

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

INSERM UMR_S1255 Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostasie, thrombose, transfusion

THÈSE

Présentée par

Julie BOSCHER

Soutenue le **16 septembre 2021**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Etude des facteurs mécanobiologiques impliqués dans la formation des plaquettes sanguines

THÈSE dirigée par :

Mme Catherine LEON

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M Martial BALLAND

MCF, INSERM, Université de Grenoble

M Alexandre KAUSKOT

CRCN, INSERM, Université de Paris

EXAMINATEUR :

Mme Nadia BENKIRANE JESSEL

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITÉ :

M François LANZA

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S1255

« Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostase, thrombose, transfusion »

Directeur : Docteur Christian GACHET

Etablissement Français du Sang (EFS) – Grand Est

10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France

Tel : +33 3 88 21 25 25, Fax : +33 3 88 21 25 21

Directeur de thèse :

Docteur Catherine LEON

E-mail : Catherine.leon@efs.sante.fr

Ce travail a été soutenu par la **Fondation pour la Recherche Médicale** via une bourse de thèse "Espoir de la Recherche" (numéro de subvention FRM ECO20170637508) ainsi qu'une subvention de fin de thèse (FDT202012010422) et par l'**Agence Nationale de la Recherche**.



REMERCIEMENTS

Tout d’abord, je souhaite ici revenir brièvement sur mon intérêt personnel pour ce projet de recherche. La biologie est pour moi un sujet de grande curiosité depuis l’enfance et c’est assez naturellement que j’ai entamé des études dans ce domaine. Durant mes premières années à la faculté des sciences de la vie de Strasbourg, j’ai développé une forte affinité pour la biologie humaine. Lors d’une année d’échange international dans une autre université, j’ai eu la possibilité de sélectionner moi-même mes enseignements et ai choisi d’en apprendre plus sur l’hématologie. Le domaine d’étude m’a plu car j’y ai vu la possibilité de faire une recherche appliquée proche de la médecine. A mon retour en France, j’ai ainsi effectué mon stage de master 2 au sein du laboratoire de Biologie et Pharmacologie des plaquettes sanguines. Je connaissais déjà le lieu pour y avoir donné mon sang mais j’y découvrais la présence d’une unité de recherche. J’ai retrouvé au laboratoire les deux points qui me semblent les plus importants à considérer avant de débiter une thèse, à savoir : un environnement de travail de qualité (aussi bien au niveau des moyens techniques que de l’encadrement) et un sujet de recherche qui m’intéressait. Le sujet de ma thèse s’est inscrit dans la continuité de mon projet de master avec la problématique générale suivante : l’étude des mécanismes mis en œuvre par les cellules à l’origine des plaquettes sanguines pour s’adapter aux contraintes de leur environnement. La thématique hématologique m’a donc attirée et je découvrais le domaine encore relativement émergent de la mécanobiologie. L’alliance des deux m’a plu et m’a donné l’envie de poursuivre le travail entamé durant le master.

J’ai démarré mon aventure dans ce laboratoire en septembre 2016, cinq années se sont écoulées depuis. Cinq riches années qui m’ont fait grandir scientifiquement et personnellement et ce grâce à toutes les personnes qui m’ont accompagnées dans ce joli parcours. Pour avoir accepté de siéger dans mon jury, d’évaluer mon travail de thèse et me permettre ainsi de clôturer cette étape, je remercie très sincèrement **Madame Nadia Jessel, Monsieur Alexandre Kauskot et Monsieur Martial Balland**.

Catherine, merci pour ta confiance dès mon arrivée en master. Tu as su trouver l’équilibre entre m’accompagner et me challenger afin de faire grandir mon esprit scientifique. Je pense que nous avons formé un bon duo étudiante – directrice. J’ai énormément appris grâce à toi et je garde de très bons souvenirs de ce doctorat, particulièrement des congrès (plus ou moins loin) auxquels nous avons pu participer ensemble. J’admire beaucoup ton parcours qui est pour moi source d’inspiration.

J'adresse mes remerciements à **Monsieur Gachet**, directeur de l'unité 1255 et de l'EFS Grand-Est. Merci de m'avoir permis d'intégrer ce laboratoire lors de mon Master 2 puis de poursuivre avec une thèse dans cet environnement scientifique stimulant.

Je remercie **François Lanza**, directeur de l'équipe 2, pour toutes ses suggestions, questions et remarques ; à la lecture de mon manuscrit d'abord, mais aussi et surtout, lors de réunions tout au long de ma thèse. Cela m'a permis d'affiner et d'améliorer ma réflexion et mon travail.

Merci aussi à toi, **Nathalie** pour avoir relu mon travail et pour toutes tes remarques constructives.

Merci **Pierre** pour nos discussions et pour les idées que tu as apportées au projet.

J'adresse toute ma reconnaissance à la **Fondation pour la Recherche Médicale** qui a financé mon travail de thèse durant ces quatre années. Je souhaite également remercier mes responsables de master, **Sophie Jarriault**, **Vincent Leclerc** et **Nicolas Matt** ainsi que **Monsieur Serge Potier** qui m'ont permis de prétendre à cette bourse.

Vanessa et **Amandine**, mes deux encadrantes du jardin des sciences, après avoir défendu ma thèse en 180 secondes la voici en plusieurs centaines de pages ! Un exercice bien différent que MT180 mais si enrichissant. J'ai pris beaucoup de plaisir à participer à cette aventure.

Anna Dyngo, mon mentor pour le *Nouveau Chapitre de Thèse*, merci pour votre regard extérieur qui a été fondamental pour ma réflexion sur mon parcours de thèse au-delà des données scientifiques. Et car l'obtention du doctorat n'est pas une fin, mais simplement la clôture d'un (gros) chapitre et qu'il est important de prendre le temps de réfléchir à comment l'on souhaite que se continue l'histoire, merci de m'avoir permis de prendre ce recul.

Betty et **Elisabeth**, merci pour vos sourires chaque matin et chaque soir qui ont le pouvoir d'enseigner même les jours les plus gris.

Josiane, tu es ma super-héroïne du labo ! Vraiment. En plus d'avoir toujours les mots pour m'encourager tu avais, à chaque fois que je t'appelais à l'aide, la solution à mes problèmes. Merci pour ta bienveillance en toutes circonstances.

Thao, merci pour ta folie qui m'a manqué ces dernières années. Heureusement **Inès** était là pour reprendre le flambeau et me faire sourire en toutes circonstances. Inès tu es une personne géniale je te souhaite une thèse à ton image.

Pour finir avec l'équipe CFL, **Mathilde**, merci et bravo pour ton travail ! Merci aussi pour tes petits mots d'encouragements qui m'ont fait du bien. Je te souhaite beaucoup de réussite et d'épanouissement dans la suite de ton parcours.

Alicia B. même si tu n'es plus à nos réunions tu fais toujours partie de la team CFL pour moi. Toujours à l'écoute et disponible pour papoter science ou autre.

Emily, nous n'avons jamais directement travaillé ensemble et pourtant c'est bien toi mon binôme ! J'ai la chance d'avoir gagné une véritable amie. Encore une fois, il s'en passe des choses dans nos vies et ces cinq années auraient eu une toute autre saveur sans toi à mes côtés pour traverser les bons moments comme les plus difficiles.

Merci à vous deux, ma team bureau du fond, pour votre soutien dans cette dernière ligne droite !

David, Marianne, Clarisse, (autres membres de la Team Labo Party) Merci ! Journée bateau, sorties rando, soirée raclette, pique-nique d'anniversaire, après trampoline, escape game, Strasbourgeoise... qui a dit qu'on ne faisait que bosser pendant une thèse ? Je me serais bien ennuyée sans vous !

L'équipe de microscopie **Anita, Fabienne** et **Jean-Yves**, je vous remercie pour votre patience, votre accueil et votre bonne humeur (malgré ma maladresse) lorsque je passais pas mal de temps dans vos quartiers pour apprendre l'art de la microscopie électronique.

Merci à l'équipe de l'animalerie, **Monique, Catherine Z., Ketty, Lauriane** et **Nolwenn** de prendre soin de nos petites souris.

Merci **Nico**. On aura bien plus discuté cuisine et pâtisserie que science et c'était génial ! Merci aussi pour tes mots d'encouragement qui me redonnaient confiance dès que je doutais.

Un merci spécial à **Sylvie** et **Pascal** pour les blagues et la bonne humeur qui reboostent une journée de la loose !

Merci aussi aux doctorants et post-doctorants présents et passés **Cyril** (à ton tour !), **Quentin, Anaïs, Sasha, Adèle, Camille, Marie-Belle, Valentin, Marion, Margaux** et bien sûr **Alicia** qui m'a appris tant de choses à mon arrivée au laboratoire.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour les coups de pouce, les conseils, les sauvetages, les encouragements, les discussions scientifiques ou pas, en réunion, au café, en manip, ou en coup de vent dans un couloir.

Mes bibiches, **Emma**, **Ludmilla**, **Mano** merci les filles pour votre soutien indéfectible et pour tous ces moments partagés ensemble. Merci évidemment à **Edouard**, **Simon** et **Thomas**, j'ai beaucoup de chance de vous compter tous les six parmi mes amis proches.

Lou, la distance ne nous a jamais empêché de papoter. Tu as toujours su trouver les mots justes pour m'encourager et je compte bien faire de même, la prochaine thèse est pour toi !

Loulou et **Alia** même si nos études respectives ne nous laissaient pas toujours beaucoup de temps pour se voir nos petites réunions ont été d'agréables parenthèses.

Flora, tout a commencé sur les bancs du Le Bel alors que nous débutions nos études de biologie et nous voilà toutes les deux au bout du parcours, toujours avec cette belle amitié.

A tous mes camarades de **master**, on se voit certes moins mais je ne vous oublie pas. Grâce à vous mes années de master ont été un vrai bonheur, vous me manquez. Il faut prévoir une réunion BDSC bientôt !

Merci à toute **ma famille** pour les encouragements infaillibles quelques soient les projets que j'entreprends.

Je remercie **mes parents**, pour tout. Sponsor de ces longues années d'études et des détours à l'étranger. Vous m'avez toujours poussée, non pas à être la meilleure, mais à faire de mon mieux. Vous m'avez toujours fait confiance même dans les moments où je n'étais pas sûre de moi. Merci d'avoir tant rabâché les tables de multiplication pour qu'enfin ça rentre et de n'avoir jamais donné de crédit à certains professeurs qui disaient avec fatalité que je n'avais tout simplement pas un « esprit scientifique ». Vous m'avez fait sentir qu'aucune voie n'était inaccessible si je m'en donnais les moyens. Voir la fierté dans vos yeux reste encore et toujours ma plus grande satisfaction.

Romain, peut être sans t'en rendre compte tu as été dès le début, et est toujours, un modèle à mes yeux et une partie de moi sera toujours motivée par l'envie de t'impressionner et te rendre fière de ta petite sœur. Alors merci de me pousser à me dépasser !

Hervé, j'ai gagné ! Je ne suis pas médecin mais je serai docteur avant toi alors merci d'avance pour le bon dîner que tu vas m'offrir ! Toi l'internat, moi le doctorat, ces dernières années ont été plutôt studieuses mais si heureuses. Te savoir à mes côtés quoi qu'il arrive m'est si précieux. Merci d'être là et de contribuer à mon bonheur au quotidien.

*A mes **grands-pères**,*

*A toi, **petit cœur**, dont les battements m'accompagnent de très près depuis quelques mois.*

Promis, mon prochain grand projet c'est toi.

Déclaration sur l'honneur *Declaration of Honour*

J'affirme être informé que le plagiat est une faute grave susceptible de mener à des sanctions administratives et disciplinaires pouvant aller jusqu'au renvoi de l'Université de Strasbourg et passible de poursuites devant les tribunaux de la République Française.

Je suis conscient(e) que l'absence de citation claire et transparente d'une source empruntée à un tiers (texte, idée, raisonnement ou autre création) est constitutive de plagiat.

Au vu de ce qui précède, j'atteste sur l'honneur que le travail décrit dans mon manuscrit de thèse est un travail original et que je n'ai pas eu recours au plagiat ou à toute autre forme de fraude.

I affirm that I am aware that plagiarism is a serious misconduct that may lead to administrative and disciplinary sanctions up to dismissal from the University of Strasbourg and liable to prosecution in the courts of the French Republic.

I am aware that the absence of a clear and transparent citation of a source borrowed from a third party (text, idea, reasoning or other creation) is constitutive of plagiarism.

In view of the foregoing, I hereby certify that the work described in my thesis manuscript is original work and that I have not resorted to plagiarism or any other form of fraud.

Nom : Prénom : BOSCHER Julie

Ecole doctorale : ED 414 Science du Vie et de la Santé

Laboratoire : UMR-S 1255 Biologie et Pharmacologie des plaquettes sanguines.

Date : 02.12.2021

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES ANNEXES	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
PREAMBULE.....	19
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
I. La moelle osseuse hématopoïétique : un milieu complexe	25
A. La mise en place du système hématopoïétique au cours du développement	25
1. L'hématopoïèse primitive.....	25
2. L'hématopoïèse définitive	25
3. La moelle hématopoïétique	26
B. Le tissu hématopoïétique adulte	27
C. La structure et la composition de la moelle hématopoïétique	29
1. La vascularisation de la moelle osseuse	29
1.1. L'organisation du système vasculaire de la moelle osseuse.....	30
1.2. Le vaisseau sinusóide médullaire.....	31
2. La composition cellulaire de la moelle osseuse	32
2.1. Les cellules stromales	33
2.2. Les cellules hématopoïétiques	35
3. La matrice extracellulaire	36
3.1. Les protéines structurales constituant la MEC médullaire	36
3.2. Les glycoprotéines	38
3.3. Les autres constituants de la MEC : protéoglycanes et glycosaminoglycanes	38
D. La moelle osseuse : un environnement soumis à des contraintes mécaniques	39
1. Les forces hémodynamiques.....	40
2. Le confinement.....	41
3. La rigidité du tissu.....	42
4. Modifications des propriétés mécaniques de la moelle : deux exemples	47
II. La mégacaryocytopoïèse et la biogénèse des plaquettes.....	51
A. L'hématopoïèse	51
1. Les cellules souches hématopoïétiques	51
2. Les différents devenir de la cellule souche hématopoïétique	52
3. La voie alternative de la mégacaryopoïèse dite « voie biaisée »	54
B. Le mégacaryocyte mature : produit final de la mégacaryopoïèse	55

1.	Les caractéristiques du mégacaryocyte mature.....	55
1.1.	<i>Endomitoses et polyploïdie</i>	55
1.2.	<i>Forte activité protéique</i>	58
1.3.	<i>Le réseau de membrane interne (DMS)</i>	58
1.4.	<i>La zone périphérique (PZ)</i>	61
2.	La classification des mégacaryocytes selon leur degré de maturation	62
C.	La mégacaryopoïèse : un processus très contrôlé	63
1.	Régulation de la mégacaryopoïèse	64
1.1.	<i>Régulation par les cytokines</i>	64
1.2.	<i>Régulation par les facteurs de transcription</i>	66
D.	La thrombopoïèse	67
1.	Les plaquettes sanguines : produit final de la thrombopoïèse	67
2.	Les différentes théories de formation des plaquettes.....	67
3.	La thrombopoïèse <i>in vitro</i>	69
4.	Les étapes successives de la thrombopoïèse <i>in vivo</i>	71
4.1.	<i>Le passage de la barrière endothéliale</i>	71
4.2.	<i>L'élongation des proplaquettes</i>	72
4.3.	<i>La libération des plaquettes</i>	74
5.	Les maladies plaquettaires : défauts qualitatifs ou quantitatifs des plaquettes	75
5.1.	<i>Les thrombopathies</i>	75
5.2.	<i>Les thrombopénies</i>	77
5.3.	<i>Les thrombocytoses</i>	78
III.	Rôle de la mécanobiologie dans la formation des plaquettes sanguines	80
A.	Un domaine d'étude récent	80
1.	Les contraintes mécaniques, une composante de l'environnement cellulaire.....	80
1.	Les débuts de la mécanobiologie	81
2.	Définition de la mécanobiologie	83
B.	Mécanorécepteurs, les systèmes de perception du signal	84
1.	Les récepteurs d'adhésion.....	85
1.1.	<i>Les intégrines</i>	85
1.2.	<i>Les Cadhérines</i>	86
2.	Les récepteurs couplés aux protéines G.....	87
3.	Les canaux ioniques mécanosensibles	88
3.1.	<i>Généralités</i>	88
3.2.	<i>Les canaux Piezo</i>	88
3.3.	<i>Les canaux TRPV</i>	90

4. Le cytosquelette	93
4.1. L'actine	94
4.2. La myosine	95
4.3. Les filaments intermédiaires.....	95
4.4. Le complexe LINC.....	96
C. L'adaptation cellulaire par modification de l'expression génique.....	98
1. La voie YAP – TAZ.....	98
2. La voie MKL1.....	100
D. La mécanobiologie dans la mégacaryopoïèse	102
1. L'intérêt de modéliser les contraintes mécaniques dans les systèmes <i>in vitro</i>	102
2. Les modèles d'études de la mécanobiologie dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse	103
2.1. Les systèmes sur matrice en 2D	103
2.2. Les modèles d'étude de l'environnement mécanique	104
2.3. Les forces de cisaillement	107
3. Signalisation.....	108
3.1. Actomyosine et MKL1	108
3.2. Voie Hippo et YAP/TAZ	109
3.3. Les intégrines.....	109
3.4. Canaux mécanosensibles.....	110
OBJECTIFS DE LA THESE	113
RESULTATS DU TRAVAIL DE THESE	119
DISCUSSION GENERALE	197
ANNEXES.....	209
BIBLIOGRAPHIE.....	249

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mise en place de l'hématopoïèse chez l'Homme et la souris au court du développement embryonnaire.	27
Figure 2 : Localisation de la moelle hématopoïétique chez l'adulte.	28
Figure 3 : Architecture du système vasculaire de la moelle osseuse.....	30
Figure 4 : Représentation schématique et simplifiée de la moelle osseuse.....	32
Figure 5: Schématisation des éléments influençant la rigidité structurelle du microenvironnement médullaire.	40
Figure 6 : Echelle d'élasticité de différents tissus.....	42
Figure 7: Différentes techniques de mesure des propriétés mécaniques d'un échantillon biologique.	45
Figure 8 : Techniques utilisées par Jansen et al. pour caractériser la moelle osseuse porcine.	46
Figure 9 : Histologie de la moelle à différents stades de myélofibrose.....	49
Figure 10 : Hématopoïèse et engagement mégacaryocytaire.	53
Figure 11 : Les voies biaisées de la mégacaryopoïèse.....	54
Figure 12 : L'endomitose lors de la mégacaryopoïèse.	57
Figure 13 : Biogenèse et développement du réseau de membrane interne (DMS).....	60
Figure 14 : Caractéristiques d'un mégacaryocyte mature <i>in situ</i>	61
Figure 15 : Stades de maturation des mégacaryocytes.....	63
Figure 16 : Voie de signalisation de la thrombopoïétine.	64
Figure 17 : Cytokines et facteurs de transcription régulant la mégacaryopoïèse.	65
Figure 18 : Structure des proplaquettes <i>in vitro</i>	70
Figure 19 : Etapes successives de la thrombopoïèse <i>in situ</i> et rôle du cytosquelette.	75
Figure 20 : Travaux fondateurs du domaine de la mécanobiologie par Engler et al.....	82
Figure 21 : Signaux mécaniques environnementaux, mécanoréception et mécanotransduction. ...	84
Figure 22 : Structure et mécanismes d'activation du canal Piezo 1.....	89
Figure 23 : Canaux TRPV4 et TRPV2.	93
Figure 24 : Représentation schématique des acteurs intracellulaires impliqués dans la mécanotransduction <i>via</i> le complexe LINC.....	97
Figure 25 : Signalisation des facteurs de transcription YAP et TAZ.	100
Figure 26 : Signalisation du facteur de transcription MKL1.	102
Figure 27 : Modèles tridimensionnels pour la culture de cellules hématopoïétiques.	106

Table récapitulative des gènes mutés identifiés dans les thrombopénies héréditaires

« Supplementary table 1: Gene mutated in inherited thrombocytopenia »

Issu de la revue bibliographique : Boscher et al. 2020. "Blood Platelet Formation at a Glance." Journal of cell science

« Three-Dimensional Culture in a Methylcellulose-Based Hydrogel to Study the Impact of Stiffness on Megakaryocyte Differentiation »

Alicia Aguilar, Julie Boscher, Fabien Pertuy, Christian Gachet, Catherine Léon

Methods in Molecular Biology book series (MIMB, volume 1812). Platelets and Megakaryocytes pp 139-153 2018;1812:139-153. doi: 10.1007/978-1-4939-8585-2_9.

Chapitre méthodologique

« Combined deficiency of RAB32 and RAB38 in the mouse mimics Hermansky-Pudlak syndrome and critically impairs thrombosis »

Alicia Aguilar, Josiane Weber, Julie Boscher, Monique Freund, Catherine Ziessel, Anita Eckly, Stéphanie Magnenat, Catherine Bourdon, Béatrice Hechler, Pierre H Mangin, Christian Gachet, François Lanza, Catherine Léon

Blood Advances. 2019 Aug 13;3(15):2368-2380. doi: 10.1182/bloodadvances.2019031286.

Article scientifique

LISTE DES ABREVIATIONS

5-FU	5-Fluorouracile
AFM	Microscopie à force atomique
AGM	Aorte, Gonades et Mésonéphron
aGPCR	Récepteurs d'adhésion couplés aux protéines G
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMR	micro-rhéologie active par pinces optiques / optical tweezers active microrheology
Angptl-3	Angiopoïétine-3
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Protéines morphogéniques osseuses
CALR	Calréticuline
CCL5	Chemokine C-C motif ligand 5
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CMP	Progéniteur myéloïde commun
cPPT	Proplaquette de culture
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CTTN	Cortactine
DMS	Réseau de membrane interne / Demarcation Membrane System
E	Module de Young / module d'élasticité
EDA	Extra domain A
EPO	Erythropoïétine
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes / Fibroblast Growth Factor
FLI-1	Friend Leukemia Interaction 1
G'	Module élastique
G''	Module visqueux
GAG	Glycosaminoglycane
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GMP	Progéniteur granulocytaire - monocytaire
hMSC	human Mesenchymal Stem Cell
HUVEC	Cellule endothéliale de veine de cordon ombilical
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukine
JAK2	Kinase Janus 2
KO	Knock out
LATS	LArge Tumor Suppressor
LATS	LArge Tumor Suppressor kinase
LINC	Linker of Nucleus and Cytoskeleton
LRO	Lysosome related organelle
LT-CSH	Cellule souche hématopoïétique à long terme
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MC	Méthylcellulose
MEC	Matrice extracellulaire
MEP	Progéniteur érythro- mégacaryocytaire

MK	Mégacaryocyte
MKL1	Megakaryoblastic leukemia 1
MO	Moelle osseuse
MPL	Myeloproliferative leukemia
MPP	Progéniteur multipotent
MSC	Cellule stromale mésenchymateuse
MST	Mammalian STE20-like protein kinase
Nesprin	Nuclear Envelope SPectrIN repeat
NF-E2	Nuclear factor, erythroid 2
NK	Natural killer
NMP	Néoplasme myéloprolifératif
nPPT	Proplaquette native
Pa	Pascal (unité de mesure)
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PPT	Proplaquette
PTI	Purpura thrombopénique immunologique
PV	Polycythemia vera
PZ	Zone périphérique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène / reactive oxygen species
S1P	Sphingosine-1 phosphate
SCF	Stem Cell Factor
SDF	Facteur dérivé des cellules stromales / Stromal Derived Factor
SL-MkP	Stem-like megakaryocyte-committed progenitors
Sp-PA	Splanchnopleure para-aortique
SRF	Serum Response Factor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STM	Scanning Tunneling Microscope
TAZ	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TE	Thrombocythémie essentielle
TEAD	Transcriptional Enhancer factor Domain
TPO	Thrombopoïétine
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
TSP	Thrombospondine
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
vWF	Facteur von Willebrand
YAP	Yes-associated protein

PREAMBULE

Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital pour notre organisme. Elles sont nécessaires au maintien de l'intégrité vasculaire et à la prévention des hémorragies. Les patients ayant une diminution du nombre de plaquettes suite à un traumatisme, une chimiothérapie ou souffrant d'une anomalie plaquettaire (thrombopénie, thrombopathie), présentent des risques élevés d'hémorragies pouvant nécessiter des transfusions. Les plaquettes sont produites par les mégacaryocytes (MK), cellules issues de la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse (MO). A l'heure actuelle, même s'il est possible de cultiver les MK *in vitro*, la différenciation des progéniteurs mégacaryocytaires, appelée mégacaryopoïèse, n'est pas optimale et le rendement de production de plaquettes reste faible. Il est admis, depuis une dizaine d'années, que la rigidité du milieu influence le comportement cellulaire et peut notamment agir sur la différenciation des cellules souches. Ces phénomènes mécanobiologiques sont restés très peu étudiés dans le contexte de la différenciation mégacaryocytaire et dans l'hématopoïèse en général. De récents travaux du laboratoire ont mis en évidence que la culture de progéniteurs hématopoïétiques *in vitro*, dans un milieu tridimensionnel confiné de rigidité comparable à celle de la moelle, favorise une meilleure production de plaquettes.

Ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier les mécanismes mis en œuvre par les MK pour s'adapter à des changements de contraintes mécaniques. Le travail portait plus spécifiquement sur la perte de confinement qui a lieu lors de l'émission des proplaquettes, de fines extensions cytoplasmiques émises par les MK dans la lumière des vaisseaux sinusoides, hors du stroma médullaire. Les travaux réalisés ont permis de mettre en avant une différence de mécanisme de formation des proplaquettes entre les conditions *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, mon travail a mis en évidence un rôle majeur du calcium extracellulaire dans le phénomène de formation des proplaquettes. Les résultats obtenus permettent de conclure de l'implication des canaux TRPV4 et TRPV2 ainsi que des récepteurs Piezo 1 et 2 dans la thrombopoïèse. Les perspectives de ce projet sont fondamentales par la meilleure compréhension des processus physiologiques de la formation des plaquettes. A plus long terme, une meilleure compréhension des mécanismes de formation des plaquettes pourra permettre d'améliorer la production de plaquettes *in vitro* à grande échelle.

Cette introduction bibliographique est divisée en trois grandes parties. La première partie décrit la moelle hématopoïétique en tant qu'environnement complexe et contraint. La deuxième partie traite de la différenciation des MK jusqu'à la formation des plaquettes, en passant par la maturation des MK et l'élongation des proplaquettes. Enfin la troisième et dernière partie porte sur la mécanobiologie qui est d'abord abordée de façon générale puis développée spécifiquement dans le contexte mégacaryocytaire.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La moelle osseuse hématopoïétique : un milieu complexe

L'hématopoïèse est le processus physiologique de formation et de renouvellement permanent des cellules sanguines et des plaquettes sanguines. La mise en place du système hématopoïétique est un processus complexe qui débute au cours du développement embryonnaire et fait intervenir plusieurs régions de l'organisme selon une cinétique précise, **Figure 1**. En effet, chez l'individu adulte c'est dans la MO que l'hématopoïèse se déroule. En revanche, au cours du développement embryonnaire, elle émerge dans d'autres lieux.

A. La mise en place du système hématopoïétique au cours du développement

1. L'hématopoïèse primitive

Chez l'Homme comme chez la souris, l'hématopoïèse dite primaire ou primitive débute de façon extra-embryonnaire dans le **sac vitellin**. Les premières cellules hématopoïétiques y sont produites dès la 3^{ème} semaine de développement embryonnaire chez l'Homme (Julien, El Omar, and Tavian 2016) et dès le 7^{ème} jour de développement embryonnaire (E7) chez la souris, **Figure 1** (M. A. S. Moore and Metcalf 1970). Le sac vitellin permet essentiellement la production de précurseurs érythroïdes primitifs puis de précurseurs myélo-érythroïdes qui sont ensuite acheminés vers le foie foetal pour y compléter leur maturation (Mikkola and Orkin 2006; Palis et al. 1999). De petits MK immatures apparaissent également dans le sac vitellin entre E8.5 et E10 (Matsumura and Sasaki 1989; Potts et al. 2014). De grosses plaquettes très réticulées sont détectées dans la circulation sanguine embryonnaire à partir de E10.5 provenant vraisemblablement des progéniteurs mégacaryocytaires du sac vitellin (Tober et al. 2007). Contrairement à l'idée que le sac vitellin était le seul site d'hématopoïèse durant le développement embryonnaire, des travaux réalisés dès la fin des années 90 ont permis d'identifier des régions intra-embryonnaires très précoces. L'hématopoïèse émerge dans la **splanchnopleure para-aortique** (Sp-Pa) puis dans sa région dérivée de l'aorte dorsale dite de l'AGM (Aorte, Gonades et Mésonéphron).

2. L'hématopoïèse définitive

Chez la souris, des progéniteurs érythroïdes-myéloïdes apparaissent dans la région de l'**AGM** à E9 (Julien, El Omar, and Tavian 2016; Medvinsky et al. 1993). Ce site hématopoïétique semble bien

plus actif que le sac vitellin, avec notamment la présence de cellules capables de reconstituer toutes les lignées hématopoïétiques après transplantation (Cumano et al. 2001). La greffe de cellules de l'AGM à des souris adultes irradiées permet en effet la restauration totale et fonctionnelle du système hématopoïétique (A. M. Müller et al. 1994). Ce sont les premières cellules souches hématopoïétiques (CSH) à long terme (LT-CSH), des cellules ayant la capacité d'autorenouveau et de différenciation en tous les lignages hématopoïétiques. C'est l'émergence de ces cellules qui marque le début de l'hématopoïèse dite définitive.

Un possible rôle **du placenta** comme site hématopoïétique lors du développement embryonnaire est encore débattu aujourd'hui. L'activité des CSH du placenta émergerait à E10.5, rapidement après celle de la région de l'AGM (Gekas et al. 2005). Les CSH présentes dans le placenta possèderaient les capacités des progéniteurs hématopoïétiques multipotents adultes. Cependant, la génération de CSH *de-novo* dans cet organe n'a pas été prouvée expérimentalement et le placenta apparaît plutôt comme un organe hématopoïétique transitoire avec une fonction de " niche " spécialisée pour soutenir le développement de CSH exogènes (Julien, El Omar, and Tavian 2016).

Le foie foetal ne produit pas de CSH par lui-même mais les collecte *via* la circulation sanguine. Dès E9.5 des cellules hématopoïétiques provenant du sac vitellin, puis (vers E13.5) des CSH provenant de l'AGM, colonisent le foie qui constitue alors l'organe majeur de l'hématopoïèse embryonnaire au sein duquel les CSH se multiplient et se différencient, jusqu'à ce que s'établisse l'hématopoïèse médullaire, **Figure 1** (Mikkola and Orkin 2006). A E12, des MK peuvent être observés dans le foie foetal (Matsumura and Sasaki 1989). Autour de E16, la population de CSH fœtales atteint un plateau puis diminue, ce qui coïncide avec l'étape de colonisation de la MO par les CSH (Ema and Nakauchi 2000; Mikkola and Orkin 2006).

3. La moelle hématopoïétique

C'est la mise en place du squelette et de sa vascularisation qui vont permettre le dépôt de progéniteurs et de cellules souches au sein de la moelle afin de former la **moelle hématopoïétique**, qui sera le lieu définitif de l'hématopoïèse adulte, **Figure 1**. A E17, les CSH ont colonisé le tissu médullaire. Une fois logées dans le tissu médullaire, il est suggéré que les CSH opèreraient un basculement, passant d'un comportement prolifératif à un état quiescent, notamment par l'action de signaux provenant des cellules osseuses. Coşkun *et al.* ont observé à l'aide d'embryons de souris mutantes, Osterix-null (*Osx*^{-/-}) dépourvues d'ostéoblastes, que ce défaut dans le microenvironnement médullaire impacte négativement la génération et le maintien des LT-CSH (Coşkun et al. 2014).

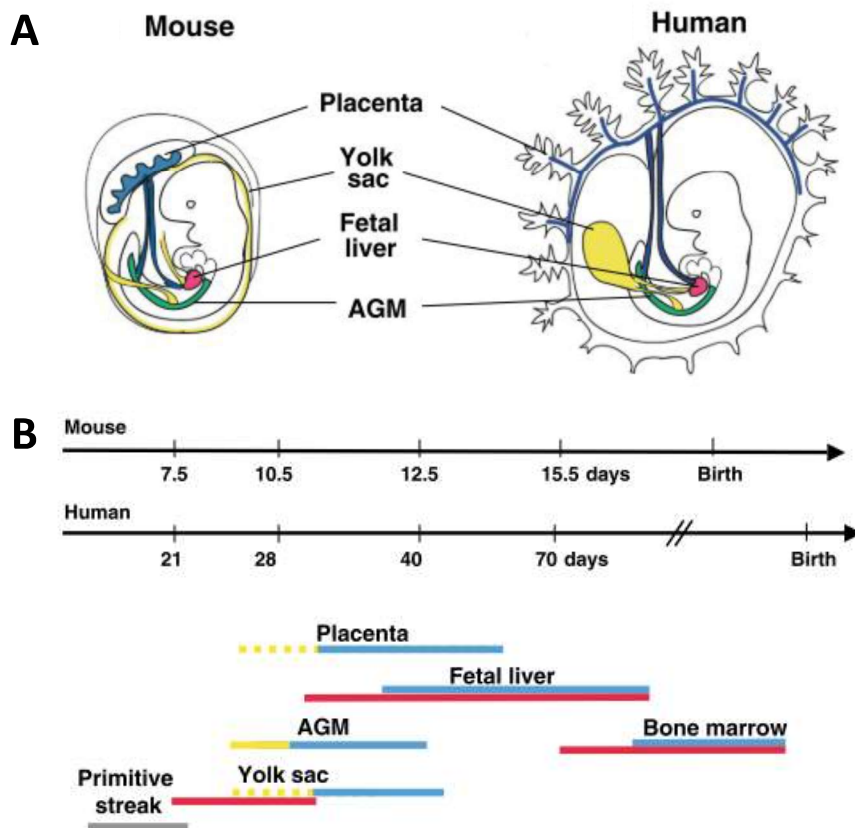


Figure 1 : Mise en place de l'hématopoïèse chez l'Homme et la souris au court du développement embryonnaire. A. Illustration d'un embryon murin et Humain, montrant les organes hématopoïétiques à 11 jours et 5 semaines de gestation respectivement (en jaune, le sac vitellin ; en vert, l'aorte dorsale ; en rouge, le foie fœtal ; en bleu, les vaisseaux ombilicaux et vascularisation fœtale dans le placenta). AGM, région aorte-gonade-mésonephron. B. Les âges embryonnaires puis post-natals auxquels les sites hématopoïétiques de la souris et de l'Homme sont actifs. Les barres grises représentent le mésoderme ; les rouges, la différenciation hématopoïétique active ; les jaunes, la genèse des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les bleues indiquent la présence de CSH fonctionnelles de type adulte (Schémas Mikkola and Orkin 2006).

B. Le tissu hématopoïétique adulte

Chez l'Homme, la moelle hématopoïétique, également appelée moelle rouge, est très active chez les enfants et se retrouve dans la plupart des os plats, courts et longs. Le tissu hématopoïétique évolue au fur et à mesure du temps et la moelle hématopoïétique, qui à la fin du développement

embryonnaire constitue la quasi-totalité du tissu médullaire, se change progressivement en moelle non-hématopoïétique dite jaune, principalement constituée de cellules adipeuses (Hartsock et al. 1965). Cette transition démarre juste avant la naissance, au niveau des phalanges terminales puis se poursuit dans les os longs proximaux (Kricun 1985). A 25 ans, la moelle jaune représente entre 50 et 70% du tissu médullaire et cette proportion continue d'augmenter avec l'âge (Hardouin, Rharass, and Lucas 2016). Cette moelle jaune constitue tout de même un tissu de réserve pour l'hématopoïèse puisque qu'elle peut être reconvertie en moelle rouge sous certaines conditions de stress (Kricun 1985). Ainsi, chez l'Homme adulte, le tissu hématopoïétique représente environ un quart de la moelle totale et est restreint aux os spongieux, courts et plats (côtes, crâne, os du bassin, sternum). Les os longs sont divisés en trois régions ; la diaphyse, partie centrale longue et creuse, les épiphyses aux deux extrémités, et les métaphyses qui désignent la partie à la jonction entre la diaphyse et l'épiphyse. Chez l'homme, la moelle hématopoïétique est également active dans l'os trabéculaire des épiphyses des os longs (fémur et humérus) **Figure 2** (Agool et al. 2011; Gurevitch, Slavin, and Feldman 2007).

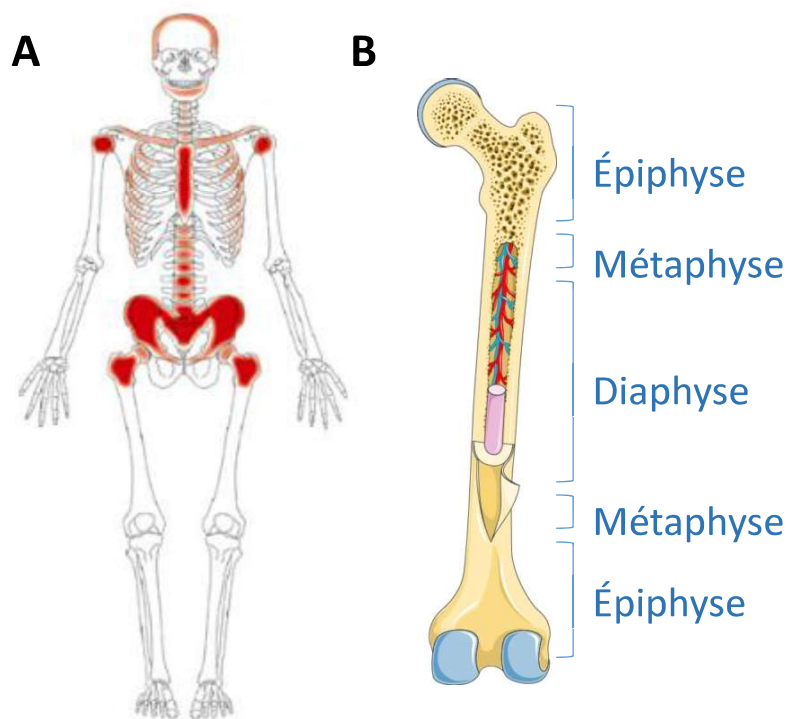


Figure 2 : Localisation de la moelle hématopoïétique chez l'adulte. A. Chez l'Homme adulte la moelle hématopoïétique est principalement localisée dans les os spongieux, courts et plats que sont les côtes, le crâne, les os du bassin et le sternum (Schéma Agool et al. 2011). B. Structure de l'os long divisé en trois régions : la diaphyse au centre puis les métaphyses et enfin les épiphyses, constituées d'os trabéculaire, aux extrémités.

Dans cette thèse, les travaux ont été réalisés à l'aide du modèle murin. L'utilisation de ce modèle animal, pour ce type de travail, se justifie par une grande similarité fonctionnelle sur le plan hématopoïétique entre Homme et souris (Tavian and Péault 2005). Il existe toutefois des différences notamment concernant la localisation du tissu hématopoïétique. La régression du territoire de la moelle hématopoïétique avec l'âge observée chez l'Homme se produit également chez les rongeurs mais dans une moindre mesure et avec une cinétique plus lente (Hardouin, Rharass, and Lucas 2016). Chez des rats de deux mois, 80% du tissu médullaire est constitué de moelle hématopoïétique. Pour des animaux de 2 ans, la proportion reste élevée, à hauteur de 66,5% (Cline and Maronpot 1985). On retrouve donc, chez des individus adultes, une moelle hématopoïétique active dans les os plats tels que le sternum, les côtes ou la crête iliaque mais également dans les cavités centrales des os longs tels que le fémur, le tibia ou l'humérus. C'est la raison pour laquelle de la moelle provenant de fémurs et de tibias de souris jeunes (de 7 à 12 semaines) a été utilisée dans ce travail pour isoler des MK et progéniteurs mégacaryocytaires.

C. La structure et la composition de la moelle hématopoïétique

La MO hématopoïétique est un tissu complexe et très dynamique du fait de sa forte activité cellulaire. En effet, la MO hématopoïétique est en renouvellement constant, produisant sans cesse une quantité importante de cellules sanguines. On peut également parler de tissu complexe car il présente une organisation tridimensionnelle spécifique et est constitué d'une grande diversité de composants aussi bien cellulaires que protéiques et physiques ; autant de facteurs qui vont influencer le comportement des cellules qui le composent. Afin d'introduire les bases de notre étude sur le rôle de l'environnement mécanobiologique dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse, cette partie aborde de manière générale la composition de la MO en détaillant les différents types cellulaires présents, y compris le réseau vasculaire ainsi que la matrice extracellulaire (MEC). Puis, avant de détailler plus spécifiquement les caractéristiques mécaniques de la MO, je présenterai quelques techniques possibles pour les mesurer.

1. La vascularisation de la moelle osseuse

La MO est un environnement très vascularisé. Cela apparaît logique si l'on considère que la MO hématopoïétique est le lieu de production de tous les types cellulaires sanguins. Ainsi, il est nécessaire que toutes les cellules sanguines, une fois mures, puissent rejoindre le système sanguin

facilement pour accomplir leur rôle dans la circulation sanguine et/ou être distribuées vers leur lieu d'action. Les MK qui sont les cellules d'intérêt de ce travail, doivent étendre des prolongements cytoplasmiques à travers la paroi des vaisseaux afin de permettre la libération de plaquettes dans la circulation. Ce phénomène est décrit dans la partie III.D.4. Le système vasculaire forme ainsi un véritable maillage au travers de toute la MO. Il existe une organisation particulière du système vasculaire dans la MO qui est commune aux os longs. Ce réseau est hiérarchisé et constitué de plusieurs types de vaisseaux différents qui ensemble permettent une vascularisation fonctionnelle de la moelle.

1.1. L'organisation du système vasculaire de la moelle osseuse

La MO est desservie par de nombreux vaisseaux sanguins de différentes tailles qui y pénètrent à travers l'os cortical par des canaux nutritifs (De Bruyn, Breen, and Thomas 1970). Le sang est distribué du centre de la moelle et de l'artère centrale, vers la périphérie par le réseau artériel. Des artères proviennent également du périoste pour irriguer l'os compact avant d'entrer dans la cavité médullaire. Elles se ramifient et donnent naissance à de petites artères. Certaines artères fusionnent avec l'artère centrale, d'autres se ramifient en artérioles. Les artérioles, que l'on retrouve majoritairement près de la région endostéale (Kunisaki et al. 2013), s'anastomosent avec des sinusoides veineux, qui eux-mêmes se connectent ensuite à la veine nourricière centrale (Asghar et al. 2020; Birbrair and Frenette 2016; Travlos 2006). Ces capillaires sinusoides sont les voies de sortie principales pour les cellules hématopoïétiques de la moelle, **Figure 3** (Clara-Trujillo, Ferrer, and Ribelles 2020; Grüneboom et al. 2019; Itkin et al. 2016; Tavassoli and Aoki 1981)

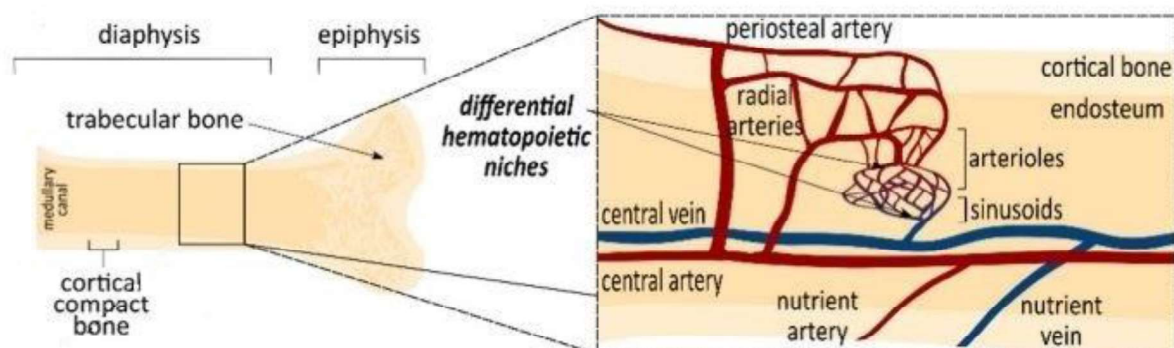


Figure 3 : Architecture du système vasculaire de la moelle osseuse. (Schéma, Clara-Trujillo, Ferrer, and Ribelles 2020).

Les différents types de vaisseaux se distinguent par leur taille, leur fonction et leur composition. Tous sont composés d'un endothélium, il s'agit d'un épithélium particulier présent au niveau de la lumière du vaisseau. L'endothélium est caractérisé par une couche de cellules endothéliales jointives et polarisées avec un pôle apical du côté de la lumière du vaisseau et un pôle basal reposant sur une lame basale. Des cellules mésenchymateuses appelées péricytes peuvent partiellement recouvrir la face externe des vaisseaux.

