. S., Ogawa, M. et Watson, D. K. (2000) Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, n°15, p. 5643-5652.

Starck, J., Weiss-Gayet, M., Gonnet, C., Guyot, B., Vicat, J.-M. et Morlé, F. (2010) Inducible Fli-1 gene deletion in adult mice modifies several myeloid lineage commitment decisions and accelerates proliferation arrest and terminal erythrocytic differentiation. *Blood*, vol. 116, n°23, p. 4795-4805.

Stevenson, W. S., Morel-Kopp, M.-C., Chen, Q., Liang, H. P., Bromhead, C. J., Wright, S., Turakulov, R., Ng, A. P., Roberts, A. W., Bahlo, M. et Ward, C. M. (2013) GFI1B mutation causes a bleeding disorder with abnormal platelet function. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, vol. 11, n°11, p. 2039-2047.

Stevenson, W. S., Rabbolini, D. J., Beutler, L., Chen, Q., Gabrielli, S., Mackay, J. P., Brighton, T. A., Ward, C. M. et Morel-Kopp, M.-C. (2015) Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in FLI1. *Blood*, vol. 126, n°17, p. 2027-2030.

Stockley, J., Morgan, N. V., Bem, D., Lowe, G. C., Lordkipanidzé, M., Dawood, B., Simpson, M. A., Macfarlane, K., Horner, K., Leo, V. C., Talks, K., Motwani, J., Wilde, J. T., Collins, P. W., Makris, M., Watson, S. P., Daly, M. E. et UK Genotyping and

Phenotyping of Platelets Study Group (2013) Enrichment of FLI1 and RUNX1 mutations in families with excessive bleeding and platelet dense granule secretion defects. *Blood*, vol. 122, n°25, p. 4090-4093.

Sun, L., Gorospe, J. R., Hoffman, E. P. et Rao, A. K. (2007) Decreased platelet expression of myosin regulatory light chain polypeptide (MYL9) and other genes with platelet dysfunction and CBFA2/RUNX1 mutation: insights from platelet expression profiling. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, vol. 5, n°1, p. 146-154.

Sun, L., Mao, G. et Rao, A. K. (2004) Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC-theta and impaired receptor-mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. *Blood*, vol. 103, n°3, p. 948-954.

Suzuki, T., Li, W., Zhang, Q., Karim, A., Novak, E. K., Sviderskaya, E. V., Hill, S. P., Bennett, D. C., Levin, A. V., Nieuwenhuis, H. K., Fong, C.-T., Castellan, C., Mitterski, B., Swank, R. T. et Spritz, R. A. (2002) Hermansky-Pudlak syndrome is caused by mutations in HPS4, the human homolog of the mouse light-ear gene. *Nature Genetics*, vol. 30, n°3, p. 321-324.

Tablin, F. (2011) Proplatelet formation flex required. *Blood*, vol. 118, n°6, p. 1434-1435.

Thompson, A. A. et Nguyen, L. T. (2000) Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nature Genetics*, vol. 26, n°4, p. 397-398.

Thompson, A. A., Woodruff, K., Feig, S. A., Nguyen, L. T. et Schanen, N. C. (2001) Congenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis: a new familial syndrome. *British Journal of Haematology*, vol. 113, n°4, p. 866-870.

Thompson, A. R., Wood, W. G. et Stamatoyannopoulos, G. (1977) X-linked syndrome of platelet dysfunction, thrombocytopenia, and imbalanced globin chain synthesis with hemolysis. *Blood*, vol. 50, n°2, p. 303-316.

Tijssen, M. R., Cvejic, A., Joshi, A., Hannah, R. L., Ferreira, R., Forrai, A., Bellissimo, D. C., Oram, S. H., Smethurst, P. A., Wilson, N. K., Wang, X., Ottersbach, K., Stemple, D. L., Green, A. R., Ouwehand, W. H. et Göttgens, B. (2011) Genome-wide analysis of simultaneous GATA1/2, RUNX1, FLI1, and SCL binding in

megakaryocytes identifies hematopoietic regulators. *Developmental Cell*, vol. 20, n°5, p. 597-609.

Tijssen, M. R. et Ghevaert, C. (2013) Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, vol. 11, n°4, p. 593-604.

Tolmachova, T., Abrink, M., Futter, C. E., Authi, K. S. et Seabra, M. C. (2007) Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, n°14, p. 5872-5877.

Tong, W. et Lodish, H. F. (2004) Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, n°5, p. 569-580.

Topka, S., Vijai, J., Walsh, M. F., Jacobs, L., Maria, A., Villano, D., Gaddam, P., Wu, G., McGee, R. B., Quinn, E., Inaba, H., Hartford, C., Pui, C.-H., Pappo, A., Edmonson, M., Zhang, M. Y., Stepensky, P., Steinherz, P., Schrader, K., Lincoln, A., Bussel, J., Lipkin, S. M., Goldgur, Y., Harit, M., Stadler, Z. K., Mullighan, C., Weintraub, M., Shimamura, A., Zhang, J., Downing, J. R., Nichols, K. E. et Offit, K. (2015) Germline ETV6 Mutations Confer Susceptibility to Acute Lymphoblastic Leukemia and Thrombocytopenia. *PLoS genetics*, vol. 11, n°6, p. e1005262.

Trainor, C. D., Omichinski, J. G., Vandergon, T. L., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. et Felsenfeld, G. (1996) A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 16, n°5, p. 2238-2247.

Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M. et Orkin, S. H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, vol. 90, n°1, p. 109-119.

Tubman, V. N., Levine, J. E., Campagna, D. R., Monahan-Earley, R., Dvorak, A. M., Neufeld, E. J. et Fleming, M. D. (2007) X-linked gray platelet syndrome due to a GATA1 Arg216Gln mutation. *Blood*, vol. 109, n°8, p. 3297-3299.

van der Meer, L. T., Jansen, J. H. et van der Reijden, B. A. (2010) Gfi1 and Gfi1b:

key regulators of hematopoiesis. *Leukemia*, vol. 24, n°11, p. 1834-1843.

Vo, K. K., Jarocha, D. J., Lyde, R. B., Hayes, V., Thom, C. S., Sullivan, S. K., French, D. L. et Poncz, M. (2017) FLI1 level during megakaryopoiesis affects thrombopoiesis and platelet biology. *Blood*, vol. 129, n°26, p. 3486-3494.

Vyas, P., Ault, K., Jackson, C. W., Orkin, S. H. et Shivdasani, R. A. (1999) Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*, vol. 93, n°9, p. 2867-2875.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. et Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, vol. 153, n°4, p. 910-918.

Wang, L. C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D. G., Golub, T. R. et Orkin, S. H. (1997) Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *The EMBO journal*, vol. 16, n°14, p. 4374-4383.

Wang, L. C., Swat, W., Fujiwara, Y., Davidson, L., Visvader, J., Kuo, F., Alt, F. W., Gilliland, D. G., Golub, T. R. et Orkin, S. H. (1998) The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes & Development*, vol. 12, n°15, p. 2392-2402.

Wang, L. et Hiebert, S. W. (2001) TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene*, vol. 20, n°28, p. 3716-3725.

Wang, Q., Dong, S., Yao, H., Wen, L., Qiu, H., Qin, L., Ma, L. et Chen, S. (2014) ETV6 mutation in a cohort of 970 patients with hematologic malignancies. *Haematologica*, vol. 99, n°10, p. e176-178.

Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H. et Speck, N. A. (1996) Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, n°8, p. 3444-3449.

Wang, X., Crispino, J. D., Letting, D. L., Nakazawa, M., Poncz, M. et Blobel, G. A. (2002) Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *The EMBO journal*, vol. 21, n°19, p. 5225-5234.

- Watson, D. K., Smyth, F. E., Thompson, D. M., Cheng, J. Q., Testa, J. R., Papas, T. S. et Seth, A. (1992) The ERGB/Fli-1 gene: isolation and characterization of a new member of the family of human ETS transcription factors. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 3, n°10, p. 705-713.
- Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M. A., Anastasi, J., Karp, J. E., Le Beau, M. M. et Crispino, J. D. (2002) Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nature Genetics*, vol. 32, n°1, p. 148-152.
- White, J. G. (2008) Electron opaque structures in human platelets: which are or are not dense bodies? *Platelets*, vol. 19, n°6, p. 455-466.
- White, J. G., Nichols, W. L. et Steensma, D. P. (2007) Platelet pathology in sex-linked GATA-1 dyserythropoietic macrothrombocytopenia II. *Cytochemistry. Platelets*, vol. 18, n°6, p. 436-450.
- Wijgaerts, A., Wittevrongel, C., Thys, C., Devos, T., Peerlinck, K., Tijssen, M. R., Van Geet, C. et Freson, K. (2017) The transcription factor GATA1 regulates NBEAL2 expression through a long-distance enhancer. *Haematologica*, vol. 102, n°4, p. 695-706.
- Woolthuis, C. M. et Park, C. Y. (2016) Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood*, vol. 127, n°10, p. 1242-1248.
- Yu, C., Niakan, K. K., Matsushita, M., Stamatoyannopoulos, G., Orkin, S. H. et Raskind, W. H. (2002) X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*, vol. 100, n°6, p. 2040-2045.
- Zang, C., Luyten, A., Chen, J., Liu, X. S. et Shivdasani, R. A. (2016) NF-E2, FLI1 and RUNX1 collaborate at areas of dynamic chromatin to activate transcription in mature mouse megakaryocytes. *Scientific Reports*, vol. 6, p. 30255.
- Zhang, L., Lemarchandel, V., Romeo, P. H., Ben-David, Y., Greer, P. et Bernstein, A. (1993) The Fli-1 proto-oncogene, involved in erythroleukemia and Ewing's sarcoma, encodes a transcriptional activator with DNA-binding specificities distinct from other Ets family members. *Oncogene*, vol. 8, n°6, p. 1621-1630.
- Zhang, M. Y., Churpek, J. E., Keel, S. B., Walsh, T., Lee, M. K., Loeb, K. R.,

Gulsuner, S., Pritchard, C. C., Sanchez-Bonilla, M., Delrow, J. J., Basom, R. S., Forouhar, M., Gyurkocza, B., Schwartz, B. S., Neistadt, B., Marquez, R., Mariani, C. J., Coats, S. A., Hofmann, I., Lindsley, R. C., Williams, D. A., Abkowitz, J. L., Horwitz, M. S., King, M.-C., Godley, L. A. et Shimamura, A. (2015) Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nature Genetics*, vol. 47, n°2, p. 180-185.

Zhao, Y. et Adjei, A. A. (2014) The clinical development of MEK inhibitors. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, vol. 11, n°7, p. 385-400.

Zimmet, J. et Ravid, K. (2000) Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Experimental Hematology*, vol. 28, n°1, p. 3-16.

Zucker, J., Temm, C., Czader, M. et Nalepa, G. (2016) A Child With Dyserythropoietic Anemia and Megakaryocyte Dysplasia Due to a Novel 5'UTR GATA1s Splice Mutation. *Pediatric Blood & Cancer*, vol. 63, n°5, p. 917-921.

Zweidler-Mckay, P. A., Grimes, H. L., Flubacher, M. M. et Tschlis, P. N. (1996) Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 16, n°8, p. 4024-4034.

ANNEXE

ANNEXE 1

Long-term management of leukocyte adhesion deficiency type III without hematopoietic stem cell transplantation

Long-term management of leukocyte adhesion deficiency type III without hematopoietic stem cell transplantation

Leukocyte adhesion deficiency type III (LAD-III) is a recessive autosomal condition characterized by bleeding events and life-threatening infections. This condition is due to variations in the *FERMT3* gene (encoding the kindlin-3 protein) that impair integrin function. Less than 40 LAD-III cases have been reported.¹ The primary treatment for this condition is early hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), which is, however, associated with severe complications and high rates of treatment-related mortality.

In 2011, our team described a patient of gypsy ethnicity carrying a novel biallelic *FERMT3* variant.² Herein, we discuss the long-term data regarding innovative therapeutic management of the disorder, which involves

hemostatic and antimicrobial treatment, without HSCT. We performed a systematic literature review, which provides exhaustive data concerning complications, therapeutic strategies and prognosis of LAD-III. Furthermore, we investigated *in vitro* the effect of recombinant factor VIIa (rFVIIa) on kindlin-3-deficient platelet aggregation.

The patient was included in the study after written informed consent was obtained from his parents, in accordance with the Declaration of Helsinki. The systematic review was included in the PROSPERO international prospective register (registration number CRD42017064092). The electronic databases MEDLINE, Cochrane Library and Web of Science were included in the literature search according to the strategy described on the PROSPERO website. The flow diagram of the systematic review is presented in Figure 1A. Thirty-four LAD-III patients were included in the review. Data from the systematic review are compiled in Figure 1B-E and Online Supplementary Table S1.