1.2. Le vaisseau sinusoïde médullaire

La MO présente un type de vaisseau particulier, les sinusoides qui sont une spécialisation des capillaires veineux. A la différence des sinusoides présents dans les autres organes, le revêtement endothélial des sinusoides médullaires est continu et non pas fenestré (Anita Eckly et al. 2020). Ils sont répartis uniformément dans toute la cavité de la MO et recueillent le sang provenant des artérioles. Il s'agit de petits vaisseaux d'un diamètre minimum de 50 μm . Contrairement aux autres vaisseaux dont la paroi vasculaire est composée de trois couches (l'intima, la média et l'adventice), les sinusoides sont ainsi formés d'une couche unique de cellules endothéliales et sont partiellement entourés de cellules adventitielles (Bianco 2011). Les sinusoides forment une barrière perméable et sélective permettant les échanges entre le sang et le stroma, et sont ainsi le site de transmigration de toutes les cellules sanguines matures dans la circulation (Itkin et al. 2016; Tavassoli and Aoki 1981). En effet, les leucocytes et érythrocytes transmigrent au travers de l'endothélium des sinusoides et les MK étendent des prolongements cytoplasmiques au travers de la barrière endothéliale. C'est probablement pour faciliter ces phénomènes que l'endothélium de ces vaisseaux particuliers ne possède que très peu, voire pas, de jonctions serrées (Tavassoli and Shaklai 1979). Leur lame basale est discontinue et de composition différente de celle des autres vaisseaux. Elle est formée de laminines, de chondroïtine-sulfate, et de collagène de type IV et ne contient pas d'héparan sulfate, habituellement présent au niveau des vaisseaux et assurant une certaine stabilité de la lame basale (Inoue and Osmond 2001). La structure d'un vaisseau sinusoides est ainsi relativement lâche et leur maintien est plutôt garanti par le soutien mécanique des cellules médullaires voisines. En effet, il a été observé qu'après un traitement myélosuppresseur qui entraîne une décellularisation de la moelle suite à l'apoptose des progéniteurs hématopoïétiques en division, les vaisseaux soumis à des pressions moindres de la part de l'environnement cellulaire se dilatent sous l'impact de la pression hydrostatique. Lors de la régénération du tissu, les vaisseaux, à nouveau comprimés, retrouvent leur volume normal (Kopp et al. 2005; Narayan, Juneja, and Garcia 1994; Shirota and Tavassoli 1992 et observations du laboratoire).

2. La composition cellulaire de la moelle osseuse

La MO est un tissu à forte densité cellulaire constitué de nombreux types cellulaires. En effet, on retrouve au sein de la MO les CSH ainsi que des cellules de toutes les lignées hématopoïétiques à différents stades de maturation dont des cellules immunitaires, mais également divers types de cellules dites « stromales », cellules souches mésenchymateuses, ostéoblastes, endothéliales et périvasculaires, des fibres neuronales et des adipocytes, **Figure 4** (Bunn and Aster 2017). En s'organisant localement, ces différents types cellulaires forment des microenvironnements particuliers dont la composition influence le devenir des CSH et des progéniteurs qui y résident (Birbrair and Frenette 2016; Reagan and Rosen 2016; Shen and Nilsson 2012). Ainsi, de nombreuses interactions cellulaires ont lieu au sein de la moelle et influencent le comportement des CSH et des progéniteurs. Je détaillerai ici quelques aspects du rôle des interactions dans la régulation des CSH ainsi que dans la différenciation/maturation des MK.

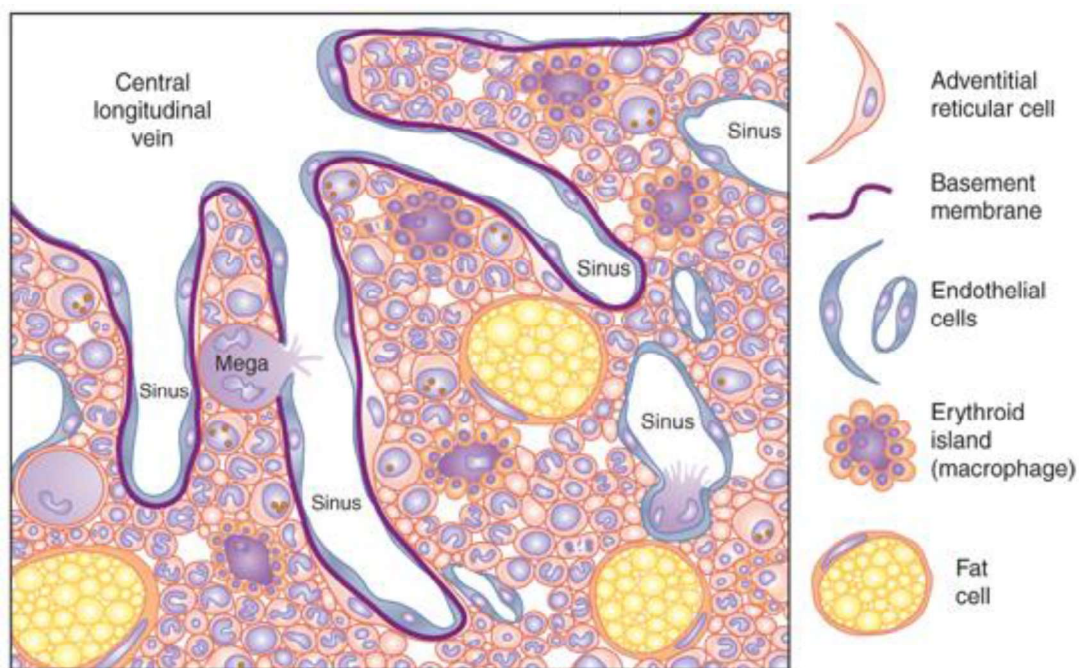


Figure 4 : Représentation schématique et simplifiée de la moelle osseuse. La moelle est le lieu de l'hématopoïèse, processus conduisant à la formation de toutes les cellules sanguines. C'est un environnement hétérogène, où de nombreux types cellulaires cohabitent et où les cellules hématopoïétiques se renouvellent sans cesse (Schéma Bunn and Aster 2017).

2.1. Les cellules stromales

Les **ostéoblastes**, localisés au niveau de l'endoste, en bordure intérieure de l'os, ont pour fonction principale d'assurer la croissance et la minéralisation du tissu osseux. Cependant, ils interagissent également avec des cellules présentes dans le milieu médullaire, notamment avec les CSH. En effet, il y a une vingtaine d'années des travaux ont démontré que la présence d'ostéoblastes dans les cultures pouvait multiplier le nombre de CSH jusqu'à quatre fois et que co-transplantés avec des CSH, les ostéoblastes favorisent la prise de la greffe (El-Badri et al. 1998; Taichman, Reilly, and Emerson 1999). Les ostéoblastes produisent un certain nombre de cytokines et facteurs de croissance importants pour la maturation et le maintien de la population des CSH. L'ostéopontine par exemple, une glycoprotéine reconnue notamment par les intégrines, régule négativement la différenciation des CSH, permettant le maintien d'une population non-différenciée, et joue un rôle dans leur localisation (Nilsson et al. 2005). On peut également mentionner l'agrin, protéoglycane exprimé par les cellules souches mésenchymateuses et les ostéoblastes, qui semble essentiel à la survie et la prolifération des CSH, son absence chez les souris knock-out (KO) entraînant l'apoptose des CSH (Mazzon et al. 2011).

La MO est un tissu très vascularisé, aussi les **cellules endothéliales** y sont présentes en nombre non négligeable. De manière indissociable du rôle de barrière physique entre le sang et le tissu environnant, l'endothélium est aussi une importante surface d'échange moléculaire et cellulaire. Les cellules endothéliales ont une fonction angiocrine importante et produisent différents facteurs (comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)-A, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF)-2, le facteur dérivé des cellules stromales (SDF-1), les angiopoïétines et la thrombospondine-1 (TSP-1), pouvant influencer de nombreux processus (Shahin Rafii, Butler, and Ding 2016). Les cellules endothéliales présentent une grande variabilité phénotypique entre les différents tissus, voire même entre différentes zones d'un même tissu selon le type de vaisseau concerné. Elles sont hétérogènes dans leur morphologie, leur expression génétique, leur composition antigénique, leur distribution et leur fonction. Au sein de la MO elles contribuent à l'établissement d'une niche hématopoïétique régulant la prolifération et la différenciation des CSH. Les cellules endothéliales médullaires ont été identifiées comme positives pour le VEGFR-2, VEGFR-3, VE-cadhérine. Elles stimulent l'autorenouveau des CSH en exprimant des facteurs solubles et membranaires, notamment les protéines morphogéniques osseuses (BMP) 2 et 4, la protéine de liaison du facteur de croissance de l'insuline (IGFBP) 2, le SDF-1, les ligands de Notch et le ligand de Kit. Chez la souris, des marqueurs différentiels artério/veineux ont été proposés (Aitsebaomo et al. 2008). En effet, l'analyse par microscopie de coupes de moelle a mis en évidence des marqueurs

spécifiques selon le type de vaisseau. Au niveau des sinusoides, les cellules endothéliales exprimeraient peu ou pas CD90, Sca-1, CD34 et le facteur von Willebrand (vWf) et possèderaient CD31, CD105 et VCAM-1 (Coutu et al. 2017). Il a été publié en 2011 que les cellules endothéliales des sinusoides expriment des niveaux élevés d'angiopoïétine-3 (Angptl-3), protéine qui se lie directement aux CSH et influence leur devenir. Les souris KO pour Angptl-3 ont moins de CSH (Zheng et al. 2011). Les cellules endothéliales artérielles sont également productrices de Stem Cell Factor (SCF), un important régulateur des CSH (Ding et al. 2012; C. Xu et al. 2018). Le microenvironnement spécifique régulant les CSH et identifié à proximité des vaisseaux sanguins dans la moelle adulte est appelé la niche périvasculaire (Asada, Takeishi, and Frenette 2017). Cette niche est elle-même hétérogène, une étude récente a montré que les CSH quiescentes résident spécifiquement à proximité des artérioles plutôt que des sinusoides, proposant l'existence de niches périvasculaires spatialement distinctes pour les CSH quiescentes et en prolifération (Kunisaki et al. 2013). Cette différence est notamment due à une variabilité des cytokines présentes dans les deux localisations (Asada et al. 2017). Dans les années 90, le groupe de Shahin Rafii a étudié le rôle des cellules endothéliales médullaires sur la mégacaryopoïèse *in vitro* à l'aide de co-cultures. Leur travail a mis en évidence l'importance de l'origine médullaire de ces cellules par rapport aux cellules HUVEC (cellules endothéliales de veine de cordon ombilical) dans leur capacité à favoriser la mégacaryopoïèse à partir de progéniteurs CD34+ (S Rafii et al. 1994; Shahin Rafii et al. 1995). De plus, les cellules endothéliales des vaisseaux sinusoides jouent un rôle clé dans la maturation des MK et dans le passage des proplaquettes dans la circulation sanguine. En effet, les chimiokines sécrétées par ces cellules permettraient la localisation des progéniteurs mégacaryocytaires à proximité de l'endothélium pour les dernières étapes de la mégacaryopoïèse (Avecilla et al. 2004).

Le stroma médullaire contient également des **cellules stromales mésenchymateuses (MSC)**. Elles représentent 0,001 à 0,01 % des cellules de la moelle (Pittenger et al. 1999). Les MSC de moelle sont des cellules multipotentes qui peuvent se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes. Ces cellules adhérentes ont une apparence fusiforme et un fort pouvoir prolifératif (Friedenstein, Gorskaja, and Kulagina 1976). L'équilibre entre la quiescence, l'autorenouvellement et la différenciation des CSH est modulé en partie par les MSC dont la présence, et notamment la synthèse de nestine, favorise le maintien de la population de CSH (Méndez-Ferrer et al. 2010). De plus, il a été montré que les MSC de moelle favorisent la production de MK émettant des proplaquettes à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ (L. Cheng et al. 2000). Un autre travail a réalisé des co-transplantations de MSC avec des cellules CD34+ dans des souris immunodéficientes et les auteurs ont observé une meilleure reprise de la mégacaryopoïèse et de la

production de plaquettes par rapport à une transplantation de CD34+ seules (Angelopoulou et al. 2003).

On retrouve également au sein de la MO des **fibroblastes**, des **adipocytes**, des **cellules neuronales** et des **péricytes**, cellules localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des vaisseaux. Tous ces types cellulaires contribuent à constituer le microenvironnement médullaire. Les fibres nerveuses participeraient à la mobilisation et la maturation des progéniteurs immatures (S. Chen et al. 2016; Katayama et al. 2006).

2.2. Les cellules hématopoïétiques

Le stroma médullaire étant le lieu de naissance de toutes les **cellules hématopoïétiques**, celles-ci y sont bien évidemment présentes, au stade souche ou engagées dans toutes les voies de différenciation et à différents stades de maturation. Toutes participent à la constitution de la niche hématopoïétique. Le (MK), cellule d'intérêt lors de mon travail de thèse, fait partie de ces cellules hématopoïétiques issues des CSH (voir partie II.B.). Il s'agit du précurseur des plaquettes sanguines. Le MK joue un rôle indirect dans la régulation des CSH (Bruns et al. 2014). En effet, les MK contrôlent la disponibilité de la thrombopoïétine (TPO). La TPO agit sur les CSH en les maintenant dans un état quiescent et dans les environnements privés de cette glycoprotéine, les CSH augmentent leur différenciation et diminuent progressivement en nombre. C'est le cas lorsqu'une mutation entraîne un nombre très important de MK (comme chez les souris mutées pour Myb ou p300) qui utilisent toute la TPO disponible (De Graaf et al. 2010; de Graaf and Metcalf 2011). Des **cellules immunitaires** sont également présentes dans le tissu médullaire. Les **macrophages** permettraient le maintien de la population de CSH dans la MO (Chow et al. 2013).

Les rôles des interactions cellulaires au sein de la MO hématopoïétique ne sont pas tous connus à l'heure actuelle. Il est également important de considérer que, compte tenu de la complexité et diversité cellulaire du tissu, il est délicat d'attribuer des fonctions spécifiques à une interaction précise. Les études de l'impact de populations cellulaires individuelles sur les CSH se poursuivent, cependant la recherche évolue également vers une approche plus intégrée prenant en compte l'organisation anatomique et fonctionnelle des différentes populations cellulaires entre elles.

3. La matrice extracellulaire

En sus de sa diversité cellulaire, la MO est également composée d'éléments non-cellulaires : les protéines et les facteurs solubles. Cet ensemble constitue la matrice extracellulaire (MEC) (Klein 1995; Nilsson et al. 1998; Shen and Nilsson 2012). *In vivo*, la MEC exerce plusieurs rôles importants, notamment celui de support d'ancrage des cellules et entraîne des interactions à la fois chimiques et mécaniques (Kim, Turnbull, and Guimond 2011). Elle constitue également un réservoir de facteurs de croissance, et est responsable de signalisations après interaction avec les récepteurs des cellules. Tous les types cellulaires peuvent synthétiser de la MEC, mais certains produisent des éléments spécifiques. C'est cette spécificité qui est à l'origine de la variété de composition de la MEC d'un tissu à un autre et même au sein d'un seul tissu. Au sein de la MO, les cellules stromales et hématopoïétiques, dont les MK, synthétisent des protéines de la MEC (Malara et al. 2014; Zuckerman and Wicha 1983). Je détaillerai ci-après les protéines de MEC les plus exprimées dans la moelle et notamment leur rôle connu lors de leur interaction avec les MK.

3.1. *Les protéines structurales constituant la MEC médullaire*

Les protéines structurales ont la capacité de s'assembler en chaînes elles-mêmes groupées en structures plus ou moins organisées. Ces protéines forment au sein de la moelle un réseau tridimensionnel qui participe à la topographie du stroma médullaire. Au-delà de ce rôle structural, elles confèrent à la matrice ses propriétés intrinsèques, telles que sa rigidité et son élasticité. Dans certaines conditions pathologiques inflammatoires, on observe un dépôt excessif de protéines de MEC dans le tissu médullaire, entraînant le remplacement progressif du tissu sain par du tissu fibrotique pouvant aboutir à une insuffisance médullaire (voir la partie I.D.4 sur la myélofibrose). Les cellules présentes dans le stroma perçoivent et réagissent à ces paramètres mécaniques (Reilly and Engler 2010). La rigidité du réseau est déterminée par la nature des structures qui le constituent. Plus les protéines sont organisées en structure échafaudée de manière régulière et réticulée, plus la stabilité et la rigidité sont importantes. C'est le cas du collagène de type I dont la structure fasciculée est plus rigide et, par conséquent, moins extensible qu'un réseau composé en partie de fibronectine et/ou d'élastine qui lui présente une structure moins organisée donc plus lâche et plus souple (Guthold et al. 2007). Les cellules de la moelle possèdent à leur surface un grand nombre de récepteurs leur permettant de reconnaître les protéines de la MEC, pouvant alors influencer leur prolifération, différenciation, migration et maturation (Hynes 2009).

Le **collagène** est une protéine composée de trois chaînes alpha polypeptidiques associées ensemble. Il existe 28 isotypes différents de collagène, chacun possède une structure propre (Ricard-Blum 2011). Dans la MO, on retrouve majoritairement les collagènes de type I, III et IV. Le collagène de type I est principalement localisé dans l'endoste et les trabécules osseux. Le collagène III est présent dans le périoste et le stroma tout comme le collagène de type IV que l'on retrouve également en bordure des artères et vaisseaux sinusoïdes afin de garantir leur résistance et leur élasticité (Coutu et al. 2017). Outre leur localisation différentielle dans la moelle, les types de collagène ont des propriétés et des interactions cellulaires différentes. Une étude a mis en évidence, qu'en présence de collagène I, les MK ont tendance à adhérer fortement à cette matrice et à modifier leur tension intracellulaire en formant des fibres de stress composées d'actine (Sabri et al. 2004). Cette adhésion au collagène I serait favorable à la différenciation et la maturation des MK, mais entraîne une inhibition de la formation des proplaquettes par l'activation de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et de l'axe Rho/ROCK en aval (A. Balduini et al. 2008; Malara, Gruppi, Pallotta, et al. 2011; Pallotta et al. 2009; Sabri et al. 2004; Semeniak et al. 2016). En revanche, le collagène IV stimule la production de proplaquettes *via* l'activation de la voie de signalisation PI3K (Phosphoinositide-3-Kinase)/Akt (Abbonante et al. 2017). On peut émettre l'hypothèse que cette inhibition par le collagène I a pour rôle d'empêcher une émission inutile de proplaquettes au contact de l'os, riche en collagène I, et de favoriser l'extension au niveau des vaisseaux sinusoïdes, riches en collagène IV. Ces observations ont néanmoins été réalisées *in vitro*, sur des surfaces extrêmement rigides (plastique et verre) et on peut suspecter que dans ces conditions, les protéines n'ont pas la même conformation ni la même rigidité qu'*in situ*. Des données plus récentes confirment en effet que le collagène I, dans une conformation moins rigide, favoriserait également la formation des proplaquettes (voir dans le chapitre III. D. 2.1).

La **fibronectine** est une glycoprotéine centrale dans l'interaction des cellules avec la MEC et joue un rôle dans l'adhésion, la migration et la différenciation (Pankov and Yamada 2002). Elle participerait notamment à la prolifération des progéniteurs ainsi qu'à la formation des proplaquettes mais inhiberait la maturation et la polyploïdisation des MK (Malara et al. 2014; Malara, Gruppi, Rebuzzini, et al. 2011). Elle est synthétisée par les cellules hématopoïétiques ainsi que de nombreuses cellules stromales, c'est pourquoi on la retrouve au niveau de l'os, du périoste et de l'endoste et au sein du stroma ainsi que dans la membrane basale des artérioles et vaisseaux sinusoïdes (Coutu et al. 2017; Van Der Velde-Zimmermann et al. 1997). Elle est capable de lier les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ des intégrines et pourrait contribuer à l'organisation des fibrilles de collagène II et III en matrice structurée. Il a en effet été montré qu'une matrice de fibronectine préformée est essentielle pour la formation du réseau de collagène et que les intégrines liant le collagène renforcent fortement ce processus (Athanasios and Deligianni 2001; Velling et al. 2002).

3.2. Les glycoprotéines

Les glycoprotéines **laminines** sont, comme le collagène de type IV, très présentes au niveau des parois artérielles et sont retrouvées de façon discontinue autour des vaisseaux sinusoides (Coutu et al. 2017). Elles sont également abondantes dans le périoste mais cependant absentes de l'endoste (Nilsson et al. 1998). Les laminines jouent un rôle *in vitro* dans l'adhésion et la migration des progéniteurs hématopoïétiques, *via* le récepteur intégrine $\alpha 6$ (Gu et al. 2003).

Le **fibrinogène** est une glycoprotéine soluble synthétisée par les hépatocytes du foie puis libérée dans le plasma (Drury and McMaster 1929; Lowe et al. 1997). Le fibrinogène est endocyté au cours de la mégacaryopoïèse *via* son interaction avec la GPIIb-IIIa, c'est pourquoi on le retrouve au sein des MK ainsi que dans les plaquettes (Hung et al. 2012; Kieffer et al. 1991). Dans le tissu, le fibrinogène extracellulaire est présent au niveau de la paroi des sinusoides (Belloc et al. 1985; Handagama et al. 1993; De Larouzière et al. 1998; Larson and Watson 2006; Louache et al. 1991). *In vitro*, les MK adhèrent au fibrinogène *via* l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ et cette interaction semble requise pour permettre la production de proplaquettes (Schick et al. 1998). En effet, *in vitro*, les MK exposés à des antagonistes de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$, pour empêcher la liaison au fibrinogène, n'étendent pas de proplaquettes (Larson and Watson 2006). Cependant, ces données sont à modérer car *in vivo* l'absence de fibrinogène n'entraîne pas de thrombopénie majeure.

La **thrombospondine** (TSP-2) est une protéine retrouvée dans la MEC du stroma médullaire exprimée par les MK. Il semble que la captation de TSP-2 par les MK soit nécessaire à leur bonne différenciation et à la libération de plaquettes fonctionnelles (Kyriakides et al. 2003).

3.3. Les autres constituants de la MEC : protéoglycanes et glycosaminoglycanes

La MEC de la MO est également constituée de **protéoglycanes** auxquels sont attachées des chaînes latérales de glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont des sucres à longues chaînes composés de 1 à 25 000 répétitions de disaccharides (Handel et al. 2005; Klein 1995). Ces sucres forment un gel hydraté capable d'absorber la pression mais également de capter des molécules solubles comme des cytokines et des facteurs de croissance et, en les séquestrant dans la MEC, constituent un réservoir de ces protéines (Bonnans, Chou, and Werb 2014; Hynes 2009). Au sein du stroma médullaire on retrouve notamment les héparan sulfates, impliqués dans la mobilisation des CSH (di Giacomo et al. 2012; Klein 1995), et l'acide hyaluronique nécessaire au bon déroulement de l'hématopoïèse (Goncharova et al. 2012; Orly Leiva et al. 2018). Les GAG jouent un rôle important

dans le développement des MK (Tajika et al. 1996). L'acide hyaluronique semble être un inhibiteur fort de la maturation des MK et de la production de plaquettes (Petrey et al. 2016). *In vitro*, le dermatan sulfate augmente la production de proplaquettes à partir de MK stimulés à la TPO (Kashiwakura et al. 2006). Le perlécan est un héparan sulfate présent dans MO. La liaison du perlécan au récepteur G6b-B inhibe la fonction plaquettaire et mégacaryocytaire en induisant une signalisation en aval *via* les tyrosine phosphatases Shp1 et Shp2 (Vögtle et al. 2019).

D. La moelle osseuse : un environnement soumis à des contraintes mécaniques

Le stroma médullaire est un environnement multifactoriel. En plus du microenvironnement chimique, cellulaire et matriciel, les cellules de la MO sont soumises, comme dans tous les tissus de l'organisme, à des contraintes mécaniques et physiques, **Figure 5** (Psaila 2016). En effet, tous les composants de la moelle contribuent à son activité fonctionnelle mais participent également à son architecture et la MO peut être aussi caractérisée par ses propriétés physiques. Il s'agit de l'un des tissus les plus mous de l'organisme, très fortement vascularisé, logé à l'intérieur de l'os. L'os étant peu extensible à l'échelle cellulaire, les cellules sont simultanément soumises à une faible rigidité et à un fort confinement. De plus, il s'agit d'un tissu qui se renouvelle sans cesse et rapidement ce qui entraîne inévitablement des contraintes de pression des cellules les unes sur les autres. Dans la lumière des vaisseaux médullaires s'exercent également des contraintes mécaniques provoquées par le flux sanguin. Nous abordons dans cette partie l'environnement médullaire sous l'angle de la mécanobiologie.

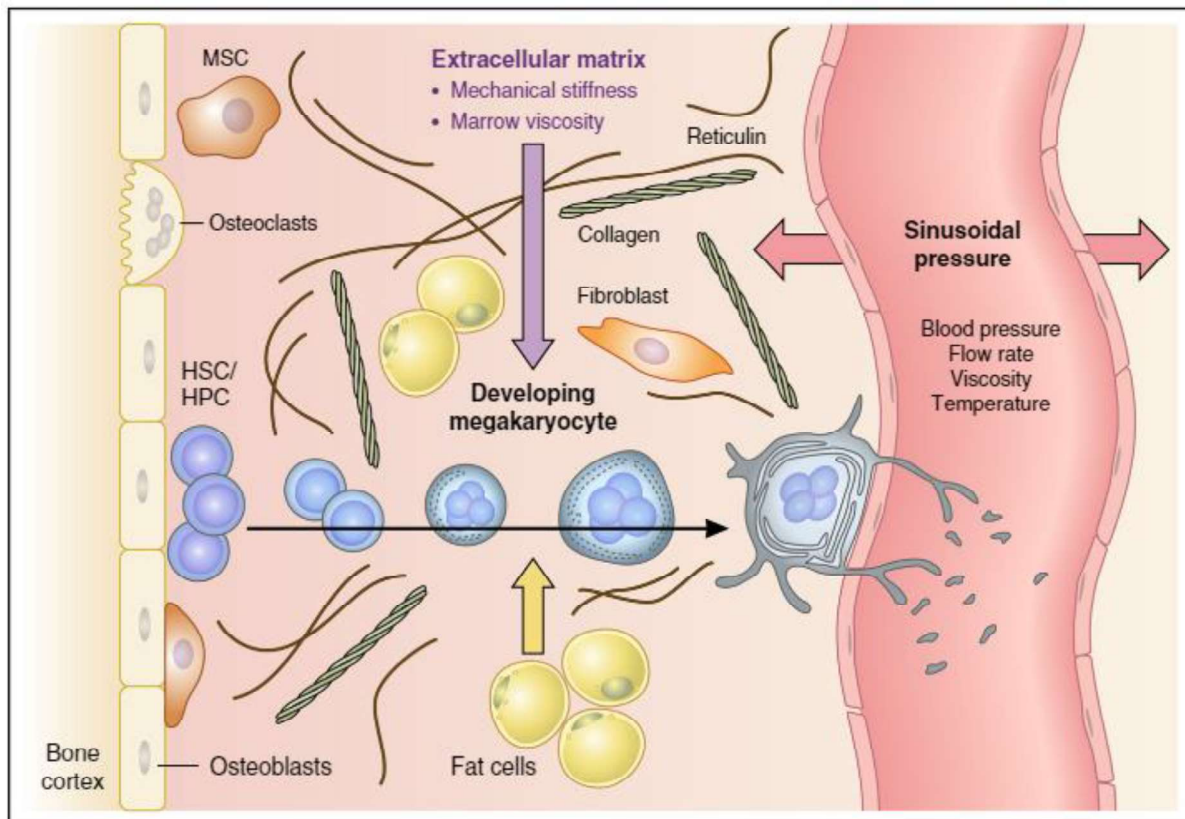


Figure 5: Schématisation des éléments influençant la rigidité structurelle du microenvironnement médullaire. Les flèches représentent les facteurs susceptibles d'influencer les forces mécaniques au sein de la moelle osseuse. Ces facteurs comprennent ; la composante cellulaire du tissu, les composants de la matrice extracellulaire (MEC) (par exemple, le collagène et la réticuline), la pression liée au confinement du tissu dans l'os et la pression hydrostatique des sinusoides, elle-même déterminée par la pression sanguine, le débit, la viscosité du sang et la température. HPC, cellule progénitrice hématopoïétique ; HSC = CSH cellule souche hématopoïétique ; MSC, cellule stromale mésenchymateuse (Schéma Psaila, 2016).

1. Les forces hémodynamiques

L'hémodynamique est l'étude des propriétés physiques de la circulation sanguine. C'est un terme général qui englobe tous les paramètres liés aux mouvements et à la circulation du sang. Au vu du volume important occupé par le système vasculaire de la moelle, et particulièrement les sinusoides, ces forces sont une composante importante du tissu médullaire. Pourtant, s'il est démontré que l'hémodynamique joue un rôle important dans l'hémostase et la thrombose (Nesbitt et al. 2006), très peu de travaux ont étudié l'impact des forces hémodynamiques au niveau de la MO. Deux articles rapportent que les contraintes de cisaillement de la paroi vasculaire activent les voies de développement qui favorisent le destin hématopoïétique et potentialisent l'implantation de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques embryonnaires provenant de la Sp-PA et de

l'AGM. (Adamo et al. 2009; Diaz et al. 2015). Dans les sinusoides, l'écoulement du sang n'est pas homogène mais complexe du fait de l'anastomose des vaisseaux, présentant des zones de flux-reflux et de stase, mais reste toujours relativement lent, allant d'une dizaine à plusieurs centaines de $\mu\text{m/s}$ (Bixel et al. 2017; Mazo and von Andrian 1999). Les contraintes de cisaillement sont également hétérogènes allant de 0 à 10 dyn/cm^2 (Bixel et al. 2017). Même en présence de ces contraintes de faible ampleur, les forces appliquées sont suffisantes pour pouvoir déclencher une signalisation intracellulaire comme cela a été montré dans des cellules endothéliales (Chao et al. 2018). Actuellement, on ne sait rien du rôle possible des forces hémodynamiques dans le comportement des cellules endothéliales de vaisseaux sinusoides et il serait intéressant d'étudier cet aspect en terme de « permissivité » à la transmigration des proplaquettes. En revanche, il semble assez clair que les forces hémodynamiques favorisent ensuite l'élongation des proplaquettes (sujet abordé plus en détail à la partie II.D.4) (Bornert et al. 2020; Chao et al. 2018).

2. Le confinement.

Une cellule est dite confinée lorsqu'elle se trouve dans un espace restreint dans les trois dimensions. C'est le cas pour toute cellule se trouvant au cœur d'un tissu, que celui-ci soit très rigide ou non. En revanche, les forces s'exerçant sur la cellule confinée sont déterminées par les propriétés du tissu. Plus spécifiquement, ce sont l'architecture de l'environnement local, notamment la MEC, et la concentration cellulaire qui modulent les pressions appliquées à la surface de la cellule. Cette dernière adapte sa morphologie en conséquence (Y. J. Liu et al. 2015).

La MO est un tissu très cellularisé, avec un renouvellement constant et des cellules en perpétuelle migration vers les vaisseaux sinusoides, générant ainsi une forte pression cellulaire. L'impact du confinement sur les cellules est directement observable. En effet, *in situ*, les cellules médullaires n'ont pas une morphologie sphérique bien régulière mais présentent plutôt un aspect facetté, témoignant des pressions que les cellules exercent les unes sur les autres. Un traitement myélosuppresseur permet de mettre en évidence l'importance du confinement sur la structure du tissu médullaire. L'exposition au 5-fluorouracile (5-FU), qui entraîne une décellularisation de la moelle et une diminution de la compression environnementale, s'accompagne de l'élargissement des vaisseaux et les cellules médullaires perdent en partie leur aspect facetté (Narayan, Juneja, and Garcia 1994; J. M. Radley and Scurfield 1979; et observations du laboratoire).

3. La rigidité du tissu

En sciences de matériaux, la rigidité représente la capacité d'un échantillon à s'opposer et résister à des déformations lorsqu'il est soumis à des sollicitations mécaniques telles que des forces de torsion ou de cisaillement. Elle est définie par le module de Young E (également appelé module d'élasticité). Des ordres de grandeur du module de Young sont connus pour différents tissus de l'organisme, **Figure 6** (Discher, Mooney, and Zandstra 2009) Il ne faut pas confondre la rigidité et la dureté qui elle définit la résistance relative qu'oppose sa surface à la pénétration d'un corps plus dur.

Comme son nom l'indique, la MO est logée au sein des os. Ainsi, bien qu'il s'agisse d'un des tissus les moins rigides de l'organisme, il subit l'influence de la rigidité de l'os qui est le tissu le plus rigide (supérieure à 100 kPa). Mesurer la rigidité de la moelle au sein de l'os s'avère particulièrement délicat. Avant de faire la revue de la littérature rapportant la mesure de rigidité de la MO, je détaillerai différentes techniques utilisées pour mesurer la rigidité d'un tissu.

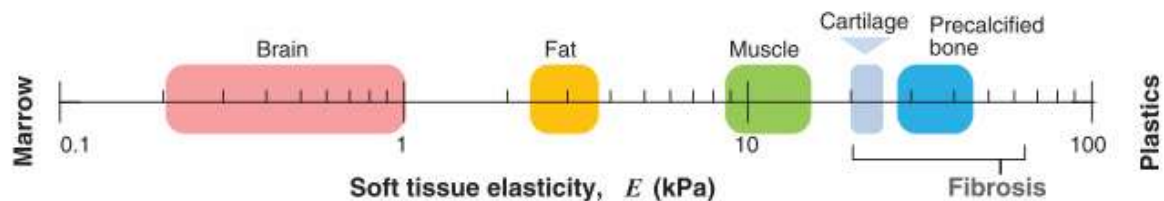


Figure 6 : Echelle d'élasticité de différents tissus. Sont placés sur l'échelle de valeur les modules élastiques de plusieurs tissus mous allant du cerveau, de la graisse et des muscles striés, au cartilage rigide et à l'os précalcifié (Schéma Discher et al. 2009).

Les techniques de mesures de la rigidité d'un tissu

Il existe différentes méthodes permettant de mesurer la rigidité d'un matériau, selon la question posée. Certaines approches permettent de préserver au maximum l'intégrité du tissu tandis que d'autres sont privilégiées pour une étude des caractéristiques physiques de l'échantillon analysé.

- **La rhéologie**, du grec *rhéō*, « couler » et *lógos*, « étude » est l'étude de l'écoulement et de la déformation d'un matériau auquel on applique une contrainte mécanique. Cette discipline a permis de remettre en question les notions de « solide élastique » et « liquide visqueux » établies, respectivement, par les lois de Hooke et de Stokes. L'élasticité est la propriété d'un

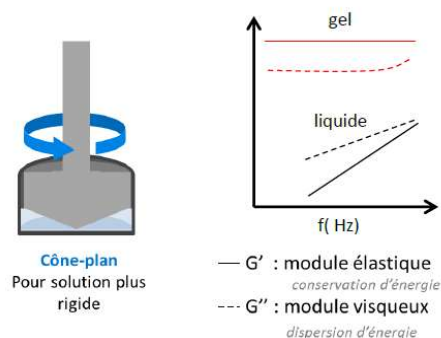
matériau déformé à revenir à sa forme d'origine. La viscosité comprend l'ensemble des phénomènes de résistance à l'écoulement d'un matériau. Anciennement, la vision adoptée était qu'un matériau se caractérise par l'une ou l'autre de ces propriétés. Il est aujourd'hui admis qu'un matériau peut avoir de façon concomitante un comportement élastique et visqueux. La rhéométrie permet la mesure de l'indicateur de rigidité appelé module de Young ; $E = \sigma/\epsilon$ (force en fonction de la surface/allongement relatif). Cette grandeur caractérise l'élasticité d'un matériau, soit sa capacité à s'opposer à la déformation et à revenir à son état initial (Guthold et al. 2007). La mesure s'effectue dans des conditions de pression, de température et de temps contrôlées. L'appareil de mesure est un rhéomètre, classiquement composé d'un réceptacle accueillant l'échantillon, la chambre, et d'un cône. Le cône s'insère dans la chambre et oscille à une fréquence donnée induisant des forces de cisaillement. L'appareil de mesure décompose la réponse viscoélastique de l'objet en deux composantes ; le module élastique de conservation de l'énergie G' et le module visqueux G'' traduisant la dispersion d'énergie. Lorsque G' est supérieure à G'' , le comportement est dominé par la composante élastique du matériau, dans le cas contraire, le caractère visqueux domine, **Figure 7 A**. Les dispositifs de rhéologie sont largement utilisés pour la caractérisation des propriétés viscoélastiques des nouveaux milieux de culture cellulaire en 3D. Une limite de la rhéométrie est qu'il s'agit d'une technique macroscopique. En effet, le tissu médullaire est analysé dans son ensemble et non pas au niveau cellulaire, et nécessite d'extraire la moelle de la cavité osseuse (Orly Leiva et al. 2018). Cette méthode est néanmoins couramment utilisée pour mesurer les paramètres viscoélastiques des hydrogels et c'est notamment celle-ci qui a initialement servi à déterminer les propriétés de l'hydrogel de méthylcellulose (MC) que j'ai utilisé dans ces travaux de thèse, initialement caractérisé au cours de l'étude menée précédemment au laboratoire (Aguilar et al. 2016).

- D'autres études utilisent une méthode **d'aspiration par micropipette** pour mesurer la rigidité. La technique consiste à placer un micro-capillaire en verre à côté du tissu et appliquer une pression sous vide pour mesurer la longueur de tissu aspirée dans la pipette, **Figure 7 B**. C'est à partir de cette longueur qu'il est possible d'obtenir une mesure de la rigidité (R. Zhao, Sider, and Simmons 2011). Cette méthode est généralement utilisée pour caractériser des tissus plutôt mous ou mesurer la déformabilité ou la force d'adhésion de cellules uniques, des cellules stromales de moelle adhérentes sur fibronectine et sur des cellules mésenchymateuses hMSC (human Mesenchymal Stem Cells) (Athanasios and Deligianni 2001; Tan et al. 2008). Elle peut être utilisée sur la MO pour mettre en évidence des différences locales de rigidité. Cependant, cette technique est confrontée aux mêmes

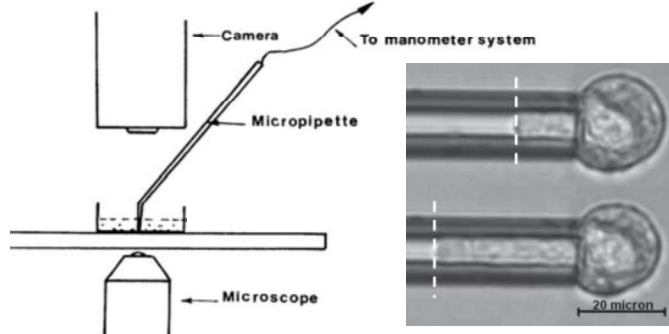
limites que la rhéométrie car elle permet d'obtenir une mesure régionale et non pas une rigidité précise au niveau cellulaire. En effet, même si elle offre la possibilité de faire des mesures sur cellule unique, les données obtenues ne donnent des informations que sur la force d'adhésion de la cellule.

- Une autre méthode pour mesurer la rigidité est la **micro-rhéologie active par pinces optiques**, optical tweezers active microrheology (AMR) (Ashkin et al. 1986). Cette technique mesure et analyse les mouvements d'une particule micrométrique, appelée le traceur, placée dans l'échantillon. Un faisceau laser hautement focalisé fait office de pince optique pour appliquer des forces sur ce traceur dont la trajectoire va correspondre à la réaction mécanique de l'échantillon étudié. L'analyse de la réaction du traceur permet d'établir une relation contrainte/déformation et d'en extraire les propriétés mécaniques de l'échantillon, **Figure 7 C**, (McGloin 2006).
- Dans les années 1980 les chercheurs Gerd Binnig et Heinrich Rohrer développent le scanning tunneling microscope (STM). Cette invention permettant de déterminer les propriétés de surfaces conductrices avec une excellente résolution leur vaut un prix Nobel de physique. Quelques années plus tard, en partant du modèle du STM, Binnig élabore la technique **d'atomic force microscopy**, la microscopie à force atomique, (AFM) (Binnig, Quate, and Gerber 1986). L'AFM permet de reconstruire une image à partir des mouvements qu'effectue une pointe sondant la surface d'un échantillon. Cette petite pointe de 10 nm appelée « tip » est fixée à l'extrémité d'un bras mobile, le cantilever. Alors que le tip balaye la surface de l'échantillon, il va monter ou descendre suivant la topographie et l'élasticité de la surface, faisant ainsi bouger le cantilever. Un laser permet la détection et l'amplification des mouvements du cantilever. Les variations de position sont ensuite analysées par ordinateur afin d'obtenir la topographie de l'échantillon ainsi qu'une carte de son élasticité, **Figure 7 D**, (Ivanovska et al. 2015). L'AFM fournit une résolution spatiale d'environ 1 nm et peut être utilisée sur cellules vivantes mais également pour mesurer la rigidité de composants de la MEC (D. J. Müller et al. 2009). Cette technique est particulièrement adaptée à la mesure de rigidité de petits échantillons ayant une rigidité faible. Elle permet de préserver les tissus fragiles qui, *via* une autre méthode, pourraient avoir tendance à se dégrader par manque de structure. De ce fait, elle semble tout indiquée pour l'analyse de la MO.

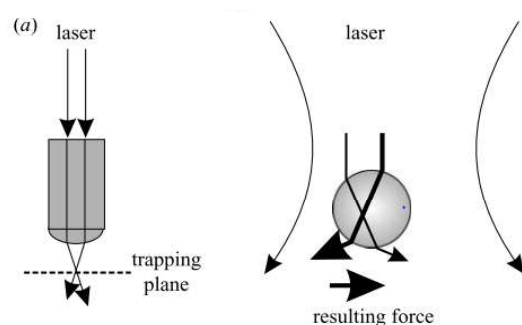
A Rhéologie



B Aspiration par micropipette



C Micro-rhéologie active par pinces



D Microscopie à force atomique

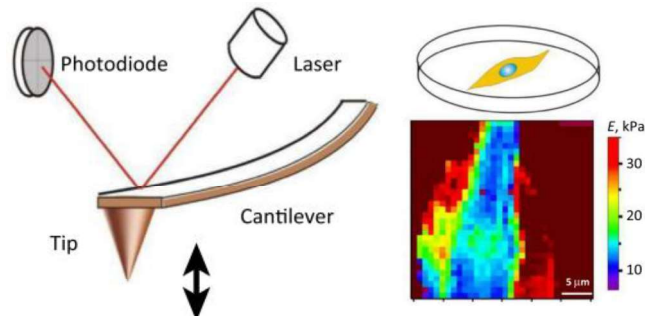


Figure 7: Différentes techniques de mesure des propriétés mécaniques d'un échantillon biologique. A. La rhéologie. L'échantillon est placé dans la chambre. Le cône oscille à une fréquence f induisant des forces de cisaillement. La réponse de l'objet est divisée en deux composantes G' et G'' . Lorsque $G' > G''$, le comportement est dominé par la composante solide. Lorsque $G'' > G'$ le comportement est dominé par le caractère visqueux (schéma Alicia Aguilar, UMR_S1255, EFS-Grand Est). B. L'aspiration par micropipette. Schéma et image d'aspiration par micropipette de cellules souches mésenchymateuses humaines au temps $t = 15$ secondes et 200 secondes après l'application de la pression d'aspiration (schéma Tan et al. 2008, images Athanassiou et Deligiann 2001) C. La micro-rhéologie active par pinces optiques. Schématisation du principe de focalisation d'une source laser sur le traceur dont la réaction donne des informations sur les propriétés mécaniques de l'échantillon (schéma McGloin 2006). D. La microscopie à force atomique. Schématisation du bras mobile (cantilever) sur lequel se trouve une pointe qui balaye l'échantillon. La pointe monte et descend suivant la topographie de l'échantillon et son élasticité (à droite, l'élasticité d'une cellule mise en culture sur un film de collagène) (figure Ivanovska et al. 2015).

Mesures de la rigidité de la moelle osseuse.

S'il n'est pas aisé de mesurer avec précision la rigidité d'un tissu *in situ*, c'est d'autant plus complexe dans le cas de la moelle hématopoïétique et très peu d'études ont tenté d'en mesurer la rigidité (Orly Leiva et al. 2018). Comme décrit précédemment, chez les grands mammifères, celle-ci

est difficile d'accès car située à l'intérieur des os trabéculaires (la diaphyse contenant essentiellement une moelle dite jaune composée en majorité d'adipocytes). Dans notre modèle d'étude qu'est la souris, le tissu hématopoïétique est également présent dans la diaphyse ce qui le rend plus facilement accessible. Cependant un autre problème persiste ; une fois extrait de l'os, le tissu ne reste pas cohésif.

En 2015, l'équipe de S. Peyton a réalisé des mesures de rigidité sur de la moelle jaune de porc en comparant différentes techniques ; la rhéologie, l'indentation (compression de l'échantillon) et la rhéologie de cavitation (à l'intérieur de l'os), **Figure 8** (Jansen et al. 2015). Pour la rhéologie de masse et l'indentation, les échantillons étudiés sont des biopsies de moelle prélevées de la cavité médullaire à partir de sections longitudinales de fémur de porcs. Pour la méthode dite de cavitation, la mesure est réalisée à l'aide d'une aiguille introduite dans des sections transversales d'os, la moelle reste ainsi logée dans l'os. Les mesures obtenues par les techniques de rhéologie et d'indentation sont semblables, celles obtenues par cavitation sont plus élevées ce qui s'explique par le fait que la moelle reste confinée dans l'os lors des tests. Ce travail a mis en évidence une hétérogénéité de la rigidité du tissu médullaire variant de 0,7 à 69 kPa. Outre les différentes méthodes de mesure et la température à laquelle elles ont été réalisées, cette hétérogénéité s'explique probablement par la distribution également hétérogène des composants de la MEC (voir la partie I.C). Il a en effet été documenté que la rigidité de la MEC augmente de façon non linéaire lorsque la concentration de collagène de type I augmente, tandis que des concentrations croissantes de collagène de type III mélangé à du collagène de type I diminuent la rigidité (Asgari et al. 2017; Licup et al. 2015).