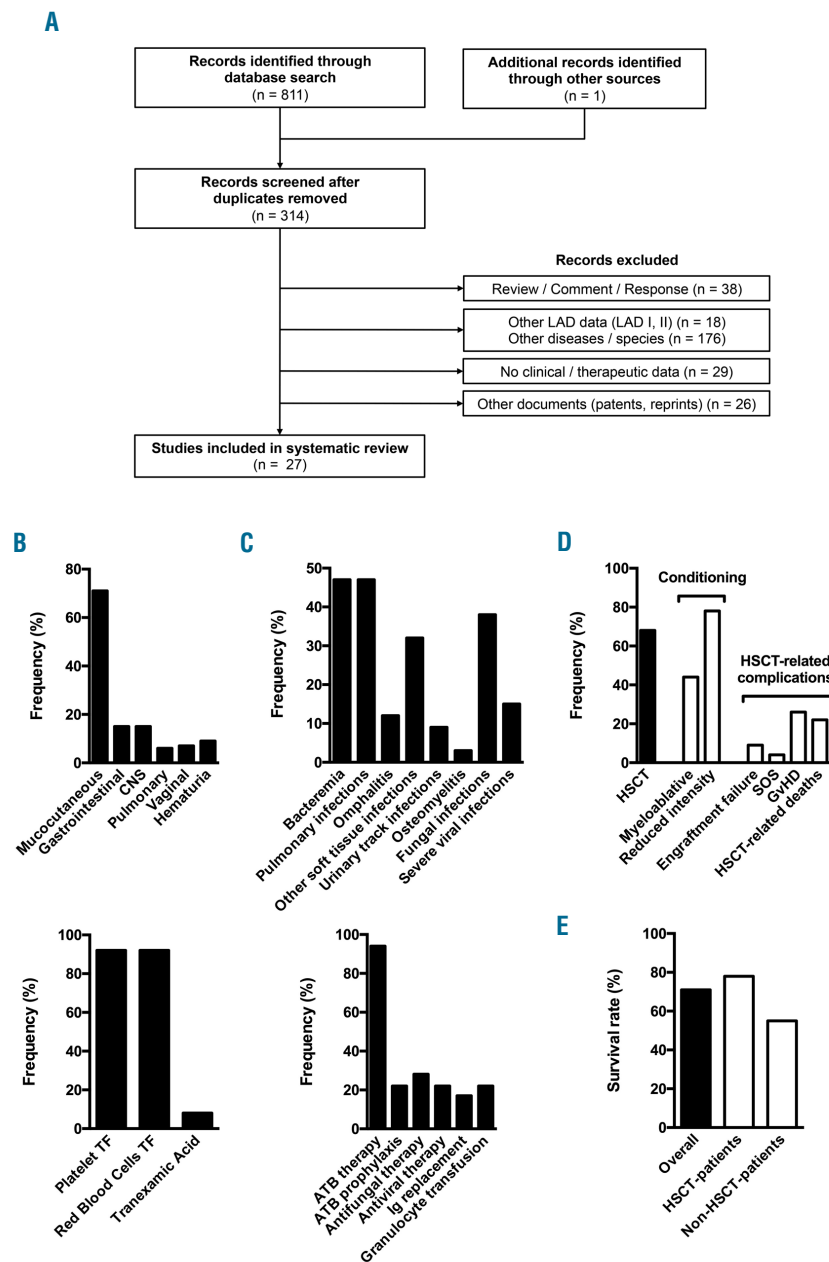


Figure 1. Systematic review of leukocyte adhesion deficiency type III complications, treatments and outcome. (A) Flow diagram of the systematic review. The number of records included or excluded is indicated at each step. Twenty-seven records reporting data from 34 patients were ultimately included in the analysis. The previous report from our group² was excluded. (B) Prevalence of bleeding events with regards to topography (top; n=27) and associated treatments (bottom; n=24) among LAD-III patients reported in the literature. Frequency of vaginal bleeding was calculated for female patients. (C) Prevalence of infections with regards to topography/type (top; n=27) and associated treatments (bottom; n=18) among LAD-III patients reported in the literature. (D) Description of LAD-III patients treated with hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The percentage of patients treated with HSCT was calculated for all reported LAD-III patients (n=34). The frequency of conditioning regimens and HSCT-related complications was calculated for transplanted patients (n=23). Some patients underwent two HSCTs with different types of conditioning regimen, thus the sum of the conditioning regimen frequencies exceeds 100%. Conditioning regimen intensity was defined as previously reported.¹³ (E) Survival rate of reported LAD-III patients. LAD: leukocyte adhesion deficiency; CNS: central nervous system; TF: transfusion; ATB: antibiotics; Ig: immunoglobulin; GVHD: graft-versus-host disease; SOS: sinusoidal obstruction syndrome.

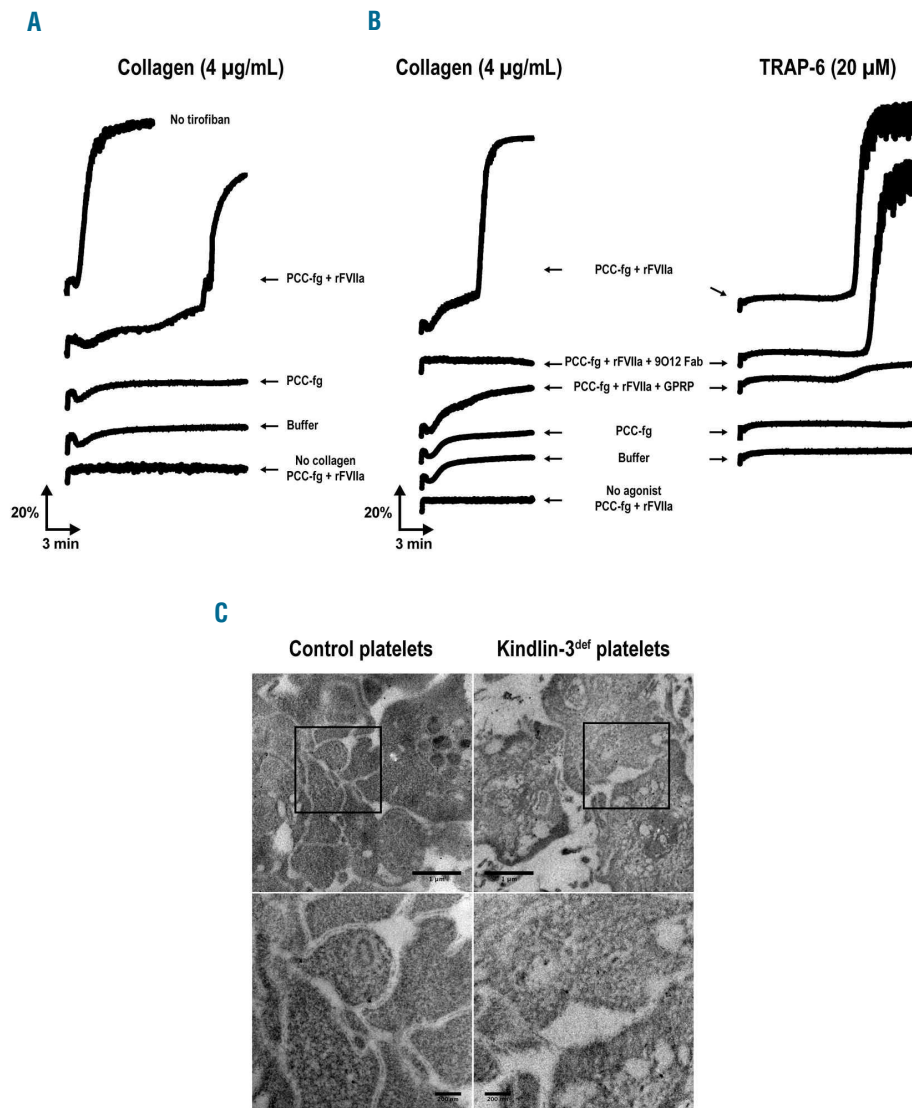


Figure 2. rFVIIa-mediated aggregation of α IIb β 3-inhibited and kindlin-3-deficient platelets. (A-B) Light transmission aggregometry. Washed platelets were prepared from citrated blood samples obtained by venipuncture and resuspended in Hepes-Tyrode buffer at pH 7.4 (final platelet concentration = 200×10^9 /l). The platelet suspension was recalcified with 3 mM CaCl_2 . Aggregation of (A) control platelets pretreated for 10 minutes with the α IIb β 3 inhibitor tirofiban (50 µg/ml; Sigma-Aldrich) and (B) kindlin-3-deficient platelets was monitored using a PAP-8E aggregometer (Bio/Data Corporation) at 37 °C, with a stir speed of 900 rpm. The platelets were activated with 4 µg/mL collagen (Hyphen) or 20 µM TRAP-6 (SFLLRN; PolyPeptide Group). The effect of (1) a fibrin-generating system consisting of fibrinogen (fg; 50 µg/ml), factor II (0.13 IU/ml), factor VII (0.07 IU/ml), factor IX (0.16 IU/ml), factor X (0.18 IU/ml), and recombinant factor VIIa (rFVIIa; 1.2 µg/ml; Novoseven®; NovoNordisk), (2) the fibrin polymerization inhibitor Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP; 5 mM; AnaSpec/Eurogentec), and (3) the anti-GPVI blocking Fab 9012⁸ (30 µg/ml) was evaluated. Factors II, VII, IX, and X – i.e., prothrombin complex concentrate (PCC) – were prepared using a Confidex® solution (CSL Behring GmbH). The data are representative of two independent experiments for the patient's platelets and four independent experiments for the tirofiban-treated control platelets. (C) Representative transmission electron microscopy images of platelet aggregate ultrathin sections. The aggregates of control platelets (left) and kindlin-3-deficient platelets in the presence of the fibrin-generating system described above (right) were fixed and prepared as previously described,¹⁴ after a 10 min stimulation with 4 µg/ml collagen. Images of the same field acquired at higher magnification are shown at the bottom. Scale bar, 1 µm (top) and 200 nm (bottom). TRAP-6: thrombin receptor activator for peptide 6; rFVIIa: recombinant factor VIIa; GPRP: Gly-Pro-Arg-Pro.

The patient presented with bleeding symptoms starting at birth, as is common in most LAD-III patients. He constantly suffered from mild to moderate mucocutaneous bleeding (petechiae, buccal hemorrhaging and epistaxis). A total of 71% of reported LAD-III cases presented with mucocutaneous bleeding, which constitutes a hallmark of the disease (Figure 1B, top). The patient's medical history involved severe bleeding episodes (traumatic penile hematoma, hematuria and traumatic bleeding of the tongue). The patient's International Society on

Thrombosis and Hemostasis – Bleeding Assessment Tool (ISTH-BAT) bleeding score was 13. The LAD-III bleeding phenotype may be more severe than that of Glanzmann thrombasthenia.³ Indeed, intracranial hemorrhage, gastrointestinal bleeding and pulmonary bleeding occurred in 15%, 15% and 6% of reported patients, respectively (Figure 1B, top). The management of these complications remains very challenging, as illustrated by the reports of three deaths due to bleeding complications.

Erythrocyte and platelet transfusions were performed

in >90% of LAD-III cases, constituting a pivotal treatment for bleeding events (Figure 1B, bottom). Some patients received >20 erythrocyte transfusions and >50 platelet transfusions per year.⁴ Our patient received only one platelet transfusion, which may be due to the use of rFVIIa as a first-line treatment for severe bleeding as well as a preventive treatment in high-risk situations (off-label use). Ten doses of 90–120 μ g/kg rFVIIa were successfully administered to treat penile hematoma (one dose), tongue bleeding (five doses) and three preventive circumstances (one to two doses; dental surgeries). The first dose of rFVIIa was administered at 17 months of age. This treatment has not been previously reported in LAD-III cases. Tranexamic acid was used in 8% of reported cases. Our patient received this antifibrinolytic drug as a long-term prophylaxis, which has never been reported in LAD-III cases. This treatment has been used from the age of three at a dose of 25 mg/kg/day divided into three oral doses.

The clinical efficacy of rFVIIa to control bleeding in Glanzmann thrombasthenia patients has been clearly demonstrated,³ although the mechanism of action of rFVIIa in this disease is not fully understood. Direct activation of Factor X on the platelet surface by rFVIIa may improve local thrombin generation.⁵ Furthermore, rFVIIa treatment restores aggregation of Glanzmann thrombasthenia platelets *in vitro*.⁶ We observed rFVIIa-mediated platelet aggregation for α IIb β 3-inhibited platelets and kindlin-3-deficient platelets (Figures 2A,B), thereby possibly explaining the clinical efficacy of rFVIIa in LAD-III patients. Platelet aggregates were analyzed using transmission electron microscopy (Figure 2C). The interplatelet distance within rFVIIa-mediated aggregates of kindlin-3-deficient platelets was increased and less regular compared with that of control platelet aggregates (mean $\pm$ standard deviation 359 $\pm$ 373 nm, n=31 versus 59 $\pm$ 18 nm, n=59, respectively; n referring to the number of interplatelet distances measured). However, interplatelet close interactions (<100 nm) were also observed.