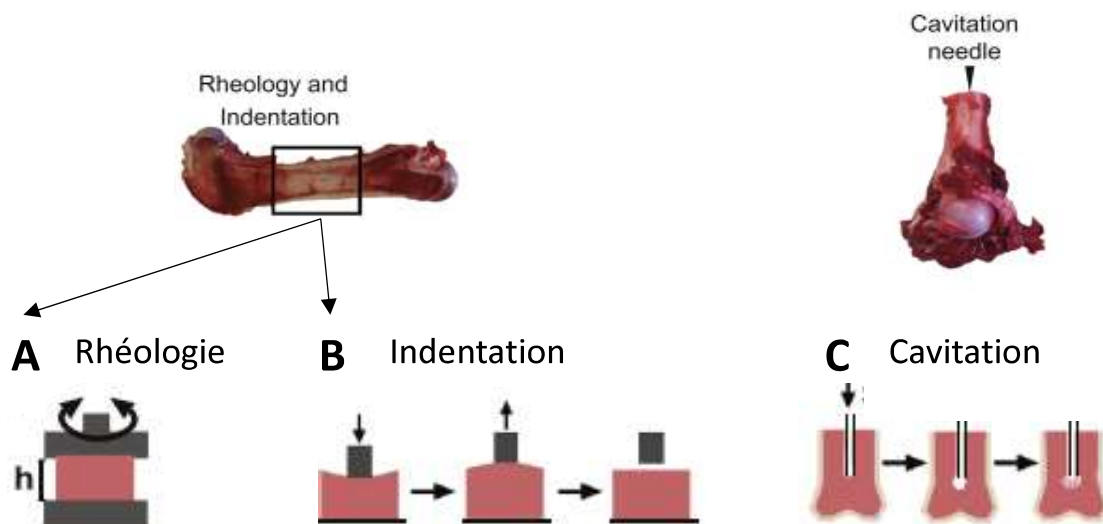


Figure 8 : Techniques utilisées par Jansen et al. pour caractériser la moelle osseuse porcine. Des échantillons ont été prélevés dans la cavité médullaire de fémurs pour la rhéologie et l'indentation (à gauche). A. Les mesures rhéologiques ont été effectuées entre deux plaques parallèles actionnées pour créer des forces de cisaillement. B. L'indentation est un test de compression axisymétrique. La section transversale horizontale du fémur a été utilisée pour la cavitation (à droite). C. La cavitation enregistre la pression lors de l'effondrement de la cavité du substrat (figure d'après Jansen et al. 2015).

Un groupe de recherche a également utilisé la propagation d'ultrasons dans de l'os spongieux de bovin pour effectuer une caractérisation physique du tissu. Les auteurs mesurent une viscosité dynamique de la moelle de $\eta = 1,5 \text{ N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ (Newton seconde par mètre carré) et une densité de $\rho = 930 \text{ kg}/\text{m}^3$ (et $1960 \text{ kg}/\text{m}^3$ pour l'os). Cette méthode n'a été que peu utilisée depuis sur ce type d'échantillon (Hosokawa and Otani 1997).

Enfin, Shin et ses collaborateurs ont mesuré la rigidité de la moelle hématopoïétique *in situ* provenant de fémurs et tibias de souris tranchés de manière longitudinale de façon à exposer la moelle tout en la préservant dans l'os. La microscopie à force atomique leur a permis d'estimer la rigidité de la moelle de la diaphyse à $0,32 \pm 0,07 \text{ kPa}$, ce qui place la moelle parmi les tissus les plus mous de l'organisme, **Figure 6** (J.-W. Shin et al. 2014).

4. Modifications des propriétés mécaniques de la moelle : deux exemples

Nous venons de détailler les propriétés mécaniques de la MO et nous verrons ci-après (partie III.D) leur importance dans la biogénèse des plaquettes. Ces contraintes physiques sont en grande partie déterminées par la composition du tissu médullaire, aussi bien cellulaire que fibrillaire. Ainsi, certaines conditions pathologiques qui entraînent ou sont causées par une perturbation et une modification de la composition du stroma médullaire auront inévitablement un retentissement sur les propriétés physiques de la moelle, et je détaillerai ci-dessous deux exemples: le cas des myélofibroses, avec dépôt de tissus fibreux, plus rigides, et le cas de certains traitements médicamenteux qui entraînent une perte des cellules dans la moelle, diminuant ainsi le confinement et vraisemblablement la rigidité locale.

- La myélofibrose

La dérégulation de la structure de la MEC avec un dépôt excessif de matrice, une activité accrue de réticulation et une dégradation défectueuse de la matrice, entraînent un remplacement progressif du tissu médullaire par du tissu fibreux, **Figure 9**. Même si la littérature ne nous donne pas de comparatif de rigidité entre une moelle normale et une moelle présentant de la myélofibrose, il est vraisemblable que la rigidité de cette dernière soit augmentée, comme c'est le cas lors des fibroses pulmonaires ou hépatiques (Georges et al. 2007; Jaffar et al. 2018; F. Liu et al. 2015). Ces phénomènes sont associés à une pathologie de la MO : la fibrose médullaire. Il existe des myélofibroses d'origine non maligne. Des troubles associés à une carence en vitamine D sont

notamment susceptibles de favoriser l'apparition d'une fibrose médullaire. L'exposition à certaines toxines, à des radiations ou à des traitements médicamenteux peuvent également entraîner une perturbation profonde du tissu médullaire et ainsi de ses propriétés mécaniques (Orly Leiva et al. 2018). Dans d'autres cas, la myélofibrose résulte d'un néoplasme myéloprolifératif (NMP). Ce terme regroupe les hémopathies malignes issues des CSH entraînant une augmentation des cellules sanguines matures dans la circulation. On distingue la myélofibrose primaire de la myélofibrose secondaire à une polycythémie vraie ou à une thrombocythémie essentielle. Dans ces trois cas, il s'agit d'une tumeur maligne hétérogène et clonale BCR-ABL1-négative qui touche les CSH. Les mutations touchent majoritairement les gènes codant pour la kinase Janus 2 JAK2 (60%) et la calréticuline CALR (25%) ou plus rarement le récepteur de la TPO MPL (myeloproliferative leukemia) (5%) (O. Leiva et al. 2017; Orly Leiva et al. 2018). Dans tous les cas, on observe une sur-activation anormale de la voie JAK/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), qui conduit notamment à une prolifération incontrôlée des MK, et une augmentation du nombre de plaquettes circulantes aux premiers stades de la maladie. On pense que les MK, anormalement stimulés, libèreraient des facteurs de croissance, notamment du TGF β 1, responsable de la stimulation de la synthèse de protéines de MEC par diverses cellules, y compris les MK eux-mêmes. La myélofibrose s'accompagne progressivement d'une altération profonde de la structure de la moelle et de la composition de la matrice dont les propriétés mécaniques se trouvent modifiées. Elle se caractérise également par une néoangiogenèse plus importante, une hypercellularité de la moelle avec un nombre accru de cellules stromales et de MK anormaux ainsi qu'une surabondance de protéines matricielles (Le Bousse-Kerdilès 2012; Gianelli et al. 2017). Ces fibres sont essentiellement des fibres de réticuline composées de collagène de type III, qui peuvent être accompagnées de fibres de collagène de type I, et de fibronectine. Il a par ailleurs été observé une expression accrue de l'isoforme EDA (extra domain A) de la fibronectine au cours de la progression de la myélofibrose (Malara et al. 2019)

L'évaluation de la gravité de la fibrose est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé et se fait par un système de gradation basé, entre autre, sur la présence de mutation JAK2, CALR et/ou MPL, la prolifération mégacaryocytaire, la quantité de fibres de réticuline, leur réticulation et la présence de faisceaux de collagène, **Figure 9** (Barbui et al. 2018; Gianelli et al. 2012; Thiele and Kvasnicka 2007). A des stades avancés, la myélofibrose s'accompagne souvent d'une hématopoïèse extramédullaire et d'une splénomégalie. La fibrose médullaire est également observée dans d'autres hémopathies malignes, telles que la leucémie myéloïde aiguë, la leucémie lymphocytaire aiguë, le syndrome myélodysplasique et la leucémie myéloïde chronique.

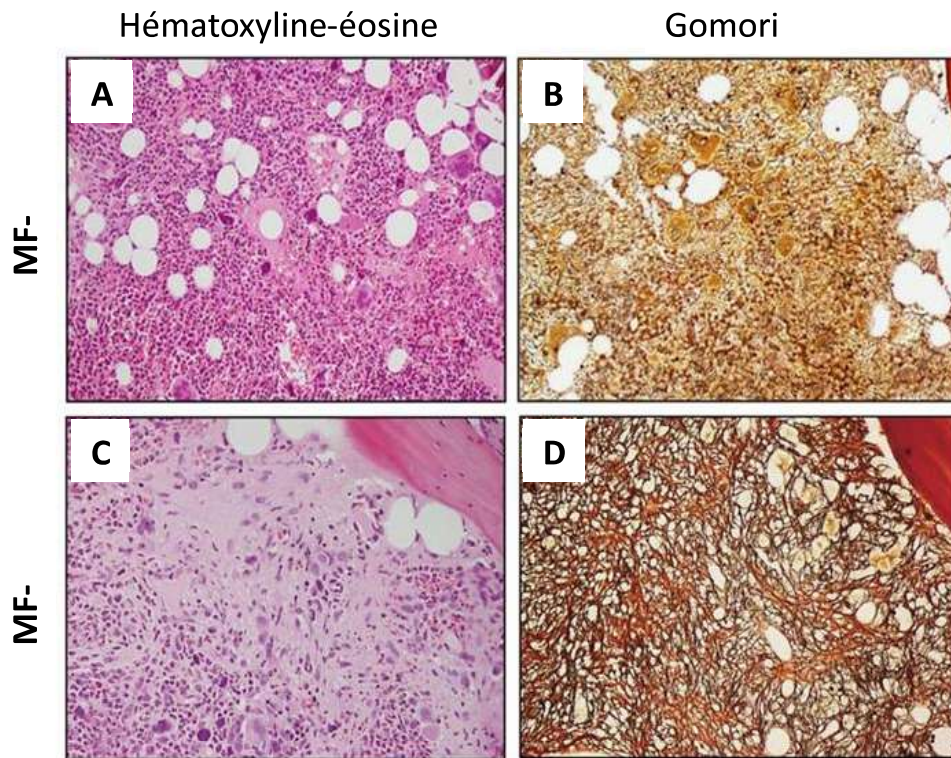


Figure 9 : Histologie de la moelle à différents stades de myélofibrose. A gauche, un marquage hématoxyline-éosine, à droite, la technique Gomori d'imprégnation à l'argent permettant de mettre en évidence les fibres réticulaires. On remarque une augmentation de la densité et du maillage des fibres de réticuline ainsi qu'un épaississement des faisceaux de collagène entre le stade MF-0 (myélofibrose pré-fibrotique A. et B.) et MF-3 (myélofibrose de stade 3 C. et D.) (images, Gianelli et al. 2012).

- Les agents myélosuppresseurs

Des altérations importantes de la composition et de la structure du stroma médullaire peuvent également être provoquées par l'administration de certains traitements pharmacologiques, notamment certains traitements chimiothérapeutiques anti-cancéreux ayant des effets dits myélosuppresseurs, ou les traitements à visée myélosuppressive préalables à une greffe de CSH.

L'administration d'agents pharmacologiques dits antiméitotiques agit en bloquant la mitose des cellules en division notamment les cellules cancéreuses. C'est le cas pour le 5-FU qui en bloquant l'activité de la thymidylate synthase stoppe l'activité métabolique des cellules en division et entraîne leur mort par apoptose. Cela permet donc un ciblage et une élimination des cellules cancéreuses mais impacte également les cellules saines en division, notamment les cellules de la MO. Une exposition au 5-FU provoque ainsi de nombreux effets secondaires délétères dont la suppression des progéniteurs prolifératifs qui se manifeste par une décellularisation progressive de la moelle après que les cellules matures, non prolifératives, aient transmigré dans la circulation (J. M. Radley and

Scurfield 1979). Par la suite, les CSH quiescentes, qui sont épargnées par ce traitement, entrent massivement en cycle et permettent le repeuplement médullaire par la différenciation en progéniteurs et engagement dans les différents lignages. Au début de la phase de re-cellularisation, on observe une modification du microenvironnement médullaire. En effet, le repeuplement du tissu s'accompagne d'une l'augmentation transitoire de la quantité de protéines de matrice telles que le collagène IV, la laminine et la fibronectine (Kuter et al. 2007). L'exposition au 5-FU remodèle donc la composition et la structure de la MO modifiant inévitablement les contraintes mécaniques qui s'exercent sur les cellules.

Ainsi, comprendre comment les cellules médullaires, et notamment les MK, réagissent et répondent aux forces mécaniques de l'environnement est non seulement important pour la compréhension de la mégacaryopoïèse à l'état homéostatique mais également lors de conditions pathologiques où ces forces sont modifiées.

II. La mégacaryocytopoïèse et la biogénèse des plaquettes

Les plaquettes sont produites par les MK, eux-mêmes provenant de la différenciation des CSH au cours de la mégacaryocytopoïèse. La mégacaryocytopoïèse est l'une des branches de l'hématopoïèse, le processus physiologique qui assure la production et le renouvellement de toutes les cellules sanguines.

A. L'hématopoïèse

1. Les cellules souches hématopoïétiques

Toutes les cellules sanguines de la lignée hématopoïétique dérivent des CSH qui sont dites multipotentes, présentes au sein de la MO hématopoïétique. Elles ont comme caractéristique spécifique la capacité d'autorenouveaulement (Keller and Snodgrass 1990). L'autorenouveaulement se définit par la possibilité de se diviser en deux cellules filles dont au moins l'une reste indifférenciée et garde les mêmes propriétés que la cellule mère. Ce phénomène est appelé division asymétrique. Tandis que la division symétrique a pour résultat deux cellules filles identiques, la division asymétrique des CSH génère une cellule souche et un progéniteur orienté (Beckmann et al. 2007; Brummendorf et al. 1998). Les CSH peuvent ainsi se différencier tout en maintenant leur nombre.

C'est en 1961 que sont réalisés les premiers travaux mettant en évidence la présence de CSH. L'injection de cellules de MO à des souris préalablement irradiées a permis à l'équipe de Till et McCulloch d'identifier les cellules de la MO capables de reconstituer le système hématopoïétique (Till and McCulloch 1961). De nombreuses études ayant fait suite à ces travaux ont permis de mieux discriminer phénotypiquement la population de CSH chez la souris (Goodell et al. 1996; Spangrude, Heimfeld, and Weissman 1988). Actuellement, la population de CSH murines est définie par le phénotype : Lin⁻ Sca-1+c-kit+CD48-CD150+ (lin⁻ étant négatif pour : CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD11b, Ter119 et CD41) (Bryder, Rossi, and Weissman 2006; Kiel et al. 2005). Chez l'Homme, elle est caractérisée par le phénotype suivant : CD45+CD34+CD38-CD45RA-CD90+CD49f+CD71-BAH1- (Notta, Zandi, Takayama, Dobson, Gan, Wilson, Kaufmann, McLeod, et al. 2016).

Au sein de la MO, les CSH sont en interaction permanente avec le stroma. Les types cellulaires à proximité, les cytokines et facteurs de croissance sécrétés ou encore les contraintes

physiques de leur environnement local sont autant de sources de stimuli qui pris ensemble constituent la niche hématopoïétique - c'est à dire le microenvironnement qui permet le maintien des CSH - et influencent le devenir des CSH, à savoir leur quiescence ou leur différenciation en progéniteurs qui s'orientent progressivement vers un lignage spécifique (Lee-Thedieck and Spatz 2014; Ogawa 1993; Schofield 1978).

2. Les différents devenirs de la cellule souche hématopoïétique

L'hématopoïèse regroupe l'ensemble des voies de différenciation menant des CSH à tous les types cellulaires sanguins et aux plaquettes (Metcalf, Johnson, and Mandel 1979; Spangrude, Heimfeld, and Weissman 1988). Au cours de la différenciation hématopoïétique dite classique, sous l'influence des différents facteurs environnementaux, les CSH réalisent des divisions asymétriques afin de se différencier progressivement en progéniteurs dont la capacité d'autorenouveau diminue progressivement tout comme le potentiel de différenciation qui devient de plus en plus restreint et orienté vers un lignage spécifique, **Figure 10** (Avecilla et al. 2004; Lee-Thedieck and Spatz 2014; Nilsson et al. 2005). La première étape du processus est la différenciation en progéniteurs multipotents, les MPP, dont le potentiel de prolifération et de différenciation reste large mais dont la capacité d'autorenouveau est perdue. Les MPP se différencient ensuite en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), à l'origine de la lignée lymphocytaire, ou en progéniteurs myéloïdes communs (CMP) (Akashi et al. 2000). Les CMP continuent de se différencier en progéniteurs granulocytaires - monocytaires (GMP) (à l'origine des granulocytes, monocytes et macrophages) ou en progéniteurs érythro- mégacaryocytaires (MEP). Les MEP sont à l'origine des érythrocytes et des MK qui une fois matures donneront eux-mêmes les plaquettes sanguines (L. D. Wang and Wagers 2011; Woolthuis and Park 2016).

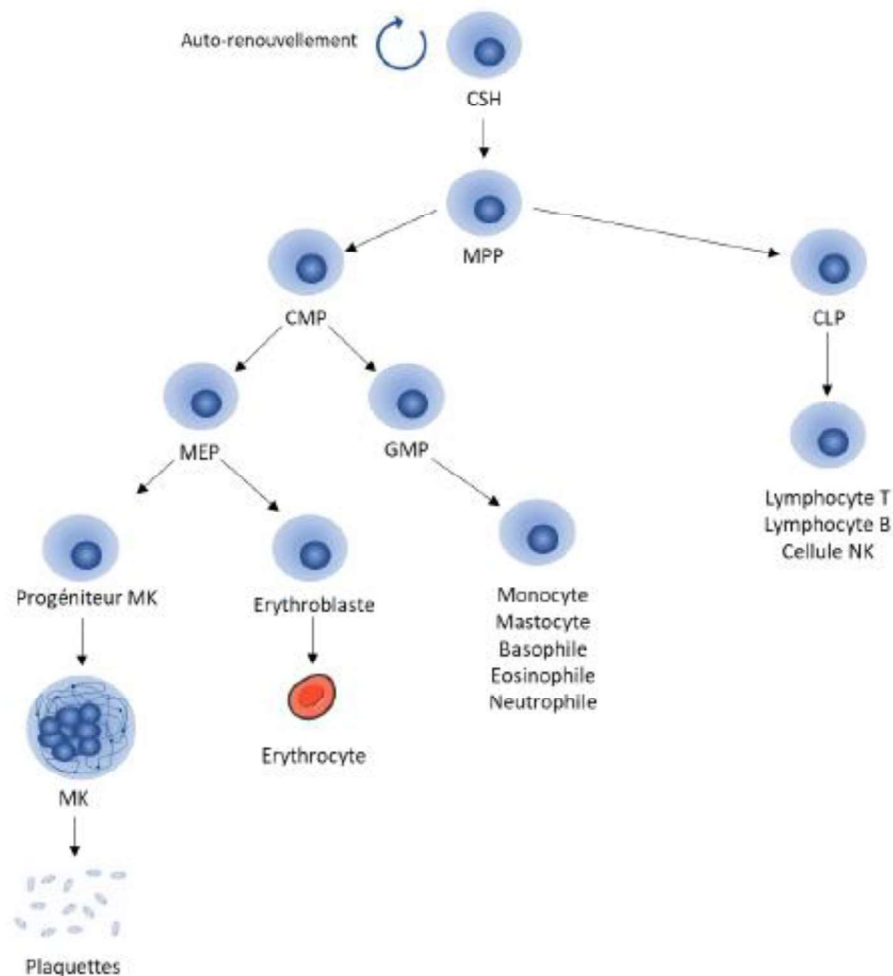


Figure 10 : Hématopoïèse et engagement mégacaryocytaire. La cellule souche hématopoïétique (CSH) est à l'origine de tous les types cellulaires sanguins y compris les plaquettes sanguines. L'hématopoïèse regroupe l'ensemble des processus menant de la CSH à une cellule hématopoïétique mature. La CSH se différencie d'abord en progéniteur multipotent (MPP). Le MPP se différencie à son tour en progéniteur commun myéloïde (CMP) ou en progéniteur commun lymphoïde (CLP). Le CLP va donner le lymphocytes B, T et les cellules natural killer (NK). Le CMP est à l'origine du progéniteur commun érythro- mégacaryocytaire (MEP) et du progéniteur commun granulocytaire monocytaire (GMP). Le GMP permet la production des monocytes, mastocytes, basophiles, éosinophiles et neutrophiles. Les MEP donnent les érythrocytes et le progéniteur mégacaryocytaire qui deviendra un mégacaryocyte (MK) mature capable de produire des plaquettes sanguines (schéma Camille Jost, UMR_S1255, EFS-Grand Est).

3. La voie alternative de la mégacaryopoïèse dite « voie biaisée »

Au cours des dix dernières années, cette vision de la différenciation ayant pour origine une population homogène de CSH a été révisée, **Figure 11** (Notta, Zandi, Takayama, Dobson, Gan, Wilson, Kaufmann, Mcleod, et al. 2016). Un certain nombre d'études, essentiellement réalisées chez la souris, ont proposé l'existence d'une voie de différenciation de la lignée myéloïde dérivant directement d'une sous-population de CSH et MPP. En 2009, Huang & Cantor ont suggéré que les progéniteurs mégacaryocytaires pourraient se différencier directement de la CSH car les deux populations cellulaires partagent des caractéristiques telles que des récepteurs de surface, des facteurs de transcription et des voies de signalisation spécifiques à la lignée MK (H. Huang and Cantor 2009). Une sous-population de CSH exprimerait en effet l'ARNm du vWF. Cette population de CSH vWF+ serait capable de se différencier avec un biais vers la lignée mégacaryocytaire (Sanjuan-Pla et al. 2013). Une méthode de suivi précis des progéniteurs hématopoïétiques, l'analyse « single-cell » de leur devenir et des modèles expérimentaux de greffe de moelle ont confirmé la présence de certaines CSH capables de donner directement naissance à des progéniteurs mégacaryocytaires unipotents par division asymétrique, en contournant le stade MEP (Carrelha et al. 2018). Cette population cellulaire serait dépendante de la TPO car elle est réduite chez les souris déficientes pour le récepteur MPL (Nishikii, Kurita, and Chiba 2017). La prolifération et le devenir des CSH vWF+ seraient eux-mêmes régulés par les MK *via* CXCL4 (Bruns et al. 2014; Pinho et al. 2018).

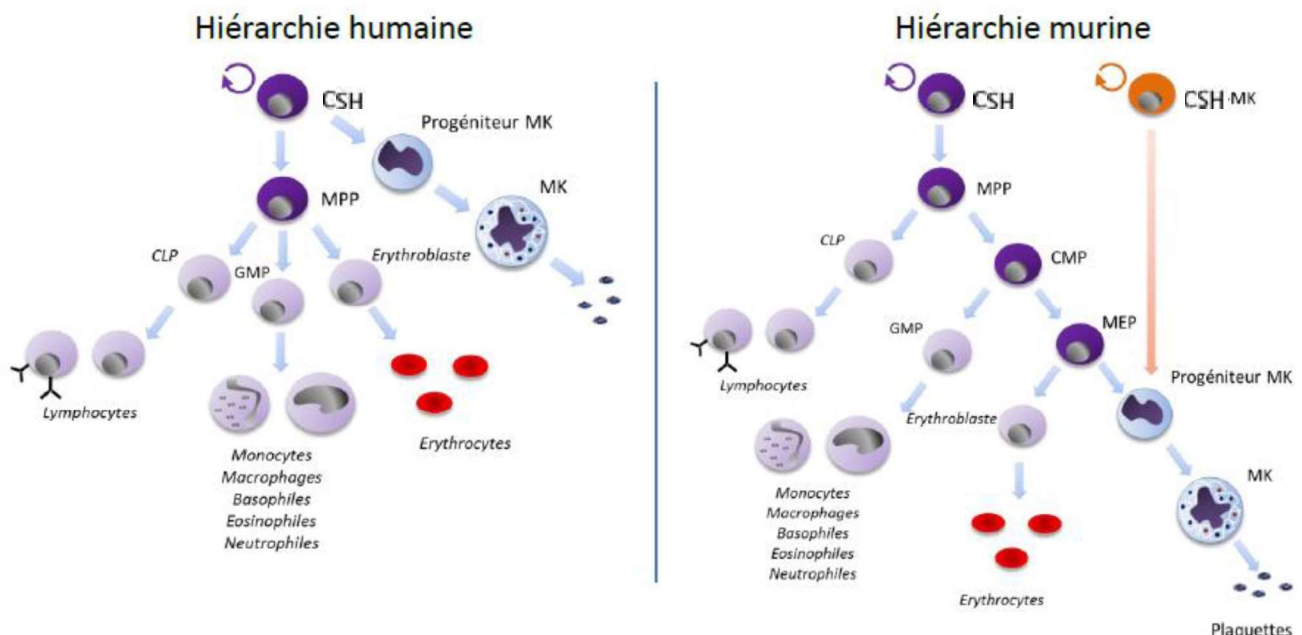


Figure 11 : Les voies biaisées de la mégacaryopoïèse. Chez l'Homme, une même CSH serait capable de générer directement un progéniteur mégacaryocytaire unipotent et un MPP qui donnera à son tour les progéniteurs unipotents des différents types cellulaires hématopoïétiques. Chez la souris, s'ajoute au schéma classique une CSH s'orientant préférentiellement vers la lignée mégacaryocytaire sans passer par des progéniteurs multipotents (schéma par Alicia Aguilar, UMR_S1255, EFS-Grand Est).

Dans ce modèle révisé de différenciation des MK, l'engagement de la lignée se fait en s'affranchissant de la hiérarchie classique des progéniteurs (Yamamoto et al. 2013). Le mécanisme permettant l'orientation de la lignée des CSH en conditions basales / physiologiques peut être différent de celui qui est actif en cas d'hématopoïèse induite par stress inflammatoire. Haas et coll. suggèrent que le compartiment des HSC contient des stem-like megakaryocyte-committed progenitors (SL-MkP) ; des cellules souches ayant les capacités de progéniteurs mégacaryocytaires. A l'état homéostatique, les SL-MkP sont maintenues quiescentes mais se trouvent activées par une signalisation inflammatoire afin de reconstituer rapidement le pool plaquettaire lors d'un stress inflammatoire (Haas et al. 2015). Shin *et al.* ont cependant émis l'idée que ce biais vers la lignée mégacaryocytaire pourrait également se produire dans des conditions basales. Ils suggèrent que l'équilibre entre autorenouveau classique des CSH et engagement vers la lignée mégacaryocytaire est déterminé par l'expression de c-Kit (J. Y. Shin et al. 2014). Bien que des preuves solides existent chez la souris, la présence d'une population de CSH biaisées vers la lignée mégacaryocytaire n'a pas été démontrée de manière convaincante chez l'Homme. En outre, l'expression des marqueurs mégacaryocytaires dans les CSH humaines semble être plus faible que dans les homologues murins. Ainsi, il convient de rester prudent quant à la présence et au rôle de cette voie biaisée chez l'Homme, et de ne pas transposer directement les observations de la souris à l'Homme tant que de nouvelles données ne sont pas disponibles.

B. Le mégacaryocyte mature : produit final de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse (ou mégacaryocytopoïèse) caractérise les processus de différenciation et de maturation aboutissant à la formation des MK à partir des CSH. Une fois engagés vers la lignée MK, les progéniteurs MK subissent un processus de maturation au cours duquel ils acquièrent les composants des futures plaquettes ainsi que les propriétés nécessaires à leur production et libération. Le processus de maturation est notamment caractérisé par des endomitoses successives entraînant une polyploïdie, un agrandissement conséquent du cytoplasme, une forte activité de synthèse protéique ainsi que le développement d'un réseau de membranes internes.

1. Les caractéristiques du mégacaryocyte mature

1.1. Endomitoses et polyploïdie

Au cours de sa maturation, le progéniteur mégacaryocytaire subit des endomitoses successives jusqu'à devenir une cellule géante polyploïde de 8 à 64N voire même jusqu'à 128N (Chang et al.

2007). L'endomitose se caractérise par un déroulement classique de la mitose jusqu'à la fin de l'anaphase. En revanche, la cytokinèse est défectueuse et l'abscission est absente (Ravid et al. 2002; Vitrat et al. 1998). Ainsi, une cellule engagée dans cette mitose particulière ne donne pas naissance à deux cellules filles indépendantes mais reste intègre. Chaque cycle résulte ainsi en une augmentation du volume cellulaire et le doublement du matériel nucléaire, **Figure 12 A**. Lors d'une division cellulaire dite classique, l'étape de cytokinèse nécessite la contraction, médiée par la protéine RhoA, d'un anneau métaphasique formé par le cytosquelette d'actomyosine (Basant and Glotzer 2018). Dans les progéniteurs mégacaryocytaires, le sillon mitotique se forme mais régresse avant que la séparation des cellules filles puisse avoir lieu (Geddis et al. 2007). Il a été suggéré en 2001 que la kinase Aurora B serait dégradée au début de l'anaphase dans les MK et que cette absence serait la cause de la régression du sillon et ainsi de la polyploïdie (Kawasaki et al. 2001). Par la suite, d'autres études, ont mis en évidence l'expression et l'activité fonctionnelle d'Aurora B dans les MK en endomitose (Geddis et al. 2007; Lordier et al. 2010; Mazzi et al. 2018). L'un de ces travaux a montré que la polyploïdie peut avoir lieu sans la présence de cette kinase mais que celle-ci est importante pour la ségrégation chromosomique nécessaire à une endomitose complète (Lordier et al. 2010). La scission membranaire, médiée par l'anneau d'actomyosine, est régulée par RhoA or, lors des phases d'endomitose ayant lieu pendant la maturation des MK, l'activation et l'accumulation de RhoA est inhibée dans cette zone (Gao et al. 2012; Roy, Lordier, Mazzi, et al. 2016). C'est la diminution de l'expression des facteurs d'échange de guanine GEF-H1 et ECT2, qui inhibe l'action de RhoA dans cette zone médiane, empêchant ainsi l'abscission (Gao et al. 2012; Mazzi et al. 2018). De plus, au cours de la différenciation du MK, le facteur RUNX1 inhibe l'expression de l'isoforme IIB de la myosine. L'absence de myosine IIB et la faible activation de RhoA au niveau de l'anneau de contraction entraîne une contractilité trop faible pour que la cytokinèse aboutisse à la séparation des deux cellules filles, **Figure 12 B** (Lordier, Bluteau, et al. 2012; Pleines and Nieswandt 2016; J.-W. Shin et al. 2011).

A une étape de cytokinèse avortée s'ajoute un défaut de caryocinèse (séparation en deux noyaux distincts) (Lordier, Pan, et al. 2012; Mazzi et al. 2018). En effet, les lots de chromosomes migrent aux pôles mitotiques mais un noyau unique se reforme autour donnant l'aspect polylobé de ce dernier, **Figure 12**. La maturation du progéniteur mégacaryocytaire résulte ainsi en un MK caractérisé par sa grande taille (atteignant un diamètre de 30 à 50 μm) ainsi que par un noyau polyploïde et polylobé (Deutsch and Tomer 2006).

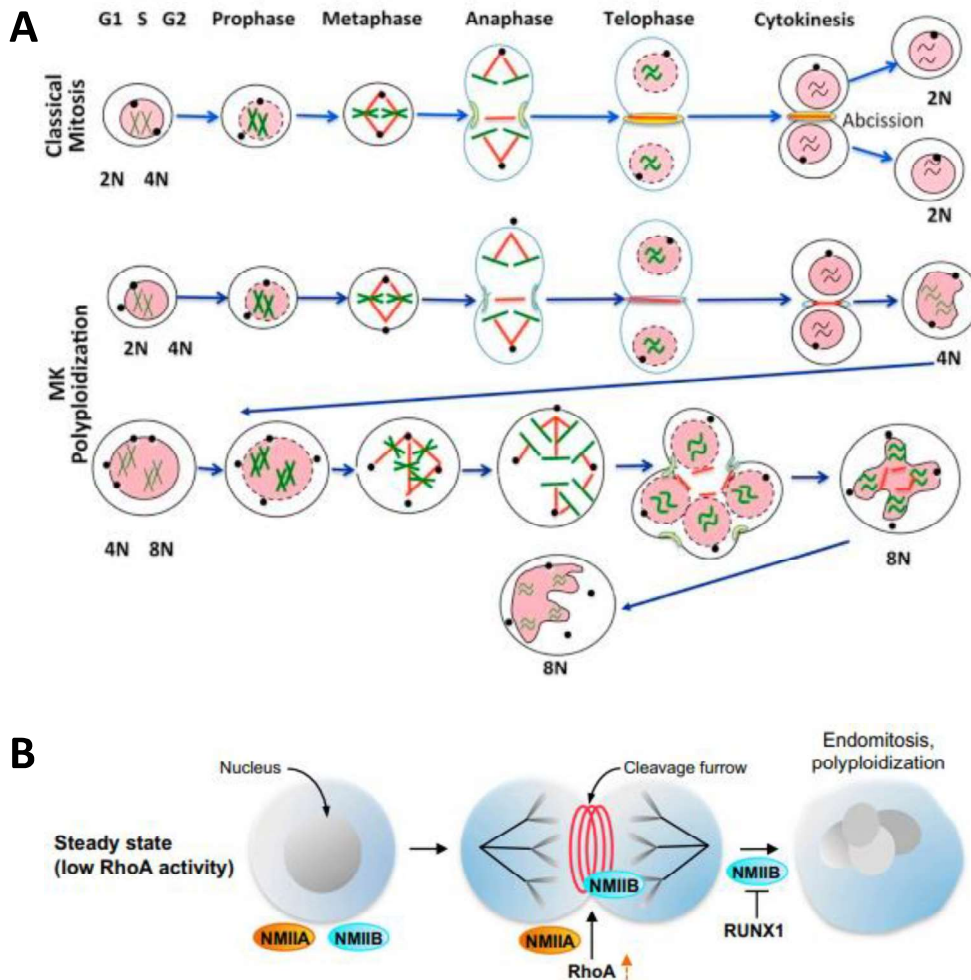


Figure 12 : L'endomitose lors de la mégacaryopoïèse. A. L'endomitose correspond à la multiplication du matériel génétique sans division cellulaire. Cela implique une modification du cycle cellulaire permettant le passage de la métaphase directement à la phase G1 sans cytokinèse complète (schéma Mazzi, Lordier et al. 2018) B. Le processus résulte d'un défaut de contraction de l'anneau d'actomyosine, dû à un faible niveau d'activation de RhoA et à l'inhibition de la myosine IIB dans cette zone. Le phénomène aboutit à un noyau polylobé caractéristique des MK matures (schéma Pleines et Nieswandt 2016). NMIIB : myosine IIB non musculaire.

Bien que la polypléidie puisse sembler être une situation particulière, cet état n'est pas spécifique des MK et est retrouvé dans d'autres types cellulaires comme par exemple les cellules hépatiques, les cellules musculaires formant des syncytiums, les trophoblastes (cellules géantes du placenta) et les ostéoclastes, cependant les mécanismes ne sont pas identiques (S. Zhang et al. 2019). Dans le cas des cellules musculaires par exemple, il est question de fusion cellulaire ; les myoblastes fusionnent pour former des fibres multi-nucléées appelées myotubes. La polypléidie est également chose fréquente dans le règne végétal.

Si la raison biologique de l'augmentation de la ploïdie n'est, à ce jour, pas clairement identifiée, on peut supposer qu'elle se justifie par la nécessité pour le MK de produire rapidement et en grandes quantités, des protéines plaquettaires ainsi que des réserves de membrane en prévision de la production de plaquettes. Des progéniteurs diploïdes provenant du sang de cordon et du sac vitellin sont capables de produire des plaquettes sanguines, bien qu'en nombre plus faible par rapport aux MK polyploïdes (Mattia et al. 2002; Potts et al. 2014). Ainsi, bien qu'elle ne soit pas indispensable à la formation des plaquettes, la polyploïdisation pourrait être un processus de formation des plaquettes plus efficace et économe en énergie, permettant notamment à l'organisme de s'adapter rapidement à des demandes aiguës de plaquettes (Vainchenker and Raslova 2020).

1.2. Forte activité protéique

Parallèlement, la maturation du MK est associée à une forte activité de synthèse de protéines et de lipides. Au cours de leur développement, les précurseurs des MK commencent à exprimer des récepteurs plaquettaires spécifiques parmi lesquels l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$, intervenant dans l'agrégation des plaquettes, ainsi que le complexe GPIb-IX-V et la GPVI, qui eux participent à l'adhésion et l'activation plaquettaire (A. T. Nurden 2014; A. T. Nurden and Nurden 2014). La machinerie cellulaire s'active fortement pour permettre la biogenèse des protéines qui seront contenues dans les futurs granules des plaquettes, qui elles ne réalisent pas (ou peu) de synthèse protéique (Flaumenhaft and Sharda 2018). En effet le contenu de ces granules est primordial pour les fonctions plaquettaires hémostatiques comme non hémostatiques (angiogenèse, inflammation, immunité, cicatrisation...), c'est pourquoi il est important que ces granules soient, en grande partie, matures au moment de la formation des plaquettes. Enfin, la forte activité de synthèse protéique et lipidique permet au MK en cours de maturation de générer une quantité impressionnante de membranes. Ces membranes, constituant le réseau de membrane interne ou DMS pour Demarcation Membrane System (voir partie B 1.3), vont par la suite avoir un rôle crucial permettant au MK mature d'étendre des proplaquettes.

1.3. Le réseau de membrane interne (DMS)

Les progéniteurs MK développent progressivement un vaste réseau de membranes, le DMS, dans leur cytoplasme, **Figure 13**. Dans un MK mature le réseau de DMS est très développé, formant une véritable arborescence membranaire qui occupe une grande partie de l'espace cytoplasmique. Ces

membranes sont extrêmement importantes car elles constituent un réservoir pour les membranes des futures plaquettes (Schulze et al. 2006). *In situ*, le DMS présente une morphologie caractéristique lorsqu'il est observé en microscopie optique et surtout en microscopie électronique à transmission, semblant délimiter des espaces appelés « territoires cytoplasmiques », **Figure 14**. Chaque territoire est délimité par des doubles feuilletts membranaires, étroitement apposés (Anita Eckly et al. 2012, 2014). Le DMS est relié à la membrane plasmique et l'espace entre les feuilletts apposés communique avec le milieu extérieur (M. P. Mahaut-Smith et al. 2003). Ces territoires ont d'abord été considérés comme des plaquettes préformées prêtes à être libérées dans la circulation sanguine. On sait aujourd'hui qu'il s'agit d'une vision erronée. Celui-ci constitue une réserve de membrane plasmique nécessaire à l'alimentation membranaire des prolongements cytoplasmiques du MK tout au long de leur formation et rend possible leur élongation et est, par voie de conséquence, nécessaire pour l'extension des proplaquettes (voir partie II.D.1). La biogenèse de ce réseau membranaire débute à la surface de la cellule par invagination de la membrane plasmique, **Figure 13**. Par conséquent, les membranes du DMS présentent les mêmes marqueurs que la membrane plasmique. On retrouve notamment CD41 et CD42, marqueurs de surface plaquettaire. L'initiation de l'invagination de la membrane est régulée notamment par le complexe protéique filamine A - PACSIN2 (protein kinase C and casein kinase II substrate 2) et la protéine CIP4 (Cdc42 interacting protein 4). Ces deux protéines contiennent un domaine F-BAR leur permettant de se lier aux membranes et de favoriser les invaginations tubulaires (Begonja et al. 2015; Y. Chen et al. 2013; Chitu and Stanley 2015). La combinaison de techniques de microscopie électronique et photonique, a mis en évidence que l'alimentation du DMS se poursuivait par l'apport de membrane *via* des vésicules venant de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique, **Figure 13** (Anita Eckly et al. 2014; Ru et al. 2015). Les composants du cytosquelette jouent un rôle clé dans la mise en place et le maintien de la structure du DMS. Les membranes du DMS sont enrichies en PI-4,5-P₂, un phospholipide qui, *via* le recrutement et l'activation du complexe WASP-Arp2/3, favorise la polymérisation de l'actine (Schulze et al. 2006). Ainsi, la déstabilisation (pharmacologique ou génétique) de l'actomyosine ou de la spectrine aboutit à une perturbation du réseau (Anita Eckly et al. 2009; Patel-Hett et al. 2011; Schulze et al. 2006).

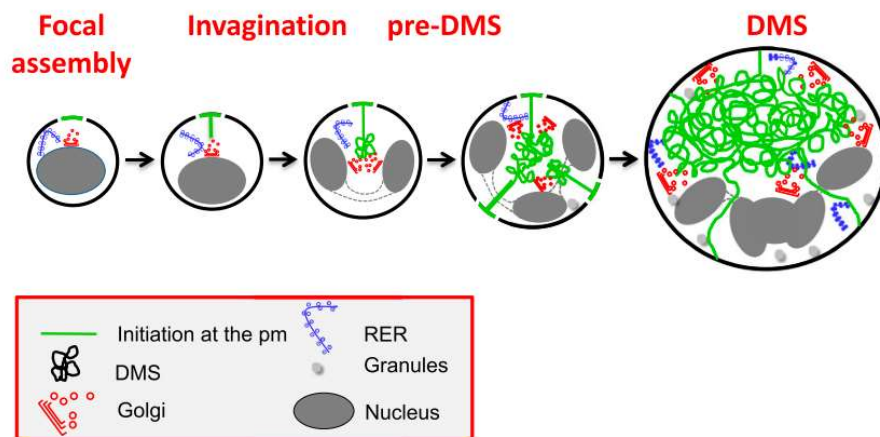


Figure 13 : Biogenèse et développement du réseau de membrane interne (DMS). La formation du DMS débute par l'apparition d'un point focal sur la membrane plasmique qui va progressivement s'invaginer vers le noyau. Au cours de la maturation des MK, une structure appelée, pré-DMS, est formée dans la région périnucléaire. D'autres invaginations se forment et le DMS s'étend dans le cytoplasme grâce à l'apport membranaire provenant de vésicules du Golgi (schéma Eckly et al., 2014). PM : membrane plasmique, RER : réticulum endoplasmique.

Des défauts d'organisation du DMS sont souvent associés à des conditions pathologiques. Les mutations ou délétions de gènes affectant la GPIb-IX, la filamine A ou les protéines régulant la dynamique de l'actine filamenteuse - dont les petites Rho GTPases – aboutissent à un DMS anormal généralement couplé à un défaut d'émission des proplaquettes et une thrombopénie (Ghalloussi, Dhenge, and Bergmeier 2019). L'inhibition de Cdc42, entraîne une désorganisation du DMS démontrant un lien fonctionnel entre dynamique de l'actine et maturation du DMS (Antkowiak et al. 2016). Dans le syndrome de Bernard-Soulier, le déficit d'expression du complexe GPIb-V-IX conduit à une structure anormale du DMS. Les membranes de celui-ci sont dilatées et les territoires cytoplasmiques plus larges, un défaut qui se traduit par une macrothrombopénie (Strassel et al. 2009). Un défaut de développement et d'organisation du DMS est également observé en cas de mutation du gène *MYH9* codant pour la myosine IIA non musculaire. Au niveau plaquettaire, la répercussion de cette condition se traduit par une macrothrombopénie – avec une diminution de 70% du compte plaquettaire - et des plaquettes présentant une distribution anormale du nombre d'organites et un défaut de leurs fonctions hémostatiques (Anita Eckly et al. 2009; Léon et al. 2007)

1.4. La zone périphérique (PZ)

On trouve en périphérie du MK une zone cytoplasmique quasi exempte d'organelles et de DMS mais riche en cytosquelette d'actine, désignée sous le terme de zone périphérique (PZ), **Figure 14**. Le rôle de la PZ n'est, à ce jour, pas précisément défini et reste encore peu étudié. On pourrait envisager la PZ comme une barrière physique prévenant la déformation du MK et la formation de proplaquettes. Il a été observé que la PZ est séparée de la zone granulaire par un réseau dense de filaments de myosine, liés à l'actine, suggérant un rôle clé de l'actomyosine dans la formation/le maintien de la PZ (Anita Eckly et al. 2009). En accord avec cette hypothèse, l'absence de myosine IIA chez les MK est associée, *in situ*, à la disparition de la PZ et à une morphologie relâchée (Anita Eckly et al. 2009). Dès les années 90, Tablin *et al.* avaient d'ailleurs proposé un modèle de formation des plaquettes en culture impliquant la rupture de la zone périphérique riche en actine pour permettre l'élongation des proplaquettes (Leven and Yee 1987; Tablin, Castro, and Leven 1990). En outre, plusieurs travaux réalisés *in vitro*, suggèrent que la déstabilisation de la PZ faciliterait la formation des proplaquettes, l'inactivation de la voie RhoA/Rho kinase/myosine IIA augmentant la formation des proplaquettes (A. Balduini et al. 2008; Chang et al. 2007; Z. Chen et al. 2007; A. Eckly et al. 2010; Tablin, Castro, and Leven 1990).