Platelet glycoprotein VI (GPVI) has recently been shown to bind to immobilized fibrin.⁷ We hypothesized that GPVI-fibrin interactions may mediate the aggregation of kindlin-3-deficient platelets in our model. In the presence of a fibrin generating system (prothrombin complex concentrate, fibrinogen, rFVIIa), washed kindlin-3-deficient platelets fully aggregated in response to collagen or thrombin receptor activator for peptide 6 (TRAP-6) (Figure 2B). This aggregation was impeded if fibrin polymerization was inhibited by the Gly-Pro-Arg-Pro (GPAP) peptide (Figure 2B). Blocking GPVI using the anti-GPVI Fab fragment 9O12⁸ inhibited collagen-induced aggregation of the kindlin-3-deficient platelets, which correlates with the fact that GPVI represents the receptor for platelet activation by collagen. However, the anti-GPVI Fab fragment 9O12, which was shown to inhibit GPVI-fibrin interactions,⁷ did not prevent rFVIIa-mediated aggregation upon TRAP-6 stimulation. This suggests that GPVI-fibrin interactions were not involved in this response (Figure 2B). Dependence on rFVIIa-mediated fibrin generation may explain the increased aggregation lag-time compared with that observed upon activation of normal platelets (Figure 2A,B). The use of collagen in this model probably results in collagen/thrombin double stimulation, which is known to strongly promote the formation of procoagulant platelets.⁹ This may explain the difference in aggregation lag-time following collagen or TRAP-6 stimulation (Figure 2B).

Regarding infections, the patient was treated with trimethoprim/sulfamethoxazole at five months of age for probable *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, as reported for other LAD-III patients. Thereafter, preventive antibiotics (trimethoprim/sulfamethoxazole and itraconazole) were initiated. The patient did not suffer from additional severe infections, even after itraconazole was discontinued at 3.5 years of age. Severe bacterial infections have been reported in LAD-III patients, including bacteremias (47%), pulmonary infections (47%), omphalitis (12%) and other soft tissue infections (32%) (Figure 1C, top). Furthermore, fungal infections, such as *Aspergillus* pneumonia and *Fusarium* sepsis have been reported. Few authors have reported the use of bacterial or fungal prophylaxis in LAD-III patients (22%) (Figure 1C, bottom). Although these data emphasize individual variability, systematic antifungal and antibacterial prophylaxis should be considered for LAD-III patients.

With sustained hypogammaglobulinemia, our patient required long-term γ -globulin replacement at 10 months of age. This treatment has rarely been reported in the literature (17%; Figure 1C, bottom). γ -globulin levels were only evaluated in six cases. Two of these patients suffered from hypogammaglobulinemia.^{10,11} These patients presented no severe infection while undergoing γ -globulin replacement, and one patient developed severe sepsis a few weeks after discontinuing replacement therapy.¹¹ In some patients, a defect in the adaptive immune response is thus an aspect of LAD-III, which suggests that kindlin-3 plays a role in B-cell biology.¹¹ γ -globulin levels must be systematically evaluated, as long-term γ -globulin replacement may effectively prevent severe infections in LAD-III patients with hypogammaglobulinemia.

HSCT has been reported as the only curative therapy for LAD-III.¹ Indeed, several groups have reported long-term, disease-free LAD-III survivors after HSCT. This therapy option has been applied in 68% of cases (Figure 1D). Furthermore, the reported survival of non-transplanted patients is relatively low (55%) (Figure 1E). Lethality is probably underestimated due to cases who died prior to diagnosis. Indeed, several siblings of LAD-III patients have died during the first months of life due to bleeding or infection. However, the mortality rate was 22% among transplanted patients (Figures 1D,E), and all deaths were directly due to HSCT complications. Severe complications were reported in 48% of cases, e.g., graft failure, sinusoidal obstruction syndrome or graft-versus-host disease (Figure 1D). Notably, 32% of patients had osteopetrosis, which likely compromises engraftment. Therefore, the balancing of the risk of rejection and toxicity is challenging in this disease. This may explain that the appropriate type of conditioning regimen remains controversial (Figure 1D). Furthermore, LAD-III survivors treated without HSCT have been reported.¹² Regarding our patient, optimized treatment to manage bleeding and infection without HSCT appears to be an efficient therapeutic approach, with no significant adverse events. Indeed, this strategy led to a favorable outcome after a 10-year follow-up. Our patient exhibits normal growth and development and has been integrated into a standard school system. This approach may also apply to other LAD-III patients.

The study herein provides new insights regarding the complications, management and prognosis of LAD-III. Notably, we report the first effective use of rFVIIa to treat and prevent bleeding in a LAD-III patient, which was supported by *in vitro* platelet ultrastructural and aggrega-

tion data. Our results suggest that rFVIIa activity is platelet activation-dependent, fibrin-dependent and independent of GPVI-fibrin interaction. International registry and cohort studies should be implemented to identify prognostic factors that could guide therapeutic strategies for LAD-III.

Paul Saultier,^{4,2} Sarah Szepletowski,⁴ Matthias Canault,² Céline Falaise,^{1,3,4} Marjorie Poggi,² Pierre Suchon,^{2,3} Vincent Barlogis,^{4,5} Gérard Michel,^{4,5} Stéphane Loyau,⁶ Martine Jandrot-Perrus,⁶ Jean-Claude Bordet,^{7,8} Marie-Christine Alessi,^{2,3,4} and Hervé Chambost^{4,2}

¹APHM, La Timone Children's Hospital, Department of pediatric hematology and oncology, Marseille; ²Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille; ³APHM, CHU Timone, Laboratory of Hematology, Marseille; ⁴APHM, CHU Timone, French national reference center for inherited platelet disorders (CRPP), Marseille; ⁵APHM, La Timone Children's Hospital, French national reference center for primary immune deficiencies (CEREDIH), Marseille; ⁶Laboratory of Vascular Translational Science, U1148 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité; ⁷HCL, Hôpital Cardiologique Louis Pradel, Unité d'Hémostase Biologique, Bron, and ⁸EAM 4609 Hémostase et cancer, Université Claude Bernard Lyon 1, France

Funding: the study was funded by the "Fondation pour la Recherche Médicale" (grant to PSA: FDM20150633607).

Acknowledgments: the authors thank Laurence Panicot-Dubois and Christophe Dubois (Aix-Marseille Univ, INSERM, C2VN, Marseille, France) for the kind gift of Gly-Pro-Arg-Pro, David Gabriele for technical assistance, Sandra Moore for the revision of the paper, and the patient and his family for their participation in this study.

Correspondence: paul.saultier@gmail.com
doi:10.3324/haematol.2017.186304

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

1. Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiency III - when integrins activation fails. *J Clin Immunol*. 2014;34(8):900-903.
2. Robert P, Canault M, Farnier C, et al. A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. *J Immunol*. 2011;186(9):5273-5283.
3. Poon M-C, Di Minno G, d'Oiron R, Zotz R. New insights into the treatment of Glanzmann Thrombasthenia. *Transfus Med Rev*. 2016;30(2):92-99.
4. Kuijpers TW, van Bruggen R, Kamerbeek N, et al. Natural history and early diagnosis of LAD-1/variant syndrome. *Blood*. 2007;109(8):3529-3537.
5. Di Minno G. Eptacog alfa activated: a recombinant product to treat rare congenital bleeding disorders. *Blood Rev*. 2015;29 Suppl 1:S26-33.
6. Lisman T, Adelmeijer J, Heijnen HFG, de Groot PG. Recombinant factor VIIa restores aggregation of alphaIIb beta3-deficient platelets via tissue factor-independent fibrin generation. *Blood*. 2004;103(5):1720-1727.
7. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*. 2015;126(5):683-691.
8. Lecut C, Feeney LA, Kingsbury G, et al. Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments. *J Thromb Haemost*. 2003;1(12):2653-2662.
9. Agbani EO, Poole AW. Procoagulant platelets: generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood*. 2017;130(20):2171-2179.
10. Kuijpers TW, Van Lier RA, Hamann D, et al. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1725-1733.
11. Surattannon N, Yeetong P, Srichomthong C, et al. Adaptive immune defects in a patient with leukocyte adhesion deficiency type III with a novel mutation in FERMT3. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(2):214-217.
12. Kuijpers TW, van de Vijver E, Weterman MAJ, et al. LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Blood*. 2009;113(19):4740-4746.
13. Chiesa R, Veys P. Reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplant in primary immune deficiencies. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(3):255-266; quiz 267.
14. Saultier P, Vidal L, Canault M, et al. Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: ultrastructural and pathogenic features. *Haematologica*. 2017;102(6):1006-1016.

Supplemental Table: Complications, therapeutic management and outcome of previously reported LAD-III patients

FERMT3 alteration	Gender (M / F)	HSCt Age at conditioning, donor, conditioning regimen, complications, outcome	Bleeding complications		Infections		Survival (Y / N)	Supplemental references
			Description	Management	Description	Management		
c.48G>A p.W16X	M	Yes	Mucosal bleedings, CNS bleeding	RBC TF	Lymphadenitis, Recurrent infections	NA	Y	1
	F	Yes	Mucocutaneous bleedings, CNS bleeding	Platelet TF	Recurrent infections	NA	Y	1
c.687G>A p.W229X	NA	Yes, †	Moderate bleeding tendency	NA	NA	NA	N	2,3
c.687G>A p.W229X	M	6 years, MMRD, RIC (alemtuzumab/Bu/Flu/Mel), †	Mucocutaneous bleedings Life-threatening bleedings	Platelet and RBC TF, Tranexamic acid	Omphalitis, Recurrent soft tissue infections, Bacteremia (Staphylococcus), Osteomyelitis, CMV viremia, Disseminated fungal infection (†)	ATB therapy, granulocyte TF, surgical debridement, ATB prophylaxis, ganciclovir, antifungal treatment	N	4,5
c.687G>A p.W229X	F	21 and 51 months, MMUUCBD 5/6 and MMUD 8/10, MAC (Bu/Cy/ATG) and RIC (Flu/Treo/TT/ATG), GvHD (Grade IV), good outcome	Mucocutaneous bleedings, Gastrointestinal bleedings	Platelet and RBC TF	Pneumocystis pulmonary infection, Recurrent CMV viremia	ATB therapy, ganciclovir	Y	5
c.687G>A p.W229X	M	12 months, MRD, RIC (Flu/Bu/Cy/rabbit ATG), no GvHD, good outcome	Cutaneous bleeding	Platelet and RBC TF	Recurrent pulmonary infections, Cellulitis, Gangrene, Deep-seated abscesses, Intestinal infection, Bacteremia (Pseudomonas, Klebsiella)	ATB therapy, amputation	Y	5
c.[922G>A;1287delT] p.[G308R;E430Rfs*3]	F	8 months, MMUUCBD 5/6, RIC (Flu/Bu/Cy/rabbit ATG), skin and gut GvHD (Grade III), good outcome	Gastrointestinal bleedings, Traumatic hematomas	Platelet and RBC TF	Necrotizing enterocolitis, RSV pulmonary infection, Urinary tract infection (E. coli, P. aeruginosa), Bacteremia (S. aureus)	ATB therapy, Partial bowel resection	Y	6,7

c.1324-1G>A splice variant	F	No HSCT	Joint bleedings (knee, elbow), Mucocutaneous bleedings	NA	Pulmonary infection, Otitis media, Arthritis, Recurrent CMV viremia	ATB therapy, ganciclovir	Y	8
	M	8 months, MRD, Good outcome	Mucosal bleedings	NA	Omphalitis, Urachal duct cyst infection, Soft tissue infection, Bacteremia (Staphylococcus), Pneumocystis pulmonary infection, Oral candidiasis; Urinary tract infection	ATB therapy	Y	9-11
	M	15 weeks, Good outcome	Cutaneous bleedings	NA	Oral candidiasis, Omphalitis, Bacteremia (Staphylococcus)	ATB therapy	Y	9
c.1537C>T p.R513X	F	MUD, GvHD (†)	Gastrointestinal bleedings, Hematuria, Mucosal bleedings	Platelet and RBC TF	Recurrent pulmonary infections, Bacteremia (†)	NA	N	12
	M	Good outcome	Gastrointestinal bleedings, Hematuria, Mucosal bleedings	Platelet and RBC TF	Recurrent pulmonary infections	NA	Y	12
c.1537C>T p.R513X	M	No HSCT	Severe mucocutaneous bleedings	Platelet and RBC TF	Bacteremia and fungemia	NA	N	13
	M	No HSCT	Cutaneous bleedings, Pulmonary hemorrhage (†)	NA	Recurrent pulmonary infections, Intestinal infection, Bacteremia (P. aeruginosa), Oral candidiasis	NA	N	13,14
c.1537C>T p.R513X	F	3.5 years, MMRD x 2, RIC (Flu/Mel/TT/rabbit ATG) and MAC (Bu/Cy/TLNI), no engraftment	Severe bleeding tendency	Platelet and RBC TF	Recurrent pulmonary infections, buccal infection (P. aeruginosa)	ATB therapy	Y	13-15
	F	No HSCT	Mucocutaneous bleedings, Pulmonary hemorrhage (†)	Platelet and RBC TF	Pulmonary infections, Otitis media, Bacteremia (†)	ATB therapy	N	13,14
c.1537C>T p.R513X	M	13 years, MUD, †	Mucosal bleedings, Postoperative thoracic bleeding	Platelet and RBC TF	Perianal abscesses, Pulmonary infection, Bacteremia (P. aeruginosa), Mediastinal mass	ATB therapy, ATB prophylaxis, Ig replacement therapy, granulocyte TF, voriconazole	N	2,3,16,17

c.1537C>T p.R513X	M	4 years, Good outcome	Severe bleeding tendency, Cutaneous bleedings	Platelet and RBC TF	Perianal abscesses, Candidiasis	NA	Y	2,3,16
c.1537C>T p.R513X	M	1 year, Sinusoidal obstruction syndrome (†)	Severe bleeding tendency, CNS bleeding	Platelet and RBC TF	Pulmonary aspergillosis	Amphotericin B	N	2,3,16
c.1537C>T p.R513X	M	No HSCT	Severe bleeding tendency	Platelet and RBC TF	Omphalitis, Fungemia (F. oxysporum), Soft tissue infection, Bacteremia (P. aeruginosa) (†)	ATB therapy, Amphotericin B, flucytosine, granulocytes TF	N	2,3,16
c.1537C>T p.R513X	M	No HSCT	Severe traumatic epistaxis (†)	Platelet and RBC TF	Bacterial infections	NA	N	2,3,16
c.1537C>T p.R513X	M	Yes	Severe bleeding tendency, CNS bleeding	Platelet and RBC TF	Omphalitis, Perianal abscesses, CMV infections	ATB therapy	Y	2,3,16
c.1537C>T p.R513X	F	No HSCT	Moderate bleeding tendency	Platelet and RBC TF	NA	NA	Y	2,3,16
c.1537C>T p.R513X	F	No HSCT	Moderate bleeding tendency	Platelet and RBC TF	NA	NA	Y	2,3,16
c.1537C>T p.R513X	M	No HSCT	Moderate bleeding tendency Mucocutaneous bleedings	Platelet and RBC TF	Sepsis, CMV infection	NA	Y	2,3,16
c.1537C>T p.R513X	F	No HSCT	Hematuria, Gastrointestinal bleedings, Cutaneous bleedings	RBC TF	Cutaneous ulcers, Cellulitis, Bacteremia	NA	Y	18
c.1597C>T p.Q533X	F	5 months, MUD, RIC (Bu/Flu/TT), no GvHD, Good outcome	Gastrointestinal bleedings, Vaginal bleedings	Platelet and RBC TF	Presumed amnion infection	ATB therapy	Y	19

c.1683-2A>G splice variant	Antenatal CNS					ATB therapy, ATB prophylaxis	7,18,20
	F	Yes, Good outcome	Antenatal CNS bleeding, Cutaneous bleeding	Platelet TF, Tranexamic acid	Recurrent infections, Cutaneous ulcers		
c.1729C>T p.R577X	M	7 years, MUD, MAC (Bu/Flu/Cy/Rabbit ATG), GvHD (grade II), Good outcome	Buccal bleedings, Epistaxis	Platelet and RBC TF	Recurrent infections, Pulmonary infections, bacteremia (S. pneumoniae)	ATB therapy	21
c.1729C>T p.R577X	M	3.5 years, MUD, MAC (Bu/Flu/Cy), Chronic lung GvHD (grade I)	Mucosal bleedings	NA	Recurrent infection, Pulmonary infections	ATB therapy	21
c.1729C>T p.R577X	NA	No HSCT	Moderate bleeding tendency	NA	NA	NA	2,3
c.1796A>C p.Q599P	F	No HSCT	Mild bleeding tendency	NA	Recurrent pulmonary infections (A. baumannii, S. mitis, E. coli), Bacteremia (P. aeruginosa), Mucocutaneous candidiasis, Intestinal infection (Salmonella), Urinary tract infection	ATB therapy, Ig replacement therapy	22-24
c.1802delA p.N601Mfs*?	F	2 months, MUUCBD, RIC (Flu/Treo/TT/rabbit ATG), Liver and skin GvHD (grade III)	Cutaneous bleedings	NA	Pulmonary candidiasis, CMV viremia	NA	25
c.1857delG p.A620Pfs*?	NA	14 months, MUUCBD, good outcome	Cutaneous bleeding, Epistaxis	NA	Pneumocystis pulmonary infection	NA	26,27

FERMT3 variants were numbered according to the reference sequence NM_178443. The conditioning regimen intensity was defined as previously described.²⁸ The affected families are separated using dotted lines. Abbreviations: †: death; ATB: antibiotic; ATG: anti-thymocyte globulin; Bu: busulfan; CMV: cytomegalovirus; CNS: central nervous system; Cy: cyclophosphamide; F: female; Flu: fludarabine; GvHD: graft versus host disease; HSCT: hematopoietic stem cell transplantation; Ig: immunoglobulin; M: male; MAC: myeloablative conditioning; Mel: melphalan; MMRD: mismatched related donor; MMUUCBD mismatched unrelated umbilical cord blood donor; MRD: matched related donor; MUD: matched unrelated donor; MUUCBD: matched unrelated umbilical cord blood donor; N: no; NA: not available; RBC: red blood cells; RIC: reduced intensity conditioning; RSV: respiratory syncytial virus; TF: infusion; TLNI: total lymph node irradiation; Treo: treosulfan; TT thiotepa; Y: yes.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Malinin NL, Zhang L, Choi J, et al. A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *Nat Med*. 2009;15(3):313–318.
2. Kuijpers TW, van de Vijver E, Weterman MAJ, et al. LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Blood*. 2009;113(19):4740–4746.
3. van de Vijver E, Weterman MA, de Boer M, et al. Leukocyte Adhesion Deficiency-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:32–32.
4. Alon R, Aker M, Feigelson S, et al. A novel genetic leukocyte adhesion deficiency in subsecond triggering of integrin avidity by endothelial chemokines results in impaired leukocyte arrest on vascular endothelium under shear flow. *Blood*. 2003;101(11):4437–4445.
5. Stepensky PY, Wolach B, Gavrieli R, et al. Leukocyte adhesion deficiency type III: clinical features and treatment with stem cell transplantation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(4):264–268.
6. Sabnis H, Kirpalani A, Horan J, et al. Leukocyte adhesion deficiency-III in an African-American patient. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(1):180–182.
7. McDowall A, Svensson L, Stanley P, et al. Two mutations in the KINDLIN3 gene of a new leukocyte adhesion deficiency III patient reveal distinct effects on leukocyte function in vitro. *Blood*. 2010;115(23):4834–4842.
8. Meller J, Malinin NL, Panigrahi S, et al. Novel aspects of Kindlin-3 function in humans based on a new case of leukocyte adhesion deficiency III. *J Thromb Haemost JTH*. 2012;10(7):1397–1408.
9. Harris ES, Smith TL, Springett GM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Leukocyte adhesion deficiency-I variant syndrome (LAD-Iv, LAD-III): molecular characterization of the defect in an index family. *Am J Hematol*. 2012;87(3):311–313.
10. Harris ES, Shigeoka AO, Li W, et al. A novel syndrome of variant leukocyte adhesion deficiency involving defects in adhesion mediated by beta1 and beta2 integrins. *Blood*. 2001;97(3):767–776.
11. Harris ES, Li W, Shigeoka AO, Zimmerman GA, Lorant DE. A new leukocyte-adhesion deficiency (LAD) variant characterized by defective signaling of beta 1 and beta 2 integrins in an Epstein-Barr (EB) virus-transformed cell line. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(3):A264–A264.

12. Aygun D, Nepesov S, Gershoni R, Camcioglu Y. Leukocyte Adhesion Deficiency III: Report of Two Siblings. *Pediatr Neonatol*. 2017;58(1):99–100.
13. Kilic SS, Etzioni A. The clinical spectrum of leukocyte adhesion deficiency (LAD) III due to defective CalDAG-GEF1. *J Clin Immunol*. 2009;29(1):117–122.
14. Pasvolsky R, Feigelson SW, Kilic SS, et al. A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEF1 in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *J Exp Med*. 2007;204(7):1571–1582.
15. Elhasid R, Kilic SS, Ben-Arush M, Etzioni A, Rowe JM. Prompt recovery of recipient hematopoiesis after two consecutive haploidentical peripheral blood SCTs in a child with leukocyte adhesion defect III syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(2):413–414.
16. Kuijpers TW, Van Lier RA, Hamann D, et al. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1725–1733.
17. Kuijpers TW, van Bruggen R, Kamerbeek N, et al. Natural history and early diagnosis of LAD-1/variant syndrome. *Blood*. 2007;109(8):3529–3537.
18. Svensson L, Howarth K, McDowall A, et al. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in *KINDLIN3* affecting integrin activation. *Nat Med*. 2009;15(3):306–312.
19. Crazzolara R, Maurer K, Schulze H, Zieger B, Zustin J, Schulz AS. A new mutation in the *KINDLIN-3* gene ablates integrin-dependent leukocyte, platelet, and osteoclast function in a patient with leukocyte adhesion deficiency-III. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(9):1677–1679.
20. McDowall A, Inwald D, Leitinger B, et al. A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins. *J Clin Invest*. 2003;111(1):51–60.
21. Jurk K, Schulz AS, Kehrel BE, et al. Novel integrin-dependent platelet malfunction in siblings with leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III) caused by a point mutation in *FERMT3*. *Thromb Haemost*. 2010;103(5):1053–1064.
22. Suratannon N, Yeetong P, Srichomthong C, et al. Adaptive immune defects in a patient with leukocyte adhesion deficiency type III with a novel mutation in *FERMT3*. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(2):214–217.
23. Suratannon N, Yeetong P, Srichomthong C, et al. Improvement of Recurrent Infections after IVIG Supplementation in a Patient with Leukocyte Adhesion Deficiency III with a Novel

Missense Mutation in FERMT3. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):AB183-AB183.

24. Suratannon N, Chatchatee P, Yeetong P, et al. Adaptive Immune defect in a rare phagocytic disorder: leukocyte adhesion deficiency III with a novel missense mutation in FERMT3. *Allergy*. 2014;69:500–500.

25. Palagano E, Slatter MA, Uva P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation corrects osteopetrosis in a child carrying a novel homozygous mutation in the FERMT3 gene. *Bone*. 2017;97:126–129.

26. Taaning E, Shah B, Schejbel L, et al. Leukocyte adhesion deficiency type III due to a novel mutation in the FERMT3 gene. *Vox Sang*. 2012;103:270–270.

27. Shah B, Taaning E, Schejbel L, et al. Leukocyte adhesion deficiency type III due to a novel mutation in the FERMT3 Gene. *J Clin Immunol*. 2012;32:215–216.

28. Chiesa R, Veys P. Reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplant in primary immune deficiencies. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(3):255–266; quiz 267.

29. Robert P, Canault M, Farnarier C, et al. A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;186(9):5273–5283.

ANNEXE 2

Peripartum bleeding management in a patient with CaIDAG-GEFI deficiency

REFERENCES

1. Poon MC, Di Minno G, d'Oiron R, et al. New insights into the treatment of glanzmann thrombasthenia. *Transfus Med Rev.* 2016;30:92-99.
2. Santoro C, Rago A, Biondo F, et al. Prevalence of allo-immunization anti-HLA and anti-integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ in Glanzmann Thrombasthenia patients. *Haemophilia.* 2010;16:805-812.
3. Martin K, Key NS. How I treat patients with inherited bleeding disorders who need anticoagulant therapy. *Blood.* 2016;128:178-184.
4. Ten Cate H, Brandjes DP, Smits PH, et al. The role of platelets in venous thrombosis: a patient with Glanzmann's thrombasthenia and a factor V Leiden mutation suffering from deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003;1:394-395.
5. Rezende SM. Secondary prophylaxis with warfarin for recurrent thrombosis in a patient with Glanzmann thrombasthenia and F5 G1691A. *Br J Haematol.* 2012;156:144.
6. Gruel Y, Pacouret G, Bellucci S, et al. Severe proximal deep vein thrombosis in a Glanzmann thrombasthenia variant successfully treated with a low molecular weight heparin. *Blood.* 1997;90:888-890.
7. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood.* 1990;75:1383-1395.
8. Ragsdell B, Thachil J. Lessons from recurrent deep vein thrombosis in Glanzmann thrombasthenia. *Haemophilia.* 2013;19:e391-e393.
9. Phillips R, Richards M. Venous thrombosis in Glanzmann's thrombasthenia. *Haemophilia.* 2007;13:758-759.
10. Nurden A, Mercie P, Zely P, Nurden P. Deep vein thrombosis, Raynaud's phenomenon, and Prinzmetal angina in a patient with glanzmann thrombasthenia. *Case Rep Hematol.* 2012;2012:156290.

Accepted: 27 August 2017

DOI: 10.1111/hae.13352

Peripartum bleeding management in a patient with CalDAG-GEFI deficiency

To the editor,

Pregnant women with inherited platelet disorders are at high risk of life-threatening haemorrhage during delivery. Foetuses and newborns can also be affected, and be at risk of bleeding complications.^{1,2} Here, we describe bleeding diathesis and its management during the course of pregnancy in a young woman with severe mucocutaneous bleeding and platelet dysfunction caused by calcium and diacylglycerol-guanine exchange factor I (CalDAG-GEFI) deficiency recently characterized by several groups.³⁻⁶ The patient was explored after informed written consent was obtained, in accordance with the Declaration of Helsinki.

The propositus was born in 1994 from asymptomatic consanguineous parents (cousins). She experienced easy bruising and recurrent epistaxis from early childhood (Figure 1A) with an International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) bleeding score⁷ of 5. She carried a homozygous frameshift mutation c.199_200delAA (p.N67Lfs*24) within the CalDAG-GEFI coding gene, *RASGRP2*.⁶ Westbury et al recently described her clinical features and platelet phenotypes, emphasizing a platelet aggregation defect after stimulation with intermediate- and low-dose agonists.