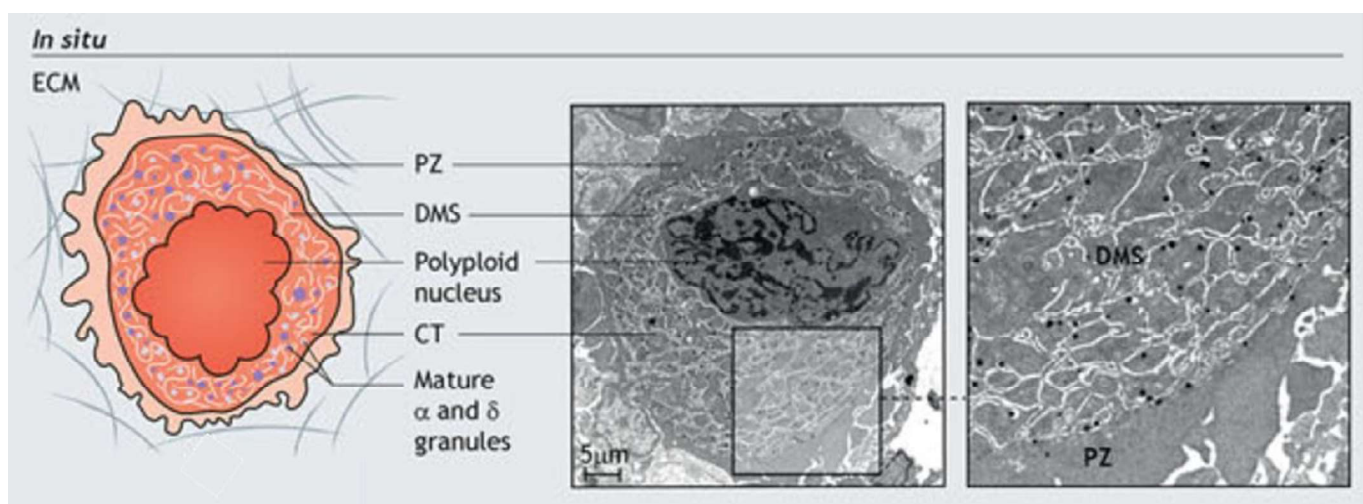


Figure 14 : Caractéristiques d'un mégacaryocyte mature *in situ*. Prise de vue en microscopie électronique à transmission d'un mégacaryocyte mature murin au sein de la moelle osseuse (échelle : 5μm). ECM pour MEC : matrice extracellulaire, CT : territoire cytoplasmique, PZ : zone périphérique, DMS : réseau de membrane interne (Figure Boscher et al., 2020).

2. La classification des mégacaryocytes selon leur degré de maturation

Le MK est une cellule rare qui ne représenterait pas plus de 0,05% de la composante cellulaire de la moelle hématopoïétique (Anita Eckly et al. 2012; Nakeff and Maat 1974) avec une densité moyenne de 9 ± 2 MK par millimètre carré de tissu médullaire chez l'Homme et 20 chez la souris (Schmitt et al. 2001).

L'observation en microscopie électronique à transmission a permis la classification des MK en trois stades suivant leur état de maturation, **Figure 15** (Anita Eckly et al. 2012; Levine, Hazzard, and Lamberg 1982). Les MK de stade I dits « mégacaryoblastes » sont les plus immatures. Ils sont de petite taille avec un diamètre compris entre 10 et 15 μm . Leur noyau, uni- ou bilobé, occupe la quasi-totalité du cytoplasme qui ne contient pas ou peu de granules et de DMS (Anita Eckly et al. 2014; Levine, Hazzard, and Lamberg 1982; Yamada 1957). Les MK de stade II, dits « promégacaryocytes », ont un diamètre compris entre 15 à 30 μm . Leur cytoplasme est pauvre en DMS mais riche en mitochondries (Anita Eckly et al. 2012). Ces cellules contiennent des granules immatures, et des MVB (multivesicular bodies), des lysosomes, un appareil de golgi et un réticulum endoplasmique très développé, nécessaire à l'importante synthèse protéique qui a lieu lors de la maturation (Bentfeld-Barker and Bainton 1982). Les MK les plus avancés dans le processus de maturation sont dits de stade III. Ce sont de très grosses cellules de diamètre supérieur à 30 μm , possédant un noyau multilobé de grande taille, un système de membranes internes très étendu remplissant quasiment tout le cytoplasme et délimitant des territoires cytoplasmiques ainsi que des granules matures spécifiques à la lignée plaquettaire (granules α et δ) et des lysosomes (Levine, Hazzard, and Lamberg 1982; Tomer 2004; Yamada 1957). Ces MK matures possèdent également une zone périphérique (PZ) (cf ci-dessus).

En terme de représentation au sein de la moelle, les MK de stade III sont majoritaires (plus de 70%), les MK de stade II représentent une proportion de 20 à 30% tandis que moins de 5% sont des MK de stade I (Anita Eckly et al. 2012).

Certains travaux font mention d'un stade IV désignant les MK formant des plaquettes (Levine, Hazzard, and Lamberg 1982; Straneva et al. 1986).

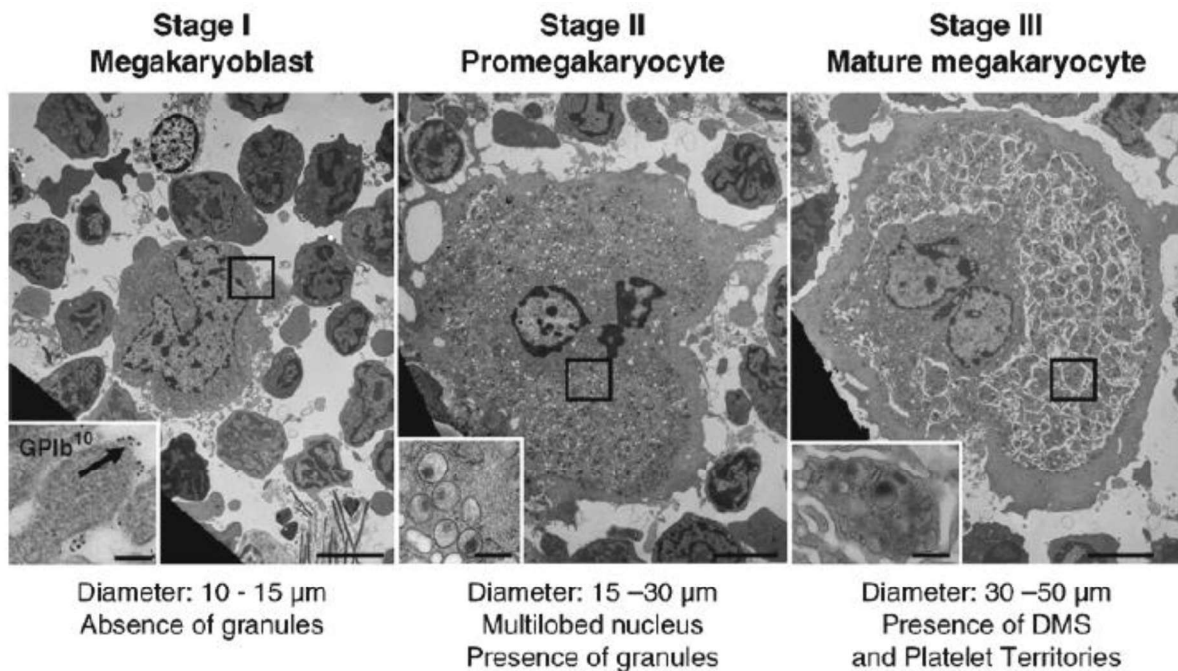


Figure 15 : Stades de maturation des mégacaryocytes. Images de microscopie électronique à transmission de mégacaryocytes à différents stades de développement. Le stade I, le mégacaryoblaste, est une cellule très indifférenciée, ne disposant que de peu de caractères morphologiques. Le stade II, le promégacaryocyte, présente un noyau multilobé et les précurseurs des granules. Enfin, le stade III correspond au mégacaryocyte mature, avec un DMS développé délimitant des territoires cytoplasmiques (échelle : 5 μm , 200nm pour les inserts) (Figure Eckly et al. 2012).

C. La mégacaryopoïèse : un processus très contrôlé

Chez un individu adulte sain, la fourchette de numération plaquettaire sanguine est relativement large, comprise entre 150 000 et 400 000 plaquettes par microlitre de sang, mais présente une surprenante stabilité au cours de la vie de chaque individu (Daly 2011). Ce nombre varie selon l'âge, le sexe ainsi que l'origine ethnique (C. L. Balduini and Noris 2014; Troussard et al. 2014). La durée de vie des plaquettes étant d'environ huit à dix jours, une production journalière de l'ordre de 10^{11} plaquettes est nécessaire pour maintenir une concentration stable et assurer le bon fonctionnement de l'organisme. Pour assurer cette production, les phénomènes de mégacaryopoïèse et de formation des plaquettes - lors d'un processus appelé thrombopoïèse - sont soumis à une régulation fine faisant intervenir différents facteurs.

1. Régulation de la mégacaryopoïèse

1.1. Régulation par les cytokines

De nombreuses cytokines interviennent dans les processus d'engagement des CSH vers la voie mégacaryocytaire et de maturation des MK. Parmi ces acteurs, la TPO est le principal régulateur physiologique de la mégacaryopoïèse (Hitchcock and Kaushansky 2014). Cette glycoprotéine est principalement synthétisée dans le foie, et dans une moindre mesure par certaines cellules stromales de la moelle et au niveau des reins. La TPO agit par le biais de la liaison à son récepteur MPL. Une fois activé par la liaison de la TPO, le MPL se dimérise et active JAK2 (Janus Kinase-2). La phosphorylation de JAK2 provoque la phosphorylation de MPL, qui entraîne par la suite le recrutement et l'activation en cascade de STAT3, PI3K et MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), **Figure 16** (Besancenot et al. 2014; Deutsch and Tomer 2006; de Graaf and Metcalf 2011; Stasi et al. 2010). Les souris déficientes pour la TPO ou MPL présentent une réduction importante de la numération plaquettaire et du nombre de MK (~80% de moins que les souris de type sauvage) ce qui confirme le rôle de la TPO comme cytokine majeure de la mégacaryopoïèse (Gurney et al. 1994; De Sauvage et al. 1996). Elle est aujourd'hui utilisée sous le nom de romiplostim pour traiter des thrombopénies (Doobaree et al. 2019; Yang et al. 2019).

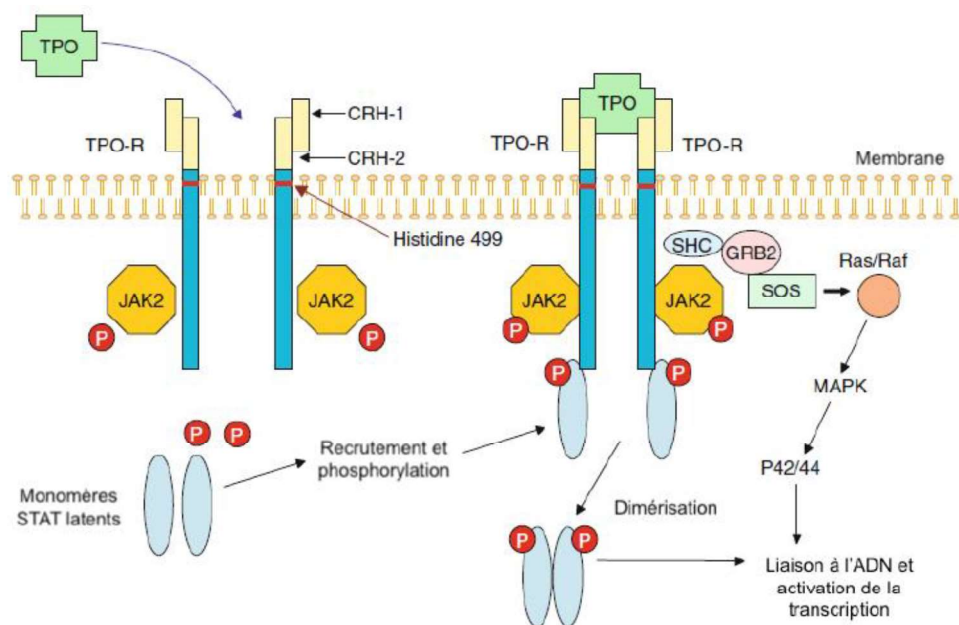


Figure 16 : Voie de signalisation de la thrombopoïétine. Lorsque la thrombopoïétine se lie à son récepteur, MPL, celui-ci s'associe avec la Janus Kinase 2 (JAK2). Les STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) sont alors recrutés et phosphorylés, puis se dimérisent avant d'être transportés vers le noyau. JAK2 est à l'origine de l'activation d'autres voies de signalisation, comme la voie des MAPK ou la voie PI3K permettant notamment la phosphorylation de promoteurs de survie et de prolifération mégacaryocytaire (Schéma d'après Stasi et al., 2010).

Malgré leur déficience, ces souris produisent tout de même des plaquettes en quantité limitée. La TPO n'est donc pas le seul facteur de régulation entrant en jeu, **Figure 17**. En effet, la TPO agit également en combinaison avec d'autres cytokines, en particulier les interleukines 3 (IL3), IL6, IL11, IL1 α , le SCF (Stem Cell Factor) et GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), le FGF et l'érythropoïétine (EPO) (Behrens and Alexander 2018; Bunting et al. 1997). Ces cytokines agissent en synergie avec la TPO pour réguler la transcription des gènes responsables de la survie et de la prolifération cellulaire ainsi que des gènes codant pour les cytokines elles-mêmes et leurs récepteurs (de Graaf and Metcalf 2011; Kaushansky 2006). Des voies indépendantes de la TPO ont également été identifiées, notamment un rôle de l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1), de CCL5 (chemokine C-C motif ligand 5) et de la tyrosyl-ARNt synthétase et de l'interleukine 1 α (IL-1 α) (S. Chen et al. 2018; Machlus et al. 2016; Nishimura et al. 2015). Cependant, les rôles respectifs de ces facteurs extracellulaires dans la mégacaryopoïèse classique comme inflammatoire restent à être clarifiés.

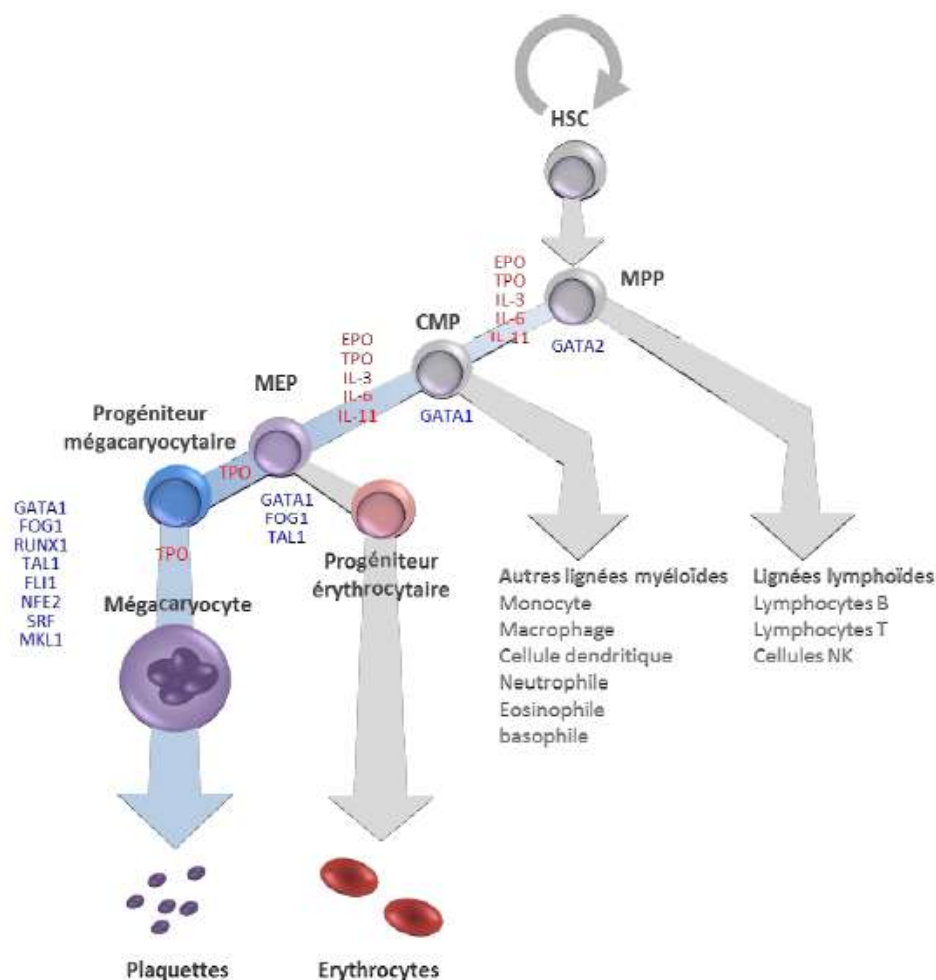


Figure 17 : Cytokines et facteurs de transcription régulant la mégacaryopoïèse. Les principales cytokines impliquées sont annotées en rouge, les facteurs de transcriptions principaux figurent en bleu (Schéma Léon et al. 2015).

1.2. Régulation par les facteurs de transcription

Le développement et la maturation des MK est également sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription, **Figure 17** (Boscher et al. 2020; Szalai, LaRue, and Watson 2006). En agissant de concert avec les cofacteurs et les modificateurs de la chromatine, les facteurs de transcription orchestrent le programme de transcription nécessaire à l'engagement et à la maturation des MK en activant ou en réprimant l'expression des gènes (Bianchi et al. 2016).

Parmi ces facteurs, **GATA1** (en interaction avec son co-facteur FOG1) est essentiel pour la différenciation érythro-mégacaryocytaire (Mancini et al. 2012). L'inactivation causée par une mutation entraîne une létalité embryonnaire chez l'Homme et la souris en raison d'une anémie sévère. Une inactivation conditionnelle dans la lignée mégacaryocytaire diminue le nombre de plaquettes de 15%, la morphologie des plaquettes est altérée et il y a une accumulation de MK immatures dans la MO (R A Shivdasani et al. 1997). L'interaction de Gata1 avec son cofacteur **FOG-1** est essentielle pour la différenciation des MK (Guo et al. 2015; Tsang et al. 1997). Le proto-oncogène **FLI-1** (Friend Leukemia Interaction 1) agit avec GATA1 pour activer des gènes spécifiques responsables de la régulation des étapes tardives de la mégacaryopoïèse (Eisbacher et al. 2003; H. Huang et al. 2009; Seth et al. 1993). Les souris FLI-1^{-/-} meurent *in utero* et présentent des MK à la morphologie anormale, avec moins de granules cytoplasmiques et des membranes du DMS désorganisées, ainsi qu'une légère diminution du nombre de MK (Ramesh A. Shivdasani 2001). Le facteur de transcription hétérodimérique **NF-E2** (nuclear factor, erythroid 2) joue un rôle clé dans les phases tardives de la mégacaryopoïèse et dans la thrombopoïèse (Lecine et al. 1998; Tijssen and Ghevaert 2013). Chez les souris inactivées pour la sous-unité P45 de NF-E2, spécifiquement dans les lignées érythroïdes, mégacaryocytaires et mastocytaires, le nombre de MK est normal mais la libération de plaquettes est considérablement affectée ce qui se reflète par un nombre de plaquettes circulantes diminué. Les plaquettes et les MK de ces souris ont une organisation anormale, notamment des MK de grande taille et des plaquettes anormalement grandes, rondes et hétérogènes avec des granules rares et non denses aux électrons. *In vitro*, aucune plaquette ne se forme (Levin et al. 1999; R A Shivdasani et al. 1995). La surexpression du facteur de transcription **RUNX1** favorise la prolifération des progéniteurs et régule négativement les derniers stades de la maturation de la MKP. Sa délétion entraîne une baisse du nombre de plaquettes et une diminution de la taille des MK (Ichikawa et al. 2004). Enfin, un autre degré de complexité dans la régulation de la MKP est apporté par certains microARN qui se trouvent sur- ou sous-exprimés lors de la mégacaryopoïèse, régulant différemment l'expression de leurs gènes cibles (H. Li et al. 2011; Raghuwanshi et al. 2019).

D. La thrombopoïèse

1. Les plaquettes sanguines : produit final de la thrombopoïèse

Lorsque les mégacaryocytes sont matures, ils sont prêts à former des plaquettes, lors du processus appelé thrombopoïèse (ou thrombocytopoïèse). Les plaquettes sanguines sont de petits éléments cellulaires du sang mesurant 2 à 5 μm de diamètre (Boneu and Cazenave 1997). C'est en 1881 qu'elles sont identifiées pour la première fois comme de nouveaux éléments du sang responsables de la formation des thrombi (Bizzozero 1882; Ribatti and Crivellato 2007). Une vingtaine d'années plus tard, J.H. Wright caractérise les plaquettes (qu'il nomme « blood plates ») comme des corps ovales de la taille d'un demi ou d'un tiers de globule rouge et propose le mégacaryocyte comme étant la cellule médullaire responsable de la production des plaquettes (J. H. Wright 1902, 1906). Contrairement aux vertébrés non-mammifères qui ont des thrombocytes nucléés à 2N (Belamarich et al. 1966; Levin 2007), les mammifères ont évolué vers des plaquettes anucléées. L'avantage biologique de cette évolution n'est pas clairement identifié. Cette particularité pourrait conférer au thrombus une résistance supérieure aux forces de cisaillement (Schmaier et al. 2011).

2. Les différentes théories de formation des plaquettes

Tandis que l'identité du MK en tant que cellule précurseur des plaquettes fut rapidement adoptée, les mécanismes et le site de libération des plaquettes *in vivo* ont longtemps fait débat et quelques controverses subsistent encore actuellement. Plusieurs modèles menant à la formation des plaquettes ont été proposés (Stenberg and Levin 1989). Parmi les différentes théories avancées, on peut mentionner la théorie des « territoires plaquettaires » suggérée par Yamada en 1957 (Yamada 1957). D'après ce modèle, les plaquettes sont préformées et fonctionnelles à l'intérieur du MK qui les libère par fragmentation de son cytoplasme (Kosaki 2005; Kosaki and Kambayashi 2011). Cette hypothèse se base sur l'aspect des membranes du DMS qui, au sein du cytoplasme du MK, délimitent des zones de taille et de contenu similaires à une plaquette, ce qui leur a longtemps valu le terme de « territoires plaquettaires ». L'idée est alors que la fragmentation du cytoplasme suivant ces territoires permet le relargage des plaquettes contenues dans le MK. Faute d'éléments de preuve solides, cette théorie d'un relargage passif de plaquettes préformées a été écartée.

Un autre modèle dit du « gant retourné » a remis en cause la théorie précédente des territoires plaquettaires préformés. Des observations datant des années 70 sont à l'origine de cette deuxième

théorie. Les auteurs proposent que les membranes du DMS se débloquent à l'extérieur du MK pour former des extensions cytoplasmiques, les proplaquettes, desquelles se détachent les futures plaquettes (Schulze et al. 2006; Shaklai and Tavassoli 1978). D'un point de vue mécanistique ce modèle ne semble pas plausible. Il est difficile d'imaginer ce type de retournement au regard du réseau très branché et organisé du DMS.

Une troisième théorie, qui est la plus communément admise par la communauté scientifique à ce jour, propose également l'extension de proplaquettes mais ce, non pas *via* un « déblocage » du DMS, mais par extension de la membrane plasmique, rendue possible par l'apport de vésicules membranaires qui fusionnent au fur et à mesure à la membrane plasmique du MK et de la proplaquette. Dès les années 90, des observations faites en microscopie électronique révèlent la présence de vésicules dans les MK formant des proplaquettes, suggérant qu'au moment de former les proplaquettes (PPT), le DMS se dilaterait et formerait ces vésicules qui en fusionnant avec la membrane plasmique alimenteraient les proplaquettes (E. M. Cramer et al. 1997; Tablin, Castro, and Leven 1990). Plus récemment, l'utilisation de la tomographie et de la reconstruction 3D a permis de visualiser la fusion du DMS le long de la proplaquette en extension *in situ* dans la MO (Brown et al. 2018). Le DMS servirait ainsi de réservoir de membrane permettant d'alimenter, *via* la membrane plasmique, les longs prolongements cytoplasmiques étendus par les MK dans la lumière des sinusoides médullaires. Sous l'influence du flux sanguin, ces extensions proplaquettaires sont libérées dans la circulation par détachement. Ces fragments sont ensuite remodelés dans la circulation sanguine en aval pour libérer les plaquettes proprement dites (Stenberg and Levin 1989; Zucker-Franklin and Philipp 2000). Cette théorie a notamment été corroborée par le développement de la microscopie intravitale permettant la visualisation du phénomène *in vivo* et en temps réel. Il est aujourd'hui admis que les MK matures, se trouvant au contact des vaisseaux sinusoides médullaires, étendent des projections cytoplasmiques à travers la barrière endothéliale des vaisseaux (Bornert et al. 2020; Junt et al. 2007; Kowata et al. 2014; Stegner et al. 2017).

En 2015, Nishimura *et al.* émettent des doutes quant à l'efficacité de la synthèse de plaquettes par formation de proplaquettes. Les auteurs estiment que ce mécanisme aurait un rendement trop faible pour produire un nombre suffisant de plaquettes, notamment dans des conditions de forte demande plaquettaire, telles qu'une inflammation, une infection, une thrombopénie d'origine immune ou une hémorragie massive. Ils suggèrent l'existence d'un mécanisme de formation de PPT par rupture de la membrane des MK (Nishimura et al. 2015). Ce mécanisme, indépendant de la TPO, ferait intervenir l'IL1 α et l'activation de la caspase 3 qui réduit la stabilité de la membrane plasmique et favorise sa rupture. Nishimura *et al.* projettent que le phénomène de rupture serait vingt fois plus efficace que la formation de proplaquettes et qu'il prendrait le relais en situation de nécessité forte

et rapide de plaquettes. Même s'il s'agit d'une théorie à considérer, à l'heure actuelle il y a relativement peu de preuves permettant d'en faire une hypothèse solide.

Enfin, une publication récente tente de remettre en question le mécanisme de production des plaquettes sanguines par extension de proplaquettes et propose un processus de bourgeonnement (« budding ») (Potts et al. 2020). Les observations faites *in vivo* suggèrent la présence de MK matures présentant des bourgeons de la taille d'une plaquette directement attachés à leur membrane plasmique. Une fois libérés dans la circulation, ces bourgeons deviendraient des plaquettes fonctionnelles. Les auteurs n'excluent pas l'existence des proplaquettes mais affirment que le « budding » représenterait le phénomène majoritaire de formation des plaquettes. Pour le moment, ces premières observations n'ont pas été corroborées par de nouveaux travaux et éléments de preuve et restent à être réexaminées.

3. La thrombopoïèse *in vitro*

La thrombopoïèse (ou thrombocytopoïèse) est un processus extrêmement bien orchestré, basé sur l'extension de longs prolongements cytoplasmiques, les proplaquettes. Toutefois, les mécanismes gouvernant l'extension de ces prolongements *in vitro* diffèrent, du moins en partie, de ceux ayant lieu *in vivo*. *In vitro*, les MK n'étant pas polarisés, les protrusions se forment en plusieurs endroits tout autour de la cellule, **Figure 18 A et B** (Bornert et al. 2020; Thiery and Bessis 1956). Ces protrusions s'organisent en projections longues et fines caractérisées par une tige mince, des ramifications et des bourgeons apicaux aussi appelés boutons plaquettaires. Les protéines du cytosquelette jouent un rôle essentiel dans la formation des proplaquettes *in vitro* (Choi et al. 1995; E. M. Cramer et al. 1997; J. E. Italiano et al. 1999; Tablin, Castro, and Leven 1990). L'actine filamenteuse semble jouer un rôle dans la formation de ramifications (J. E. Italiano et al. 1999). Quant aux microtubules, il a été démontré qu'ils sont les principaux moteurs de l'extension des PPT de culture. Ils sont organisés sous la forme de fuseaux tout le long de la tige des PPT puis s'enroulent au niveau des bourgeons, **Figure 18 A et C**. L'incubation des MK en présence d'agents pharmacologiques qui dépolymérisent les microtubules empêche la formation des PPT en culture (J. E. Italiano et al. 1999; Tablin, Castro, and Leven 1990). De plus, l'ajout de ces mêmes produits après extension des PPT, ainsi que la dépolymérisation des microtubules induite par le froid, provoque leur rétraction (J. E. Italiano et al. 1999; Tablin, Castro, and Leven 1990; Thon et al. 2010). Le glissement des microtubules, contrôlé par des moteurs à dynéine, semble être important pour l'extension des PPT *in vitro* (Bender et al. 2015). Les moteurs à kinésine se chargent du transport des granules et des

organelles dans les proplaquettes en progressant le long des microtubules, utilisant les faisceaux comme support (J. E. J. Italiano, Patel-Hett, and Hartwig 2007; Richardson et al. 2005). Depuis les travaux du groupe de Joseph Italiano, ce modèle de formation des proplaquettes fortement dépendant des microtubules a continué à prévaloir bien que ces dernières années les études *in vivo* ont mis en évidence des différences (voir partie II.D.4.2). *In vitro*, la culture de MK en chambre de flux accélère la libération des proplaquettes et modifie leur vitesse d'extension (Bender et al. 2015; Dunois-Lardé et al. 2009) et différents systèmes perfusables composés de micro-piliers, de canaux ou de structures poreuses ont été mis au point pour optimiser la libération de plaquettes *in vitro* (Blin et al. 2016; Nakagawa et al. 2013).

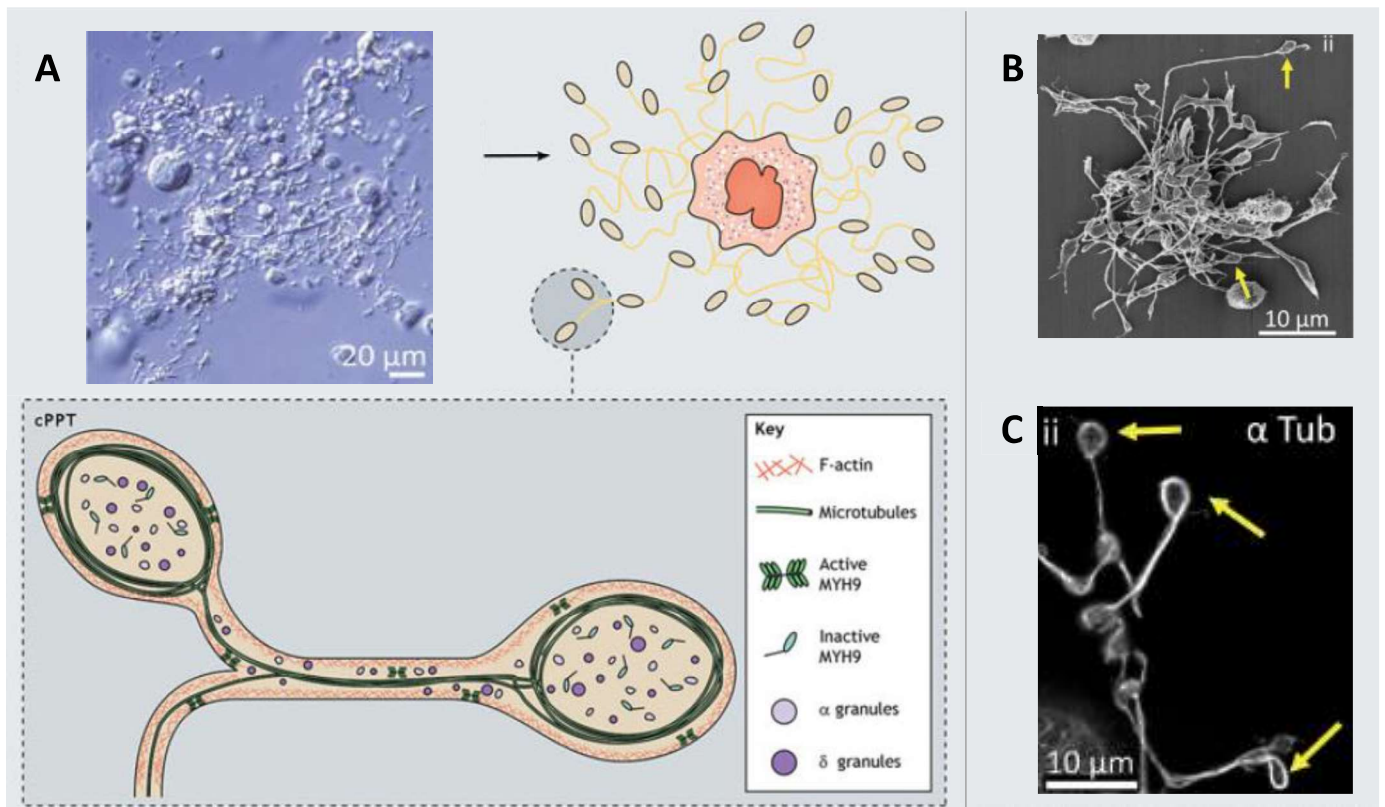


Figure 18 : Structure des proplaquettes *in vitro*. Images représentatives de proplaquettes de culture obtenues *in vitro* (cPPT) et schéma de l'organisation du cytosquelette. A. cPPT visualisées par microscopie à champ clair au fond du puit de culture avant fixation B. Image représentative de cPPT après fixation au paraformaldéhyde et observation par microscopie électronique à balayage. C. Immunmarquage de l' α tubuline sur cPPT après fixation (schéma Boscher et al. 2020 images Bornert et al. 2020).

4. Les étapes successives de la thrombopoïèse *in vivo*

4.1. Le passage de la barrière endothéliale

Pour atteindre la circulation sanguine, les PPT doivent traverser la barrière endothéliale des vaisseaux sinusoïdes ce qui nécessite une polarisation des MK. Les signaux gouvernant cette polarisation ne sont pas clairement identifiés à ce jour. Le SDF1 α (stromal derived factor 1 alpha), sécrété par les cellules réticulaires et endothéliales, a été proposé comme signal important pour l'orientation des MK et des extensions vers les vaisseaux (Avecilla et al. 2004). Par la suite, il a été proposé que la sphingosine-1 phosphate (S1P), qui circule dans le sang à une concentration allant de 0,1 à 0,6 μ M, pourrait créer un gradient permettant l'orientation des PPT vers le vaisseau (Berdyshev et al. 2005; Yatomi et al. 1997; L. Zhang et al. 2012, 2013). Toutefois cette théorie a été revue et des travaux très récents réfutent le rôle de la S1P dans la polarisation de l'extension des PPT (H et al. 2019). Enfin plus récemment, il a été montré que la régulation de la polymérisation de l'actine est susceptible de jouer un rôle important dans le processus. En effet, l'inactivation des gènes WASP, Arp2/3 ou profiline, tous trois impliqués dans la dynamique de l'actine filamenteuse, entraîne une perturbation de la polarisation du DMS se traduisant par une libération anormale de fragments mégacaryocytaires dans le compartiment extravasculaire de la MO (Ghalloussi, Dhenge, and Bergmeier 2019). De plus, les petites GTPases Cdc42 et RhoA régulent également la polarisation des MK permettant l'émission transendothéliale des proplaquettes. Une déficience fonctionnelle de GPIb ou de Cdc42 réduit la polarisation des MK *in vitro* et altère le passage de protrusions transendothéliales *in vivo*. En revanche, l'absence de RhoA dans les MK entraîne une augmentation de l'activité de Cdc42 et une hyperpolarisation des MK qui transmigrent tout entiers dans les sinusoïdes de la moelle. Ces résultats révèlent que Cdc42 et RhoA agissent comme des points de contrôle moléculaire qui régulent la biogenèse transendothéliale des plaquettes *in vivo* (Dütting et al. 2017).

L'extension des proplaquettes dans la circulation sanguine est un processus différent de celui permettant la formation de PPT *in vitro*, ne serait-ce que parce qu'*in vivo* s'y ajoute la nécessité pour ces proplaquettes de franchir la barrière endothéliale. Deux voies de transmigration sont en théorie envisageables : la voie transcellulaire, à travers des pores formés dans la cellule endothéliale, et la voie paracellulaire, au niveau des jonctions entre deux cellules endothéliales. Dans les années 70, des observations en microscopie électronique ont mis en évidence des protrusions de MK dans le cytoplasme des cellules endothéliales de sinusoïdes (Lichtman et al. 1978). Il a été proposé que les MK étendent des structures de type podosomes pour sonder leur environnement (Schachtner et al.

2013). Récemment, ces structures riches en actine ont été visualisées *in situ* provenant de MK en contact avec les vaisseaux sinusoïdes ; ces structures pouvant provoquer la déformation des cellules endothéliales sous-jacentes (Anita Eckly et al. 2020). Une des hypothèses avancées est que ces extensions servent à sonder leur milieu environnant pour définir la voie préférentielle de passage et fournissent la force nécessaire à la fusion-fission des membranes endothéliales apicale et basale. Se forment alors des pores transendothéliaux au travers desquels les MK passent ou font passer dans un premier temps une protrusion initiale relativement large représentant une partie du cytoplasme et contenant des granules et du DMS, **Figure 19**. Ces protrusions initiales sont à l'origine des PPT (Becker and De Bruyn 1976; Anita Eckly et al. 2020; Tavassoli and Aoki 1981). Si le passage transcellulaire a été clairement documenté, cela n'exclut pas pour autant la possibilité que le passage soit également en partie paracellulaire, bien que ce phénomène n'ait pas été documenté jusqu'à aujourd'hui. En effet, il n'a pas été observé de jonctions serrées entre les cellules endothéliales des sinusoïdes, ainsi les proplaquettes pourraient se frayer un chemin entre deux cellules pour atteindre la lumière du vaisseau (Tavassoli and Shaklai 1979). Les mécanismes moléculaires qui assurent la protrusion initiale, provenant du cytoplasme des MK, à travers la paroi endothéliale restent encore peu connus à l'heure actuelle.

4.2. L'élongation des proplaquettes

Une fois dans la lumière du vaisseau sinusoïde, les protrusions cytoplasmiques initiales des MK forment des épaulements au niveau de la face luminale de l'endothélium. A l'image de petits crochets, il est suggéré que ces structures riches en actine permettent aux cellules de s'ancrer à leur support, facilitant ainsi l'extension des PPT dans la circulation, **Figure 19** (Behnke and Forer 1998; Bornert et al. 2020; Brown et al. 2018). A un stade plus avancé, les protrusions observées *in situ*, bien qu'étant allongées, ont une morphologie différente de celles présentes *in vitro*, et bien moins homogène. Concernant leurs dimensions, le travail du laboratoire a mesuré une longueur moyenne de 173 μm (de 41,57 à 518,6 μm) avec une épaisseur à la base de l'extension de l'ordre de 1 à 7 μm ce qui correspond aux données précédentes de la littérature rapportant une longueur pouvant aller de quelques microns mètres jusqu'à 200 μm et une épaisseur moyenne entre 1,5 μm et 10 μm (Becker and De Bruyn 1976; Bornert et al. 2020; Brown et al. 2018; Kowata et al. 2014). En terme de morphologie il y a donc bien une nette différence entre les proplaquettes obtenues en culture *in vitro* et les proplaquettes natives. Ces dernières ne sont pas ou peu branchées, leur tige est près de quatre fois plus épaisse et leur volume est également bien plus important (Bornert et al. 2020).

Les différences morphologiques existant entre les PPT obtenues *in vitro* et les PPT natives générées *in vivo* soulèvent la possibilité que les mécanismes d'élongation médiés par le cytosquelette soient également différents. Un fait intéressant à mentionner est que l'élongation *in vivo* (d'une vitesse moyenne obtenue lors de nos observations de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$) n'est pas linéaire (Bornert et al. 2020; Junt et al. 2007). En effet, le processus présente des phases de pause et même de rétraction. Un travail du laboratoire, auquel j'ai participé pendant mon doctorat, a permis d'identifier la myosine IIA comme responsable de ces forces de rétraction (Bornert et al. 2020). Ce travail a également permis de caractériser l'organisation des microtubules au sein des proplaquettes ainsi que leur contribution à l'élongation proplaquettaire selon que l'on se trouve *in vivo* ou *in vitro*. *In vivo* les microtubules sont distribués de manière hétérogène à l'intérieur des PPT, ce qui diffère de la situation *in vitro* (Bornert et al. 2020; Brown et al. 2018). En effet, dans les PPT de culture les microtubules sont organisés en un faisceau qui suit la tige de la proplaquette, **Figure 19** (J. E. Italiano et al. 1999). Les résultats obtenus en microscopie intravitale suggèrent qu'*in vivo*, les forces hémodynamiques sont suffisantes pour contribuer de manière substantielle à l'allongement des PPT, les microtubules ayant plutôt un rôle d'échafaudage pour maintenir la forme allongée de la proplaquette, plutôt qu'un rôle mécanique dans l'allongement en tant que tel. Ces données peuvent expliquer pourquoi, dans certains cas, de fortes divergences ont été observées entre la capacité à étendre des PPT, quantifiée *in vitro*, par rapport au nombre de plaquettes circulantes *in vivo* seulement modérément diminué. C'est notamment le cas lors de l'inactivation de la tubuline $\beta 1$ ou de la mutation de la tubuline $\alpha 4a$. Cela entraîne une quasi absence de PPT *in vitro*, tandis que seule une diminution modérée des plaquettes circulantes est observée *in vivo* (Bornert et al. 2020; Strassel et al. 2019). Ces résultats n'excluent bien évidemment pas un rôle clé des microtubules soit au moment de l'initiation des protrusions, soit lors du remodelage des proplaquettes. Nous pouvons en effet spéculer que le remodelage final de la PPT en plaquettes pourrait se produire par des mécanismes basés sur les microtubules, similaires à ceux précédemment établis *in vitro* en culture liquide, **Figure 19** (Bender et al. 2015; Bornert et al. 2020; Thon and Italiano 2012).

Enfin, comme évoqué précédemment (section II.D.3.), le DMS occupe une place centrale dans ce processus d'élongation. L'équipe d'Alastair Poole a publié en 2018 un travail qui, *via* la combinaison de diverses techniques de microscopie, met en évidence des phénomènes de fusion entre des vésicules de DMS et la membrane des proplaquettes en cours de croissance. Ce phénomène permet un réapprovisionnement constant en membrane le long de la PPT, ce qui joue probablement un rôle important également dans la vitesse d'élongation car cela diminue certainement considérablement la tension membranaire et réduit les forces requises pour l'élongation des PPT (Brown et al. 2018; J. Radley and Haller 1982).

4.3. La libération des plaquettes

Dans la lumière des vaisseaux sinusoïdes, il a été observé que de longs fragments se détachent à la base des PPT. Ces morceaux libérés dans la circulation représentent des volumes équivalents à plusieurs centaines de plaquettes, voire quelques milliers (Bornert et al. 2020; Kowata et al. 2014). Une fois libérés, ils sont rapidement emportés par le flux sanguin (Junt et al. 2007). Ces longs fragments vont se remodeler sous l'effet du flux sanguin pour former les plaquettes proprement dites, d'un diamètre compris entre 2 et 5 μm . Il a été proposé depuis longtemps que la microcirculation en aval, en particulier la microcirculation pulmonaire, puisse être un site majeur de libération des plaquettes sanguines. C'est en effet en 1893 que Aschoff fait la première observation de MK entiers dans la circulation pulmonaire. Il suggérait que les MK émigraient de la MO, restaient logés dans le réseau capillaire des poumons en raison de leur grande taille, et y libéraient des plaquettes (Aschoff 1893). Plus tard, d'autres travaux se basant sur des observations microscopiques et des calculs théoriques présentèrent les poumons comme un site important de libération de plaquettes (Howell and Donahue 1937; Trowbridge, Martin, and Slater 1982; Zucker-Franklin and Philipp 2000). Plus récemment, des observations en vidéo-microscopie intravitale dans les poumons ont permis de visualiser en temps réel la fragmentation de PPT dans le système vasculaire pulmonaire murin (Lefrançais et al. 2017). Des études *ex vivo* ont suggéré qu'une fois les proplaquettes fragmentées en « préplaquettes », celles-ci se remodeleraient sous forme d'haltères (« barbell platelets »), puis à la suite de phénomènes de torsion gouvernés par les microtubules, se fragmenteraient en plaquettes proprement dites (Thon et al. 2010). Ainsi, tandis que la MO est clairement le site de production de MK et de PPT, la microcirculation pulmonaire serait un organe important de libération de plaquettes. Actuellement, on ne peut exclure la participation de la microcirculation d'autres organes également dans la libération des plaquettes, **Figure 19**.

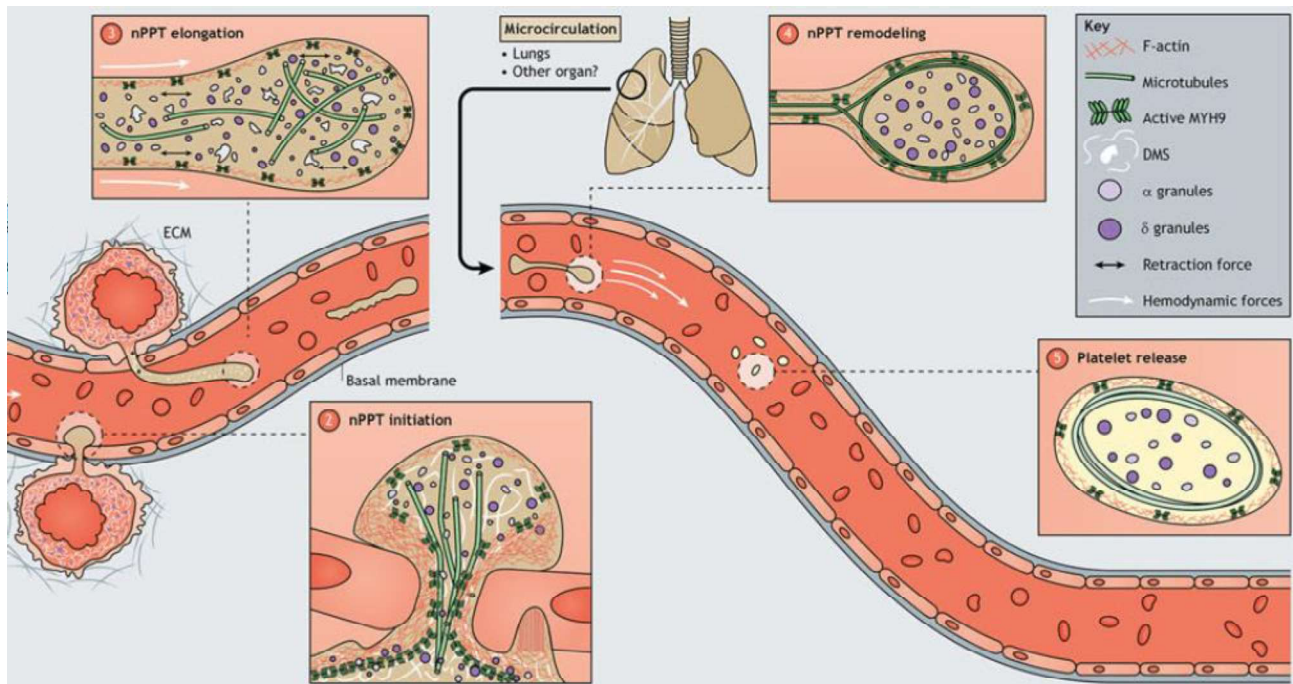


Figure 19 : Etapes successives de la thrombopoïèse *in situ* et rôle du cytosquelette. *In vivo*, l'initiation de la formation des proplaquettes natives (nPT) a lieu dans la moelle et dépend à la fois du cytosquelette d'actine et des microtubules. Au cours de l'élongation dans la circulation, les microtubules sont pour la plupart isolés et jouent un rôle essentiel pour contrecarrer la rétraction des nPT dépendante de la myosine, tandis que les contraintes hémodynamiques contribuent aux forces de protrusion. Des fragments de nPT libérés dans les sinusoides sont encore remodelés dans la microcirculation en aval pour donner les plaquettes circulantes finales, probablement *via* des mécanismes basés sur les microtubules similaires aux mécanismes *in vitro* (Figure Boscher et al. 2020).

5. Les maladies plaquettaires : défauts qualitatifs ou quantitatifs des plaquettes

Du fait de leur rôle majeur dans l'arrêt des saignements et dans le maintien de l'intégrité vasculaire, un défaut plaquettaire fonctionnel ou quantitatif peut entraîner des risques de saignement plus ou moins importants selon la nature du défaut.

5.1. Les thrombopathies

Le terme thrombopathies désigne les maladies hémorragiques ayant pour cause un défaut fonctionnel des plaquettes. On parle de thrombopathies acquises ou de thrombopathies constitutionnelles si elles sont héréditaires. Dans le cas des thrombopathies dites constitutionnelles,

ce sont des mutations qui sont la cause des défauts de fonctionnalité plaquettaire. Les mutations peuvent impacter l'expression des protéines membranaires comme c'est le cas pour la thrombasthénie de Glanzmann pour laquelle on observe une atteinte des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Cette pathologie est caractérisée par une diminution de la capacité des plaquettes à adhérer, s'étaler et s'agréger entre elles (A. T. Nurden 2006; Solh, Botsford, and Solh 2015). La prévalence de ces maladies est probablement sous-estimée car les pathologies sont hétérogènes et le diagnostic reste difficile. De plus, les patients sont souvent asymptomatiques dans la vie courante et ne présentent pas toujours de complications hémorragiques lors d'une intervention chirurgicale ou d'un traumatisme. A titre d'exemple, pour la thrombasthénie de Glanzmann, qui est la pathologie plaquettaire constitutionnelle la plus fréquente, le nombre de personnes atteintes en France est estimé à 500 environ (Centre de référence des thrombopathies constitutionnelles CHU Bordeaux). Un autre exemple est le syndrome de Bernard-Soulier causé par l'absence d'expression ou une anomalie fonctionnelle d'une des sous-unités du complexe GPIb-IX, nécessaire à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium. Ce défaut fonctionnel est également associé à une diminution du nombre de plaquettes, qui sont anormalement grosses (Lanza 2006). Dans le cas des maladies dites du pool vide, ce sont les protéines contenues dans les granules des plaquettes qui sont dysfonctionnelles, impactant ainsi fortement l'activité plaquettaire (Aguilar et al. 2019a; A. T. Nurden 2005; A. T. Nurden and Nurden 2014; Salles et al. 2008). Elles peuvent être non syndromiques et affecter uniquement le contenu des granules plaquettaires, ou bien syndromiques affectant d'autres organelles apparentées aux granules plaquettaires (famille des LRO, lysosome related organelles) (A. T. Nurden and Nurden 2014). Ce sont essentiellement les syndromes de Hermansky-Pudlak et de Chediak-Higashi, dont les patients peuvent présenter, en plus d'un défaut d'hémostase, des anomalies de pigmentation oculo-cutanée, des désordres immunologiques ainsi que des insuffisances pulmonaires (Aguilar et al. 2019b; Huizing, Anikster, and Gahl 2001; D. Ward, Shiflett, and Kaplan 2002). Quant aux thrombopathies acquises, celles-ci ont la plupart du temps une cause médicamenteuse. Il a notamment été montré que, lorsque administrés à fortes doses, l'aspirine, les anti-inflammatoires ou encore certains antibiotiques de type bêta-lactamine, tel que la pénicilline, ont un effet inhibiteur sur les fonctions plaquettaires (Capodanno, Ferreiro, and Angiolillo 2013; Cazenave et al. 1973; Gachet 2015; Kariyazono et al. 1997).

5.2. Les thrombopénies

Les anomalies plaquettaires quantitatives sont appelées thrombopénies. Elles se définissent par une numération plaquettaire anormalement basse, inférieure à 150×10^9 plaquettes par litre de sang (B. Johnson, Fletcher, and Morgan 2016). Elles peuvent être classées en deux catégories, les thrombopénies acquises ou héréditaires.

Dans le cas d'une thrombopénie acquise, celle-ci peut avoir diverses origines. La cause peut être médicamenteuse ; certains traitements, comme les chimiothérapies, peuvent avoir un effet myélosuppresseur important menant à une baisse conséquente du compte plaquettaire et nécessitant une transfusion (Arnold et al. 2013). Une infection d'origine virale (telle que le VIH, la varicelle ou encore la dengue) peut également être à l'origine d'une thrombopénie (Ali, Anwar, et al. 2006; Ali, Nadeem, et al. 2006; Franchini, Veneri, and Lippi 2017; Kuter 2015). Enfin, en situation auto-immune où l'organisme produit des anticorps dirigés contre des glycoprotéines membranaires de ses propres plaquettes, comme pour le purpura thrombopénique immunologique (PTI), le système immunitaire est responsable de l'élimination des plaquettes (Neunert et al. 2015; Nishimoto et al. 2017). On peut distinguer les thrombopénies périphériques, dues à une consommation augmentée des plaquettes, des thrombopénies centrales. Ces dernières résultent d'un défaut de production de plaquettes soit par insuffisance médullaire d'origine médicamenteuse ou maligne (chimiothérapie ayant un effet myélosuppresseur, NMP), soit par anomalie de la mégacaryocytopoïèse résultant de mutations congénitales héréditaires (Eto and Kunishima 2016; A. Nurden and Nurden 2020). La mutation en question peut se trouver dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la mégacaryopoïèse, tels que des facteurs de transcription impliqués à divers stades de différenciation et/ou de maturation des mégacaryocytes. Dans ce cas, on observe une diminution du nombre de MK. Ceux-ci sont également immatures et forment moins de plaquettes. La mutation peut également impacter les gènes codant pour des protéines nécessaires à la production de plaquettes. Dans le cas d'une atteinte des protéines du cytosquelette par exemple, la production de plaquettes est fortement diminuée (Kunishima et al. 2013; Léon et al. 2007; Pecci and Balduini 2014). Au total, 46 gènes ont actuellement été identifiés porteurs de mutations entraînant des thrombopénies (voir la **table récapitulative des gènes mutés identifiés dans les thrombopénies héréditaires** en annexe). La mise en évidence de ces mutations a notamment permis d'apporter des connaissances sur les mécanismes de la biogénèse des plaquettes. Il est intéressant de souligner que pour près de la moitié des patients touchés, la cause de thrombopénie reste inconnue (Pecci and Balduini 2014). Aujourd'hui les équipes médicales savent comment prendre en charge la majorité des patients, du moins pour les aspects hémostatiques. Cependant, l'utilisation de

séquençage haut débit pour identifier de nouveaux gènes responsables de ces maladies se révèle importante pour améliorer la surveillance et la prévention notamment dans les formes syndromiques avec évolution vers des tumeurs ou d'autres défauts (A. Nurden and Nurden 2020).

A l'heure actuelle, peu de traitements sont disponibles pour traiter les thrombopénies. Le développement d'agents thrombopoïétiques de 2^{ème} génération, tels que le romiplostim et le eltrombopag, a permis de proposer un traitement pour augmenter la numération plaquettaire dans le cas des PTI (Lam 2010; Stasi et al. 2010). Des données de la littérature suggèrent également que ces traitements pourraient être proposés dans certains cas de thrombopénies héréditaires (Léon et al. 2012; Pecci et al. 2010; Rodeghiero, Pecci, and Balduini 2018). Ainsi, il est important de poursuivre les recherches visant à comprendre les mécanismes de formation des plaquettes sanguines afin de pouvoir proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter les thrombopénies.

5.3. *Les thrombocytoses*

A l'inverse de la thrombopénie, la thrombocytose désigne un dysfonctionnement de la mégacaryopoïèse qui aboutit à un compte plaquettaire anormalement élevé, supérieur à 450×10^9 plaquettes par litre de sang chez l'Homme. La thrombocytose peut être divisée en deux groupes : la thrombocytose primaire et la thrombocytose secondaire. La thrombocytose secondaire, également appelée thrombocytose réactive, est définie comme une numération plaquettaire anormalement élevée due à des événements sous-jacents, à une maladie ou à l'utilisation de certains médicaments (Vo and Thompson 2019). Parmi les personnes atteintes de thrombocytose, 80 à 90 % présentent une thrombocytose secondaire (Rokkam and Kotagiri 2021).

La thrombocytose primaire est due à une anomalie de la régulation de la production de plaquettes par les cellules progénitrices de la MO. Elles sont généralement associées au groupe des NMP. C'est notamment le cas de la thrombocytémie essentielle (TE) et la polycythemia vera (PV) (ou maladie de Vaquez) qui présentent un risque accru de thrombose et d'hémorragie par rapport aux thrombocytoses secondaires. Dans ces deux pathologies, la thrombocytose est la conséquence de mutations dans les gènes codant pour le récepteur MPL, JAK2 ou la CALR. Ces mutations génétiques provoquent une prolifération non contrôlée des progéniteurs mégacaryocytaires (Besancenot et al. 2014; Bianchi et al. 2016). La TE ainsi que la PV peuvent évoluer en myélofibrose (on parle alors de myélofibrose secondaire), une condition pathologique dans laquelle le tissu hématopoïétique est progressivement remplacé par un tissu fibreux ce qui entraîne, entre autre, la modification des

propriétés mécaniques tissulaires qui sont une composante importante de l'environnement médullaire (voir la partie III sur la mécanobiologie) (Parnes and Ravi 2016).

III. Rôle de la mécanobiologie dans la formation des plaquettes sanguines

A. Un domaine d'étude récent

1. Les contraintes mécaniques, une composante de l'environnement cellulaire

Toutes les cellules sont en contact avec leur environnement. Il ne s'agit pas d'un contact passif entre la cellule et le milieu dans lequel elle se trouve mais bien d'une multitude d'interactions. La cellule est en effet capable de sonder et de percevoir son environnement afin de réagir aux stimuli auxquels elle se trouve exposée. Ces stimuli peuvent provenir de tous les éléments constituant l'environnement cellulaire à savoir la MEC, les autres cellules présentes dans le tissu, qu'il s'agisse du même type cellulaire ou non, les facteurs solubles tels les cytokines et également la composante physique (température, pH...) et mécanique (compression, étirement, cisaillement, rigidité du milieu...). Le signal perçu entraîne une réaction de nature biochimique, la cellule modifiant sa signalisation intracellulaire, son expression génique et/ou son métabolisme. La réponse produite par la cellule peut également être dynamique *via*, par exemple, une adaptation de sa migration, polarisation, sécrétion, etc.... Cette réponse adaptative est nécessaire à la cellule pour garantir sa survie mais aussi pour déterminer son comportement et sa différenciation.

Au cours de ce travail, je me suis intéressée au rôle des facteurs mécaniques dans la formation des plaquettes. Les interactions mécaniques entraînent la conversion de contraintes extracellulaires mécaniques en signaux intracellulaires biochimiques (Orr et al. 2006). Ce processus est désigné par le terme de mécanotransduction. Celle-ci peut se produire en réaction aux forces mécaniques de l'environnement cellulaire, la cellule pouvant ressentir les forces liées à la nature du substrat dues aux propriétés de rigidité et d'élasticité de ce dernier (C. S. Chen 2008; Gurkan and Akkus 2008). L'organisation tridimensionnelle du tissu détermine également certaines contraintes telles que le confinement des cellules. Une réaction de mécanotransduction peut également être provoquée par la survenue d'un stress mécanique dynamique tel que la présence de forces de cisaillement, de compression et d'étirement ou de traction. La réception du signal se fait *via* des mécanorécepteurs parmi lesquels on retrouve notamment des canaux ioniques (Delmas and Coste 2013), d'autres mécanorécepteurs membranaires comme les récepteurs d'adhésion intégrines (Geiger, Spatz, and Bershadsky 2009; Wei et al. 2008), certains récepteurs couplés aux protéines G

(RCPG) (Chachisvilis, Zhang, and Frangos 2006). Le cytosquelette est l'un des composants majeurs impliqué directement ou indirectement dans les mécanismes de mécanotransduction. Les différents mécanosenseurs ainsi que les réponses intracellulaires adaptatives impliquant les facteurs de transcription mécanosensibles seront abordés plus en détails dans la partie (III.C)

1. Les débuts de la mécanobiologie

La mécanobiologie est donc l'étude de la réponse de la cellule face aux forces mécaniques de son environnement. S'il est maintenant admis que les cellules peuvent ressentir les stimuli mécaniques extracellulaires et les transformer en signaux intracellulaires biochimiques, cela est relativement récent. À la fin des années 1990, en utilisant des hydrogels présentant différents modules élastiques recouverts de protéines de MEC comme substrats de culture cellulaire, Pelham et Wang ont montré que la rigidité du substrat affectait l'adhésion cellulaire et notamment la formation des adhésions focales, l'étalement et la migration (Pelham and Wang 1997). Depuis cette étude, plusieurs groupes ont utilisé des gels de polyacrylamide, ou d'autres systèmes à module élastique réglable, pour montrer que la rigidité du substrat affecte de manière relativement générale des processus aussi variés que la prolifération, la migration, l'adhésion ou encore la différenciation des cellules (Bershadsky, Balaban, and Geiger 2003; Chaudhuri et al. 2020; Discher, Janmey, and Wang 2005; Lo et al. 2000; Vogel and Sheetz 2006). C'est plus particulièrement depuis le papier fondateur publié il y a une quinzaine d'années par l'équipe de Denis Discher que l'intérêt pour la mécanobiologie a progressivement grandi. Ce travail novateur a montré que la rigidité du substrat influence le devenir des cellules souches. Ainsi, les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier vers un lignage neuronal, musculaire ou même osseux, sans aucune autre influence que la rigidité du substrat, **Figure 20** (Engler et al. 2006). Les auteurs observent notamment que lorsque les cellules souches mésenchymateuses sont cultivées sur des gels rigides mimant l'élasticité du muscle et recouverts de collagène I, les marqueurs myogéniques sont régulés à la hausse, tandis que lorsque les cellules sont cultivées sur des gels plus rigides qui reproduisent l'os précalcifié, les cellules apparaissent ostéogéniques (Discher, Mooney, and Zandstra 2009). De nombreux travaux ont depuis lors confirmé ces observations et l'importance des facteurs mécaniques dans le comportement des cellules. Ainsi, le consensus actuel est que les cellules réagissent aux propriétés intrinsèques de la MEC à laquelle elles sont exposées, telles que la structure, l'élasticité et la composition. Les paramètres de la MEC sont extrêmement dynamiques et sont contrôlés dans l'espace et dans le temps au cours du développement. Il a été montré que les paramètres mécaniques de la matrice jouent un rôle morphogénétique en guidant la différenciation et le comportement des cellules,

agissant ainsi sur la régulation du développement embryonnaire, de l'homéostasie, des processus régénératifs et de la progression des maladies (Reilly and Engler 2010).

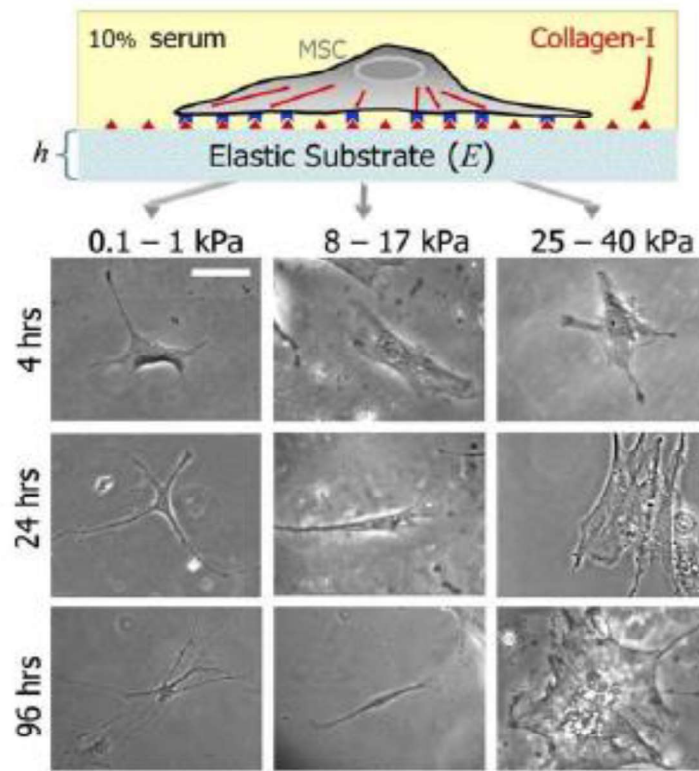


Figure 20 : Travaux fondateurs du domaine de la mécanobiologie par Engler et al. Prises de vues au microscope inversé à contraste de phase de cellules souches mésenchymateuses cultivées sur différentes matrices de collagène. Les auteurs ont démontré que la rigidité du substrat sur lequel les cellules étaient cultivées avaient un impact sur leur différenciation. A gauche, exposées à une rigidité estimée proche de celle du cerveau, les cellules se différencient progressivement en neurones. Au centre, en présence d'une rigidité estimée du tissu musculaire, elles se différencient en myoblastes. A droite, avec un substrat d'une rigidité proche de l'os, les cellules présentent la morphologie des ostéoblastes (figure Engler et al. 2006). kPa : kilo Pascal.

2. Définition de la mécanobiologie

Un processus mécano-médié peut se décomposer en deux phases : la perception du signal mécanique, appelée mécanoréception, et la réponse cellulaire au signal ressenti, il s'agit de la mécanotransduction.

Le premier acteur de la mécanoréception est la membrane plasmique, c'est en effet la partie de la cellule qui se trouve directement exposée aux contraintes du milieu environnant. Afin de remplir son rôle de sentinelle, celle-ci possède un grand nombre de récepteurs aptes à ressentir les modifications environnementales. Ce sont ces acteurs que l'on nomme mécanorécepteurs. Ces récepteurs sont sensibles aux déformations de la membrane, qu'il s'agisse de courbures, de variations d'étirements ou de tensions (Orr et al. 2006). Comme évoqué précédemment, il peut s'agir de récepteurs, dont les intégrines, de canaux ioniques ou encore directement du cytosquelette, **Figure 21**. Les mécanorécepteurs sont présentés plus en détail dans la partie III.C. La mécanotransduction est la traduction d'une information mécanique extracellulaire en un signal biochimique intracellulaire. Une fois le signal perçu par les mécanorécepteurs, celui-ci va être traité. La réponse cellulaire peut être très rapide et être réalisée en l'espace de quelques secondes à minutes ou bien prendre jusqu'à plusieurs jours pour se mettre en place (Iskratsch, Wolfenson, and Sheetz 2014). En effet, la cinétique de réaction et d'adaptation de la cellule dépend de la nature du signal et des modifications cellulaires qu'il engendre. L'échelle de temps va notamment de quelques millisecondes à secondes pour l'étirement des mécanocapteurs, quelques heures pour la modification de l'expression génétique, quelques jours pour les changements dans la fonction et le comportement des cellules, voire même quelques semaines pour le développement des tissus (Maurer and Lammerding 2019; N. Wang, Tytell, and Ingber 2009).

Les voies de signalisation mises en œuvre suite à la réception du signal mécanique dépendent des mécanorécepteurs impliqués, augmentation de calcium intracellulaire pour les canaux calciques mécanosensibles ou activation des Rho GTPases pour les récepteurs d'adhésion (C. S. Chen 2008; Orr et al. 2006). Généralement, les signalisations aboutissent à un renforcement et/ou une réorganisation du cytosquelette. Une fois activées, les voies de mécanotransduction peuvent également entraîner une modification du programme transcriptionnel de la cellule par activation et relocalisation nucléaire de facteurs de transcription dits « mécanosensibles » notamment YAP/TAZ (Yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) et MKL1 (megakaryoblastic leukemia 1) (Aguilar et al. 2016; E. C. Cheng et al. 2009; Dupont et al. 2011; X. Huang et al. 2012b; Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014). Dans ce cas, l'un des acteurs clés est là encore le cytosquelette, en particulier le cytosquelette d'actomyosine, dont la modulation contrôle

en partie la localisation cytoplasmique ou nucléaire et donc l'activation de ces facteurs de transcription (Iskratsch, Wolfenson, and Sheetz 2014; Sethi, Cram, and Zaidel-Bar 2017).

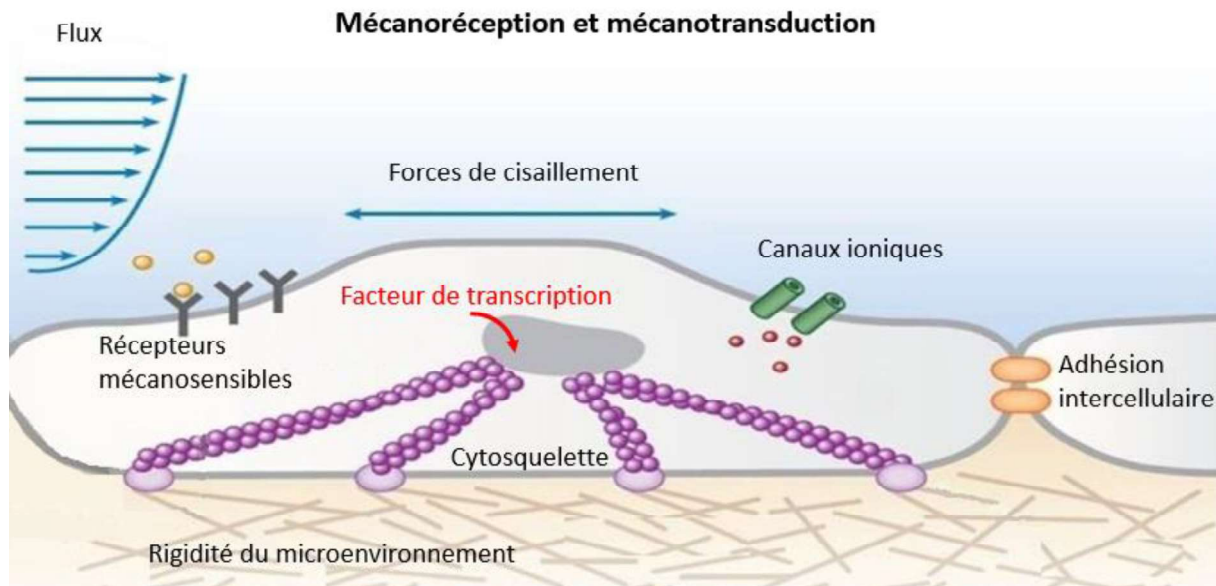


Figure 21 : Signaux mécaniques environnementaux, mécanoréception et mécanotransduction. Les stimuli mécaniques extracellulaires (cisaillement, confinement, rigidité de l'environnement...) sont ressentis par les cellules *via* des mécanorécepteurs (cytosquelette, canaux ioniques, intégrines...). L'adaptation cellulaire à de nouvelles contraintes mécaniques fait intervenir des voies de mécanotransduction pouvant aboutir à la relocalisation nucléaire de facteurs de transcription régulant ensuite l'expression génique de la cellule (Schéma adapté du groupe Fu, University of Michigan).

B. Mécanorécepteurs, les systèmes de perception du signal

Les mécanorécepteurs représentent le premier maillon de la chaîne de la mécanotransduction. Ils sont, en quelque sorte, les capteurs de la cellule. Ce sont eux qui permettent à la cellule de percevoir un changement dans les contraintes physico-mécaniques auxquelles elle se trouve exposée, qu'il s'agisse de la survenue ou de la disparition d'un stress mécanique ou bien d'un changement de nature ou d'intensité de la contrainte. Parmi ces mécanorécepteurs, on retrouve principalement des éléments présents à la membrane plasmique, zone de contact directe avec l'environnement cellulaire. Sont notamment connus des récepteurs d'adhésion comme les intégrines (Geiger, Spatz, and Bershadsky 2009; Wei et al. 2008), ou les cadhérines (Le Duc et al. 2010), des

canaux ioniques réactifs à des variations de pression (Delmas and Coste 2013), certains RCPG (Chachisvilis, Zhang, and Frangos 2006). L'activation de ces voies de signalisation aboutit en général à une réorganisation du cytosquelette qui peut aussi être lui aussi considéré comme un mécanorécepteur.

1. Les récepteurs d'adhésion

1.1. *Les intégrines*

Les intégrines font partie des mécanorécepteurs les plus étudiés. Il s'agit des récepteurs d'adhésion principaux dans les interactions avec la MEC (Hynes 2004; Sun, Guo, and Fässler 2016; Tamkun et al. 1986). Ces récepteurs transmembranaires s'organisent en hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β comportant chacune un domaine transmembranaire. Chez l'Homme, les intégrines rassemblent dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β , c'est pourquoi on ne compte pas moins de 24 combinaisons possibles (Humphries, Byron, and Humphries 2006). C'est l'association des sous-unités qui définit la spécificité de liaison aux ligands. L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ par exemple, est le principal récepteur du fibrinogène. De nombreuses combinaisons permettent ainsi la reconnaissance d'un grand nombre de protéines de la MEC. Les cellules de la lignée mégacaryocytaire possèdent les sous-unités β1 et β3 et les sous-unités α2 , α4 , α5 , α6 , αV et αIIb (Berthier et al. 1998; Fox and Kaushansky 2005; Hagiwara et al. 1996).

Les intégrines permettent à la cellule d'établir et de stabiliser des points d'ancrage à la MEC et sont impliquées dans une signalisation bidirectionnelle qui d'un côté joue sur l'affinité du récepteur pour son ligand et de l'autre stimule la dynamique du cytosquelette d'actomyosine et entraîne l'activation de kinases (Calderwood, Shattil, and Ginsberg 2000; Harburger and Calderwood 2009; Hynes 2002). *Via* ce lien au cytosquelette, les intégrines interviennent dans de nombreux processus de contractilité. Elles peuvent notamment permettre la migration de la cellule grâce aux points d'ancrage à la MEC. Les intégrines sont également impliquées de façon mécanosensible dans la détection de l'environnement. La contraction du cytosquelette couplée à une intégrine peut en effet permettre à la cellule de ressentir la rigidité de la matrice qui l'entoure (Geiger, Spatz, and Bershadsky 2009). Cette détection de la rigidité résulte de l'assemblage de complexes protéiques au niveau des domaines intracellulaires des intégrines, dont certaines présentent des propriétés mécanosensibles. Il existe différents types de complexes protéiques d'adhésion. Il a été montré qu'une rigidité dite faible (module élastique ≤ 400 Pa) provoque l'activation des intégrines sans les

impliquer dans des adhésions focales, mais en entraînant leur internalisation par endocytose (Du et al. 2011; Wei et al. 2008). Les supports de faible rigidité (module élastique ≈ 1 KPa) entraînent par ailleurs une plus grande dynamique de la myosine IIA, contrairement à la formation d'adhésions focales qui stabilisent la myosine au niveau de fibres de stress (Raab et al. 2012). Les adhésions focales sont des complexes protéiques composés de nombreux constituants dont les intégrines, les protéines du cytosquelette (comme la taline, vinculine, paxilline, α -actinine et tensine) mais également des kinase telles que les FAK (focal adhesion kinase) et les tyrosine kinases Src (Burridge 2018; Kanchanawong et al. 2010; Wehrle-Haller 2012). Lorsqu'une force s'exerce sur la membrane plasmique au niveau d'une adhésion focale, la taline liée à l'intégrine s'étire et rend accessible ses sites de liaison à la vinculine qui peut alors s'y fixer (Hirata et al. 2015; Del Rio et al. 2009). Plus la force appliquée est importante, plus la taline se déplie et expose des sites de liaison, permettant ainsi l'augmentation du nombre de vinculines présentes au niveau de l'adhésion focale (Galbraith, Yamada, and Sheetz 2002; Del Rio et al. 2009). Le complexe taline - vinculine est donc un réel mécanosenseur.

1.2. Les Cadhérines

Une autre classe de mécanorécepteurs qui ont été l'objet de nombreux travaux sont les cadhérines. Celles-ci sont localisées au niveau des complexes protéiques des jonctions cellulaires appelées jonctions adhérentes, et partagent des molécules de signalisation communes avec les adhésions focales. Les jonctions adhérentes ont pour but premier de lier les cellules adjacentes entre elles de façon stable (B. Gumbiner, Stevenson, and Grimaldi 1988; Nagafuchi and Takeichi 1988). Les liaisons intercellulaires génèrent des forces de contraction qui se transmettent au cytosquelette et modifient l'organisation intracellulaire. Grâce aux jonctions cellulaires, les forces mécaniques sont transmises d'une cellule à l'autre ce qui permet au tissu d'être cohésif et capable de résister aux pressions et étirements. De plus, cela permet la régulation de la croissance du tissu, la différenciation, la motilité et l'apoptose des cellules (Huvneers and de Rooij 2013; Mammoto and Ingber 2010; Mammoto, Mammoto, and Ingber 2013).

Les cadhérines forment la liaison physique entre les protéines de jonction et le cytosquelette. C'est *via* les caténines (la p 120, l' α et la β caténine) et la vinculine qu'elles se lient au cytosquelette d'actine (B. M. Gumbiner 2005; Jurado, de Navascués, and Gorfinkiel 2016; Reynolds et al. 1994). C'est l'interaction α -caténine - vinculine qui est responsable de la perception des forces mécaniques par le complexe cadhérine. Les forces s'exerçant au niveau de la membrane plasmique provoquent

l'étirement de l' α -caténine. En se déployant ainsi, l' α -caténine laisse apparaître ses sites de liaison à la vinculine qui s'y fixe et recrute le cytosquelette d'actine (Huvneers and de Rooij 2013). Ces dernières années, ces complexes cadhérine sont clairement apparus comme des mécanosenseurs. En utilisant l'AFM, il a été montré que l' α -caténine, au sein d'un complexe cadhérine, change de conformation en réponse à des signaux mécaniques. Une fois sous tension, le fragment d' α -caténine activé mécaniquement a une plus grande stabilité qu'un fragment non activé. La stabilité de la conformation de l' α -caténine est encore renforcée par la liaison de la vinculine (Maki et al. 2016). La N-cadhérine a été identifiée comme mécanosenseur dans des expériences utilisant des micropiliers de rigidité variable. Les auteurs ont mis en évidence une relation entre la rigidité du pilier et les forces de traction basées sur la N-cadhérine (Ladoux et al. 2010). Des preuves de l'action mécanosensible de l'E-cadhérine ont été obtenues à partir de billes magnétiques recouvertes d'E-cadhérine. Les auteurs ont démontré que les adhésions entre les cellules et les billes d'E-cadhérine se renforcent de manière proportionnelle à l'ampleur des forces de cisaillement auxquelles les cellules sont exposées (Le Duc et al. 2010).

2. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG constituent une grande famille de récepteurs membranaires présentant une structure commune à sept hélices alpha transmembranaires. L'extrémité amino-terminale de la protéine est extracellulaire, tandis que l'extrémité carboxy-terminale est intracellulaire. Les RCPG doivent leur appellation à leur capacité de couplage à des protéines hétérotrimériques liant le guanosine triphosphate, appelées protéines G. Ces protéines transmettent le signal provenant du récepteur à différents effecteurs intracellulaires permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée. Bien qu'ils soient moins étudiés dans le contexte mécanobiologique que les intégrines ou les cadhérines par exemple, certains RCPG, comme la rhodopsine, ont également une fonction mécanoréceptrice (Farrens et al. 1996). S'ils sont classiquement connus pour s'activer suite à la liaison de leur ligand, il a été démontré, par exemple, que l'étirement de la membrane peut déclencher l'activation du RCPG de type 1 de l'angiotensine II (AT1) sans que la liaison du ligand ne soit requise (Zou et al. 2004). Un autre groupe de recherche a fait une observation similaire deux ans plus tard avec des cellules endothéliales (Chachisvilis, Zhang, and Frangos 2006). Les auteurs ont découvert que la stimulation des cellules par une force de cisaillement, une contrainte hypotonique ou un agent de fluidification de la membrane, entraîne une augmentation significative de l'activité du récepteur B2 de la bradykinine dans les cellules endothéliales et ce, indépendamment de la fixation d'un ligand. Ces données démontrent que des contraintes physiques peuvent affecter l'activité des

RCPG et que ces derniers sont alors impliqués dans la transduction du signal mécanique (Chachisvilis, Zhang, and Frangos 2006).

Les récepteurs d'adhésion couplés aux protéines G (aGPCR) forment une sous-classe unique de la superfamille des RCPG, caractérisée par la présence d'un grand domaine N-terminal extracellulaire, contenant pour la plupart un site de clivage autoprotéolytique. La partie N-terminale possède des sites présentant une homologie avec des régions de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire ou l'interaction cellule-cellule, ayant donné leur nom à cette sous-famille (Hamann et al. 2015). Si l'étude de la fonction des aGPCR en général et plus particulièrement dans la mécanobiologie n'en est qu'à ses débuts, ces récepteurs semblent clairement impliqués dans différents processus de mécanoréception notamment lors de l'interaction des cellules avec leur substrat (Bassilana, Nash, and Ludwig 2019; Kusuluri et al. 2021; Scholz 2018).

3. Les canaux ioniques mécanosensibles

3.1. Généralités

Parmi les mécanorécepteurs se trouvent également certains canaux ioniques sensibles aux variations d'étirement et/ou de courbure de la membrane plasmique. L'ouverture des canaux mécanosensibles peut être déclenchée soit directement par une force physique, soit indirectement par un signal intracellulaire. L'activation directe est principalement causée par les changements physiques de la membrane plasmique, tels les étirements, modifications de courbure, rigidité de la membrane plasmique. La contrainte de cisaillement est un autre déclencheur important pour les canaux mécanosensibles. La mécanosensibilité dite indirecte peut être véhiculée par diverses voies. Les stimuli mécaniques affectent des protéines mécanosensibles sur la membrane plasmique et l'activation de cascades intracellulaires conduit finalement à l'ouverture d'un canal mécanosensible. La réorganisation du cytosquelette et la signalisation de l'intégrine/cadhérine peuvent également provoquer l'ouverture des canaux (Pethő et al. 2019).

3.2. Les canaux Piezo

Récemment identifiés, Piezo 1 et Piezo 2 sont deux récepteurs mécanosensibles de type canal ionique non sélectif (Fang et al. 2021). Ces canaux apparaissent comme des régulateurs

importants en condition physiologique mais sont également impliqués dans les dysfonctionnements pathologiques chez l'Homme. Ils interviennent notamment dans divers processus de mécanotransduction et sont exprimés dans un grand nombre de types cellulaires. Piezo 1 est retrouvé principalement dans les organes soumis au flux et les fibres non-sensorielles, tandis que Piezo 2 est présent au niveau des fibres sensorielles (Wu, Lewis, and Grandl 2017). Piezo 1 et 2 partagent 50% d'homologie de séquence. Ce sont de très grandes protéines de près de 2500 et 2750 acides aminés pour Piezo 1 et Piezo 2 respectivement (Coste et al. 2010). Le récepteur s'organise en homotrimère formant un pore - permettant le passage des ions - coiffé de trois pales, **Figure 22** (Ge et al. 2015; Saotome et al. 2018). Il a été démontré qu'ils répondent à un large éventail de signaux mécaniques : étirement de la membrane, cisaillement, rigidité et topologie du substrat, compression, distension ou confinement des tissus, **Figure 22** (J. Li et al. 2014; Ranade, Woo, et al. 2014). Aucun ligand naturel n'est connu à ce jour : seuls deux composés chimiques, Yoda1 et Jedi2, ont été définis comme activateurs spécifiques de Piezo 1. Leur mécanisme d'action reste en revanche inconnu (Syeda et al. 2015).

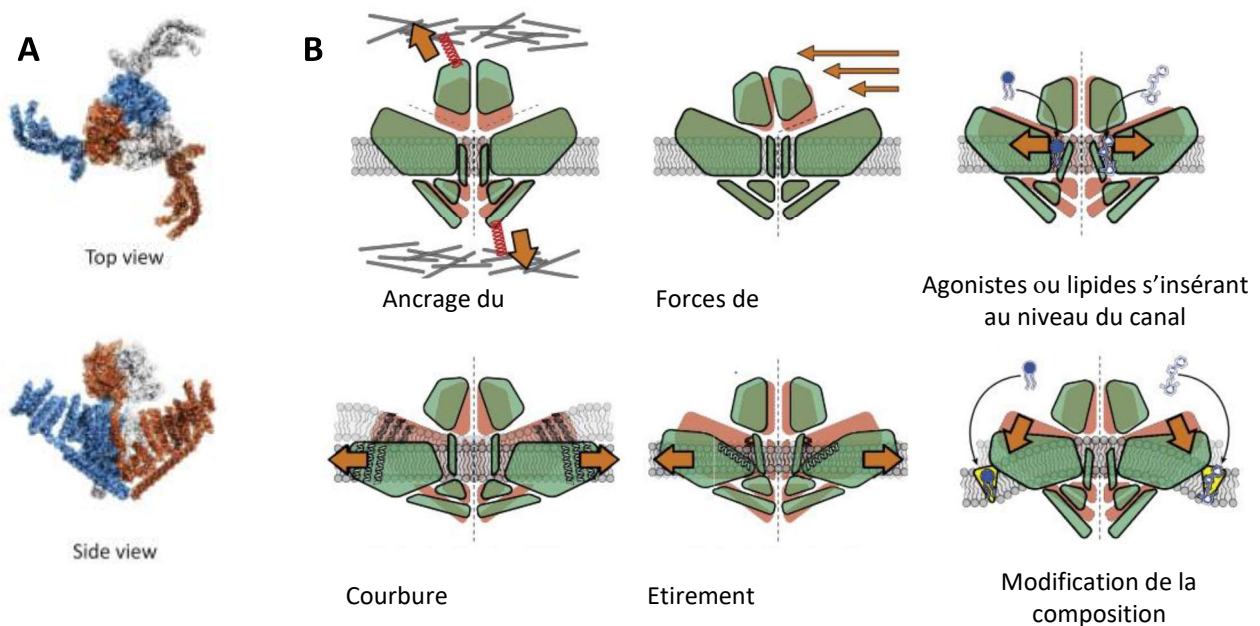


Figure 22 : Structure et mécanismes d'activation du canal Piezo 1. A. Structure homotrimérique du canal. B. Les différents mécanismes d'activation de Piezo 1 (Figure, Wu, Lewis, et Grandl, 2017).

Chez la souris, il a été démontré que Piezo 1 est essentiel au développement vasculaire. Il est exprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins au cours du développement. Chez des souris déficientes en Piezo 1, une mort *in utero* est observée avant le 14^{ème} jour de gestation (Ranade, Qiu, et al. 2014). Chez l'Homme, des mutations faux sens, occasionnant un gain de fonction de la protéine, sont à l'origine de la xérocytose héréditaire, une anémie hémolytique liée à la déshydratation des érythrocytes (Zarychanski et al. 2012). Piezo 1 joue en effet un rôle dans le contrôle des flux ioniques dans les globules rouges : une délétion du gène provoque une hyperhydratation des cellules.

Quant à Piezo 2, il a été principalement étudié dans le système nerveux. Il est présent dans les cellules de Merkel au niveau cutané, et serait impliqué dans la sensation du toucher et la proprioception (Maksimovic et al. 2014; Ranade, Woo, et al. 2014; Woo et al. 2014). Chez la souris, une délétion provoque la mort des souriceaux après la naissance par détresse respiratoire (Nonomura et al. 2017). Chez l'Homme, des mutations provoquant des gains de fonction sont à l'origine de l'arthrogrypose, une condition pathologique se caractérisant par des contractures multiples des membres (McMillin et al. 2014). Une étude de cas a identifié une autre mutation récessive qui serait à l'origine d'une perte de fonction entraînant en plus de l'arthrogrypose, une ataxie sensorielle et des défauts de la proprioception (Haliloglu et al. 2017).

3.3. Les canaux TRPV

Les canaux TRPV pour transient receptor potential vanilloid, sont un autre exemple de canaux calciques mécanosensibles **Figure 23 A**. Ils appartiennent à la superfamille des canaux cationiques du potentiel de récepteur transitoire, les TRP. Les TRP sont des canaux cationiques non sélectifs de la membrane cellulaire par lesquels passent principalement les ions calcium et sodium (Harper and Sage 2016). La superfamille des TRP comprend des protéines qui sont exprimées dans presque tous les tissus et types cellulaires et jouent un rôle important dans diverses fonctions homéostatiques ainsi que dans la perception sensorielle chez les mammifères, notamment le toucher, le goût et l'odorat (Clapham 2003; Damann, Voets, and Nilius 2008). Elles sont divisées en sept sous-familles dont celle des TRPV qui comporte TRPV1 à TRPV6 (Everaerts, Nilius, and Owsianik 2010). C'est donc à cette famille qu'appartiennent TRPV4 (transient receptor potential vanilloid-type 4) également connu sous le nom de OTRPC4, VRL-2, VR-OAC, et TRP12, et TRP2 (aussi nommé VRL et VRL-1), récepteurs auxquels je me suis plus particulièrement intéressée au cours de cette thèse.

TRPV4

L'expression de TRPV4 est ubiquitaire mais il est plus fortement exprimé dans le système nerveux, le système immunitaire, les yeux, les oreilles, le système cardiovasculaire, le système respiratoire, le système urinaire et le système digestif (Yu et al. 2019). La longueur totale de la protéine TRPV4 est de 871 acides aminés avec des terminaisons N et C intracellulaires et six hélices transmembranaires, **Figure 23 B** (Yu et al. 2019). Le groupement en homotétramère permet la formation du canal et de son pore perméable aux cations, **Figure 23 A** (Everaerts, Nilius, and Owsianik 2010; Moran et al. 2011). TRPV4 est canal cationique non sélectif de la membrane cellulaire par lequel passent principalement les ions calcium et sodium. Il est caractérisé par un rapport de perméabilité au Ca^{2+} modérément élevé ($\text{PCa/PNa} = 6\text{-}10$) (Clapham et al. 2005; Voets et al. 2002).

Le canal TRPV4 peut être activé par divers stimuli physiques et chimiques. A l'origine, TRPV4 a été identifié comme étant activé par la pression osmotique (Liedtke et al. 2000; Strotmann et al. 2000) et le gonflement hypotonique des cellules (X. Chen, Alessandri-Haber, and Levine 2007; S. H. Loukin, Su, and Kung 2009; H. Xu et al. 2003). Le canal répond également à la température et le pH acide, les substances endogènes telles que l'acide arachidonique et ses métabolites dérivés du cytochrome P450 (Lyons et al. 2017; Vriens et al. 2004), des dérivés réactifs de l'oxygène, les ROS (reactive oxygen species) (Vellino et al. 2021) mais aussi les forces de cisaillement (Baratchi et al. 2017; Mendoza et al. 2010; O'Neil and Heller 2005).

Deux mécanismes d'activation mécanosensible des TRP sont proposés, l'un direct et l'autre indirect (Christensen and Corey 2007). Dans le cas d'une signalisation mécanique directe, une déformation de la membrane plasmique entraînerait un changement de conformation du canal qui favoriserait son activation. En 2010, un groupe de recherche a d'ailleurs démontré que TRPV4 pouvait être activé par succion membranaire à l'aide d'une pipette (S. Loukin et al. 2010). Dans le cas d'une signalisation indirecte, le canal serait plutôt activé par une action mécanique venant du cytosquelette ou un second messenger généré suite à l'application de forces mécaniques, et non pas directement par l'environnement extérieur de la cellule. C'est ce qui a été démontré par le travail de Xu *et al.* qui met en évidence l'activation de TRPV4, suite à un stress hypotonique, par l'intermédiaire d'une kinase Src qui phosphoryle la tyrosine 253 de TRPV4 (H. Xu et al. 2003). Ce mécanisme d'activation indirect permet d'imaginer une activation très localisée de TRPV4. En outre, des liens croisés ont été décrits entre l'activation de TRPV4 et la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). D'une part, l'AMPC a été identifié comme supprimant l'activation de TRPV4 (Rayees et al. 2019), tandis que dans d'autres cellules, l'activation de TRPV4 a conduit à l'inhibition de l'adénylyl cyclase (E. R. Moore et al. 2018).