Western blot analysis revealed absence of CalDAG-GEFI in the patient's platelets (Figure 1B) and in Griptite 293 MSR cells expressing the p.L67 variant compared with the p.N67 (wild-type) and the p.G248W (previously reported³) variants (Figure 1C).

Between ages 5 and 11 years, the propositus was repeatedly hospitalized for intractable mucocutaneous bleeding, with sometimes acute anaemia requiring platelet/red blood cell (RBC) transfusions, recombinant factor VIIa (rFVIIa) injection (90 µg/kg), tranexamic acid

and iron supplementation (Figure 1A). At menarche (age 11 years), she experienced severe menorrhagia, treated with tranexamic acid. Severe autoimmune thrombocytopenia (6 G/L with strongly positive anti-GPIIb/IIIa (anti- $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ integrin) autoantibodies) was concomitantly evidenced. Evans' syndrome was characterized 1 year later (haemoglobin 63 g/L, platelet count 59 G/L) with further diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) complicated by lupus nephropathy at age 13 years. She was treated with initial γ -globulin infusion, corticosteroids, hydroxychloroquine and enalapril.

At age 15 years she was hospitalized for acute anaemia (46 g/L haemoglobin) due to severe menorrhagia. Her platelet count was 500 G/L, and bleeding was treated with platelet/RBC transfusions and norgestrel. Treatment on exit was iron supplementation, prednisone, enalapril and hydroxychloroquine.

At age 19 years she received progestin oral contraception to treat hypermenorrhea. Her chronic treatment was maintained.

A first pregnancy was diagnosed a few months later. She displayed normal blood pressure values and no sign of oedema. Platelet count was 252 G/L, and she tested positively for antinuclear antibodies 1/320, and negative for anti-DNA and antiphospholipid antibodies. Creatinine level was 52 µmol/L (normal range 45-90 µmol/L) with no proteinuria. The patient had a monthly follow-up, without emergence of any abnormal symptom (bleeding, SLE flare, cytopenia or manifestation of renal disease).

She was hospitalized for spontaneous onset of labour at 38 weeks plus 6 days (platelet count 277 G/L, haemoglobin 145 g/L). Spinal or epidural anaesthesia was contraindicated, and patient-controlled analgesia with remifentanyl was initiated. As labour progressed, prophylactic transfusion of 6 platelet concentrates and continuous intravenous tranexamic acid infusion (10 mg/kg bolus, then 1 mg/kg/h) were

prescribed. She gave birth after 8 hour of labour by vaginal delivery, to a healthy male newborn with normal neonatal blood cell counts. Artificial placental delivery had to be performed under general anaesthesia. Sulprostone was used to reverse uterus atony and prevent postpartum haemorrhage. No maternal or neonate bleeding was evidenced. One prophylactic transfusion of 6 platelet concentrates was performed early postdelivery. The patient was monitored for 5 days, and was released from hospital without any haemostatic maintenance treatment.

Severe metrorrhagia occurred on day 11 postpartum. A single emergency transfusion of 6 platelet concentrates was administered together with a continuous tranexamic acid infusion (Figure 1A), resulting in prompt positive clinical effects. The patient left the hospital

Essentials

- Some platelet disorders increase risk of haemorrhage during pregnancy and delivery.
- Management of bleeding diathesis during the course of pregnancy in CalDAG-GEFI deficiency.
- Severe bleeding occurred in the postpartum period similar to that in women with Glanzmann's thrombasthenia.
- A planned bleeding prevention strategy is required for pregnant women with CalDAG-GEFI deficiency.

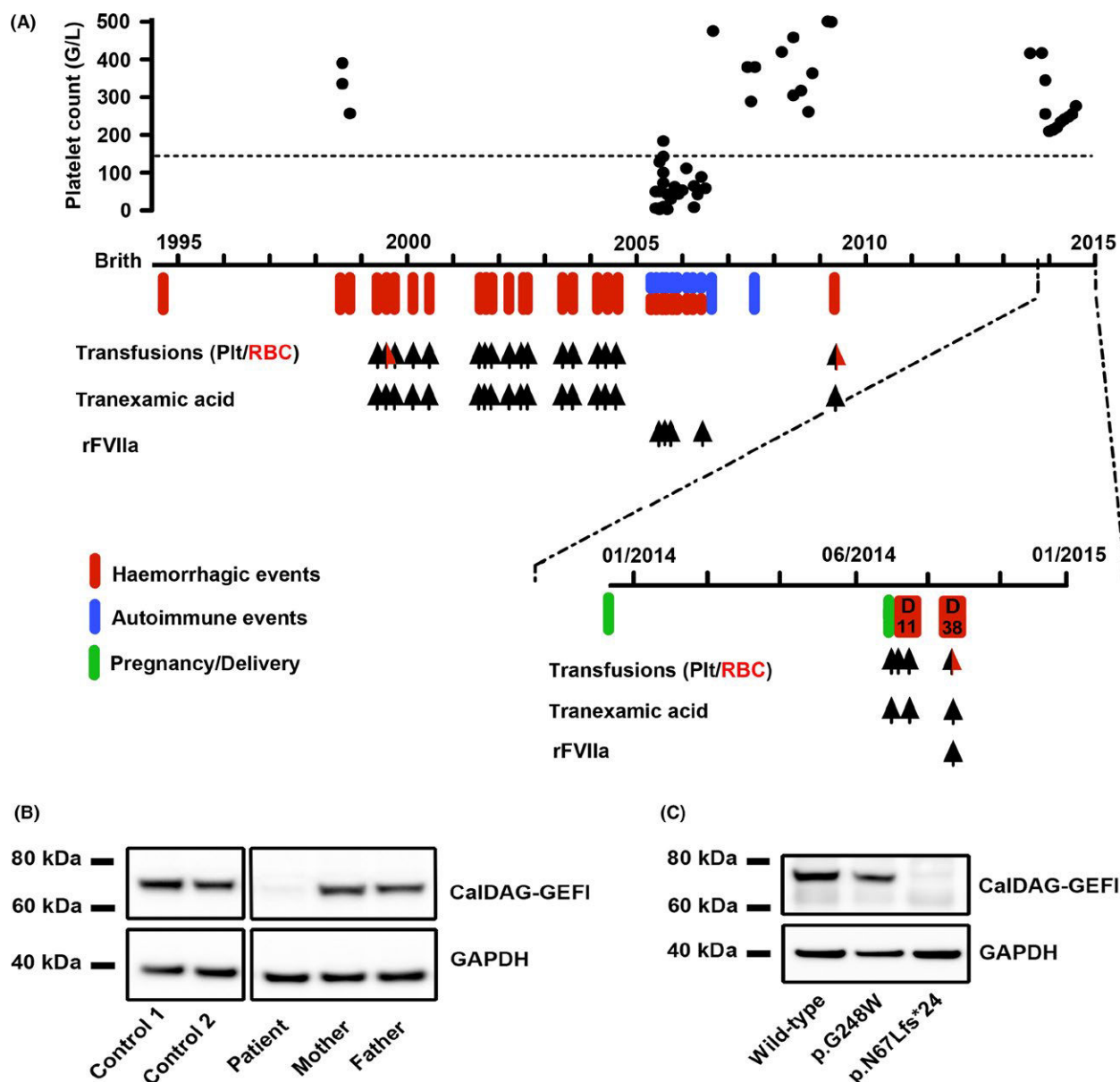


FIGURE 1 (A), Evolution of platelet count, haemorrhagic and autoimmune manifestations and haemostatic treatments prior to and during pregnancy/delivery. (B), Representative western blot for CalDAG-GEFI in platelet lysates from two healthy subjects (Controls), the patient, her mother and her father. GAPDH expression was used as equal loading and electrophoretic transfer control. (C), Representative western blot for CalDAG-GEFI in GripTite™ 293 MSR cells transfected with vectors coding for the wild-type p.G248W and p.N67Lfs*24 variants of CalDAG-GEFI. GAPDH expression was used as equal loading and electrophoretic transfer control

on day 13 postpartum; her treatment was prednisone (10 mg/d), hydroxychloroquine (400 mg/d), oral tranexamic acid (1 g each 8 hours for 3 days).

She underwent an emergency hospitalization 38 days postpartum for a severe haemorrhagic first postpregnancy menstrual period with expulsion of clots by the vaginal route. Platelet count was within normal ranges. Platelets and RBC transfusions, intravenous tranexamic acid and fluid infusions allowed haemodynamic stabilization, but showed moderate haemostatic efficacy. A single rFVIIa injection (90 µg/kg) stopped abnormal bleeding. The patient left the hospital 4 days later.

This report is the first to describe the management of pregnancy and parturition in a patient with homozygous CalDAG-GEFI deficiency. A deficit in CalDAG-GEFI leads to integrin activation defects.³⁻⁵ However, unlike in Glanzmann's thrombasthenia (GT), CalDAG-GEFI-deficient platelets achieve full aggregation when stimulated with high doses of strong agonists (TRAP-6 and collagen). This suggests that the risk of bleeding complications in these patients might be lower than in women with GT.

As in other inherited platelet disorders,¹ the course of pregnancy in this context was not altered despite the added diagnosis of SLE. Repeated platelet transfusions in the delivery period prevented haemorrhage. Close follow-up and a preventive haemostatic strategy in women with CalDAG-GEFI deficiency are required not only during the primary postpartum period (within 48 hours of birth), but also from 48 hours to several weeks postbirth until menses resume. Maintaining tranexamic acid treatment might be of benefit throughout this period.

The severe bleeding episode experienced at resumption of menses was only partially controlled by platelet and RBC transfusions. Injection of single-dose rFVIIa demonstrated a significant effect in stopping haemorrhage. Thus, rFVIIa may be considered as a strategy to manage the haemorrhagic risk in women with CalDAG-GEFI deficiency at delivery and during the following days.

In conclusion, this case illustrates for the first time that CalDAG-GEFI deficiency carries an increased risk of severe bleeding during the peripartum period. Prolonged monitoring and a planned preventive haemostatic strategy are accordingly required to minimize bleeding in these high-risk pregnant women.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the "Fondation pour la recherche médicale FRM" (grant to PS FDM20150633607). We thank J.P. Balducchi, S. Baron-Joly, N. Catteau, R. Salet, A.L. Ladra-Delenne, R. de Tayrac, S. Ripart, J.M. Ferrer, and L. Mattatia for their expert medical help in the acute and chronic management of the patient. We also thank N. Saut of the Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de la Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille for gene sequencing.

M. Canault and J-C. Gris performed the research, designed the research study, took part in the clinical characterization of patients, analysed the data and wrote the paper. P. Saultier, S. Faure and M. Poggi performed the research, analysed the data and wrote the paper. A.T. Nurden, P. Nurden, P.E. Morange and M-C. Alessi designed the research study, analysed the data and wrote the paper.

DISCLOSURES

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

ORCID

M. Canault  <http://orcid.org/0000-0002-7880-5250>

M. Canault¹ 

P. Saultier¹

S. Fauré¹

M. Poggi¹

A. T Nurden²

P. Nurden²

P. E. Morange^{1,3}

M-C. Alessi^{1,3}

J-C. Gris⁴

¹Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille, France

²Institut-Hospitalo-Universitaire LIRYC, Plateforme Technologique et d'Innovation Biomédicale, Pessac, France

³APHM, CHU Timone, French Reference Centre for Rare Platelet Disorders, Marseille, France

⁴Laboratoire d'hématologie, Groupe Hospitalo-Universitaire Caremeau, Nîmes, France

Correspondence

Matthias Canault, UMR Inserm 1062, INRA 1260, Aix-Marseille Univ Nutrition, Obesity and Risk of Thrombosis (NORT) laboratory, Faculté de Médecine Timone, Marseille, France.
Email: matthias.canault@univ-amu.fr

REFERENCES

- Civaschi E, Klersy C, Melazzini F, et al. Analysis of 65 pregnancies in 34 women with five different forms of inherited platelet function disorders. *Br J Haematol*. 2015;170:559-563. PubMed PMID: 25899604.
- Noris P, Schlegel N, Klersy C, et al. Analysis of 339 pregnancies in 181 women with 13 different forms of inherited thrombocytopenia. *Haematologica*. 2014;99:1387-1394. PubMed PMID: 24763399. PMID: 4116839.
- Canault M, Ghalloussi D, Grosdidier C, et al. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. *J Exp Med*. 2014;211:1349-1362. PubMed PMID: 24958846. PMID: 4076591.
- Kato H, Nakazawa Y, Kurokawa Y, et al. Human CalDAG-GEFI deficiency confers severe bleeding tendency and delayed alphaIIb beta3 activation velocity. *Blood*. 2016;128(23):2729-2733. PubMed PMID: 27663674.
- Lozano ML, Cook A, Bastida JM, et al. Novel mutations in RASGRP2 encoding for CalDAG-GEFI abrogate Rap1 activation causing platelet dysfunction. *Blood*. 2016;128:1282-9. PubMed PMID: 27235135.
- Westbury SK, Canault M, Greene D, et al. Expanded repertoire of RASGRP2 variants responsible for platelet dysfunction and severe bleeding. *Blood*. 2017;130:1026-1030. PubMed PMID: 28637664.
- Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost*. 2010;8:2063-2065. PubMed PMID: 20626619.