Un modèle de souris knock-out (KO) total pour TRPV4 a été généré en 2003. Le KO n'entraîne pas de létalité. Ces souris présentent des déficiences vésicales, les tissus osseux et cartilagineux sont affectés, et d'un point de vue métabolique, elles présentent une protection contre l'obésité, l'inflammation du tissu adipeux et l'insulino-résistance. Chez l'Homme, une cinquantaine de mutations du gène ont été identifiées, affectant principalement le développement du squelette et du système nerveux (Leddy et al. 2014). Une étude de cas a été publiée récemment décrivant un bébé portant une mutation du gène TRPV4 caractérisée par une substitution de G par A en position 1303 (Thom, Brandsma, and Lambert 2020). Cette mutation a entraîné une thrombocytose avec une numération plaquettaire trois fois supérieure à la normale. Une assistance respiratoire a été nécessaire dès la naissance et l'enfant est décédé à 4 mois. L'embryon présentait une dysplasie squelettique métatropique se traduisant par une circonférence thoracique réduite ainsi qu'un raccourcissement des os longs. Une étude précédente regroupant une dizaine de cas avait fait les mêmes observations morphologiques, celles-ci entraînant ou non une létalité (Camacho et al. 2010).

TRPV2

TRPV2, pour Transient Receptor Potential Vanilloid type-2 (également désigné par VRL, VRL-1 et VRL1), fait également partie de la sous-famille des TRPV, **Figure 23 C**. Le canal TRPV2, également exprimé de manière ubiquitaire, est fortement présent dans le cerveau, la moelle épinière, les neurones sensoriels, le poumon, la rate, l'intestin grêle et le gros intestin, les cellules endothéliales, les myocytes cardiaques et le muscle lisse vasculaire. TRPV2 peut être activé notamment par une température supérieure à 52°C, une hypotonicité, des facteurs de croissance ou encore un phénomène d'exocytose (O'Neil and Heller 2005). TRPV2 et TRPV4 partagent une homologie de séquence de près de 40% (Liedtke et al. 2000; Strotmann et al. 2000). Le canal est lui aussi un homotétramère formant un pore ionique (Chai et al. 2019; Zubcevic et al. 2016). TRPV2 est plus perméable aux ions Ca^{2+} qu'aux ions Na^+ avec un ratio de perméabilité de $\text{PCa/PNa} = 3:1$ (Clapham et al. 2005). Comme TRPV4, TRPV2 est aussi un mécanorécepteur pouvant être activé par un stress mécanique lié à un étirement de membre ou un changement de pression osmotique par exemple (Siveen et al. 2020).

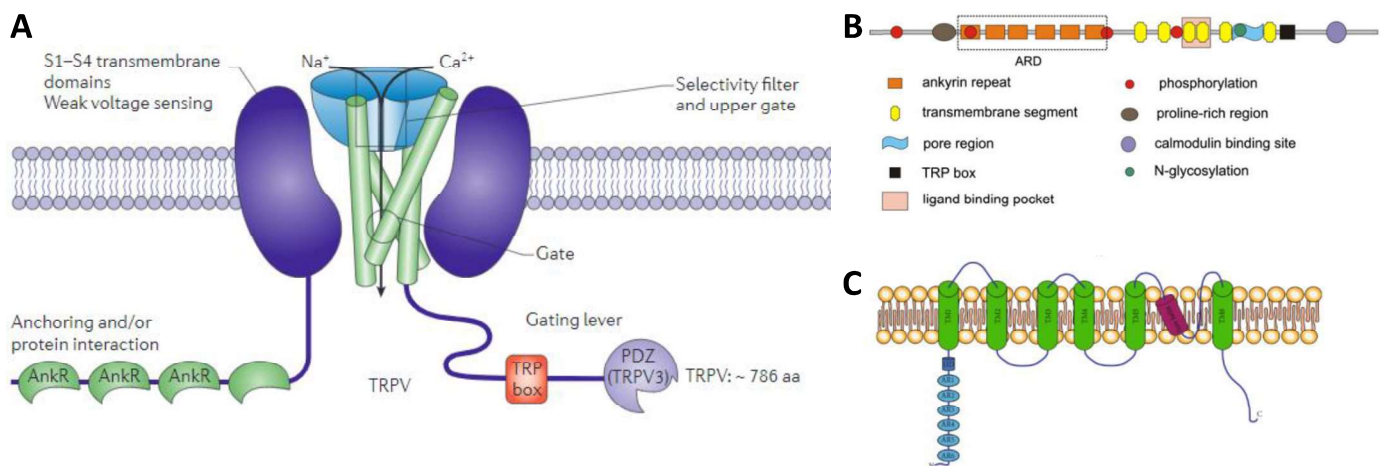


Figure 23 : Canaux TRPV4 et TRPV2. A. Structure des canaux TRPV organisés en homotétramères (Moran et al. 2011). B. Monomère de TRPV4 (Everaerts et al. 2010). C. Monomère de TRPV2 (schéma, Siveen et al. 2020).

4. Le cytosquelette

Le cytosquelette est l'un des acteurs clés de la mécanotransduction, quel que soit le mécanorécepteur impliqué, et est également lui-même un mécanosenseur en tant que tel. Il intervient dans la réponse cellulaire en modifiant la morphologie de la cellule selon le stress mécanique ressenti. Il intervient notamment dans les réponses les plus rapides. En effet, les forces mécaniques peuvent se propager le long du cytosquelette à des vitesses allant jusqu'à 30 μm par seconde, ce qui est 25 fois plus rapide que le transport des moteurs moléculaires et 12,5 fois plus rapide que la diffusion passive des molécules de signalisation (Maurer and Lammerding 2019; N. Wang, Tytell, and Ingber 2009). Etant donné qu'il constitue un lien direct entre la membrane plasmique et le noyau, sa mobilisation peut également aboutir à une modification de l'accessibilité transcriptionnelle de la chromatine et entraîner ainsi une modification de l'expression génique. Ce type de réponse est de l'ordre de plusieurs minutes à quelques heures (Khalilgharibi et al. 2016). Le cytosquelette est constitué de plusieurs types de filaments, chacun ayant des propriétés différentes ; les microtubules, la myosine, l'actine et les filaments intermédiaires. C'est l'assemblage de ces fibres en un réseau dynamique modulable qui constitue le cytosquelette cellulaire. Le rôle des microtubules dans la mécanotransduction reste encore peu éclairci à ce jour, mais il est probable qu'ils agissent de concert avec les fibres plus élastiques du cytosquelette d'actine ou des filaments intermédiaires afin d'augmenter significativement les forces de compression que celui-ci peut supporter et favoriser sa stabilité (Brangwynne et al. 2006).

4.1. L'actine

L'actine est l'élément clé du cytosquelette impliqué en mécanobiologie. Celle-ci peut être organisée sous différentes formes afin de remplir divers rôles, que ce soit un rôle de soutien architectural ou fonctionnel. Au niveau de la membrane plasmique de la cellule se trouvent des microfilaments organisés en réseau servant de soutien membranaire appelé actine corticale (Morone et al. 2006). Au niveau des lamellipodes les filaments d'actine sont orthogonaux et branchés. D'autres structures formées par l'actine sont les fibres de stress ; de longues fibres rectilignes constituées de microfilaments d'actine assemblés entre eux de façon antiparallèle par des filaments bipolaires de myosine II permettant leur tension (Pollard and Cooper 2009). On en distingue quatre sous-types selon leur localisation : les fibres dites dorsales, ventrales, les arcs transverses et les fibres constituant la capsule d'actine périnucléaire (Khatau et al. 2009; J. V. Small et al. 1998; Tojkander, Gateva, and Lappalainen 2012). Les fibres de stress participent à l'adhésion et la migration cellulaire mais également à la réponse cellulaire au stress mécanique *via* les propriétés contractiles que lui confère son interaction avec des protéines motrices de myosine (Even-Ram et al. 2007). Le cytosquelette d'actine, par son interaction avec les mécanosenseurs cellulaires taline et vinculine, facilite la transmission du message biomécanique résultant de l'adhésion à la matrice vers le noyau (Hirata et al. 2015; Huveneers and de Rooij 2013).

L'actine intervient également dans la mécanotransduction *via* la régulation de la disponibilité de facteurs de transcription, tel que le facteur MKL1 (voir la partie III.C.1.1.2). La localisation et l'activité de ce dernier sont régulées par l'actine monomérique (X. Huang et al. 2012a; Smith et al. 2013). Le cytosquelette d'actine est présent dans certaines structures cellulaires mécanosensibles. L'actine intervient dans la formation des podosomes, lamellipodes et des points d'ancrage (L. P. Cramer, Siebert, and Mitchison 1997; Tojkander, Gateva, and Lappalainen 2012). Les faisceaux d'actomyosine sont souvent ancrés aux adhésions focales qui relient la MEC au cytosquelette d'actine (Naumanen, Lappalainen, and Hotulainen 2008; Pellegrin and Mellor 2007). Ces différentes organisations confèrent à la cellule les capacités d'ancrage à la MEC, d'adhésion, de migration, d'exploration de l'environnement proche, et de changement de forme (Stricker, Falzone, and Gardel 2010). De plus, la présence de l'actine au niveau des adhésions focales permet à la cellule de ressentir la rigidité environnante et de transmettre le signal au noyau *via* l'actine périnucléaire qui agit ensuite sur la morphologie du noyau (C. S. Chen, Tan, and Tien 2004; Cho, Irianto, and Discher 2017; Khatau et al. 2009). Le cytosquelette d'actine est lui-même lié au complexe LINC (Linker of Nucleus and Cytoskeleton). Lorsqu'une force est transmise au cytosquelette, le complexe LINC transmet alors le stimulus mécanique au noyau (Lombardi and Lammerding 2011). Cette interaction

directe, permet notamment de déplacer le noyau dans la cellule, ou de réguler l'expression génique en agissant sur la chromatine (Olson and Nordheim 2010).

4.2. La myosine

La myosine est un moteur moléculaire, dont l'activité motrice dépend de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). Nous nous focalisons ici sur la myosine II responsable de la contraction des filaments d'actine. Trois isoformes sont décrites, les myosines IIA, IIB et IIC. Si la plupart des cellules expriment deux voire trois isotypes, ce n'est pas le cas des MK qui n'expriment que la myosine IIA. La myosine II est un hexamère constitué de 2 chaînes lourdes comportant un domaine N-terminal globulaire de liaison à l'actine et une partie C-terminale en double hélice, 2 chaînes légères régulatrices et 2 chaînes légères dites essentielles, ayant un rôle structural. C'est par l'intermédiaire des domaines N-terminaux globulaires de la chaîne lourde que se fait l'attachement aux filaments d'actine. Son activité contractile et sa liaison à l'actine sont dépendantes de la phosphorylation de sa chaîne légère nécessaire au déploiement de la myosine et à son activation. Une fois déployée, plusieurs molécules de myosine peuvent s'associer « tête-bêche » *via* leurs double hélices en filaments épais bipolaires possédant plusieurs « têtes » (J. V. Small 1988). Ce sont ces filaments épais de myosine qui, une fois liés aux filaments antiparallèles d'actine, permettent la contractilité des fibres de stress (Pollard, Weihing, and Adelman 1974; Salbreux, Charras, and Paluch 2012). Différents travaux ont pu mettre en évidence le rôle de la myosine non musculaire II dans les mécanismes contractiles tels que la cytokinèse (Maciver 1996), l'adhésion (Vicente-Manzanares et al. 2011) ou encore la migration (Even-Ram et al. 2007). Dans le contexte mécanobiologique, la myosine II est la plus étudiée de par son rôle de mécanosenseur permettant l'adaptation de la cellule aux contraintes mécaniques de son environnement (Greenberg et al. 2016). Lorsqu'elles sont soumises à des forces mécaniques croissantes, les molécules de myosine en recrutent d'autres pour augmenter la résistance cellulaire (Fouchard, Mitrossilis, and Asnacios 2011). C'est cette opposition aux contraintes mécaniques environnementales qui est essentielle pour préserver la morphologie cellulaire *in situ*.

4.3. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires mesurent autour de 0,5 μm de longueur (Fletcher and Mullins 2010). Il en existe plusieurs types. La structure de base des filaments est identique mais la nature des

protéines les composant est variable d'un type cellulaire à l'autre. A titre d'exemple, la vimentine est retrouvée dans les fibroblastes, la desmine dans les cellules du muscle strié squelettique, les neurofilaments dans les neurones, la cytokératine dans les cellules épithéliales et les lamines au niveau du noyau (Herrmann et al. 2007). Ces filaments sont extrêmement résistants et peuvent supporter un étirement allant jusqu'à trois fois leur longueur (Goldman et al. 2008). Ainsi, ils sont responsables de la propriété viscoélastique de la cellule. Ils interviennent dans la morphologie, la migration et l'adaptation cellulaire à son environnement (N. Wang and Stamenović 2000). Au sein du cytoplasme, les filaments intermédiaires participent à l'ancrage et au positionnement des organelles dans la cellule (Goldman et al. 2008). A l'instar du cytosquelette d'actine, les filaments intermédiaires cytoplasmiques forment un lien direct entre la membrane plasmique et le noyau. En cas de stress mécanique ressenti au niveau membranaire, les filaments transmettent le signal au noyau.

Les MK ne possèdent pas de filaments intermédiaires cytoplasmiques et expriment uniquement les filaments intermédiaires nucléaires : les lamines. Les différents sous-types de lamines (A, B et C) forment des réseaux interconnectés sous la membrane nucléaire. Elles garantissent notamment la stabilité et la rigidité du noyau (Lammerding et al. 2006; De vos et al. 2011). C'est la balance entre les lamines B, peu mobiles, et les lamines A et C, formant des interactions moins fortes, qui détermine la rigidité du noyau et ses variations (Athirasala, Hirsch, and Buxboim 2017). Il a été montré qu'au-delà d'un rôle structural, les réseaux de lamines influencent la transcription, la lamine B permettrait la transcription de gènes situés dans l'hétérochromatine tandis que les lamines A et C favoriseraient la transcription des régions d'euchromatine (Shimi et al. 2008). La rigidité nucléaire est impactée par celle de l'environnement cellulaire. Cela se confirme par le fait que les cellules issues de tissus rigides expriment plus de lamines que celles issues de tissus ayant une résistance moindre et dans lesquelles la déformation du noyau et la migration cellulaire sont favorisées (Swift et al. 2013). Ainsi, les lamines jouent elles aussi un rôle de mécano-effecteur (Osmanagic-Myers, Dechat, and Foisner 2015).

4.4. *Le complexe LINC*

Le complexe LINC permet au noyau de ressentir directement le stress extracellulaire *via* un couplage direct avec le cytosquelette, lui-même relié à la membrane plasmique. Cette structure a été identifiée au début des années 2000 (Crisp et al. 2006; Padmakumar et al. 2005). Ce complexe est composé des protéines de l'enveloppe nucléaire SUN et nesprines (Nuclear Envelope SPECTrIN repeats) (Athirasala, Hirsch, and Buxboim 2017). Les premières sont directement liées au

cytosquelette nucléaire *via* les lamines, tandis que les secondes interagissent avec le cytosquelette cytoplasmique (Kaminski, Fedorchak, and Lammerding 2014; Padmakumar et al. 2005). La contraction ou l'étirement du cytosquelette peuvent ainsi être transmis au noyau *via* le complexe LINC (Lombardi et al. 2011). S'ensuit la modification de la conformation des lamines intranucléaires qui étant liées à la chromatine vont modifier sa conformation et son accessibilité pour favoriser ou inhiber l'expression génique (Chambliss et al. 2013; Fedorchak, Kaminski, and Lammerding 2014). Liées aux filaments d'actine, les nesprines 1 et 2 réagissent à la contraction de la myosine et permettent la transduction du signal mécanique de la membrane plasmique au noyau, **Figure 24** (Arsenovic et al. 2016; Chambliss et al. 2013). De plus, leur interaction avec la kinésine et la dynéine, deux moteurs moléculaires des microtubules, rend possible le changement de position du noyau dans le cytoplasme (Lombardi and Lammerding 2011; Roux et al. 2009; Schneider et al. 2011). Dans les kératinocytes, la localisation du noyau, ainsi que sa morphologie, sont également contrôlées par la nesprine 3 liée à la plectine et aux filaments intermédiaires interagissant avec le cytosquelette d'actomyosine (Almeida et al. 2015). Un défaut du complexe LINC peut provoquer une altération de la polarisation, de la migration et de la morphologie cellulaire, notamment en terme de structure et positionnement du noyau (Lombardi et al. 2011; Lombardi and Lammerding 2011).

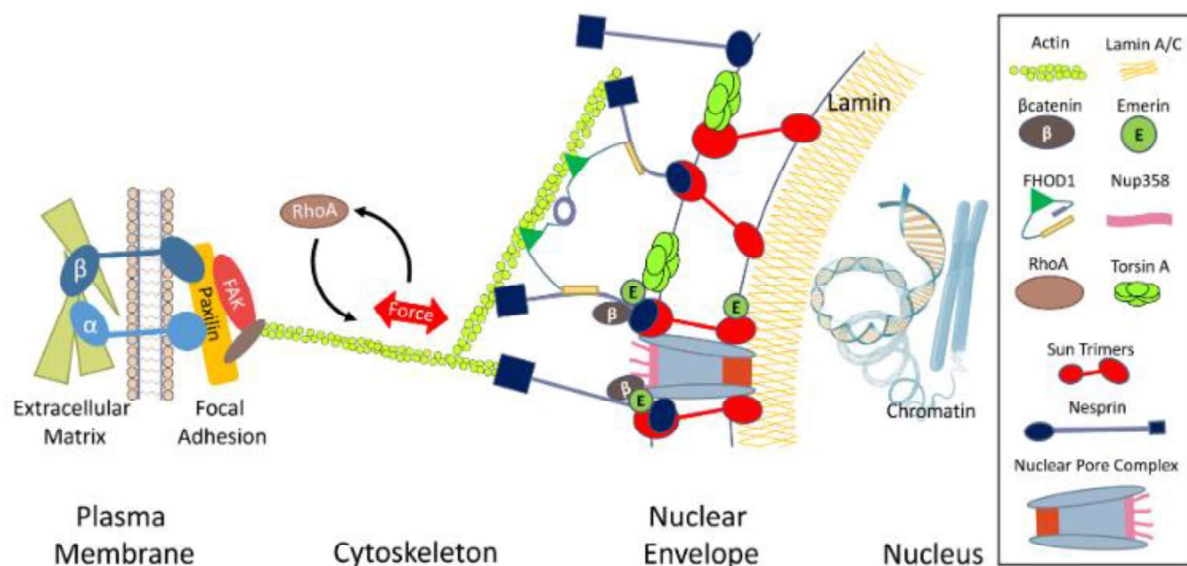


Figure 24 : Représentation schématique des acteurs intracellulaires impliqués dans la mécanotransduction *via* le complexe LINC. (Schéma, Uzer et al. 2016).

C. L'adaptation cellulaire par modification de l'expression génique

L'impact des modifications des contraintes mécaniques extracellulaires peut se traduire, selon les cellules, par une adaptation sur le long terme faisant intervenir une modification du programme transcriptionnel à la suite de l'activation de facteurs de transcription. Plusieurs facteurs de transcription sont relocalisés par les forces mécaniques environnementales ou par les signalisations qui en découlent (voie des MAPK ou voie Wnt par exemple). Dans ce manuscrit je détaille ci-après les exemples de deux co-facteurs YAP et TAZ puis du facteur MKL1, tous étant présents dans les mégacaryocytes, cellules d'intérêt de mon projet de thèse.

1. La voie YAP – TAZ

YAP et TAZ sont des coactivateurs transcriptionnels, initialement connus pour leur rôle au sein de la voie Hippo. La voie Hippo intervenant dans l'inhibition de contact est une cascade d'activation de kinases impliquée dans la régulation du développement des organes, elle intervient dans la croissance, la prolifération ainsi que la différenciation (B. Zhao et al. 2007). Dans ce cas, les kinases MST1/2 (mammalian STE20-like protein kinase 1/2) sous leur forme active phosphorylée phosphorylent les kinases LATS1/2 (LArge Tumor Suppressor kinase), qui à leur tour phosphorylent YAP et TAZ, entraînant leur séquestration par le complexe protéique 14-3-3 dans le cytoplasme (Ivanovska et al. 2015; R. Johnson and Halder 2014; Moon et al. 2017). YAP et TAZ sont ensuite dégradés par le protéasome. S'ils ne sont pas phosphorylés, les facteurs YAP et TAZ se relocalisent préférentiellement dans le noyau et interagissent avec les facteurs de transcription à domaine TEAD (Transcriptional Enhancer factor Domain) pour réguler l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire, **Figure 25 A** (Piccolo, Dupont, and Cordenonsi 2014).

Il est également admis que l'activation de YAP et TAZ peut être contrôlée par des signaux mécaniques tels que la rigidité de la matrice ou le confinement, et ce indépendamment ou non de la voie Hippo (Aragona et al. 2013; Morgan, Murphy, and Russell 2013). Ces facteurs sont aujourd'hui clairement identifiés comme des mécanotransducteurs. YAP et TAZ répondent à un large éventail de stimuli mécaniques, de la contrainte de cisaillement à la forme des cellules (selon que celles-ci ont la possibilité ou non de s'étaler) ainsi qu'à la rigidité de la matrice, et les traduisent en programmes transcriptionnels spécifiques (Panciera et al. 2017). Suite à l'augmentation de la tension intracellulaire, par exemple sur une matrice rigide, YAP et TAZ se trouvent relocalisés dans le noyau,

Figure 25 B (Dupont et al. 2011; Halder, Dupont, and Piccolo 2012). La mise en culture sur un substrat rigide induisant la formation de fibres de stress et l'étalement cellulaire, il a été proposé que l'actine intervienne dans la régulation de la voie YAP/TAZ. Dans les cellules isolées exposées à un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (la latrunculine A), la translocation nucléaire de YAP/TAZ est diminuée de moitié. Cependant, ce n'est pas le cas pour les cellules formant un tapis dense lorsque YAP et TAZ sont exclus du noyau par le phénomène dit d'inhibition de contact (Das et al. 2016). Les deux voies, Hippo et signalisation de l'actine, semblent ainsi intervenir dans la régulation de YAP et TAZ (Sansores-Garcia et al. 2011). Ceci étant dit, les mécanismes précis mis en œuvre restent aujourd'hui mal connus. Par ailleurs, il existe des interactions entre les différentes voies de mécanotransduction (Speight et al. 2016). La voie Wnt ou celle du TGF- β , *via* son effecteur Smad3, pourraient notamment intervenir dans la signalisation YAP/TAZ (Morgan, Murphy, and Russell 2013). La mécanotransduction de YAP et TAZ est considérée comme essentielle au comportement physiologique des cellules souches et apporte un nouvel éclairage sur les mécanismes par lesquels une modification des contraintes mécaniques extracellulaires pourrait contribuer à l'apparition de nombreuses maladies, telles que l'athérosclérose, la fibrose, l'inflammation ou encore les cancers (Panciera et al. 2017).

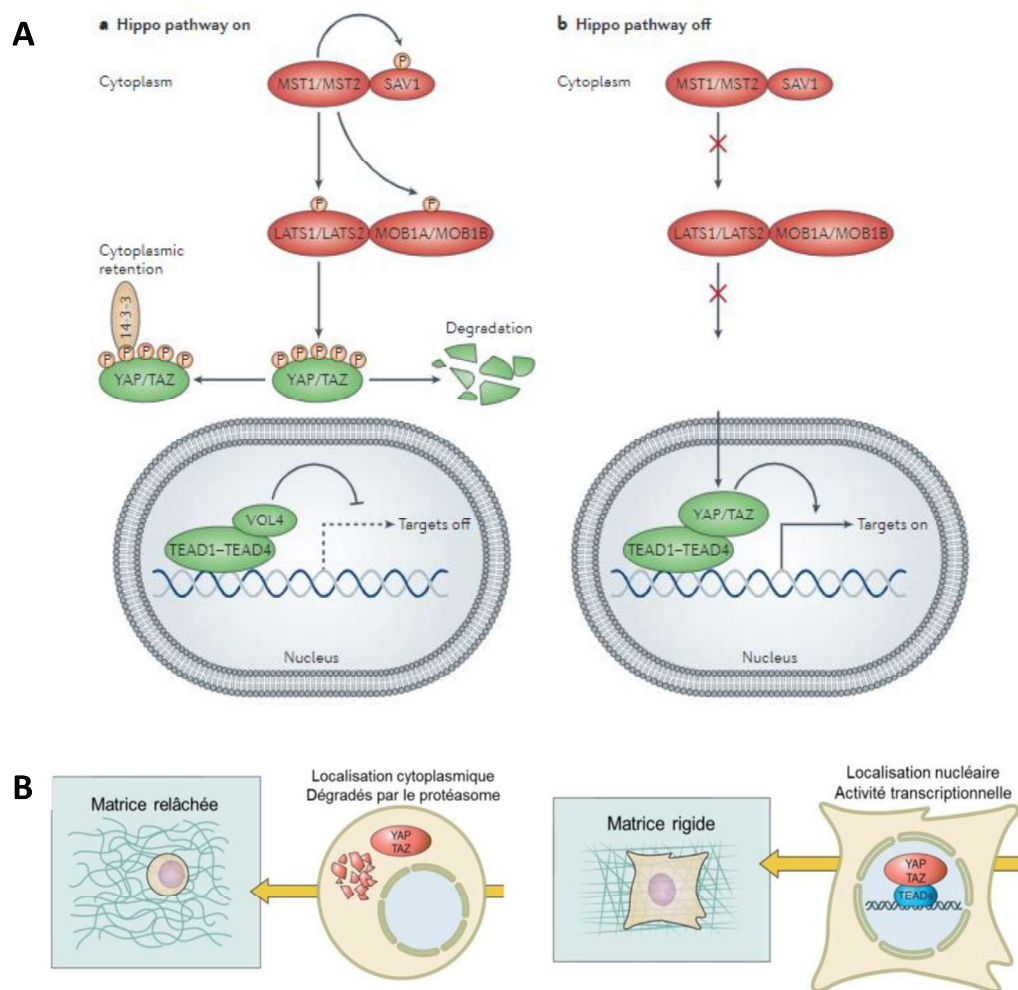


Figure 25 : Signalisation des facteurs de transcription YAP et TAZ. A. Régulation de YAP et TAZ par la voie Hippo (schéma, Johnson & Halder 2014). B. Localisation de YAP et TAZ selon les contraintes mécaniques du microenvironnement cellulaire (schéma adapté de Piccolo et al. 2014).

2. La voie MKL1

Une autre voie de mécanotransduction, très étudiée également, est celle du facteur MKL1 (aussi appelé MRTF-A ou MAL). MKL1, pour MegaKaryoblastic Leukemia factor 1, est un facteur de transcription cytosolique ubiquitaire. Il est exprimé dans de nombreux organes tels que le cerveau, le cœur, les poumons, les reins, le foie et la rate (D. Z. Wang et al. 2002). Son activité est fortement liée à la dynamique de l'actine. En effet, l'actine monomérique se lie à MKL1 *via* son domaine N-terminal et séquestre ce facteur dans le cytoplasme (Miralles et al. 2003; Mizuguchi et al. 2014). En cas

d'exposition de la cellule à un stress mécanique tel que la compression, l'étirement ou l'augmentation de la rigidité, celle-ci réagit en augmentant sa tension intracellulaire pour résister aux stress. L'augmentation de la tension intracellulaire est permise grâce à l'augmentation de la polymérisation d'actine et l'activation de la myosine. Ainsi, la GTPase RhoA favorise le recrutement et la polymérisation des monomères d'actine (Cui et al. 2015; X. Huang et al. 2012a; Iyer et al. 2012), ce qui libère MKL1 qui peut alors migrer vers le noyau où il se lie à son cofacteur SRF (serum response factor) (Athirasala, Hirsch, and Buxboim 2017; Filippi 2015; Miralles et al. 2003). Une fois localisé dans le noyau, le facteur MKL1 active de nombreux gènes, notamment certains codant pour des protéines du cytosquelette, ainsi que pour des protéines impliquées dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, **Figure 26** (Pipes, Creemers, and Olson 2006; Scharenberg et al. 2014). La translocation de MKL1 dans le noyau est un processus relativement rapide à l'échelle cellulaire. Dans des fibroblastes par exemple, la relocalisation se fait dès deux heures après l'étirement cellulaire (Cui et al. 2015). Là encore, plusieurs voies de signalisation se trouvent connectées entre elles, notamment la voie MKL1 et la signalisation du TGF- β (Scharenberg et al. 2014).

Plusieurs études ont démontré que la rigidité a une influence sur l'état d'activation de MKL1. Il a notamment été montré en 2007 que lorsqu'une force s'exerce à la surface de myofibroblastes, les monomères d'actine se polymérisent ce qui entraîne une augmentation de la translocation nucléaire de MKL1 tout au long de la stimulation (X. H. Zhao et al. 2007). Plus récemment, il a été montré que, dans des cellules fibroblastiques, plus la rigidité du substrat est forte, plus la translocation nucléaire de MKL1 est importante. De plus, celle-ci s'accompagne d'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation en cellules myofibroblastiques (X. Huang et al. 2012a).

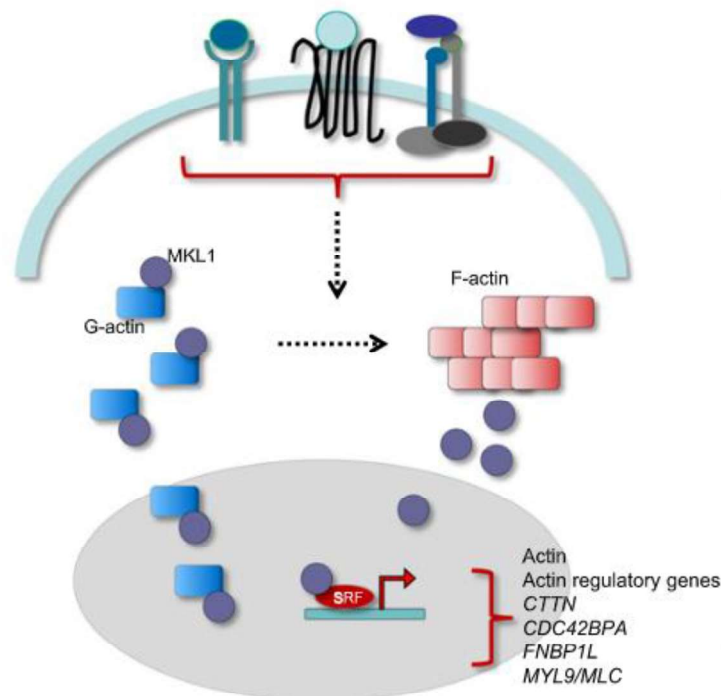


Figure 26 : Signalisation du facteur de transcription MKL1.

MKL1 est séquestré dans le cytoplasme par l'actine G. La détection d'un stimulus mécanique peut entraîner une réorganisation du cytosquelette. Ce remodelage nécessite de l'actine filamenteuse et de la myosine. L'actine G est alors recrutée pour sa conversion en actine F, libérant MKL1 qui migre au noyau. MKL1 stimule notamment l'expression de l'actine, de la cortactine (CTTN), de la protéine de liaison à la formine FNBP1L et de la chaîne légère de la myosine (MYL9/MLC) (schéma, Filippi 2015).

D. La mécanobiologie dans la mégacaryopoïèse

1. L'intérêt de modéliser les contraintes mécaniques dans les systèmes *in vitro*

Bien que les MK puissent être facilement différenciés *in vitro* en présence de TPO, ils ne présentent pas le degré de maturation qui est observé *in vivo*. Sont notamment observées des différences au niveau de la ploïdie, du développement du DMS ainsi que pour la formation de granules, ce qui implique que le processus physiologique n'est pas entièrement reproduit en culture

en milieu liquide (Aguilar et al. 2016). La culture cellulaire présente le grand avantage de pouvoir contrôler l'environnement de cellules et de favoriser la reproductibilité des données obtenues. Cependant, quel que soit le système de culture exploité, celui-ci sera toujours un modèle simplifié de la situation *in situ* ne permettant pas de récapituler entièrement la complexité de l'environnement natif et de garantir l'exacte pertinence physiologique des observations. Il est bien sûr possible de minimiser les biais et d'affiner le milieu de culture afin de se rapprocher au plus près du contexte *in situ*. Dans le cas des MK, plusieurs travaux ont permis de dégager l'importance de l'ajout au milieu de culture de cytokines (Cortin et al. 2005), de facteurs solubles (Strassel et al. 2012, 2016) et d'éléments de la MEC ou encore en réalisant des co-cultures (Larson & Watson, 2006; Tajika, Ikebuchi, Dan, & Asano, 1996; et observations du laboratoire). Si l'étude des aspects mécaniques de l'environnement médullaire tels que la rigidité et la structure tridimensionnelle demeure relativement timide, quelques études ont exploré des modèles de culture faisant intervenir des matrices de rigidité variable ou encore des supports tridimensionnels. En effet, depuis quelques années, l'impact reconnu des facteurs physiques (rigidité, dimensionnalité, forces de cisaillement) sur la différenciation des cellules souches et le comportement général des cellules a conduit quelques équipes à évaluer cet aspect dans le but de comprendre les mécanismes de régulation de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse.

2. Les modèles d'études de la mécanobiologie dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

2.1. Les systèmes sur matrice en 2D

L'influence des propriétés mécaniques de la MO a été explorée notamment par quelques travaux suggérant que le mégacaryocyte réagit à la rigidité ou à l'élasticité de son environnement. Deux publications de 2011 proposent un rôle de la mécanotransduction (Malara, Gruppi, Pallotta, et al. 2011; J.-W. Shin et al. 2011). Shin *et al.* ont observé que les matrices souples constituées d'un gel de collagène I en deux dimensions présentant une rigidité du même ordre que celle de la moelle (module d'Young $E \approx 0,3$ kPa) favorisaient la polypléïdisation des MK et la production de proplaquettes par opposition à des gels plus rigides ($E \approx 34$ kPa) (J.-W. Shin et al. 2011). Cet effet est potentialisé lorsque les MK sont traités avec un inhibiteur de myosine non-musculaire. Il est ainsi admis que les MK ressentent les contraintes mécaniques de la matrice et y réagissent, mais peu de mécanismes ont été clairement identifiés jusqu'alors. Malara *et al.* ont montré que pour résister à la traction des fibrilles du collagène I, les MK humains régulent la contractilité de leur cytosquelette par

l'activation de la voie Rho-ROCK dépendante de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ et la phosphorylation de la myosine (Malara, Gruppi, Pallotta, et al. 2011). Un autre article montre que les collagènes de type I et IV permettent une production plus importante de proplaquettes lorsqu'ils sont déposés sur des films de soie plus souples ($E \leq 10$ MPa) par rapport à des films plus rigides ($E \geq 90$ MPa), ce qui indique un impact des facteurs mécaniques (Abbonante et al. 2017). Di Buduo *et al.* ont développé des structures de soie souples ($E \leq 90$ MPa et $E \leq 10$ MPa) et ont montré que les MK ont une production plus importante de proplaquettes lorsqu'ils sont cultivés sur ces supports par rapport à d'autres plus rigides (module élastique ≥ 90 MPa) (Christian A. Di Buduo et al. 2015).

2.2. Les modèles d'étude de l'environnement mécanique

Des équipes ont également exploré l'impact de l'environnement mécanique non pas uniquement en deux dimensions mais à l'aide de systèmes tridimensionnels et ont notamment permis de démontrer un rôle de la dimensionnalité sur la survie cellulaire, la différenciation et la production de plaquettes. Di Buduo *et al.* ont notamment mis au point une structure en trois dimensions réalisée à partir de fibres de soie. Le système présente deux rigidités différentes (de l'ordre du MPa) ainsi que deux topographies ; l'une sous forme d'éponge, l'autre de tubes, ayant pour but de reproduire l'organisation du stroma médullaire, **Figure 27 A** (Christian A. Di Buduo et al. 2015). La différenciation des progéniteurs en MK matures a lieu dans la partie spongieuse – dont la rigidité n'est pas mentionnée mais qui mime la conformation 3D du tissu médullaire. Afin de modéliser les vaisseaux médullaires, des cellules endothéliales sont cultivées au niveau des parois des tubes perfusables. Dans cette étude, les auteurs mettent en avant l'influence de la topographie et de la rigidité sur la différenciation de MK et leur capacité à produire des proplaquettes. Dans l'ensemble la configuration tridimensionnelle, au plus proche du tissu médullaire, du modèle utilisé a permis un meilleur rendement total en plaquettes par rapport à de précédents systèmes. En revanche, ils n'ont pas étudié l'impact du système sur la morphologie, le DMS ou la ploïdie des cellules, ce qui ne permet pas d'apporter d'information directe quant à l'influence de la topographie et de la rigidité sur la maturation des MK.

Un autre travail qu'il est important de mentionner est celui réalisé par Pietrzyk-Nivau *et al.* en 2015. Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés à l'impact de l'environnement tridimensionnel sur la différenciation et la maturation des MK puis, dans un deuxième temps, sur la libération des plaquettes (Pietrzyk-Nivau et al. 2015). La culture de progéniteurs mégacaryocytaires humains est réalisée dans un hydrogel de pullulan-dextran, **Figure 27 B**. Les données obtenues indiquent que la

culture au sein du gel permet d'obtenir des MK de plus grande taille avec une ploïdie augmentée et que le nombre de MK formant des proplaquettes est lui aussi plus important qu'avec un milieu de culture liquide. Ainsi, l'utilisation de ce système tridimensionnel favorise la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires ainsi que leur différenciation. Dans une autre étude l'utilisation d'un hydrogel de hyaluronane favorise le maintien de la population des progéniteurs hématopoïétiques par rapport à une culture en milieu liquide (Demange et al. 2013). Ces travaux appuient l'idée que l'environnement physique n'est pas une structure inerte mais réuni un ensemble de paramètres participant activement à la différenciation et à la maturation des MK ainsi qu'à la libération des plaquettes.

Enfin, des travaux du laboratoire utilisant un gel de MC de rigidité comparable à celle de la MO (60 Pa) ont permis de révéler des voies de mécanotransduction mises en jeu, **Figure 27 C** (Aguilar et al. 2016). Le choix de l'hydrogel s'est porté sur la MC qui est un matériau permettant le développement des cellules hématopoïétiques tout en étant non réactif afin de s'affranchir des interactions MEC – récepteurs. Par comparaison avec les mégacaryocytes issus de culture liquide, la culture en hydrogel de MC favorise la différenciation en termes de développement et organisation du DMS, augmente la ploïdie et la capacité à émettre des proplaquettes. Ces travaux ont permis de démontrer que le confinement et la rigidité du gel imitant les signaux mécaniques de la moelle favorisent un niveau de maturation des MK plus proche de celui observé *in situ* ce qui n'est pas le cas lorsque les MK sont cultivés en milieu liquide, en 2D sur le dessus du gel ou dans un gel plus rigide (300-600 Pa). Ce système de culture, recréant des contraintes physiques, permet notamment de révéler les défauts des MK déficients en myosine-IIA observés à l'intérieur de la moelle mais absents en culture liquide (Aguilar et al. 2016).

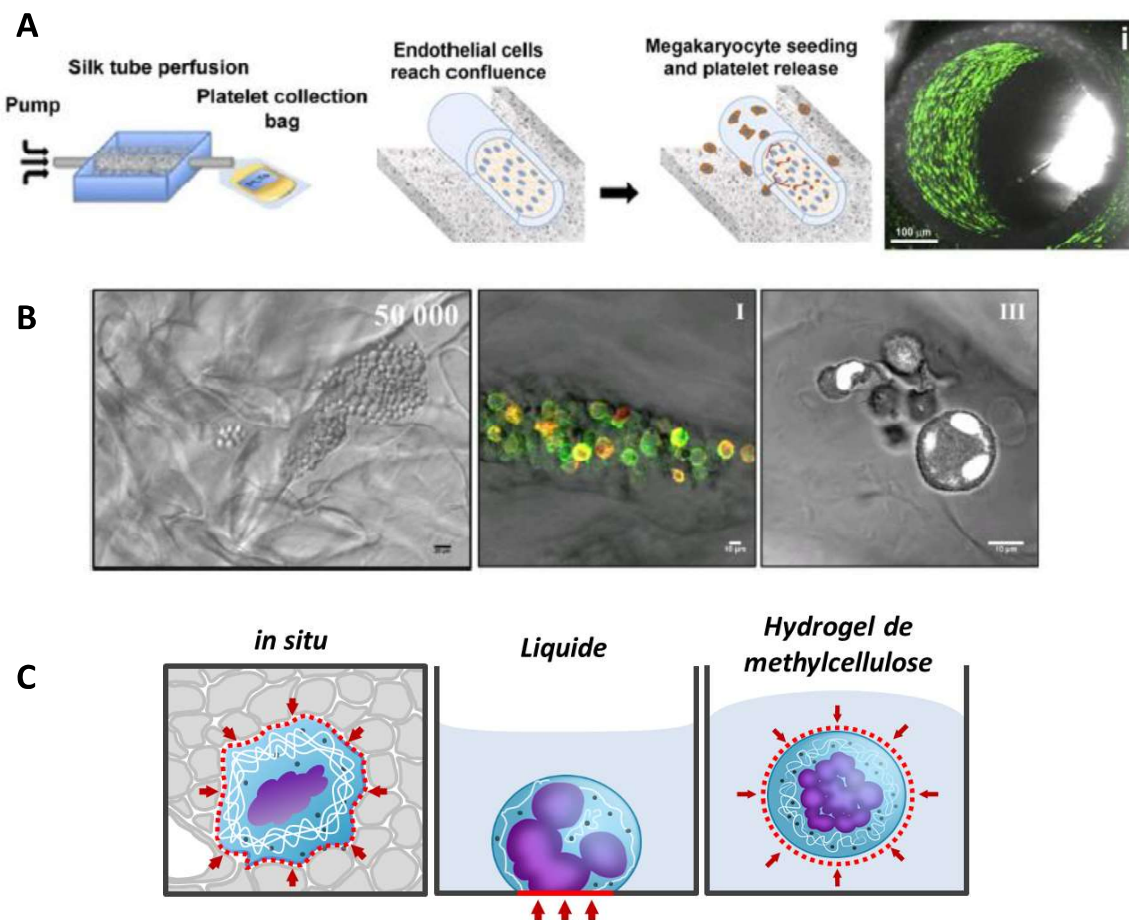


Figure 27 : Modèles tridimensionnels pour la culture de cellules hématopoïétiques. A. La structure composée d'une éponge de soie entourant un tube de soie de rigidité plus importante. Les cellules endothéliales sont ensemencées dans le tube et les progéniteurs mégacaryocytaires dans l'éponge. Les MK matures à proximité du tube étendent leur proplaquettes dans la lumière du tube. L'application d'un flux dans le tube favorise leur libération (figures de Di Buduo et al. 2015) B. L'hydrogel de pullulan-dextran. Les progéniteurs MKs ensemencés dans le gel se retrouvent piégés dans les pores (images, Pietrzyk-Nivau et al. 2015). C. L'hydrogel de méthylcellulose (MC). Dans son environnement *in situ*, des contraintes physiques s'exercent sur la cellule. En milieu liquide, la cellule est isolée et sédimente en fond de puits ce qui peut induire une polarisation artificielle. Dans l'hydrogel, la cellule est maintenue en suspension et supporte les contraintes physiques induites par la rigidité du gel (d'après Aguilar et al. 2016).

2.3. Les forces de cisaillement

Le mouvement d'écoulement d'un fluide peut être décomposé par le glissement des différentes couches qui le constituent les unes sur les autres. Ce glissement génère des forces appelées forces de cisaillement qui s'expriment par un coefficient de transport : la viscosité. Cette grandeur traduit la capacité d'un fluide donné à résister à l'écoulement. Le sang étant un fluide, des forces de cisaillement sont présentes dans tous les vaisseaux. L'écoulement du sang dans les vaisseaux sinusoides présente des contraintes de cisaillement variables allant de zéro à 10 dyn/cm^2 et un taux de cisaillement de $3 \text{ à } 340 \text{ s}^{-1}$ (Bixel et al. 2017). Bien que la signalisation ne soit pas connue à l'heure actuelle, il a été montré dans plusieurs travaux que les contraintes mécaniques liées au flux sanguin jouent un rôle substantiel dans l'élongation des proplaquettes et la libération des plaquettes et ce *in vitro* comme *in vivo*, au sein de la moelle mais également dans la microcirculation pulmonaire (Bender et al. 2015; Bornert et al. 2020; Ito et al. 2018; Lefrançais et al. 2017). Sur la base de ces observations, certains laboratoires ont développé différents systèmes microfluidiques et bioréacteurs permettant de modéliser le flux et les forces de cisaillement afin de favoriser la libération des plaquettes (Christian A. Di Buduo et al. 2021). En effet, seules les cellules cultivées dans des conditions de flux peuvent restituer les propriétés hydrodynamiques de la circulation sanguine. Les dispositifs microfluidiques ont la capacité de permettre l'extension des proplaquettes et la libération de plaquettes fonctionnelles (Blin et al. 2016; Nakagawa et al. 2013; Thon et al. 2014). Les systèmes tridimensionnels combinent les avantages d'un environnement tridimensionnel avec un flux parcourant cette structure 3D : les cellules matures peuvent migrer vers le compartiment perfusé pour y libérer des plaquettes (Christian A. Di Buduo et al. 2015). La culture cellulaire dans des bioréacteurs composés d'une cuve soumise à une agitation reproduisant des flux turbulents a été exploitée pour permettre la production à grande échelle de plaquettes (Ito et al. 2018). Une méthode de production et libération de plaquettes de culture a également été développée au laboratoire. La libération se fait grâce à des flux turbulents créés par une succession d'aspirations et de refoulements à l'aide d'une pipette de 1 mL. Ce système permet d'obtenir des plaquettes de culture ayant des propriétés similaires aux plaquettes natives (Do Sacramento et al. 2020). Se basant sur ces données, un dispositif qui permettra d'automatiser l'étape de libération et d'augmenter l'échelle de production de plaquettes est en cours de développement.