ANNEXE 3

**Extended spectrum of ACTN1 variants
causing thrombocytopenia and variable
bleeding risk reveals critical rod
domain role**

Extended spectrum of *ACTN1* variants causing thrombocytopenia and variable bleeding risk reveals critical rod domain role

Anne Vincenot,^{1,2} Paul Saultier,³ Shinji Kunishima,⁴ Marjorie Poggi,³ Marie-Françoise Hurtaud-Roux,^{1,2} Alain Roussel,⁶ ACTN1 study co-investigators,⁷ Nicole Schlegel,^{1,2} Marie-Christine Alessi^{3,5}

¹CHU Robert Debré, National Reference Center for Inherited Platelet Disorders, Paris, France

²CHU Robert Debré, Service d'Hématologie Biologique, AP-HP, Paris, France

³Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille, France

⁴National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Department of Advanced Diagnosis, Clinical Research Center, Nagoya, Japan

⁵APHM, CHU Timone, French Reference Center for Inherited Platelet Disorders, Marseille, France

⁶Aix Marseille Univ, CNRS, AFMB, Marseille, France

⁷ACTN1 study co-investigators are listed in the *Supplemental Material*

Running head: New insights into *ACTN1*-related thrombocytopenia

Corresponding author: Marjorie POGGI; NORT Lab, UMR Inserm 1062 / INRA 1260 / Aix Marseille Univ, Faculté de Médecine Timone, 27, Boulevard Jean Moulin 13385 Marseille, France; E-mail: marjorie.poggi@univ-amu.fr; Tel: +33 491 324 507; Fax: +33 491 254 336.

Conflict of interest statement: The authors have no conflict of interest to disclose.

Word count (text): 1324

Tables number: 0

Figures number: 3

Supplemental tables number: 2

Supplemental figures number: 1

Acknowledgements: The study was funded in part by the “Département de la Recherche Clinique et du Développement (DRCD), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris” (ID number P070110), the “Fondation pour la Recherche Médicale” (grant to PS: FDM20150633607), and the French Foundation for Rare Diseases (grant WES 2012-2001). The authors thank the co-investigators for completing clinical assessment of the patients, Noémie Saut for genetic analysis, Dr Odile Fenneteau for helpful discussion, and Olivier René and Sylvie Binard for technical assistance. The authors also thank the patients and their families for their participation.

32

33 MAIN TEXT

34 To the Editor,

35 Congenital thrombocytopenia (CT) involves genetic heterogeneity.^{1,2} Pathogenic
36 variants in the *ACTN1* gene encoding α -actinin-1 (ACTN1) protein were recently reported to
37 cause *ACTN1*-related thrombocytopenia (*ACTN1*-RT) (MIM #102575).³⁻⁸ *ACTN1*-RT,
38 characterized by inconstant mild bleeding and slightly increased mean platelet volume, is
39 one of the most frequent CTs (4.2%).⁵

40 ACTN1 is an anti-parallel dimeric actin cross-linking protein composed of three
41 domains: the N-terminal actin-binding domain (ABD), the C-terminal calmodulin (CaM)
42 domain, and the central rod domain comprising four spectrin-like repeats (SRs).^{6,9,10}
43 Previously reported *ACTN1* variants alter the ABD and the CaM domains³⁻⁶ (Figure 1A) and
44 induce varying degrees of actin network disorganization.³⁻⁵ Variants in the ABD domain
45 induce an increase in ACTN1 binding to actin filaments.⁶ Data on variants affecting the rod
46 domain are scarce. One variant was identified in the second SR of the rod domain, and was
47 associated *in vitro* with disorganized, thicker and shorter actin filaments.⁷ Using cluster-
48 based analysis of high-throughput sequencing data, the Bridge consortium described three
49 new *ACTN1* rod domain variants among 15 likely pathogenic *ACTN1* variants, but did not
50 perform functional tests.¹¹

51 To better define the mutation spectrum and phenotype of *ACTN1*-RT, we led
52 sequencing on the *ACTN1* gene in 272 cases with unexplained CT. We identified 30 cases
53 from 20 families carrying 15 different pathogenic *ACTN1* variants associated with CT, making
54 this the largest report of *ACTN1* variant carriers to date. This study focused on nine new
55 variants that altered the rod domain, providing new insight to help unravel the role of rod
56 domain in *ACTN1*-RT.

57 Cases were included after obtaining informed written consent, in accordance with
58 protocols approved by local institutional review boards and Declaration of Helsinki principles.

Between 2009 and 2017, we recruited 272 patients with unexplained CT referred to hospital-based French Reference Centers for Inherited Platelet Disorders (CRPP) in Paris (n=166) and Marseille (n=106). Two sequencing methods were used. First, targeted *ACTN1* gene sequencing was performed on 97 cases with *MYH9*-negative thrombocytopenia (gene Sanger sequencing) and 20 unaffected family members. Second, high-throughput gene panel sequencing was performed on 69 cases (50-gene panel, Robert Debré university hospital, Paris) and 106 cases (308-gene panel, Marseille university hospital¹²). Sanger sequencing confirmed the variants identified using high-throughput gene sequencing. Variant analysis applied the following filters: SNP at a frequency <1% (based on ExAC and 1000 Genomes data), located in coding regions or splice junctions, and called deleterious by PolyPhen-2, SIFT, Mutation Taster and PhastCons prediction algorithms. Family segregation data were analyzed to confirm the association between variants and phenotype and pattern of inheritance. The pathogenic effect on actin structure was investigated *in vitro* via immunofluorescence studies in CHO and Hela cells transiently transfected with wild-type or variant *ACTN1* constructs. Molecular modeling was used to predict the effect of the new variants on ACTN1 structure and function. Platelet count was measured in venipuncture-sampled EDTA-anticoagulated blood using an automated cell counter. Mean platelet diameter (MPD) was measured at the Robert Debré Hospital center on peripheral blood films using optical microscopy and software-assisted image analysis (Calopix, TRIBVN Healthcare, France) as previously described.¹³ Blood smears prepared with venipuncture-sampled EDTA-anticoagulated blood were May-Grünwald-Giemsa stained.

Fifteen rare, nonsynonymous, pathogenic and monoallelic *ACTN1* variants were identified in index cases (Figure 1A and Supplemental Figure 1). Three variants resulted in previously-reported ABD domain alterations at residue 46 (c.136C>T and c.137G>A) and residue 105 (c.313G>A). A previously-reported variant of residue 738 was found in the neck SR4-CaM domains (c.2212C>T). Eleven other variants were new (F10 to F20). One variant (c.770C>G) was found in the neck ABD-SR1 domain. One variant (c.2243T>A) was found in

86 the first CaM domain. The other 9 new variants were distributed throughout the rod domain
 87 (SR1, SR2, neck SR3-SR4 and SR4 domains). For F19, we found two variants in the same
 88 codon (c.[2156A>C; 2157G>C]), resulting in p.Q719P amino acid substitution (Supplemental
 89 Table 1).

90 All the new variants were absent from the 1000 Genomes and ExAC databases
 91 (Supplemental Table 1). *In silico* analysis predicted all variants as being pathogenic
 92 (Supplemental Table 1). The substituted residues were highly conserved in ACTN1 orthologs
 93 from nine distantly-related species (Supplemental Table 2). High-throughput gene panel
 94 sequencing failed to find variants in any other genes among *ACTN1*-RT patients.

95 Analysis of the pedigrees (Supplemental Figure 1) revealed a complete association
 96 between CT and one variant *ACTN1* allele, confirming autosomal dominant inheritance.
 97 Bleeding diathesis was absent or mild in most patients, although two of them (F3-I-2 and
 98 F18-II-1) experienced severe bleeding episodes (WHO bleeding score = 3; Figure 1 B-C).
 99 These patients suffered from severe bleeding in a surgical context despite moderate
 100 thrombocytopenia (90 and 78 x 10⁹ / L). However, a third of the patients (n = 10/29) had
 101 never been exposed to surgery and may not have not been challenged enough to reveal the
 102 bleeding tendency. These data underline the requirement for a planned hemostatic strategy
 103 to minimize bleeding in *ACTN1*-RT patients. Most of the index cases had moderate
 104 thrombocytopenia and were diagnosed during adolescence or young adulthood (Figure 1C).

105 Strikingly, MPD was normal in seven out of nine cases with rod domain *ACTN1*
 106 variants. Rod domain *ACTN1* variant carriers had an identical platelet count but a smaller
 107 MPD (-0.3 μ m, p<0.05) compared to non-rod domain *ACTN1* variant carriers (Figure 1D).
 108 This between-group difference was even higher after merging MPD data from the present
 109 study with data from previously-reported *ACTN1* variant carriers^{3,5} (-0.4 μ m; p<0.01; n=45;
 110 data not shown). *ACTN1*-RT should therefore also be considered in CT patients with normal
 111 platelet size. No pattern of organ or other hematological defect was noted (data not shown).

112 *ACTN1* localization and actin network organization were studied in CHO cells (Figure

2) and in Hela cells (data not shown) overexpressing wild-type or variant *ACTN1* using immunofluorescence. In wild-type *ACTN1*-transfected CHO cells, ACTN1 colocalized onto the fine actin filaments, whereas unbound ACTN1 was finely distributed within the cytoplasm. In contrast, in all variant *ACTN1*-transfected CHO cells, ACTN1 was abnormally localized as thick bundle fibers (p.V105I, p.V328M, p.A432V and p.Q719R) and short, thin fibers or speckled dots (p.T257R, p.K398T and p.H622Y). Although ACTN1 was diffusely distributed in the cytoplasm of these cells, shortened thin fibers or speckled dots of ACTN1 were observed in lamellipodia.

The effect of the new variants on ACTN1 structure and function was predicted via *in silico* structural study (Figure 3). ACTN1 and ACTN2 sequence alignment demonstrated a highly-conserved sequence with 81.4% identity (without considering the signal peptides and the large insertion from residue 752 to residue 790 in ACTN1). Therefore, the variants found in ACTN1 could be confidently localized to the crystal structure of ACTN2 (PDB code 4D1E).¹⁴ The ACTN2 dimer displays a cylindrical shape about 360 Å long and 60 Å wide. The antiparallel ACTN2 dimer assembles predominantly via the rod domain (SR1-4 domains) of the molecule. Interestingly, seven variants, *i.e.* p.K324E, p.V328M, p.Q329R, p.K398T, p.A432V, p.R450C and p.R450H, are located at the dimer interface and may thus affect dimer formation¹⁵ and destabilize the protein, as suggested by a recent report.⁸ p.R450C and p.R450H have predicted disruptive potential, as they lead to loss of the salt bridge. In addition, p.Q719P, which is not located at the dimer interface, would destabilize the structure of SR4 due to the introduction of a proline residue in a helical secondary structure. As the ACTN1 rod domain plays a pivotal role in regulation of the actin network, the destabilization induced by substitutions like p.Q719P might alter the interactions with numerous structural or signaling proteins such as integrins, talin or vinculin.⁹ Finally, p.M748K, which is located on the external face, far from the dimer interface, may also alter the interaction with protein partners.

139 This report of 20 new pedigrees significantly expands the reported cases of *ACTN1*-
140 RT and highlights the high frequency of congenital *ACTN1* variants as a cause of CT. We
141 show that the rod domain, like the other functional domains of *ACTN1*, is potentially altered
142 by congenital pathogenic variants, resulting in actin disorganization and a thrombocytopenia
143 with normal platelet size in most cases.

144

REFERENCES

1. Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2012;18 Suppl 4:154–160.
2. Rabbolini DJ, Morel-Kopp MC, Stevenson W, Ward CM. Inherited macrothrombocytopenias. *Semin. Thromb. Hemost.* 2014;40(7):774–784.
3. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, et al. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;92(3):431–438.
4. Guéguen P, Rouault K, Chen J-M, et al. A missense mutation in the alpha-actinin 1 gene (ACTN1) is the cause of autosomal dominant macrothrombocytopenia in a large French family. *PLoS One.* 2013;8(9):e74728.
5. Bottega R, Marconi C, Faleschini M, et al. ACTN1-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization. *Blood.* 2015;125(5):869–872.
6. Murphy ACH, Lindsay AJ, McCaffrey MW, Djinić-Carugo K, Young PW. Congenital macrothrombocytopenia-linked mutations in the actin-binding domain of α -actinin-1 enhance F-actin association. *FEBS Lett.* 2016;590(6):685–695.
7. Yasutomi M, Kunishima S, Okazaki S, et al. ACTN1 rod domain mutation associated with congenital macrothrombocytopenia. *Ann. Hematol.* 2016;95(1):141–144.
8. Boutroux H, David B, Guéguen P, et al. ACTN1-related Macrothrombocytopenia: A Novel Entity in the Progressing Field of Pediatric Thrombocytopenia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2017;39(8):e515–e518.
9. Sjöblom B, Salmazo A, Djinić-Carugo K. Alpha-actinin structure and regulation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 2008;65(17):2688–2701.
10. Gimona M, Mital R. The single CH domain of calponin is neither sufficient nor necessary for F-actin binding. *J. Cell Sci.* 1998;111 (Pt 13):1813–1821.
11. Westbury SK, Turro E, Greene D, et al. Human phenotype ontology annotation and cluster analysis to unravel genetic defects in 707 cases with unexplained bleeding and platelet disorders. *Genome Med.* 2015;7(1):36.
12. Saultier P, Vidal L, Canault M, et al. Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: ultrastructural and pathogenic features. *Haematologica.* 2017;102(6):1006–1016.
13. Saposnik B, Binard S, Fenneteau O, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in a large French cohort of MYH9-Related Disorders. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2014;2(4):297–312.
14. Ribeiro E de A, Pinotsis N, Ghisleni A, et al. The structure and regulation of human muscle α -actinin. *Cell.* 2014;159(6):1447–1460.
15. Foley KS, Young PW. An analysis of splicing, actin-binding properties, heterodimerization and molecular interactions of the non-muscle α -actinins. *Biochem. J.* 2013;452(3):477–488.

184 **FIGURE LEGENDS**

185 **Figure 1: Identification and characterization of new ACTN1 variant carriers**

186 (A) Structural domains of ACTN1 and location of *ACTN1* variants (i) previously described
 187 with proven functional impact (dark), (ii) previously described but untested for functional
 188 impact (grey), (iii) previously described with proven functional impact and reported here
 189 (green), or (iv) previously undescribed and reported here (red). CH: Calponin homology
 190 domain; SR: Spectrin repeat; CaM: Calmodulin-like domain. The four SRs form the rod
 191 domain of the protein.

192 (B) Characterization of the bleeding phenotype of *ACTN1* variant carriers. Bleeding episodes
 193 of the 30 affected patients were recorded. The cases are annotated with the identifiers
 194 described in Supplemental Figure 1. Number of patients suffering bleeding or not is reported
 195 on the left. Number of bleeding symptoms for each patient is indicated at the bottom. Type of
 196 bleeding is indicated on the right. Exposure to surgery is indicated in the last line. NA: not
 197 available; N: No; Y: Yes.

198 (C) Features of families with *ACTN1* variants. The cases are annotated with the identifiers
 199 described in Supplemental Figure 1. WHO BS (World Health Organization Bleeding Score):
 200 grade 0, no bleeding; grade 1, cutaneous bleeding only; grade 2, mild blood loss; grade 3,
 201 gross blood loss, requiring transfusion; grade 4, debilitating blood loss, retinal or cerebral,
 202 associated with fatality. The platelet count value given for each patient represents the mean
 203 of the platelet count values available for that patient. The reference ranges for platelet count
 204 and diameter were $[155\text{--}394 \times 10^9 / \text{L}]$ and $[1.9\text{--}2.9 \mu\text{m}]$, respectively, as defined by the 2.5–
 205 97.5 percentile range of a control population ($n = 64$ for platelet count and $n = 92$ for platelet
 206 diameter). MPD: mean platelet diameter; ND, not determined.

207 (D) Platelet phenotype of *ACTN1* variant carriers according to variant location (rod domain
 208 *versus* non-rod domain variant carriers). Among non-rod domain *ACTN1* variant carriers,
 209 ABD domain variant carriers are depicted in grey and CaM domain variant carriers are

depicted in black. Mean $\pm$ standard deviation is shown for each group. MPD value represents the mean of 200 platelet diameter values. The between-group difference was evaluated using an unpaired *t*-test. ns: non-significant; *: $p < 0.05$. The lower limit of the reference range for platelet count ($155 \times 10^9 / L$) and the upper limit of the reference range for platelet diameter ($2.9 \mu m$) are represented with a dotted line.

Figure 2: New *ACTN1* variants alter *ACTN1* localization and actin network organization

Representative immunofluorescence microscopy images of CHO cells transiently transfected with wild-type or variant *ACTN1* constructs using a standard procedure. The images were visualized after *ACTN1* and actin staining, as previously described.³ Scale bar: $20 \mu m$.

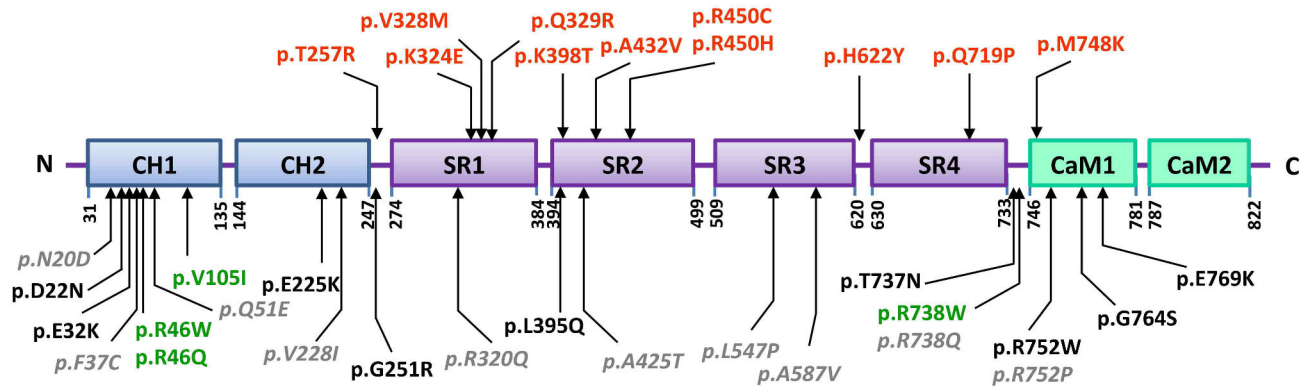
Figure 3: Predicted structural consequences of new *ACTN1* variants

Protein structure visualizations of the *ACTN1* variants. The dimeric structure of *ACTN2* was assembled from two halves of the *ACTN2* protomer (ABD-neck-SR1-SR2-SR3-SR4-CaM1-CaM2) through a crystallographic 2-fold axis. One monomer is represented as a blue surface (bottom view) and the other is colored in yellow and shown in ribbon representation (top view). The two views are rotated 90° around the horizontal axis. Residues corresponding to the variants in *ACTN1* are colored in red when located at the dimer interface and in purple when located elsewhere. The upper panels correspond to close-up views of the p.K324E, p.Q329R, p.V328M, p.K398T, p.R450C and p.A432V variants. The monomer colored in blue is shown in stick representation with the residue corresponding to the variants colored in red. The other monomer is represented as a yellow surface.

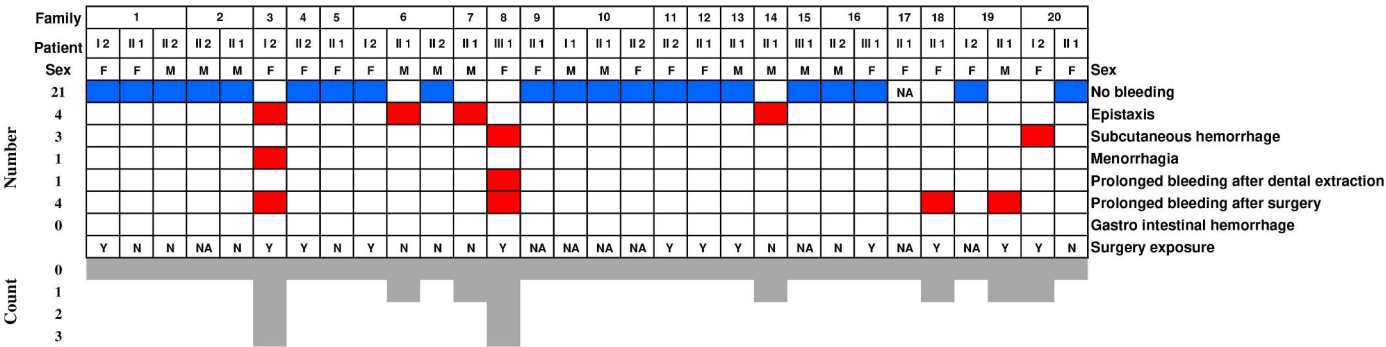
FIGURE 1

Haematologica HAEMATOL/2017/184424 Version 1

A



B



C

Family	Patient	Age at diagnosis (year)	WHO BS	Platelet Count (x10 ⁹ /l)	MPD (μm)	ACTN1 mutation
1	I 2	20	0	39	3.1	p.R46W
	II 1	1	0	54	2.8	p.R46W
	II 2	0	0	NA	2.7	p.R46W
2	II 1	29	0	54	3.0	p.R46W
	II 2	27	0	76	3.2	p.R46W
3	I 2	32	3	90	4.0	p.R46W
4	II 2	18	0	95	3.4	p.R46W
5	II 1	11	0	104	2.9	p.R46Q
6	I 2	16	0	86	2.7	p.V105I
	II 1	19	1	87	3.0	p.V105I
	II 2	0	0	106	3.2	p.V105I
7	II 1	15	1	80	3.5	p.R738W
8	III 1	18	2	95	3.0	p.R738W
9	II 1	13	0	45	NA	p.R738W
10	I 1	66	0	72	NA	p.T257R
	II 1	43	0	120	NA	p.T257R
	II 2	35	0	135	NA	p.T257R
11	II 2	NA	0	70	NA	p.K324E
12	II 1	18	0	114	2.7	p.V328M
13	II 1	31	0	124	2.9	p.Q329R
14	II 1	28	2	124	2.5	p.L398T
15	III 1	23	0	94	2.8	p.A432V
16	II 2	48	0	51	2.8	p.R450C
	III 1	20	0	99	3.2	p.R450C
17	II 1	NA	0	140	2.5	p.R450H
18	II 1	48	3	78	3.2	p.H622Y
19	I 2	NA	0	65	NA	p.Q719P
	II 1	9	0	78	2.5	p.Q719P
20	I 2	23	1	74	3.1	p.M748L
	II 1	9	0	95	3.0	p.M748L