3. Signalisation

Jusqu'à présent, la manière dont les MK détectent et réagissent aux signaux mécaniques est loin d'être entièrement comprise et documentée dans sa globalité. Cependant quelques travaux ont déjà permis de mettre en évidence certaines pistes.

3.1. Actomyosine et MKL1

Au niveau intracellulaire, les MK comme toutes les cellules s'adaptent à la rigidité en modulant leur cytosquelette d'actomyosine. Cela a notamment été démontré par l'étude du phénotype de souris déficientes pour la myosine IIA. Alors que les MK de souris témoins présentent une morphologie sphérique caractéristique, les MK de souris déficientes pour la myosine IIA adoptent une morphologie « fuyante » ; les MK semblent en effet s'infiltrer sans contrainte entre les autres cellules de la MO. En outre, l'absence de myosine affecte négativement le processus de différenciation et la formation de proplaquettes (Anita Eckly et al. 2009). En revanche, ce défaut n'est pas reproduit *in vitro* en culture liquide, où les contraintes extracellulaires sont faibles. A l'inverse, la culture de progéniteurs déficients en myosine en présence de contraintes extracellulaires mimées par l'encapsulation en hydrogel entraîne des défauts morphologiques des MK, similaires à la morphologie observée *in situ* (Aguilar et al. 2016). Ainsi, ces résultats pourraient suggérer que la myosine IIA est nécessaire pendant la maturation des MK pour contrebalancer les forces locales externes exercées par les cellules environnantes et qu'elle serait impliquée dans le mécanisme d'adaptation des MK aux contraintes mécaniques. De plus, il a également été montré que la culture en hydrogel 3D permet d'augmenter la capacité future des MK à former des proplaquettes, et que cette propriété est sous la dépendance de la relocalisation nucléaire du facteur de transcription mécanosensible MKL1 (Aguilar et al. 2016). Quelques équipes s'étaient déjà penchées sur le rôle de MKL1 dans la biologie des cellules hématopoïétiques. Il tient notamment une place importante dans la maturation et la différenciation des MK, favorisant la polyploïdie et l'expression de marqueurs plaquettaires tels que la GPV et de facteurs de transcription spécifiques de la lignée mégacaryocytaire comme GATA1 (E.-C. Cheng et al. 2009; Gilles et al. 2009; Ragu et al. 2010; Smith et al. 2013). Les souris déficientes pour MKL1, présentent une diminution de la production de plaquettes (E.-C. Cheng et al. 2009).

3.2. Voie Hippo et YAP/TAZ

Quelques études suggèrent également un rôle pour les **facteurs de transcription YAP/TAZ**. Des travaux réalisés chez la drosophile ont notamment mis en lumière l'implication de YAP et TAZ dans l'hématopoïèse (Ferguson and Martinez-Agosto 2014; Milton et al. 2014). Les auteurs ont montré que Yorkie, l'homologue de YAP chez la drosophile, est nécessaire à la spécification de la lignée hématopoïétique. Ils définissent la voie Hippo comme un médiateur clé de l'hématopoïèse en montrant qu'elle contrôle la différenciation et la prolifération des deux principaux types cellulaires sanguins. Chez les mammifères, Lorthongpanich *et al.* ont réalisé des travaux sur des cellules MEG-01, une lignée cellulaire de leucémie mégacaryoblastique humaine (Lorthongpanich et al. 2017, 2020). Les auteurs ont étudié le rôle de la voie Hippo dans la différenciation mégacaryoblastique et la formation des plaquettes. Ils ont constaté que la déplétion de LATS1/2 augmente la prolifération des cellules mégacaryoblastiques mais inhibe la maturation des mégacaryocytes et la biogenèse plaquettaire (Lorthongpanich et al. 2017). Ils ont également remarqué que la surexpression de YAP dans les MEG-01 a un effet positif sur la prolifération et la différenciation mégacaryocytaire et que, par la suite, la régulation négative du facteur YAP permet la maturation et la libération de plaquettes (Lorthongpanich et al. 2020). Ces travaux, bien que centrés sur la voie Hippo, laissent penser que YAP et TAZ pourraient également jouer un rôle dans la mécanotransduction. L'équipe de William Vainchenker a analysé le rôle de la voie Hippo-p53 dans la régulation de la polyploïdie des MK humains (Roy, Lordier, Pioche-Durieu, et al. 2016). Leurs résultats ont révélé que les protéines de la voie de signalisation Hippo-p53 sont présentes et sont fonctionnelles dans les mégacaryocytes. En outre, les mégacaryocytes polyploïdes ont montré une expression accrue des gènes cibles de YAP par rapport aux mégacaryocytes diploïdes et tétraploïdes et le knockdown de YAP réduit la masse mitochondriale dans les mégacaryocytes polyploïdes.

3.3. Les intégrines

Dans les MK, l'**intégrine $\alpha 2 \beta 1$** est impliquée dans la reconnaissance du collagène I. Lorsque le collagène I est déposé sur une surface rigide (en verre ou en plastique), un étalement des mégacaryocytes et une inhibition de la formation des proplaquettes *via* la voie Rho/ROCK sont observés, comparativement aux autres protéines de matrice qui favoriseraient plutôt la formation des proplaquettes (A. Balduini et al. 2008; Larson and Watson 2006; Malara, Gruppi, Rebuzzini, et al. 2011). A contrario, l'exposition des MK à une matrice de collagène I en conformation moins rigide favorise la formation de proplaquettes (Tablin, Castro, and Leven 1990; Topp, Tablin, and Levin

1990). L'équipe d'Alessandra Balduini a montré que des modifications chimiques du collagène I, visant à diminuer la rigidité des fibres, favorisent l'émission des proplaquettes (Malara, Gruppi, Pallotta, et al. 2011). Ces données suggèrent que les intégrines mégacaryocytaires agissent comme des mécanorécepteurs au contact de la MEC et régulent la thrombopoïèse (Malara, Gruppi, Pallotta, et al. 2011). Plus récemment, une équipe a montré que l'intégrine $\beta 1$ favorise la formation de proplaquettes en s'internalisant en réponse à l'activation mécanodépendante du canal TRPV4 (voir paragraphe suivant III.D.3.4) (Abbonante et al. 2017). Les MK expriment également les intégrines portées par la sous-unité $\beta 3$ ($\alpha IIb\beta 3$ et $\alpha v\beta 3$). Ces intégrines sont connues pour interagir avec le fibrinogène et la fibronectine, protéines de matrice naturellement présentes dans le stroma médullaire et dont la présence augmente fortement lors de myélofibrose (Matsuura et al. 2020). Toutefois, l'étude du rôle mécanosensible de ces intégrines, selon les différentes matrices, n'est pas encore totalement évalué (C. M. Ward and Ravid 2020). Des travaux en cours au laboratoire suggèrent un rôle des intégrines $\beta 3$ plutôt que $\beta 1$ dans le ressenti de la rigidité d'un substrat recouvert de fibronectine.

3.4. Canaux mécanosensibles

Il a été proposé que le canal Piezo 1 soit responsable d'influx de Ca^{2+} dans les plaquettes et mégacaryocytes, suite à une stimulation par des contraintes de cisaillement semblables à celles du flux artériel (Ilkan et al. 2017). En présence d'un agoniste de Piezo 1, les auteurs ont montré que les augmentations transitoires de calcium étaient potentialisées. Ils suggèrent également qu'en présence de forces de cisaillement, Piezo 1 pourrait contribuer à la formation de thrombi artériels. Dans des expériences de perfusion sur collagène I, la taille des thrombi formés est réduite de 50% en présence d'un inhibiteur non sélectif (GsMTx-4). Toutefois, cet inhibiteur bloque de nombreux canaux mécanosensibles indépendamment de Piezo1.

Un autre canal cationique mécanosensible s'étant révélé fonctionnel dans les mégacaryocytes est TRPV4. Son rôle a été mis en évidence dans la formation des proplaquettes, lorsque les mégacaryocytes sont cultivés sur des matrices de faible rigidité. Sur un substrat souple de collagène IV (avec une rigidité de ≤ 10 MPa), l'activation du récepteur entraîne un influx de calcium ainsi que l'activation et l'internalisation des intégrines $\beta 1$ et la phosphorylation de AKT, et favorise ainsi la formation de proplaquettes par rapport à un substrat de collagène I de plus forte rigidité (≥ 90 MPa) (Abbonante et al. 2017).

Ainsi, bien que les données de la littérature disponibles aujourd'hui restent parcellaires et que d'autres investigations demeurent nécessaires pour compléter les connaissances actuelles, l'impact des facteurs mécaniques environnementaux sur la mégacaryopoïèse ne peut être ignoré. Les MK sont, comme tout type cellulaire, capables non seulement de détecter les contraintes extracellulaires mais également d'y réagir. La compréhension de ces phénomènes de mécanosensation et mécanotransduction est particulièrement intéressante lorsque l'on considère l'étude de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse en condition physiologique mais également dans le cadre de pathologies liées à une modification de la rigidité de la moelle, comme par exemple la myélofibrose.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital, leur fonction principale étant d'assurer l'hémostase, c'est-à-dire l'arrêt des saignements. Les plaquettes sont produites dans la MO par les mégacaryocytes. De nombreux aspects entrent en jeu dans la thrombopoïèse. On peut nommer les facteurs solubles, les interactions avec les cellules environnantes et avec les protéines de la MEC. A cela s'ajoute la composante mécanique de l'environnement médullaire. En effet, toutes les cellules de l'organisme évoluent dans un microenvironnement tridimensionnel complexe et sont exposées à des contraintes mécaniques. L'importance de la rigidité et du confinement a progressivement été reconnue qu'au cours des dernières décennies. Depuis lors, l'impact des facteurs mécaniques sur le destin et le comportement cellulaire est de plus en plus étudié mais peu de travaux portent sur la moelle hématopoïétique et les mégacaryocytes. Le stroma médullaire est pourtant un milieu contraint et les mégacaryocytes sont soumis à des forces mécaniques. De plus lorsque, lors de la thrombopoïèse, les mégacaryocytes étendent des proplaquettes dans la lumière des vaisseaux sinusoides, il s'opère une transition du stroma médullaire à la circulation sanguine qui s'accompagne d'une modification des contraintes mécaniques environnantes. Les signaux mécaniques représentent ainsi un paramètre omniprésent et important dont les conséquences sur la différenciation des mégacaryocytes et la formation des proplaquettes n'ont pas été entièrement explorées.

Au cours de ma thèse, j'ai précisément étudié l'impact de l'environnement médullaire sur la biogenèse des plaquettes. Le projet consistait, en particulier, à apporter une réponse aux questions suivantes : i) comment les facteurs mécaniques impactent la formation des proplaquettes ? ii) Quels sont les mécanismes mis en œuvre par les mégacaryocytes pour s'adapter aux contraintes mécaniques de leur environnement ?

i) Formation des proplaquettes *in vivo* : rôle des microtubules et de la myosine

Le processus d'extension de proplaquettes *in vivo* diffère de celui observé en culture. Cela soulève la question de la similarité des mécanismes selon l'environnement, un travail mené au laboratoire par Alicia Bornert, post-doctorante avec qui j'ai pu collaborer. L'utilisation d'une technique de microscopie intravitale a rendue possible l'observation de la formation des PPT *in situ*. Tandis qu'*in vitro* les microtubules et l'actomyosine interviennent fortement dans l'élongation des PPT, les données *in vivo* obtenues nous ont permis de conclure à une implication différente dans le contexte natif. *In situ*, la myosine est à l'origine d'une résistance à l'élongation et les microtubules agissent essentiellement en opposition à cette rétraction endossant le rôle de soutien à la progression de l'extension mais pas de moteur en tant que tel. Les forces protrusives à l'œuvre

résultent fort probablement des contraintes hémodynamiques rencontrées par les extensions dans la circulation sanguine.

Ce travail a donné lieu à un papier pour lequel je signe en 2^{ème} auteur.

ii) Mécanismes d'adaptation aux contraintes mécaniques

Concernant l'impact des contraintes mécaniques sur la thrombopoïèse, de précédents travaux du laboratoire ont mis en évidence que la transition d'un milieu contraint à un milieu liquide favorise la formation des PPT. Ce travail a également permis la mise au point d'un système de modélisation du confinement médullaire.

Lors de mon travail de thèse, nous avons entrepris de déchiffrer les rôles potentiels des canaux calciques mécanosensibles dans le processus de formation des proplaquettes lors de la perte de confinement. L'utilisation d'une approche pharmacologique dans nos différents modèles ainsi que l'étude d'animaux KO nous ont permis d'identifier le canal TRPV4 comme un acteur mécanosensible clef dans la formation des PPT. En plus de TRPV4, les résultats obtenus révèlent que le canal TRPV2 et le récepteurs Piezo 1 et 2 sont également nécessaires pour permettre une extension optimale des proplaquettes par les MK.

Ce travail fait l'objet de la préparation d'un manuscrit, dont je serai 1^{er} auteur, pour une soumission prochaine.

Ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier les mécanismes mis en œuvre par les mégacaryocytes pour s'adapter à des changements de contraintes mécaniques. Le projet portait plus spécifiquement sur la perte de confinement qui a lieu lors de l'extension des proplaquettes, hors du stroma médullaire, dans la lumière des vaisseaux sinusoides. Les travaux réalisés ont permis de mettre en avant une différence d'implication du cytosquelette dans la formation des proplaquettes *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, mon travail a permis de mettre en évidence un rôle majeur du calcium extracellulaire dans le phénomène de formation des proplaquettes. Les résultats obtenus permettent de conclure d'une implication mécanodépendante du canal TRPV4 ainsi qu'un rôle de TRPV2 et des canaux Piezo 1 et 2 dans la thrombopoïèse.

Les différents travaux effectués lors de ces quatre années ont abouti à la réalisation des articles suivants :

- Une revue bibliographique, que je signe en premier auteur, rassemblant les connaissances actuelles sur le mécanisme de formation des plaquettes (publication 1).
- Un article méthodologique ainsi qu'une vidéo didactique, que je signe en premier auteur, détaillant le protocole de culture de progéniteurs en hydrogel de MC (publication 2).
- Un article scientifique par Alicia Bornert, sur lequel je suis deuxième auteur, révélant une implication différente du cytosquelette dans la thrombopoïèse entre *in vivo* et *in vitro* (publication 3)
- Un article scientifique en préparation, duquel je serai premier auteur, qui révèle un rôle des canaux calciques mécanosensibles TRPV et Piezo dans la thrombopoïèse (publication 4).

Ces travaux sont présentés ci-après.

RESULTATS DU TRAVAIL DE THESE

PUBLICATION 1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

« Blood platelet formation at a glance »

Julie Boscher¹, Ines Guinard¹, Anita Eckly¹, François Lanza¹, Catherine Léon²

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, F-67000 Strasbourg, France.

²Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, F-67000 Strasbourg, France Catherine.Leon@efs.sante.fr.

Publié dans Journal of Cell Science. 2020 Oct 30;133(20):jcs244731. doi: 10.1242/jcs.244731.

CELL SCIENCE AT A GLANCE

Blood platelet formation at a glance

Julie Boscher*, Ines Guinard*, Anita Eckly, François Lanza and Catherine Léon†

ABSTRACT

The main function of blood platelets is to ensure hemostasis and prevent hemorrhages. The 10^{11} platelets needed daily are produced in a well-orchestrated process. However, this process is not yet fully understood and *in vitro* platelet production is still inefficient. Platelets are produced in the bone marrow by megakaryocytes, highly specialized precursor cells that extend cytoplasmic projections called proplatelets (PPTs) through the endothelial barrier of sinusoid vessels. In this Cell Science at a Glance article and the accompanying poster we discuss the mechanisms and pathways involved in megakaryopoiesis and platelet formation processes. We especially address the – still underestimated – role of the

microenvironment of the bone marrow, and present recent findings on how PPT extension *in vivo* differs from that *in vitro* and entails different mechanisms. Finally, we recapitulate old but recently revisited evidence that – although bone marrow does produce megakaryocytes and PPTs – remodeling and the release of bona fide platelets, mainly occur in the downstream microcirculation.

KEY WORDS: Megakaryocyte, Platelet, Cytoskeleton, Mechanobiology

Introduction

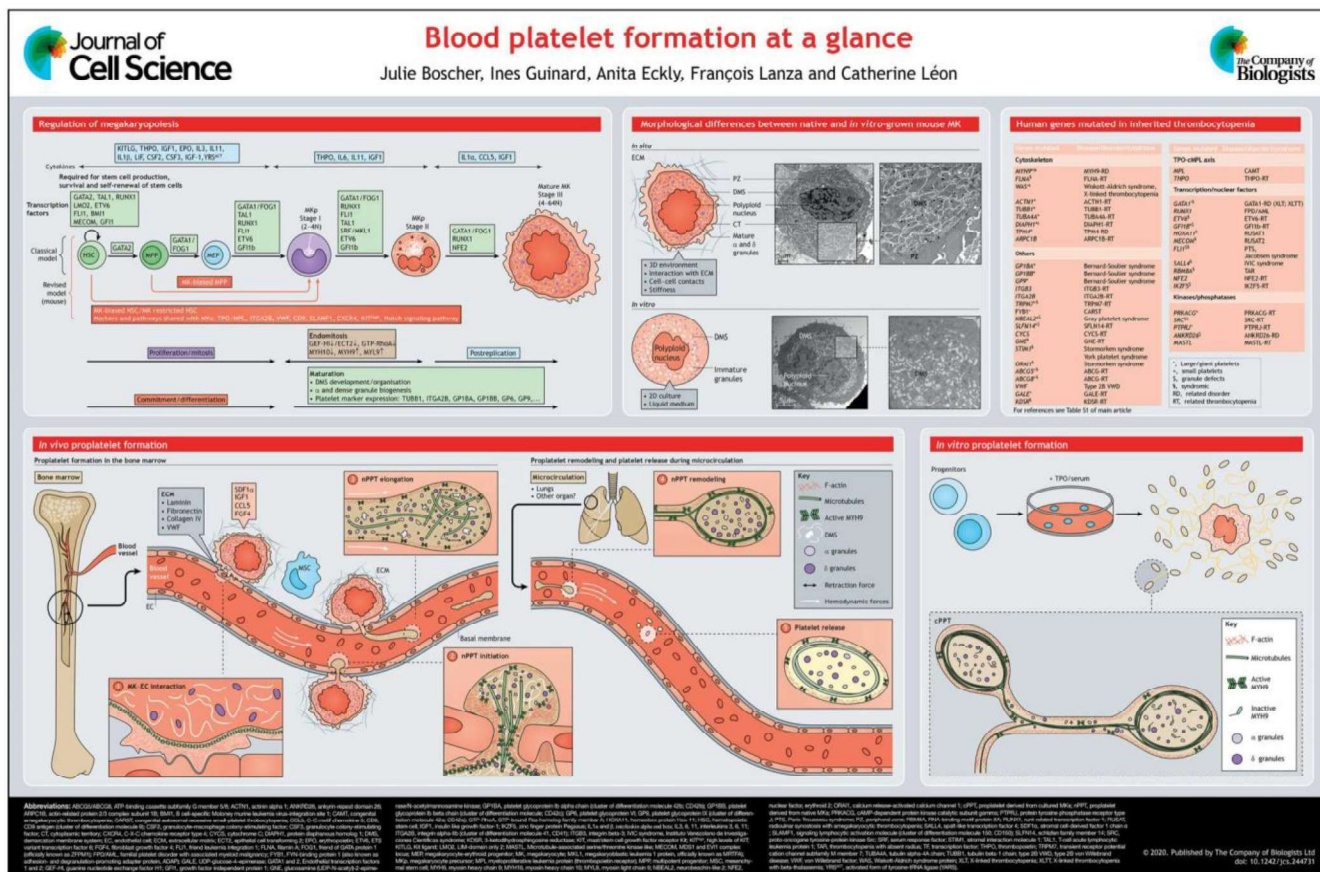
Blood platelets are crucial during hemostasis to prevent hemorrhages. At sites of vascular injury, circulating platelets immediately adhere and aggregate to form a platelet plug to stop bleeding (Nurden et al., 2008), and concomitantly release the contents of their granules to repair the lesion. Defective platelet production or function is life threatening due to the risk of hemorrhaging and may necessitate platelet transfusion. In humans, the reference range for a normal platelet count is $150\text{--}400 \times 10^9/\text{l}$ blood. With a platelet lifetime of approximately eight to ten days, a

Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, F-67000 Strasbourg, France.

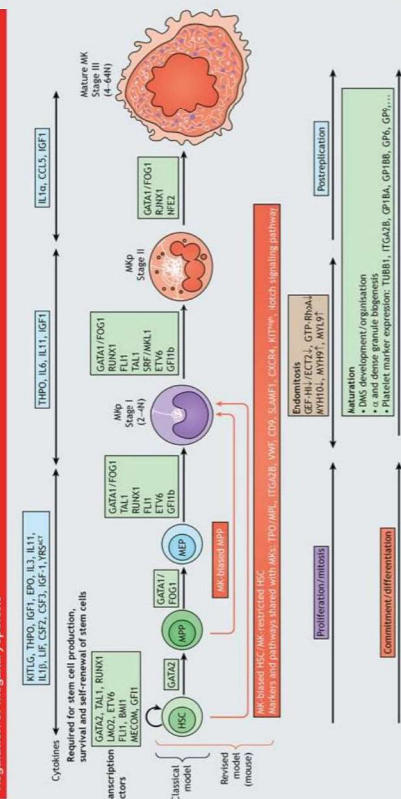
*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (Catherine.Léon@efs.sante.fr)

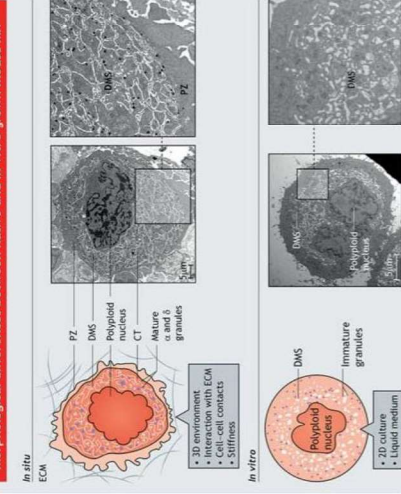
A.E., 0000-0001-9620-4961; F.L., 0000-0002-5802-4748; C.L., 0000-0002-8597-9929



Regulation of megakaryopoiesis



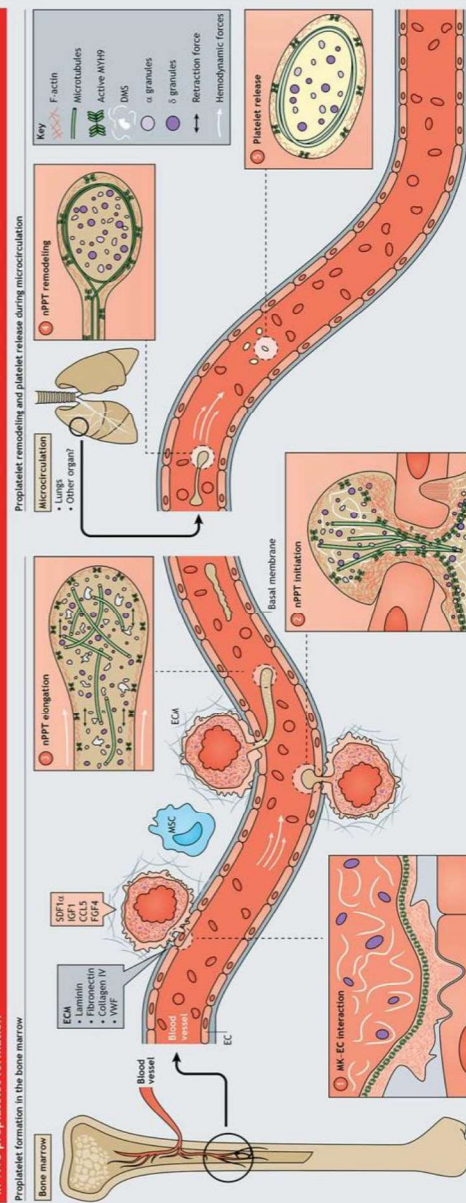
Morphological differences between native and *in vitro*-grown mouse MK



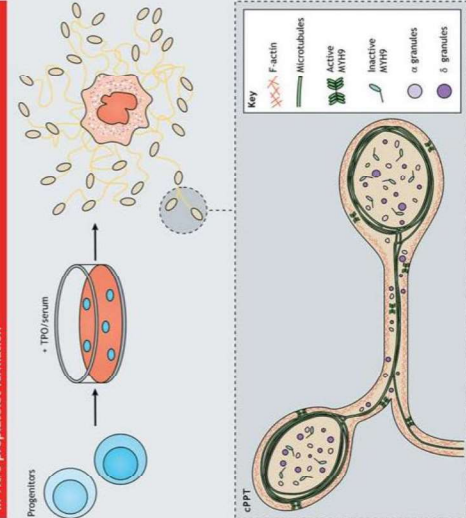
Human genes mutated in inherited thrombocytopathia

Gene	Phenotype	Protein
ADP-1	ADP-1 syndrome	ADP-1
ADP-2	ADP-2 syndrome	ADP-2
ADP-3	ADP-3 syndrome	ADP-3
ADP-4	ADP-4 syndrome	ADP-4
ADP-5	ADP-5 syndrome	ADP-5
ADP-6	ADP-6 syndrome	ADP-6
ADP-7	ADP-7 syndrome	ADP-7
ADP-8	ADP-8 syndrome	ADP-8
ADP-9	ADP-9 syndrome	ADP-9
ADP-10	ADP-10 syndrome	ADP-10
ADP-11	ADP-11 syndrome	ADP-11
ADP-12	ADP-12 syndrome	ADP-12
ADP-13	ADP-13 syndrome	ADP-13
ADP-14	ADP-14 syndrome	ADP-14
ADP-15	ADP-15 syndrome	ADP-15
ADP-16	ADP-16 syndrome	ADP-16
ADP-17	ADP-17 syndrome	ADP-17
ADP-18	ADP-18 syndrome	ADP-18
ADP-19	ADP-19 syndrome	ADP-19
ADP-20	ADP-20 syndrome	ADP-20
ADP-21	ADP-21 syndrome	ADP-21
ADP-22	ADP-22 syndrome	ADP-22
ADP-23	ADP-23 syndrome	ADP-23
ADP-24	ADP-24 syndrome	ADP-24
ADP-25	ADP-25 syndrome	ADP-25
ADP-26	ADP-26 syndrome	ADP-26
ADP-27	ADP-27 syndrome	ADP-27
ADP-28	ADP-28 syndrome	ADP-28
ADP-29	ADP-29 syndrome	ADP-29
ADP-30	ADP-30 syndrome	ADP-30
ADP-31	ADP-31 syndrome	ADP-31
ADP-32	ADP-32 syndrome	ADP-32
ADP-33	ADP-33 syndrome	ADP-33
ADP-34	ADP-34 syndrome	ADP-34
ADP-35	ADP-35 syndrome	ADP-35
ADP-36	ADP-36 syndrome	ADP-36
ADP-37	ADP-37 syndrome	ADP-37
ADP-38	ADP-38 syndrome	ADP-38
ADP-39	ADP-39 syndrome	ADP-39
ADP-40	ADP-40 syndrome	ADP-40
ADP-41	ADP-41 syndrome	ADP-41
ADP-42	ADP-42 syndrome	ADP-42
ADP-43	ADP-43 syndrome	ADP-43
ADP-44	ADP-44 syndrome	ADP-44
ADP-45	ADP-45 syndrome	ADP-45
ADP-46	ADP-46 syndrome	ADP-46
ADP-47	ADP-47 syndrome	ADP-47
ADP-48	ADP-48 syndrome	ADP-48
ADP-49	ADP-49 syndrome	ADP-49
ADP-50	ADP-50 syndrome	ADP-50
ADP-51	ADP-51 syndrome	ADP-51
ADP-52	ADP-52 syndrome	ADP-52
ADP-53	ADP-53 syndrome	ADP-53
ADP-54	ADP-54 syndrome	ADP-54
ADP-55	ADP-55 syndrome	ADP-55
ADP-56	ADP-56 syndrome	ADP-56
ADP-57	ADP-57 syndrome	ADP-57
ADP-58	ADP-58 syndrome	ADP-58
ADP-59	ADP-59 syndrome	ADP-59
ADP-60	ADP-60 syndrome	ADP-60
ADP-61	ADP-61 syndrome	ADP-61
ADP-62	ADP-62 syndrome	ADP-62
ADP-63	ADP-63 syndrome	ADP-63
ADP-64	ADP-64 syndrome	ADP-64
ADP-65	ADP-65 syndrome	ADP-65
ADP-66	ADP-66 syndrome	ADP-66
ADP-67	ADP-67 syndrome	ADP-67
ADP-68	ADP-68 syndrome	ADP-68
ADP-69	ADP-69 syndrome	ADP-69
ADP-70	ADP-70 syndrome	ADP-70
ADP-71	ADP-71 syndrome	ADP-71
ADP-72	ADP-72 syndrome	ADP-72
ADP-73	ADP-73 syndrome	ADP-73
ADP-74	ADP-74 syndrome	ADP-74
ADP-75	ADP-75 syndrome	ADP-75
ADP-76	ADP-76 syndrome	ADP-76
ADP-77	ADP-77 syndrome	ADP-77
ADP-78	ADP-78 syndrome	ADP-78
ADP-79	ADP-79 syndrome	ADP-79
ADP-80	ADP-80 syndrome	ADP-80
ADP-81	ADP-81 syndrome	ADP-81
ADP-82	ADP-82 syndrome	ADP-82
ADP-83	ADP-83 syndrome	ADP-83
ADP-84	ADP-84 syndrome	ADP-84
ADP-85	ADP-85 syndrome	ADP-85
ADP-86	ADP-86 syndrome	ADP-86
ADP-87	ADP-87 syndrome	ADP-87
ADP-88	ADP-88 syndrome	ADP-88
ADP-89	ADP-89 syndrome	ADP-89
ADP-90	ADP-90 syndrome	ADP-90
ADP-91	ADP-91 syndrome	ADP-91
ADP-92	ADP-92 syndrome	ADP-92
ADP-93	ADP-93 syndrome	ADP-93
ADP-94	ADP-94 syndrome	ADP-94
ADP-95	ADP-95 syndrome	ADP-95
ADP-96	ADP-96 syndrome	ADP-96
ADP-97	ADP-97 syndrome	ADP-97
ADP-98	ADP-98 syndrome	ADP-98
ADP-99	ADP-99 syndrome	ADP-99
ADP-100	ADP-100 syndrome	ADP-100

In vivo proplatelet formation



In vitro proplatelet formation



Abstract: Platelets are small, anucleated cells that play a central role in hemostasis and thrombosis. They are derived from megakaryocytes (MKs) in the bone marrow. The process of platelet formation, known as megakaryopoiesis, involves the differentiation of MKs from hematopoietic stem cells (HSCs). This process is tightly regulated by a variety of transcription factors and signaling pathways. In this review, we discuss the current understanding of the molecular mechanisms underlying megakaryopoiesis and platelet formation. We focus on the role of key transcription factors, including GATA2, TAL1, RUNX1, and FLI1, and the signaling pathways involved in their regulation. We also discuss the role of the hematopoietic microenvironment (HME) in regulating megakaryopoiesis and platelet formation. Finally, we discuss the clinical implications of these findings for the treatment of platelet disorders.

Keywords: megakaryopoiesis, platelet formation, transcription factors, signaling pathways, hematopoietic microenvironment.

Introduction: Platelets are small, anucleated cells that play a central role in hemostasis and thrombosis. They are derived from megakaryocytes (MKs) in the bone marrow. The process of platelet formation, known as megakaryopoiesis, involves the differentiation of MKs from hematopoietic stem cells (HSCs). This process is tightly regulated by a variety of transcription factors and signaling pathways. In this review, we discuss the current understanding of the molecular mechanisms underlying megakaryopoiesis and platelet formation. We focus on the role of key transcription factors, including GATA2, TAL1, RUNX1, and FLI1, and the signaling pathways involved in their regulation. We also discuss the role of the hematopoietic microenvironment (HME) in regulating megakaryopoiesis and platelet formation. Finally, we discuss the clinical implications of these findings for the treatment of platelet disorders.

Transcription factors: GATA2, TAL1, RUNX1, FLI1, TAL1, SRF, MAFK, GFI1, GFI1b, GFI1c, GFI1d, GFI1e, GFI1f, GFI1g, GFI1h, GFI1i, GFI1j, GFI1k, GFI1l, GFI1m, GFI1n, GFI1o, GFI1p, GFI1q, GFI1r, GFI1s, GFI1t, GFI1u, GFI1v, GFI1w, GFI1x, GFI1y, GFI1z, GFI1aa, GFI1ab, GFI1ac, GFI1ad, GFI1ae, GFI1af, GFI1ag, GFI1ah, GFI1ai, GFI1aj, GFI1ak, GFI1al, GFI1am, GFI1an, GFI1ao, GFI1ap, GFI1aq, GFI1ar, GFI1as, GFI1at, GFI1au, GFI1av, GFI1aw, GFI1ax, GFI1ay, GFI1az, GFI1ba, GFI1bb, GFI1bc, GFI1bd, GFI1be, GFI1bf, GFI1bg, GFI1bh, GFI1bi, GFI1bj, GFI1bk, GFI1bl, GFI1bm, GFI1bn, GFI1bo, GFI1bp, GFI1bq, GFI1br, GFI1bs, GFI1bt, GFI1bu, GFI1bv, GFI1bw, GFI1bx, GFI1by, GFI1bz, GFI1ca, GFI1cb, GFI1cc, GFI1cd, GFI1ce, GFI1cf, GFI1cg, GFI1ch, GFI1ci, GFI1cj, GFI1ck, GFI1cl, GFI1cm, GFI1cn, GFI1co, GFI1cp, GFI1cq, GFI1cr, GFI1cs, GFI1ct, GFI1cu, GFI1cv, GFI1cw, GFI1cx, GFI1cy, GFI1cz, GFI1da, GFI1db, GFI1dc, GFI1dd, GFI1de, GFI1df, GFI1dg, GFI1dh, GFI1di, GFI1dj, GFI1dk, GFI1dl, GFI1dm, GFI1dn, GFI1do, GFI1dp, GFI1dq, GFI1dr, GFI1ds, GFI1dt, GFI1du, GFI1dv, GFI1dw, GFI1dx, GFI1dy, GFI1dz, GFI1ea, GFI1eb, GFI1ec, GFI1ed, GFI1ee, GFI1ef, GFI1eg, GFI1eh, GFI1ei, GFI1ej, GFI1ek, GFI1el, GFI1em, GFI1en, GFI1eo, GFI1ep, GFI1eq, GFI1er, GFI1es, GFI1et, GFI1eu, GFI1ev, GFI1ew, GFI1ex, GFI1ey, GFI1ez, GFI1fa, GFI1fb, GFI1fc, GFI1fd, GFI1fe, GFI1ff, GFI1fg, GFI1fh, GFI1fi, GFI1fj, GFI1fk, GFI1fl, GFI1fm, GFI1fn, GFI1fo, GFI1fp, GFI1fq, GFI1fr, GFI1fs, GFI1ft, GFI1fu, GFI1fv, GFI1fw, GFI1fx, GFI1fy, GFI1fz, GFI1ga, GFI1gb, GFI1gc, GFI1gd, GFI1ge, GFI1gf, GFI1gg, GFI1gh, GFI1gi, GFI1gj, GFI1gk, GFI1gl, GFI1gm, GFI1gn, GFI1go, GFI1gp, GFI1gq, GFI1gr, GFI1gs, GFI1gt, GFI1gu, GFI1gv, GFI1gw, GFI1gx, GFI1gy, GFI1gz, GFI1ha, GFI1hb, GFI1hc, GFI1hd, GFI1he, GFI1hf, GFI1hg, GFI1hi, GFI1hj, GFI1hk, GFI1hl, GFI1hm, GFI1hn, GFI1ho, GFI1hp, GFI1hq, GFI1hr, GFI1hs, GFI1ht, GFI1hu, GFI1hv, GFI1hw, GFI1hx, GFI1hy, GFI1hz, GFI1ia, GFI1ib, GFI1ic, GFI1id, GFI1ie, GFI1if, GFI1ig, GFI1ih, GFI1ii, GFI1ij, GFI1ik, GFI1il, GFI1im, GFI1in, GFI1io, GFI1ip, GFI1iq, GFI1ir, GFI1is, GFI1it, GFI1iu, GFI1iv, GFI1iw, GFI1ix, GFI1iy, GFI1iz, GFI1ja, GFI1jb, GFI1jc, GFI1jd, GFI1je, GFI1jf, GFI1jg, GFI1jh, GFI1ji, GFI1jj, GFI1jk, GFI1jl, GFI1jm, GFI1jn, GFI1jo, GFI1jp, GFI1jq, GFI1jr, GFI1js, GFI1jt, GFI1ju, GFI1jv, GFI1jw, GFI1jx, GFI1jy, GFI1jz, GFI1ka, GFI1kb, GFI1kc, GFI1kd, GFI1ke, GFI1kf, GFI1kg, GFI1kh, GFI1ki, GFI1kj, GFI1kl, GFI1km, GFI1kn, GFI1ko, GFI1kp, GFI1kq, GFI1kr, GFI1ks, GFI1kt, GFI1ku, GFI1kv, GFI1kw, GFI1kx, GFI1ky, GFI1kz, GFI1la, GFI1lb, GFI1lc, GFI1ld, GFI1le, GFI1lf, GFI1lg, GFI1lh, GFI1li, GFI1lj, GFI1lk, GFI1ll, GFI1lm, GFI1ln, GFI1lo, GFI1lp, GFI1lq, GFI1lr, GFI1ls, GFI1lt, GFI1lu, GFI1lv, GFI1lw, GFI1lx, GFI1ly, GFI1lz, GFI1ma, GFI1mb, GFI1mc, GFI1md, GFI1me, GFI1mf, GFI1mg, GFI1mh, GFI1mi, GFI1mj, GFI1mk, GFI1ml, GFI1mm, GFI1mn, GFI1mo, GFI1mp, GFI1mq, GFI1mr, GFI1ms, GFI1mt, GFI1mu, GFI1mv, GFI1mw, GFI1mx, GFI1my, GFI1mz, GFI1na, GFI1nb, GFI1nc, GFI1nd, GFI1ne, GFI1nf, GFI1ng, GFI1nh, GFI1ni, GFI1nj, GFI1nk, GFI1nl, GFI1nm, GFI1nn, GFI1no, GFI1np, GFI1nq, GFI1nr, GFI1ns, GFI1nt, GFI1nu, GFI1nv, GFI1nw, GFI1nx, GFI1ny, GFI1nz, GFI1oa, GFI1ob, GFI1oc, GFI1od, GFI1oe, GFI1of, GFI1og, GFI1oh, GFI1oi, GFI1oj, GFI1ok, GFI1ol, GFI1om, GFI1on, GFI1oo, GFI1op, GFI1oq, GFI1or, GFI1os, GFI1ot, GFI1ou, GFI1ov, GFI1ow, GFI1ox, GFI1oy, GFI1oz, GFI1pa, GFI1pb, GFI1pc, GFI1pd, GFI1pe, GFI1pf, GFI1pg, GFI1ph, GFI1pi, GFI1pj, GFI1pk, GFI1pl, GFI1pm, GFI1pn, GFI1po, GFI1pp, GFI1pq, GFI1pr, GFI1ps, GFI1pt, GFI1pu, GFI1pv, GFI1pw, GFI1px, GFI1py, GFI1pz, GFI1qa, GFI1qb, GFI1qc, GFI1qd, GFI1qe, GFI1qf, GFI1qg, GFI1qh, GFI1qi, GFI1qj, GFI1qk, GFI1ql, GFI1qm, GFI1qn, GFI1qo, GFI1qp, GFI1qq, GFI1qr, GFI1qs, GFI1qt, GFI1qu, GFI1qv, GFI1qw, GFI1qx, GFI1qy, GFI1qz, GFI1ra, GFI1rb, GFI1rc, GFI1rd, GFI1re, GFI1rf, GFI1rg, GFI1rh, GFI1ri, GFI1rj, GFI1rk, GFI1rl, GFI1rm, GFI1rn, GFI1ro, GFI1rp, GFI1rq, GFI1rr, GFI1rs, GFI1rt, GFI1ru, GFI1rv, GFI1rw, GFI1rx, GFI1ry, GFI1rz, GFI1sa, GFI1sb, GFI1sc, GFI1sd, GFI1se, GFI1sf, GFI1sg, GFI1sh, GFI1si, GFI1sj, GFI1sk, GFI1sl, GFI1sm, GFI1sn, GFI1so, GFI1sp, GFI1sq, GFI1sr, GFI1ss, GFI1st, GFI1su, GFI1sv, GFI1sw, GFI1sx, GFI1sy, GFI1sz, GFI1ta, GFI1tb, GFI1tc, GFI1td, GFI1te, GFI1tf, GFI1tg, GFI1th, GFI1ti, GFI1tj, GFI1tk, GFI1tl, GFI1tm, GFI1tn, GFI1to, GFI1tp, GFI1tq, GFI1tr, GFI1ts, GFI1tt, GFI1tu, GFI1tv, GFI1tw, GFI1tx, GFI1ty, GFI1tz, GFI1ua, GFI1ub, GFI1uc, GFI1ud, GFI1ue, GFI1uf, GFI1ug, GFI1uh, GFI1ui, GFI1uj, GFI1uk, GFI1ul, GFI1um, GFI1un, GFI1uo, GFI1up, GFI1uq, GFI1ur, GFI1us, GFI1ut, GFI1uu, GFI1uv, GFI1uw, GFI1ux, GFI1uy, GFI1uz, GFI1va, GFI1vb, GFI1vc, GFI1vd, GFI1ve, GFI1vf, GFI1vg, GFI1vh, GFI1

production of 10^{11} platelets per day is needed to maintain a constant level (Daly, 2011).

Platelets are cytoplasmic fragments derived from megakaryocytes (MKs), giant cells (50–100 μm) that present at a low frequency within the bone marrow (BM) extravascular compartment (<1% of total marrow cells; Wright, 1910). Although it has been agreed that MKs are the precursor cells to platelets, the mechanisms and the site of platelet release *in vivo* has long remained a matter of debate. Fragmentation theory, whereby platelets are pre-formed within MKs (Kosaki, 2005), contradicted other hypotheses, i.e. that MKs extend cytoplasmic protrusions through the vessel wall (Radley and Scurfield, 1980) or directly enter the blood circulation to release platelets into the lungs (Zucker-Franklin and Philipp, 2000; Stenberg and Levin, 1989). With the development of intravital microscopy and the possibility to observe BM cells in real time, it is now firmly accepted that mature MKs extend cytoplasmic processes, the so-called proplatelets (PPTs), through the sinusoid vessel barrier (Bornert et al., 2020; Junt et al., 2007; Kowata et al., 2014). Once released into circulation, these extensions need to remodel in the downstream microcirculation in order to form bona fide platelets, and a recently revisited – but old – concept proposed the lungs as the main site for platelet release (Lefrançois et al., 2017). This Cell Science at a Glance article and accompanying poster highlight our latest knowledge of the molecular factors that regulate platelet formation. We also focus on recent considerations on how the native microenvironment uniquely contributes to full MK maturation and PPT extension (see poster).

Differentiation and maturation of megakaryocytes

MKs differentiate from hematopoietic stem cells (HSCs), located in the hematopoietic BM, towards the MK lineage, and develop the characteristic features of mature MKs (Deutsch and Tomer, 2013).

Megakaryopoiesis

In the classic stepwise hematopoietic differentiation model, asymmetric division of HSCs gives rise to multipotent progenitor (MPP) cells that gradually lose their self-renewal capacity and their multipotency, leading to the bipotent megakaryocytic/erythroid progenitors (MEPs) that finally differentiate into the unipotent MK progenitor and, then, MK precursor (MKp) cells (Akashi et al., 2000; Woolthuis and Park, 2016; see poster). This well-defined hierarchical model with homogeneous HSCs at the apex has been challenged in the past decade. HSCs and MPPs with a differentiation bias towards the MK lineage have been identified, including a subset of HSCs that can even give rise directly to unipotent MK progenitors (MK-restricted HSCs) (Carrelha et al., 2018; Psaila and Mead, 2019; Sanjuan-Pla et al., 2013; Yamamoto et al., 2013). The earlier observation that a HSC subpopulation also shares similar characteristics with MKs further supports this idea (Huang and Cantor, 2009; see poster). Such MK lineage bias may play a crucial role in the rapid replenishment of platelets in response to pathological conditions of acute platelet demand (Haas et al., 2015; Rodriguez-Fraticelli et al., 2018). However, although strong evidence exists in mice, MK-biased HSCs and MMPs have still not been convincingly demonstrated in human (Psaila and Mead, 2019).