D

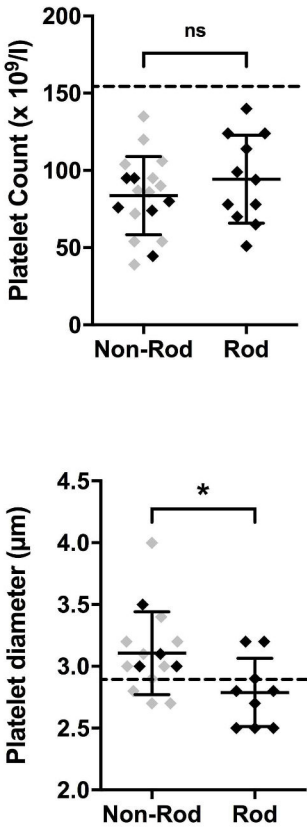


FIGURE 2

Haematologica HAEMATOL/2017/184424 Version 1

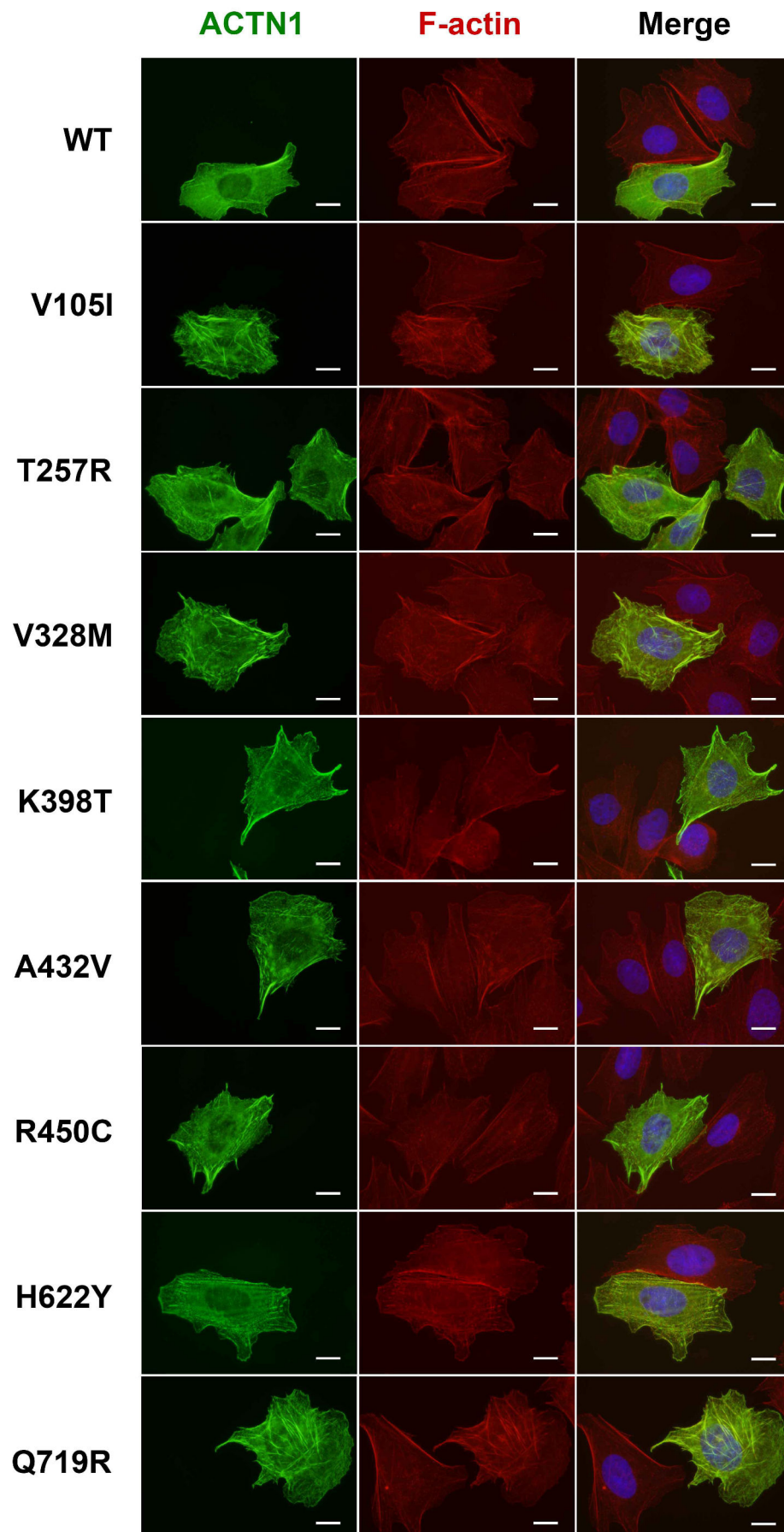
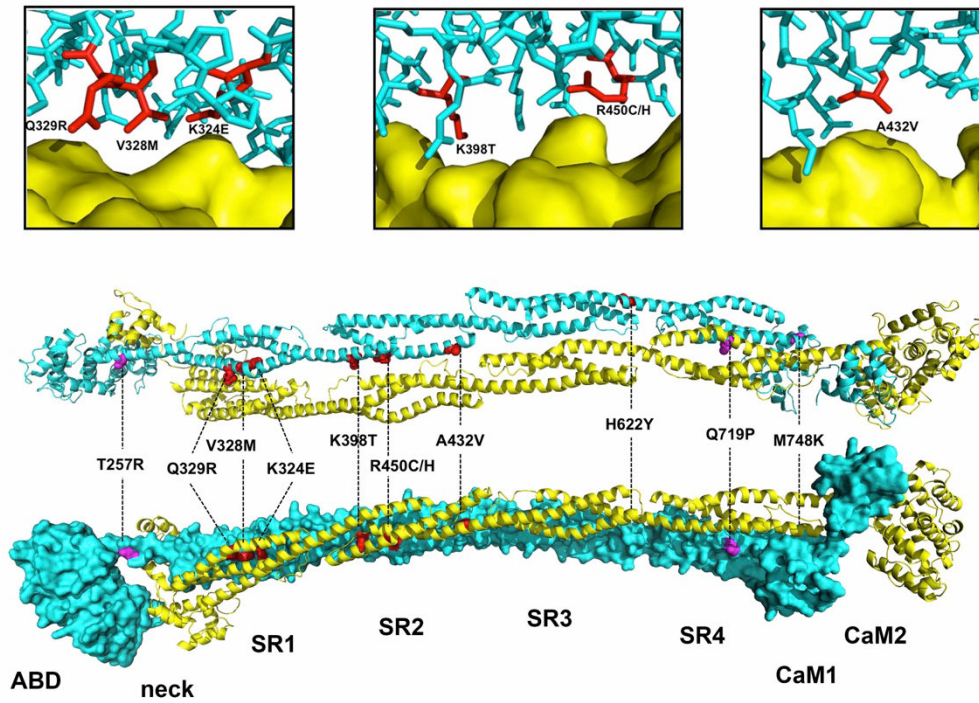


FIGURE 3



SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table 1: *In silico* analysis of the new *ACTN1* variants

Mutation (c.DNA)	VEP consequence	Exon	Protein effect	Bioinformatics analysis					Allele frequency (%)	
				PolyPhen-2	SIFT	Mutation Taster	PhastCons	CADD score	1000G	ExAc
c.770C>G	Missense	9	p.Thr257Arg	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	28.6	0	0
c.970A>G	Missense	10	p.Lys324Glu	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	28.6	0	0
c.982 G>A	Missense	10	p.Val328Met	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	26.8	0	0
c.986A>G	Missense	10	p.Gln329Arg	Benign	Not tolerated	Disease-causing	1	26.4	0	0
c.1193 A>C	Missense	11	p.Lys398Thr	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	29.8	0	0
c.1295 C>T	Missense	12	p. Ala432Val	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	34	0	0
c.1348 C>T	Missense	12	p.Arg450Cys	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	35	0	0
c.1349G>A	Missense	12	p.Arg450His	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	35	0	0
c.1864 C>T	Missense	16	p.His622Tyr	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	20.9	0	0
c.[2156A>C;2157G>C]	Missense	18	p.Gln719Pro	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	25.7	0	0
c.2243T>A	Missense	18	p.Met748Lys	Possibly damaging	Not tolerated	Disease-causing	1	24.8	0	0

The consequences of variations were analyzed using Variant Effect Predictor (VEP; <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>). The effect on the protein's function was analyzed using several bioinformatics tools (PolyPhen-2, SIFT, Mutation Taster, PhastCons and CADD scores). A PhastCons score of 1 reflects a total conservation of the residue among species, indicating then a probably

8 pathogenic alteration. A scaled CADD score (<http://cadd.gs.washington.edu/score>) of 20 means
9 that a variant is amongst the top 1% of deleterious variants in the human genome, while a
10 score of 30 means that the variant is in the top 0.1%. The in-population allele frequencies were
11 derived from 1000 Genomes Project (1000G) and ExAc databases.

12 **Supplemental Table 2: Conservation of the human ACTN1 residues T257, V328, Q329, K324, K398,**
13 **A432, R450, H622, Q719 and M748 in orthologs**

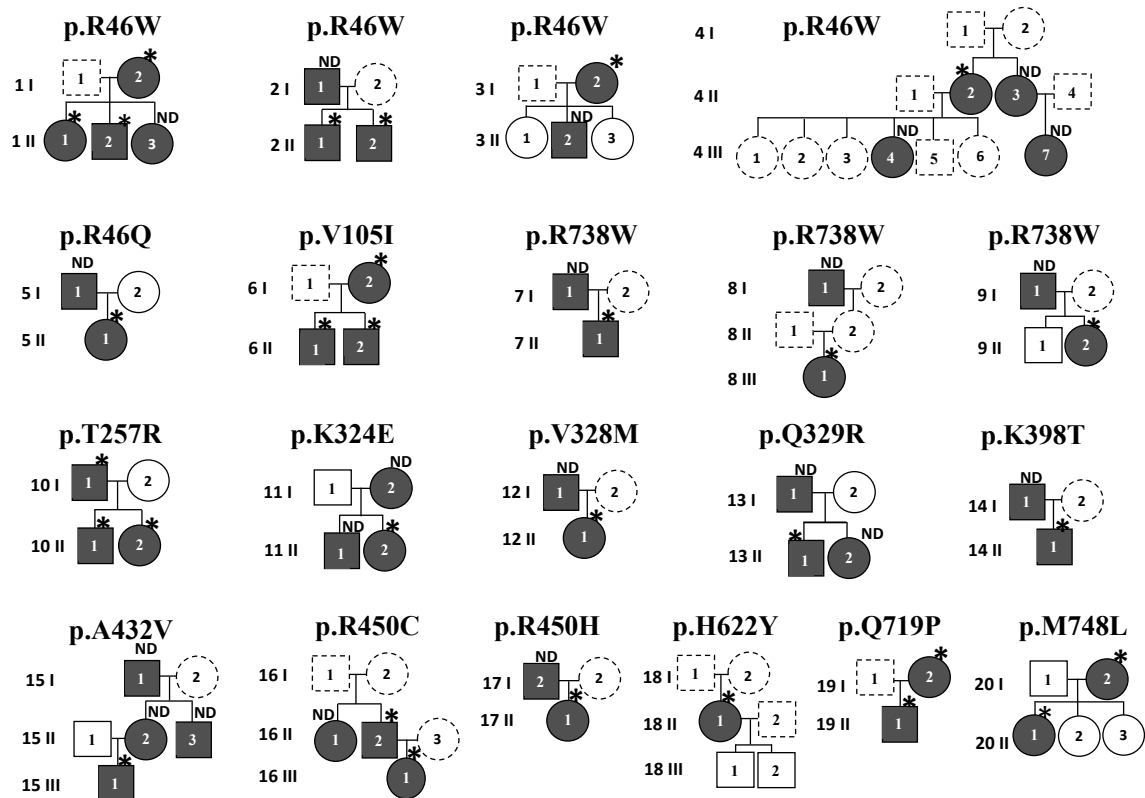
Species		UniProt ID	Residues										Identity rate	
													ACTN1	Rod domain
Human	<i>Homo sapiens</i>	P12814	T257	V328	K324	Q329	K398	A432	R450	H622	Q719	M748	Ref	Ref
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	H2RDW7	T244	V315	K311	Q316	K385	A419	R437	H609	Q706	M735	99.8%	100.0%
Macaque	<i>Macaca mulatta</i>	H9YUP4	T257	V328	K324	Q329	K398	A432	R450	H622	Q719	M748	99.9%	100.0%
Dog	<i>Canis lupus familiaris</i>	E2QY08	T257	V328	K324	Q329	K398	A432	R450	H622	Q719	M748	99.3%	99.3%
Cow	<i>Bos taurus</i>	Q3B7N2	T257	V328	K324	Q329	K398	A432	R450	H622	Q719	M748	99.4%	99.3%
Mouse	<i>Mus musculus</i>	Q7TPR4	T257	V328	K324	Q329	K398	A432	R450	H622	Q719	M748	99.2%	99.3%
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	Q6T487	T257	V328	K324	Q329	K398	A432	R450	H622	Q719	M748	99.3%	99.3%
Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	B8JHU4	T267	V338	K334	Q339	K408	A442	R460	H632	Q729	M758	93.4%	91.9%
Xenopus	<i>Xenopus tropicalis</i>	F7B6G0	T255	V326	K322	Q327	K396	A430	R448	H620	Q717	M746	94.9%	93.2%

14 The amino-acid sequence of human ACTN1 protein was compared to orthologs using Clustal OMEGA
15 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The novel variations reported in this study alter the residues
16 T257, V328, K324, Q329, K398, A432, R450, H622, Q719 and M748. The table gives the corresponding
17 residue in eight other species. Identity rate is provided for the entire ACTN1 sequence (penultimate
18 column) and for the rod domain sequence (last column), showing that ACTN1 sequence and its rod
19 domain are highly conserved between these species. Ref: reference.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplemental Figure 1: Pedigrees for the affected families

Squares denote males and circles denote females. Black filled and empty symbols represent thrombocytopenic and non-thrombocytopenic family members, respectively. Dotted-line symbols were used when platelet count was unavailable. *ATCN1* gene constitutional variant status is indicated at the top of symbols representing family members. All the identified variants were monoallelic.



Thrombocytopenia
Absence of thrombocytopenia
Absence of data on platelet count

* *ACTN1* variant
ND Genetic test not performed

Supplemental Figure 1: Pedigrees for the affected families

ACTN1 STUDY CO-INVESTIGATORS

Christine Biron-Andreani,¹ Jean-François Claisse,² Rémy Duléry,^{3,4} Eric Durot,⁵ Mathieu Fiore,⁶ Rémi Favier,⁷ Pierre Fenaux,^{8,9} Felipe Guerrero,^{10,11} Véronique Le Cam-Duchez,¹² Elisabeth Mazoyer,¹³ Stéphanie Muller,¹⁴ Bénédicte Neven,¹⁵ Catherine Pouymayou,¹⁶ Bruno Royer,¹⁷ Pierre Sie,^{10,18} Sandrine Thouvenin,¹⁹ Catherine Trichet,²⁰ Nathalie Trillot²¹ and Karima Yakouben²²

¹Laboratory of Hematology, Regional Center for Hemophilia Treatment, University Hospital of Montpellier, Montpellier, France

²Laboratory of Hematology, Center of Human Biology, University Hospital of Amiens-Picardie, Amiens, France

³CHU Saint Antoine, Hematology Department, APHP, Paris, France

⁴Pierre and Marie Curie University (UPMC), Paris, France

⁵Clinical Hematology, University Hospital of Reims, Reims, France

⁶Laboratory of Haematology, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France

⁷Biological Hematology and National Reference Center for Inherited Platelet Disorders, CHU Armand Trousseau, Paris, France

⁸Hematology Seniors Service, CHU Saint Louis, Paris, France

⁹Paris 7 University, Paris, France

¹⁰CHU Toulouse, Biological Hematology, Toulouse, France

¹¹CHU Toulouse, National Reference Center for Inherited Platelet Disorders, Toulouse, France

¹²Rouen University Hospital, Department of biological hematology, F76000 Rouen, France

¹³Hôpital Avicenne, Biological Hematology, Bobigny, France

¹⁴CH Rambouillet, Pediatrics, Rambouillet, France

¹⁵CHU Necker-Enfants Malades, Immunological and Pediatric Hematology, Paris, France

¹⁶CHU Timone, National Reference Center for Inherited Platelet Disorders, Marseille, France

¹⁷CHU Amiens, Clinical Hematology and Cellular Therapy, Amiens, France

¹⁸Université Paul Sabatier, Toulouse, France

¹⁹Pediatric Hematology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

²⁰Hematology department, HUPNVS, APHP, Clichy, France

²¹CHU Lille, Hematology and Transfusion Institute, F-59000 Lille, France

²²CHU Robert Debré, Department of Pediatric Clinical Hematology and Immunology, APHP, Paris, France