Extracellular and intracellular signals that mediate cell differentiation

Megakaryopoiesis is coordinated through the concerted action of cytokines and transcription factors (TFs), with thrombopoietin (THPO) as its main physiological regulator (Hitchcock and Kaushansky, 2014). This glycoprotein is mainly synthesized in the liver and, to a lesser extent, in the kidney and some marrow

stromal cells. The binding of THPO to its specific receptor myeloproliferative leukemia protein (MPL) promotes its dimerization, leading to activation of janus kinase 2 (JAK2). In turn, JAK2 phosphorylates MPL, resulting in the recruitment of multiple effectors, such as signal transducers and activators of transcription (STATs), phosphoinositide-3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Behrens and Alexander, 2018; Hitchcock and Kaushansky, 2014). *Thpo*- and *Mpl*-deficient mice show an ~85% decrease in their platelet and MK levels, confirming THPO as the main megakaryopoiesis cytokine, but also pointing to the existence of additional regulating factors. Other cytokines play an important role in synergy with THPO (see poster; Behrens and Alexander, 2018), but THPO-independent pathways have also been identified, including a role of insulin-like growth factor 1 (IGF1) and the activated form of tyrosine-tRNA ligase (YARS) YRS^{ACT} (Kanaji et al., 2018), C-C motif chemokine 5 (CCL5) and interleukin 1 α (IL1 α) (Noetzli et al., 2019). However, the respective roles of these extracellular factors in normal versus inflammatory and/or emergency megakaryopoiesis remain to be clarified.

At the intracellular level, several TFs, together with cofactors and chromatin modifiers, govern the lineage-specific transcription program required for normal commitment and maturation of MKs by activating or repressing gene expression. Mutations of these TFs or their target proteins often lead to congenital thrombocytopenia, a condition associated with low platelet count (Box 1; see also poster and Table S1; Almazni et al., 2019; Balduini et al., 2017; Léon et al., 2016). Among the crucial TFs, interaction between GATA1 and its cofactor friend of GATA1 (FOG1, officially known as ZFPM1) is essential for erythroid-megakaryocytic differentiation (Mancini

Box 1. Defective platelet production of hereditary origin

A decrease in the level of circulating platelets (thrombocytopenia) can have different origins and can be classified into two main categories: (i) peripheral thrombocytopenia, due to an increase in platelet destruction, consumption or sequestration in the spleen and, (ii) central thrombocytopenia, due to impaired platelet production. Abnormalities of platelet production can be either acquired, i.e. resulting from a pathological condition or medical therapy, or of hereditary origin (Smock and Perkins, 2014). These genetic forms display various clinical manifestations and platelet defects, including the degree of thrombocytopenia and abnormal platelet morphology, such as larger, smaller or spherical cells, with defective granule contents or an abnormal microtubule organization (Almazni et al., 2019; see poster and Table S1). Some are associated with other clinical symptoms (syndromic thrombocytopenia), either congenital or of later onset, which can be far more serious than the bleeding phenotype itself as, for instance, in the case of immunodeficiency, lung or kidney failure (Melazzini et al., 2017). Identification of mutated genes responsible for thrombocytopenia has helped to reveal new pathways involved in platelet biogenesis. Among the various mutated genes, a number of them affect early megakaryopoiesis and MK differentiation due to defects in the THPO–MPL axis or in transcription factors (Almazni et al., 2019; see poster and Table S1). Others are associated with the target genes of these TFs, especially those encoding cytoskeletal proteins, and result mainly in late MK maturation defects and abnormal platelets. So far, mutations have been identified in ~40 genes (Almazni et al., 2019; see poster and Table S1). Long misdiagnosed and poorly studied, our knowledge of these rare hereditary diseases has increased considerably over the last twenty years with the availability of high-throughput and whole-exome sequencing techniques, and by studying these mutations in animal models (Léon et al., 2016). Nevertheless, ~40% of diagnosed cases of constitutional thrombocytopenia remain of unknown origin.

et al., 2012). Together, the proto-oncogene friend leukemia integration 1 (FLI1) and GATA1 activate specific genes responsible for the regulation of late MK progenitor cells (Huang et al., 2009). Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) favors progenitor proliferation and modulates the late stages of MK maturation. Other TFs include MDS1 and EVI1 complex locus protein (MECOM) and the nuclear factor, erythroid 2 (NFE2), which is involved in late MK maturation (Mazzi et al., 2018; Tijssen and Ghevaert, 2013). Another degree of complexity is brought about by a number of microRNAs (miRNAs), whose expression is up- or downregulated upon megakaryopoiesis (reviewed by Li et al., 2011; Raghuwanshi et al., 2019). Notably, this is the case for miR-22, which inhibits expression of growth factor interdependent 1 (*GFII*) to promote normal MK differentiation (Weiss and Ito, 2019). By controlling the expression of their target genes, miRNAs appear to be important regulators of MK differentiation and represent an emerging field with novel therapeutic perspectives.

Megakaryocyte maturation

Once differentiated, MKp cells undergo a process of maturation, during which they acquire the components of the future platelets and the competence for their production. In contrast to fish, reptiles and birds – all of which have diploid (2N) thrombocytes – mammals evolved towards anucleate platelets, i.e. platelets without a nucleus, which present with improved shear-resistant thrombi (Schmaier et al., 2011) that might have hemostatic advantages for reproduction (Martin and Wagner, 2019). Anucleated platelets are produced by polyploid MKs that contain 8–64 sets of chromosomes, the result of endomitosis, i.e. chromosomal replication without division of the cell or nucleus. Although not mandatory *per se* for the formation of platelets (Mattia et al., 2002; Potts et al., 2014), polyploidization might be a more efficient and energy-saving process as compared to that yielding diploid cells, allowing the body to rapidly adapt to acute platelet demands (Vainchenker and Raslova, 2019).

Endomitosis results from defective cytokinesis and karyokinesis (Ravid et al., 2002; Vitrat et al., 1998; Geddis et al., 2007; Lordier et al., 2010). Cytokinesis in normal mitosis requires RhoA-regulated actomyosin contraction of the cleavage furrow for abscission (Basant and Glotzer, 2018). Upon differentiation, RUNX1 downregulates myosin-10 (MYH10) expression. Concomitantly, expression of the guanine exchange factors GEF-H1 and ECT2 is downregulated, preventing RhoA activation and accumulation at the midzone, hence preventing myosin-9 (MYH9) activation, and precluding abscission (Gao et al., 2012; Mazzi et al., 2018; Shin et al., 2011).

Concomitantly, cytoplasmic maturation takes place; this is characterized by a large increase in MK volume, and associated with substantially increased protein and lipid synthesis (Odell and Jackson, 1968; Behnke, 1968). During these steps, MKp cells begin to express platelet-specific receptors, such as integrins ITGA2B and ITGB3 required for platelet aggregation, the glycoprotein receptor GPVI (GP6) required for adhesion onto subendothelial collagen I and the glycoprotein receptor complex GPIb-IX-V – comprising four subunits, i.e. GPIbA (GP1BA), GPIbB (GP1BB), GPIX (GP9) and GPV (GP5) – required for adhesion onto von Willebrand factor (VWF) (Nurden, 2014). In addition, the machinery for the biogenesis of the future typical platelet granules becomes fully functional (Sharda and Flaumenhaft, 2018), so that granules are almost mature at the time of PPT formation. Granule content is crucial for hemostasis, allowing amplification of platelet responses (McNicol and Israels, 1999). Granules are also important for the contribution of platelets to non-hemostatic functions, such as

angiogenesis, wound healing, inflammation, innate immunity and cancer metastasis (reviewed by Margraf and Zarbock, 2019; Palacios-Acedo et al., 2019).

Another hallmark of mature MKs is the presence of a large and complex intracellular membrane network called the demarcation membrane system (DMS) that supplies the membrane of future platelets. DMS biogenesis starts with invaginations of the plasma membrane (Behnke, 1968) located in GPIb-positive clusters, further fueled by fusion with Golgi vesicles and the endoplasmic reticulum (Eckly et al., 2014). Ultimately, the membranes become highly organized so that, in mature MKs, the DMS demarcates characteristic cytoplasmic territories (Aguilar et al., 2016; see poster). PACSIN2 and CIP4 (officially known as TRIP10) are F-BAR domain-containing proteins that regulate DMS invaginations (Begonja et al., 2015; Chen et al., 2013). Filamin A (FLNA) interacts with PACSIN2 to ensure its correct localization at the sites of membrane tubulation, as well as with GPIb (Meyer et al., 1997). Several cytoskeletal components have been found to play a key role in establishing the DMS. DMS membranes are enriched in PtdIns(4,5) P_2 that facilitates the recruitment and activation of the WASP-Arp2/3 complex to nucleate short F-actin (Schulze et al., 2006). Mutations in human genes or deletions in mouse genes, such as *Gp1ba*, *Gp1bb*, *Gp9* and *Flna*, or in proteins that regulate F-actin dynamics – such as small Rho GTPases – result in an abnormal DMS that is usually accompanied by a defect in the capacity of MKs to extend PPTs and, ultimately, in thrombocytopenia (Ghalloussi et al., 2019).

Importance of the bone marrow microenvironment for full MK maturation

When differentiated in culture, MKs do not exhibit the degree of maturation observed *in vivo*. They have a decreased ploidy and poorly organized DMS with few cytoplasmic territories, and lack the typical organelle-free peripheral zone and immature granules, implying that the physiological process is not fully reproduced (Aguilar et al., 2016; see poster). This may explain why the *in vitro* production of platelets is still very inefficient (Box 2). *In vivo*, in addition to cytokines (see poster), MKs also interact with other cells and the extracellular matrix (ECM), and are exposed to mechanical stress, all of which contributes to their physiological maturation.

The role of endothelial cells is probably key in the late steps of MK maturation, as all mature MKs reside in proximity to sinusoid vessels (Stegner et al., 2017). Stromal cell-derived factor-1 (CXCL12, also known as SDF1) promotes migration of progenitors and their interaction with endothelial cells, which contributes to their maturation (Avraham et al., 1993; Hamada et al., 1998), notably through release of fibroblast growth factor 4 (FGF4) (Avecilla et al., 2004) and VWF (Ouzegdough et al., 2018). Stromal cells might also contribute, either through direct cell–cell interaction, or the secretion of ECM proteins or chemokines (Brouard et al., 2017; Tamura et al., 2016).

The role of the mechanical properties of the BM has only recently been explored. The marrow is the softest tissue of the body, with a stiffness of only 300 Pa as measured by atomic force microscopy (AFM) (Shin et al., 2014). It is, however, confined to the inside of the bone – the most rigid tissue with a stiffness of >1 GPa – which confers strong constraints to the marrow. Currently, only a few studies reported an effect of substrate stiffness on MK differentiation and PPT formation. Studies indicated that type-I collagen fibrils, which inhibit PPT formation, are stiffer than collagen IV, which promotes PPT formation (Balduini et al., 2008; Malara et al., 2011). Further work showed that MKs extended

Box 2. *In vitro* platelet production

At present, donor-derived platelets are the only source for clinical platelet transfusion. In recent years, the fear of shortages with regard to ageing societies, combined with the residual risk of disease transmission – notably for emergent pathogens – or the development of alloantibodies, has prompted laboratories to develop *in vitro* platelet production. However, to obtain a sufficient number platelets for transfusion ($\sim 5 \times 10^{11}$ platelets/unit) remains a technological challenge. Substantial progress has, however, been made, concentrating especially on the expansion of progenitors and using two main approaches. The first relies on human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and the generation of expandable MK lines. Here, one strategy used ectopic expression of the TFs myelocytomatosis proto-oncogene (MYC), B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 proto-oncogene (BML1) and B-cell lymphoma-extra large (BCL-xL); also known as BCL2L1, controlled by a doxycycline-inducible promoter (Nakamura et al., 2014). Another strategy involves overexpression of GATA1, FLI1 and T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1 (TAL1) (Moreau et al., 2016). As long-term self-renewable progenitors, hiPSCs are also amenable to genetic manipulations of human leukocyte antigen (HLA) or human platelet antigen (HPA) to prevent immune responses (Sugimoto and Eto, 2017). The second approach employs native CD34⁺ hematopoietic progenitors derived from either embryonic cord blood, adult BM or peripheral blood (Lee et al., 2014; Strassel et al., 2016). These progenitors have the advantage of their ease of differentiation into mature MKs and their relatively high capacity to produce platelets. However, as CD34⁺ cells do not indefinitely self-replicate, there is a need for a continuous supply from donors with related issues of apheresis costs and alloreactivity (Strassel et al., 2018). Optimization of the platelet fragmentation process, which is quite inefficient in static cultures, has also considerably increased platelet yields. Several laboratories have made use of various flow conditions to improve platelet release, for instance through repeated pipetting (Do Sacramento et al., 2020) or in flow perfusion bioreactors (Di Buduo et al., 2015; Dunois-Lardé et al., 2009; Thon et al., 2017). Finally, the use of a turbulence-controllable bioreactor in a scaled-up system succeeded in efficiently producing functional platelets in clinically relevant numbers (Ito et al., 2018).

more PPTs on collagen I or IV coated on soft silk film ($E \leq 10$ MPa) compared to stiffer films ($E \geq 90$ MPa), indicating an impact of mechanical factors (Abbonante et al., 2017). Matrix stiffness depends on ECM crosslinking, notably through lysyl-oxylase (LOX). Inhibition of LOX-mediated collagen crosslinking in mouse marrow lead to increased platelet count, further indicating that soft matrix promotes platelet formation (Abbonante et al., 2017; Leiva et al., 2018). Another study showed that soft 2D collagenous matrices maximize PPT extension compared to 3D or stiffer matrices (Shin et al., 2011). Independently of matrix–protein interactions, 3D culture using methylcellulose hydrogels has provided evidence that confinement and stiffness ($E \leq 0.1$ kPa) – which mimic BM mechanical cues – is preferable to liquid culture and promotes a MK maturation more similar to that in BM (Aguilar et al., 2016). Of note, such 3D culture has – by creating physical constraints – allowed to reveal defects in MYH9-deficient MKs that are present inside the marrow but went unnoticed in liquid culture (Aguilar et al., 2016).

How MKs sense and react to mechanical cues is currently still unclear. MKs express several integrins, i.e. receptors for ECM proteins known to sense matrix stiffness in many cells, and their mechanosensitive properties in MKs are still under evaluation (Ward and Ravid, 2020). One study proposed a role of the TRPV4 cation channel in sensing stiffness, leading to $\beta 1$ integrin activation and internalization, thereby promoting PPT formation (Abbonante et al., 2017). At the intracellular level, MKs – like all cells –

adapt to stiffness by modulating their actomyosin cytoskeleton. Confinement in soft hydrogels has been shown to modify MYH9 distribution and to favor the activation of the mechanosensitive myocardin-related transcription factor A (MRTFA; also known as MKL1) (Aguilar et al., 2016). Thus, extracellular constraints are thought to affect MK differentiation. Understanding how MKs sense and react to mechanical cues is of particular interest when considering pathologies that are linked to a modification of marrow stiffness, such as myelofibrosis, a severe condition associated with abnormal megakaryopoiesis for which still no effective treatment is currently available (Leiva et al., 2018).

Proplatelet extension

Once mature, MKs are able to enter the process of platelet release *per se*, i.e. thrombopoiesis, whose first step is the extension of PPTs. The structure of PPTs and the mechanisms for their extension appear to differ between *in vitro* PPTs derived from cultured MKs (hereafter referred to as cPPTs) and *in vivo* PPTs derived from native MKs (hereafter referred to as nPPTs) (Bornert et al., 2020).

Proplatelet formation *in vitro*

In vitro, MKs are not highly polarized as protrusions may be initiated at several points around the cell membrane (Radley and Haller, 1982; see poster). These protrusions are rapidly converted into long, thin projections (see poster). cPPTs are characterized by a thin shaft, numerous branching and terminal buds. Microtubules play a crucial role in the extension of cPPTs. They are organized in bundles that line the cPPT shaft and coil inside the bud, prefiguring the microtubule coils known as the marginal band in platelets (see poster; Patel-Hett et al., 2008). Microtubules have been clearly shown to be the main drivers for cPPT extension, as incubation of MKs in the presence of microtubule-depolymerizing drugs prevents cPPT formation (Italiano et al., 1999; Tablin et al., 1990). Furthermore, low temperature or addition of microtubule-depolymerizing agents after cPPTs have extended causes cPPT to retract (Italiano et al., 1999; Tablin et al., 1990). Microtubule sliding controlled by dynein motors rather than *de novo* polymerization, seems to be important for cPPT extension (Bender et al., 2015). Actomyosin is also involved because F-actin promotes the branching process and, therefore, controls the extent of cPPTs per MK (Italiano et al., 1999). By contrast, the RhoA/Rho-kinase/MYH9 pathway restrains cPPT formation (Chang et al., 2007; Chen et al., 2007; Eckly et al., 2010).

Proplatelet formation *in vivo*

In vivo, and in contrast to *in vitro* formation, native MKs differentiate in a multifactorial complex environment, in which nPPTs must traverse the endothelial physical barrier to reach the circulating blood (see poster). The signals by which MKs become polarized to extend nPPTs in the correct direction are still unclear but regulation of F-actin dynamics might contribute to the polarization. Inactivation of genes that encode proteins directly or indirectly involved in the dynamics of F-actin, such as proteins of the WASP/WAVE family, Arp2/3, profilin or FYB1 (also known as ADAP), leads to an abnormal release of MK fragments inside the extravascular BM compartment (Ghalloussi et al., 2019; Spindler et al., 2018). Furthermore, an increase in Cdc42 activity results in MK hyperpolarization and increased transendothelial migration of whole MKs (Dütting et al., 2017).

Interaction with endothelial cells might be important for initial protrusions. It has been proposed that MKs extend podosomes to sense their surroundings (Schachtner et al., 2013). Such actin-rich

podosome-like protrusions can be visualized *in situ*, i.e. within the BM, extending from the MK plasma membrane and deforming endothelial cells located beneath (Eckly et al., 2020; Tavassoli and Aoki, 1981). These podosome-like extensions might provide the force required for fusion of the apical and basal endothelial membranes, creating transendothelial pores through which MKs extend their initial nPPT protrusions (Becker and De Bruyn, 1976; Eckly et al., 2020). Once inside the sinusoid, these protrusions form actin-rich shoulders that are anchored to the luminal face of the endothelial lining and might help the nPPT to extend into the circulation (Behnke and Forer, 1998; Bornert et al., 2020; Brown et al., 2018). nPPTs elongate by several hundred micrometers, fueled by membrane replenishment through fusion of the DMS with the plasma membrane (Brown et al., 2018). Microtubule organization within nascent nPPTs is rather individual with microtubules being heterogeneously distributed (Bornert et al., 2020; Brown et al., 2018), which is in contrast to the microtubule bundles found in cPPT. In fact, the role of microtubules appears to be less crucial *in vivo*, where hemodynamic forces are strong enough to substantially contribute to nPPT elongation (Bornert et al., 2020). Accordingly, inactivation or mutation of β 1-tubulin or α 4a-tubulin result in almost total absence of cPPTs *in vitro*, compared with only ~50% decrease in nPPTs and circulating platelets observed *in vivo* (Bornert et al., 2020; Strassel et al., 2019).

Proplatelet remodeling and release in the microcirculation

The final step in platelet biogenesis requires the detachment, remodeling and fragmentation of nPPT into individual platelets by mechanisms that are still unknown. nPPTs usually detach from the remaining cell body as elongated fragments, having a volume encompassing that of several hundred platelets (Becker and De Bruyn, 1976). The released nPPTs are rapidly swept away and need further remodeling in the downstream circulation to form bona fide platelets. It has long been proposed that the pulmonary microcirculation might be the site of platelet release (Levine et al., 1993; Zucker-Franklin and Philipp, 2000). MK fragments, including whole MKs, have been first described in pulmonary circulation by Ludwig Aschoff in 1893 (Aschoff, 1893). Later on, several authors published observations of MKs within the blood circulation (Levine et al., 1993; Pedersen, 1978; Tavassoli and Aoki, 1981) and MKs lodged within the pulmonary vascular bed, capable to extend nPPTs (Howell and Donahue, 1937; Zucker-Franklin and Philipp, 2000). Comparison of the number of MKs or platelets in various venous or arteriolar beds also favored the hypothesis of the lungs being an important site of platelet release (Howell and Donahue, 1937; Kallinikos-Maniatis, 1969; Trowbridge et al., 1982). More recently, intravital videomicroscopic observations within the lungs of living mice unambiguously showed nPPT remodeling occurring in real time within the pulmonary vasculature, including whole MKs (Lefrançois et al., 2017). The origin of MKs in the lung circulation is still to be determined. It could be mature MKs entering the sinusoid vessels or immature progenitors emerging from BM (Howell and Donahue, 1937). The lungs might provide these cells with a favorable microenvironment to end maturation and with hemodynamic forces to release platelets (Ouzegdough et al., 2018). These findings, nevertheless, raise the question of how platelet counts evolve in patients suffering from lung disease. Although few data are available, they were difficult to interpret due to the inflammatory profile of such patients, who are prone to thrombotic events (Biljak et al., 2011). What seems clear is that experimental or pathological conditions, such as inflammation, thrombocytopenia rebound, THPO treatment and myelogenous leukemia – all of which are known to

increase the number or activity of MKs in the BM – will also increase the number of whole MKs present in the lungs (Léon et al., 2012; Yamauchi and Shimamura, 1994; Zucker-Franklin and Philipp, 2000); a fact that might be associated with lung fibrosis (Aschoff, 1893; Thachil, 2009). Furthermore, the lungs might not be the only capillary bed capable to fragment nPPT and/or MKs into platelets as increased MK numbers have also been reported in kidneys of patients presenting with increased MKs within BM and lungs (Broghamer and Weakley-Jones, 1981). Hence, although the BM is the main site for MK maturation and nPPT formation, further remodeling is required in the downstream circulation to release bona fide platelets.

Conclusions and future perspectives

Our knowledge of the highly complex platelet formation process has considerably increased in recent years. Technological advances in single-cell isolation and their follow-up after transplantation have allowed us to revise the long established hierarchical model of megakaryopoiesis. With regard to the final stage of the process, intravital imaging has revealed differences between *in vivo* and *in vitro* mechanisms of PPT formation. Nevertheless, more than a century after identification of the MK as the precursor cell for platelets, many questions still remain to be answered with regard to the mechanisms that regulate the full maturation of MKs, their polarization, and the signals that initiate cPPT and nPPT, as well as the events that control the final platelet remodeling. Further characterization of the different factors that act within the native environment will contribute to ameliorate treatments of thrombocytopenic patients. Moreover, identification of mechanisms that occur in cell culture will allow to optimize *in vitro* platelet production for transfusion, which now appears feasible in the long term.

Acknowledgements

We thank Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript. We especially thank Christian Gachet, Catherine Strassel, Arnaud Dupuis and Béatrice Hechler for their critical reading of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Funding

J.B. is funded through a grant from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (grant number: ECO20170637508). I.G. is funded through an Association Nationale pour la Recherche (ANR) grant (ANR-18-CE14-PlatForMechanics). Further work from the lab was also supported by APR-EFS (2016-LEON-ALS), ANR-17-CE14-MegaPlatProd, Etablissement Français du Sang, Institut National de la Santé et Recherche médicale (INSERM) and Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique (ARMESA).

Supplementary information

Supplementary information available online at <https://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.244731.supplemental>

Cell science at a glance

A high-resolution version of the poster and individual poster panels are available for downloading at <https://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.244731.supplemental>

References

- Abbonante, V., Di Buduo, C. A., Gruppi, C., De Maria, C., Spedden, E., De Acutis, A., Stali, C., Raspanti, M., Vozzi, G., Kaplan, D. L. et al. (2017). A new path to platelet production through matrix sensing. *Haematologica* **102**, 1150–1160. doi:10.3324/haematol.2016.161562
- Aguilar, A., Pertuy, F., Eckly, A., Strassel, C., Collin, D., Gachet, C., Lanza, F. and Léon, C. (2016). Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood* **128**, 2022–2032. doi:10.1182/blood-2016-02-699959
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193–197. doi:10.1038/35004599

- Almazni, I., Stapley, R. and Morgan, N. V. (2019). Inherited thrombocytopenia: update on genes and genetic variants which may be associated with bleeding. *Front. Cardiovasc. Med.* **6**, 80. doi:10.3389/fcvm.2019.00080
- Aschoff, L. (1893). Ueber capilläre embolie von riesenkernhaltigen zellen. *Arch. Pathol. Anat.* **134**, 11–25. doi:10.1007/BF01924893
- Avecilla, S. T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D. K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T. E. et al. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat. Med.* **10**, 64–71. doi:10.1038/nm973
- Avraham, H., Cowley, S., Chi, S. Y., Jiang, S. and Groopman, J. E. (1993). Characterization of adhesive interactions between human endothelial cells and megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* **91**, 2378–2384. doi:10.1172/JCI116470
- Balduini, A., Pallotta, I., Malara, A., Lova, P., Pecci, A., Viarengo, G., Balduini, C. L. and Torti, M. (2008). Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 1900–1907. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03132.x
- Balduini, C. L., Melazzini, F. and Pecci, A. (2017). Inherited thrombocytopenias—recent advances in clinical and molecular aspects. *Platelets* **28**, 3–13. doi:10.3109/09537104.2016.1171835
- Basant, A. and Glotzer, M. (2018). Spatiotemporal regulation of RhoA during cytokinesis. *Curr. Biol.* **28**, R570–R580. doi:10.1016/j.cub.2018.03.045
- Becker, R. P. and De Bruyn, P. P. H. (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am. J. Anat.* **145**, 183–205. doi:10.1002/aja.1001450204
- Begonja, A. J., Pluthero, F. G., Suphamongmee, W., Giannini, S., Christensen, H., Leung, R., Lo, R. W., Nakamura, F., Lehman, W., Plomann, M. et al. (2015). FltA binding to PACSIN2 F-BAR domain regulates membrane tubulation in megakaryocytes and platelets. *Blood* **126**, 80–88. doi:10.1182/blood-2014-07-587600
- Behnke, O. (1968). An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J. Ultrastruct. Res.* **24**, 412–433. doi:10.1016/s0022-5320(68)80046-2
- Behnke, O. and Forer, A. (1998). From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur. J. Haematol. Suppl.* **60**, 3–23. doi:10.1111/j.1600-0609.1998.tb01052.x
- Behrens, K. and Alexander, W. S. (2018). Cytokine control of megakaryopoiesis. *Growth Factors* **36**, 89–103. doi:10.1080/08977194.2018.1498487
- Bender, M., Thon, J. N., Ehrlicher, A. J., Wu, S., Mazutis, L., Deschmann, E., Sola-Visner, M., Italiano, J. E. and Hartwig, J. H. (2015). Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood* **125**, 860–868. doi:10.1182/blood-2014-09-600858
- Billjak, V. R., Pancirov, D., Čepelak, I., Popović-Grle, S., Stjepanović, G. and Grubišić, T. Ž. (2011). Platelet count, mean platelet volume and smoking status in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Platelets* **22**, 466–470. doi:10.3109/09537104.2011.573887
- Bornert, A., Boscher, J., Pertuy, F., Eckly, A., Stegner, D., Strassel, C., Gachet, C., Lanza, F. and Léon, C. (2020). Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica*, haematol.2019.239111. doi:10.3324/haematol.2019.239111
- Broghamer, W. L., Jr and Weakley-Jones, B. (1981). Megakaryocytes in renal glomeruli. *Am. J. Clin. Pathol.* **76**, 178–182. doi:10.1093/ajcp/76.2.178
- Brouard, N., Jost, C., Matthias, J. E., Albrecht, C., Egard, S., Gandhi, P., Strassel, C., Inoue, T., Sugiyama, D., Simmons, P. J. et al. (2017). A unique microenvironment in the developing liver supports the expansion of megakaryocyte progenitors. *Blood Adv.* **1**, 1854–1866. doi:10.1182/bloodadvances.2016003541
- Brown, E., Carlin, L. M., Nerlov, C., Lo Celso, C. and Poole, A. W. (2018). Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels. *Life Sci. Alliance* **1**, e201800061. doi:10.26508/lsa.201800061
- Carrelha, J., Meng, Y., Kettyle, L. M., Luis, T. C., Norfo, R., Alcolea, V., Boukarabila, H., Grasso, F., Gambardella, A., Grover, A. et al. (2018). Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature* **554**, 106–111. doi:10.1038/nature25455
- Chang, Y., Auradé, F., Larbret, F., Zhang, Y., Le Couedic, J.-P., Momeux, L., Larghero, J., Bertoglio, J., Louache, F., Cramer, E. et al. (2007). Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood* **109**, 4229–4236. doi:10.1182/blood-2006-04-020024
- Chen, Z., Naveiras, O., Balduini, A., Mammoto, A., Conti, M. A., Adelstein, R. S., Ingber, D., Daley, G. Q. and Shivdasani, R. A. (2007). The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood* **110**, 171–179. doi:10.1182/blood-2007-02-071589
- Chen, Y., Aardema, J., Kale, S., Whichard, Z. L., Awomolo, A., Blanchard, E., Chang, B., Myers, D. R., Ju, L., Tran, R. et al. (2013). Loss of the F-BAR protein CIP4 reduces platelet production by impairing membrane-cytoskeleton remodeling. *Blood* **122**, 1695–1706. doi:10.1182/blood-2013-03-484550
- Daly, M. E. (2011). Determinants of platelet count in humans. *Haematologica* **96**, 10–13. doi:10.3324/haematol.2010.035287
- Deutsch, V. R. and Tomer, A. (2013). Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br. J. Haematol.* **161**, 778–793. doi:10.1111/bjh.12328
- Di Buduo, C. A., Wray, L. S., Tozzi, L., Malara, A., Chen, Y., Ghezzi, C. E., Smoot, D., Sfara, C., Antonelli, A., Spedden, E. et al. (2015). Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies. *Blood* **125**, 2254–2264. doi:10.1182/blood-2014-08-595561
- Do Sacramento, V., Mallo, L., Freund, M., Eckly, A., Hechler, B., Mangin, P., Lanza, F., Gachet, C. and Strassel, C. (2020). Functional properties of human platelets derived in vitro from CD34(+) cells. *Sci. Rep.* **10**, 914. doi:10.1038/s41598-020-57754-9
- Dunois-Lardé, C., Capron, C., Fichelson, S., Bauer, T., Cramer-Bordé, E. and Baruch, D. (2009). Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* **114**, 1875–1883. doi:10.1182/blood-2009-03-209205
- Dütting, S., Gaits-iacovoni, F., Stegner, D., Popp, M., Antkowiak, A., van Eeuwijk, J. M. M., Nurdén, P., Stritt, S., Heib, T., Aurbach, K. et al. (2017). A Cdc42/RhoA regulatory circuit downstream of glycoprotein Ib guides transendothelial platelet biogenesis. *Nat. Commun.* **8**, 15838. doi:10.1038/ncomms15838
- Eckly, A., Rinckel, J.-Y., Laeuffer, P., Cazenave, J.-P., Lanza, F., Gachet, C. and Léon, C. (2010). Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2243–2251. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04009.x
- Eckly, A., Heijnen, H., Pertuy, F., Geerts, W., Proamer, F., Rinckel, J.-Y., Léon, C., Lanza, F. and Gachet, C. (2014). Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* **123**, 921–930. doi:10.1182/blood-2013-03-492330
- Eckly, A., Scandola, C., Oprescu, A., Michel, D., Rinckel, J.-Y., Proamer, F., Hoffmann, D., Receveur, N., Léon, C., Bear, J. E. et al. (2020). Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids. *J. Thromb. Haemost.* doi:10.1111/jth.15024
- Gao, Y., Smith, E., Ker, E., Campbell, P., Cheng, E.-C., Zou, S., Lin, S., Wang, L., Halene, S. and Krause, D. S. (2012). Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev. Cell* **22**, 573–584. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.019
- Geddis, A. E., Fox, N. E., Tkachenko, E. and Kaushansky, K. (2007). Endomitotic megakaryocytes that form a bipolar spindle exhibit cleavage furrow ingression followed by furrow regression. *Cell Cycle* **6**, 455–460. doi:10.4161/cc.6.4.3836
- Ghailoussi, D., Dhenge, A. and Bergmeier, W. (2019). New insights into cytoskeletal remodeling during platelet production. *J. Thromb. Haemost.* **17**, 1430–1439. doi:10.1111/jth.14544
- Haas, S., Hansson, J., Klimm, D., Loeffler, D., Velten, L., Uckelmann, H., Wurzer, S., Prendergast, A. M., Schnell, A., Hesel, K. et al. (2015). Inflammation-induced emergency megakaryopoiesis driven by hematopoietic stem cell-like megakaryocyte progenitors. *Cell Stem Cell* **17**, 422–434. doi:10.1016/j.stem.2015.07.007
- Hamada, T., Möhle, R., Hesselgesser, J., Hoxie, J., Nachman, R. L., Moore, M. A. S. and Rafii, S. (1998). Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J. Exp. Med.* **188**, 539–548. doi:10.1084/jem.188.3.539
- Hitchcock, I. S. and Kaushansky, K. (2014). Thrombopoietin from beginning to end. *Br. J. Haematol.* **165**, 259–268. doi:10.1111/bjh.12772
- Howell, W. H. and Donahue, D. D. (1937). The production of blood platelets in the lungs. *J. Exp. Med.* **65**, 177–203. doi:10.1084/jem.65.2.177
- Huang, H. and Cantor, A. B. (2009). Common features of megakaryocytes and hematopoietic stem cells: what's the connection? *J. Cell Biochem.* **107**, 857–864. doi:10.1002/jcb.22184
- Huang, H., Yu, M., Akie, T. E., Moran, T. B., Woo, A. J., Tu, N., Waldon, Z., Lin, Y. Y., Steen, H. and Cantor, A. B. (2009). Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development. *Mol. Cell Biol.* **29**, 4103–4115. doi:10.1128/MCB.00090-09
- Italiano, J. E., Jr, Lecine, P., Shivdasani, R. A. and Hartwig, J. H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* **147**, 1299–1312. doi:10.1083/jcb.147.6.1299
- Ito, Y., Nakamura, S., Sugimoto, N., Shigemori, T., Kato, Y., Ohno, M., Sakuma, S., Ito, K., Kumon, H., Hirose, H. et al. (2018). Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale ex vivo production. *Cell* **174**, 636–648.e18. doi:10.1016/j.cell.2018.06.011
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D. D., Graf, T., Italiano, J. E., Jr, Shivdasani, R. A. et al. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* **317**, 1767–1770. doi:10.1126/science.1146304
- Kallinikos-Maniatis, A. (1969). Megakaryocytes and platelets in central venous and arterial blood. *Acta Haematol.* **42**, 330–335. doi:10.1159/000208817
- Kanaji, T., Vo, M. N., Kanaji, S., Zarpellon, A., Shapiro, R., Morodomi, Y., Yuzuriha, A., Eto, K., Belani, R., Do, M. H. et al. (2018). Tyrosyl-tRNA

- synthetase stimulates thrombopoietin-independent hematopoiesis accelerating recovery from thrombocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E8228–E8235. doi:10.1073/pnas.1807000115
- Kosaki, G. (2005). In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets? *Int. J. Hematol.* **81**, 208–219. doi:10.1532/IJH97.04177
- Kowata, S., Isogai, S., Murai, K., Ito, S., Tohyama, K., Ema, M., Hitomi, J. and Ishida, Y. (2014). Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow. *Thromb. Haemost.* **112**, 743–756. doi:10.1160/TH14-02-0123
- Lee, E.-J., Godara, P. and Haylock, D. (2014). Biomanufacture of human platelets for transfusion: rationale and approaches. *Exp. Hematol.* **42**, 332–346. doi:10.1016/j.exphem.2014.02.002
- Lefrançois, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D. M., Thornton, E. E., Headley, M. B., David, T., Coughlin, S. R. et al. (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* **544**, 105–109. doi:10.1038/nature21706
- Leiva, O., Leon, C., Kah Ng, S., Mangin, P., Gachet, C. and Ravid, K. (2018). The role of extracellular matrix stiffness in megakaryocyte and platelet development and function. *Am. J. Hematol.* **93**, 430–441. doi:10.1002/ajh.25008
- Léon, C., Evert, K., Dombrowski, F., Pertuy, F., Eckly, A., Laeuffer, P., Gachet, C. and Greinacher, A. (2012). Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD. *Blood* **119**, 3333–3341. doi:10.1182/blood-2011-08-373811
- Léon, C., Dupuis, A., Gachet, C. and Lanza, F. (2016). The contribution of mouse models to the understanding of constitutional thrombocytopenia. *Haematologica* **101**, 896–908. doi:10.3324/haematol.2015.139394
- Levine, R. F., Eldor, A., Shoff, P. K., Kirwin, S., Tenza, D. and Cramer, E. M. (1993). Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur. J. Haematol.* **51**, 233–246. doi:10.1111/j.1600-0609.1993.tb00637.x
- Li, H., Zhao, H., Wang, D. and Yang, R. (2011). microRNA regulation in megakaryocytopoiesis. *Br. J. Haematol.* **155**, 298–307. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08859.x
- Lordier, L., Chang, Y., Jalil, A., Aurade, F., Garçon, L., Lélouche, Y., Larbret, F., Kawashima, T., Kitamura, T., Larghero, J. et al. (2010). Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. *Blood* **116**, 2345–2355. doi:10.1182/blood-2010-01-265785
- Mancini, E., Sanjuan-Pla, A., Luciani, L., Moore, S., Grover, A., Zay, A., Rasmussen, K. D., Luc, S., Bilbao, D., O'Carroll, D. et al. (2012). FOG-1 and GATA-1 act sequentially to specify definitive megakaryocytic and erythroid progenitors. *EMBO J.* **31**, 351–365. doi:10.1038/emboj.2011.390
- Margraf, A. and Zarbock, A. (2019). Platelets in inflammation and resolution. *J. Immunol.* **203**, 2357–2367. doi:10.4049/jimmunol.1900899
- Martin, J. F. and Wagner, G. P. (2019). The origin of platelets enabled the evolution of eutherian placentalation. *Biol. Lett.* **15**, 20190374. doi:10.1098/rsbl.2019.0374
- Mattia, G., Vulcano, F., Milazzo, L., Barca, A., Macioce, G., Giampaolo, A. and Hassan, H. J. (2002). Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* **99**, 888–897. doi:10.1182/blood.V99.3.888
- Mazzi, S., Lordier, L., Debili, N., Raslova, H. and Vainchenker, W. (2018). Megakaryocyte and polyploidization. *Exp. Hematol.* **57**, 1–13. doi:10.1016/j.exphem.2017.10.001
- Malara, A., Gruppi, C., Pallotta, I., Spedden, E., Tenni, R., Raspanti, M., Kaplan, D., Tira, M. E., Staii, C. and Balduini, A. (2011). Extracellular matrix structure and nano-mechanics determine megakaryocyte function. *Blood* **118**, 4449–4453. doi:10.1182/blood-2011-04-345876
- McNicol, A. and Israels, S. J. (1999). Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* **95**, 1–18. doi:10.1016/S0049-3848(99)00015-8
- Melazzini, F., Zaninetti, C. and Balduini, C. L. (2017). Bleeding is not the main clinical issue in many patients with inherited thrombocytopaenias. *Haemophilia* **23**, 673–681. doi:10.1111/hae.13255
- Meyer, S. C., Zuerbig, S., Cunningham, C. C., Hartwig, J. H., Bissell, T., Gardner, K. and Fox, J. E. B. (1997). Identification of the region in actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein IB α . *J. Biol. Chem.* **272**, 2914–2919. doi:10.1074/jbc.272.5.2914
- Moreau, T., Evans, A. L., Vasquez, L., Tijssen, M. R., Yan, Y., Trotter, M. W., Howard, D., Colzani, M., Arumugam, M., Wu, W. H. et al. (2016). Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat. Commun.* **7**, 11208. doi:10.1038/ncomms11208
- Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K.-I., Koike, T., Harimoto, K.-I., Dohda, T. et al. (2014). Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **14**, 535–548. doi:10.1016/j.stem.2014.01.011
- Noetzel, L. J., French, S. L. and Machlus, K. R. (2019). New insights into the differentiation of megakaryocytes from hematopoietic progenitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 1288–1300. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312129
- Nurden, A. T. (2014). Platelet membrane glycoproteins: a historical review. *Semin. Thromb. Hemost.* **40**, 577–584. doi:10.1055/s-0034-1383826
- Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I. and Anitua, E. (2008). Platelets and wound healing. *Front. Biosci.* **13**, 3532–3548. doi:10.2741/2947
- Odell, T. T., Jr and Jackson, C. W. (1968). Polyploidy and maturation of rat megakaryocytes. *Blood* **32**, 102–110. doi:10.1182/blood.V32.1.102.102
- Ouzeghoud, Y., Capron, C., Bauer, T., Puymirat, E., Diehl, J.-L., Martin, J. F. and Cramer-Bordé, E. (2018). The physical and cellular conditions of the human pulmonary circulation enable thrombopoiesis. *Exp. Hematol.* **63**, 22–27.e3. doi:10.1016/j.exphem.2018.04.001
- Palacios-Acedo, A. L., Mège, D., Dignat-George, F., Dubois, C. and Panicot-Dubois, L. (2019). Platelets, thrombo-inflammation, and cancer: collaborating with the enemy. *Front. Immunol.* **10**, 1805. doi:10.3389/fimmu.2019.01805
- Patel-Hett, S., Richardson, J. L., Schulze, H., Drabek, K., Isaac, N. A., Hoffmeister, K., Shivdasani, R. A., Bulinski, J. C., Galjart, N., Hartwig, J. H. et al. (2008). Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* **111**, 4605–4616. doi:10.1182/blood-2007-10-118844
- Pedersen, N. T. (1978). Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. *Scand. J. Haematol.* **21**, 369–375. doi:10.1111/j.1600-0609.1978.tb00381.x
- Potts, K. S., Sargeant, T. J., Markham, J. F., Shi, W., Biben, C., Josefsson, E. C., Whitehead, L. W., Rogers, K. L., Liakhovitskaia, A., Smyth, G. K. et al. (2014). A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood* **124**, 2725–2729. doi:10.1182/blood-2014-02-559468
- Psaila, B. and Mead, A. J. (2019). Single-cell approaches reveal novel cellular pathways for megakaryocyte and erythroid differentiation. *Blood* **133**, 1427–1435. doi:10.1182/blood-2018-11-835371
- Radley, J. M. and Haller, C. J. (1982). The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* **60**, 213–219. doi:10.1182/blood.V60.1.213.213
- Radley, J. M. and Scurfield, G. (1980). The mechanism of platelet release. *Blood* **56**, 996–999. doi:10.1182/blood.V56.6.996.996
- Raghuwanshi, S., Dahariya, S., Musvi, S. S., Gutti, U., Kandi, R., Undi, R. B., Sahu, I., Gautam, D. K., Paddibhatla, I. and Gutti, R. K. (2019). MicroRNA function in megakaryocytes. *Platelets* **30**, 809–816. doi:10.1080/09537104.2018.1528343
- Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J. M. and Jones, M. R. (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell. Physiol.* **190**, 7–20. doi:10.1002/jcp.10035
- Rodriguez-Fraticelli, A. E., Wolock, S. L., Weinreb, C. S., Panero, R., Patel, S. H., Jankovic, M., Sun, J., Calogero, R. A., Klein, A. M. and Camargo, F. D. (2018). Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature* **553**, 212–216. doi:10.1038/nature25168
- Sanjuan-Pla, A., Macaulay, I. C., Jensen, C. T., Woll, P. S., Luis, T. C., Mead, A., Moore, S., Carella, C., Matsuoka, S., Bouriez Jones, T. et al. (2013). Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* **502**, 232–236. doi:10.1038/nature12495
- Schachtner, H., Calaminus, S. D. J., Sinclair, A., Monypenny, J., Blundell, M. P., Leon, C., Holyoake, T. L., Thrasher, A. J., Michie, A. M., Vukovic, M. et al. (2013). Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane. *Blood* **121**, 2542–2552. doi:10.1182/blood-2012-07-443457
- Schmaier, A. A., Stalker, T. J., Runge, J. J., Lee, D., Nagaswami, C., Mericko, P., Chen, M., Cliché, S., Gariépy, C., Brass, L. F. et al. (2011). Occlusive thrombi arise in mammals but not birds in response to arterial injury: evolutionary insight into human cardiovascular disease. *Blood* **118**, 3661–3669. doi:10.1182/blood-2011-02-338244
- Schulze, H., Korpai, M., Hurov, J., Kim, S.-W., Zhang, J., Cantley, L. C., Graf, T. and Shivdasani, R. A. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* **107**, 3868–3875. doi:10.1182/blood-2005-07-2755
- Sharda, A. and Flaumenhaft, R. (2018). The life cycle of platelet granules. *F1000Res.* **7**, 236. doi:10.12688/f1000research.13283.1
- Shin, J.-W., Swift, J., Spinler, K. R. and Discher, D. E. (2011). Myosin-II inhibition and soft 2D matrix maximize multinucleation and cellular projections typical of platelet-producing megakaryocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 11458–11463. doi:10.1073/pnas.1017474108
- Shin, J.-W., Buxboim, A., Spinler, K. R., Swift, J., Christian, D. A., Hunter, C. A., Léon, C., Gachet, C., Dingal, P. C. D. P., Ivanovska, I. L. et al. (2014). Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* **14**, 81–93. doi:10.1016/j.stem.2013.10.009
- Smock, K. J. and Perkins, S. L. (2014). Thrombocytopenia: an update. *Int. J. Lab. Hematol.* **36**, 269–278. doi:10.1111/ijlh.12214
- Spindler, M., van Eeuwijk, J. M. M., Schurr, Y., Nurden, P., Nieswandt, B., Stegner, D., Reinhold, A. and Bender, M. (2018). ADAP deficiency impairs megakaryocyte polarization with ectopic proplatelet release and causes microthrombocytopenia. *Blood* **132**, 635–646. doi:10.1182/blood-2018-01-829259

- Stegner, D., vanEeuwijk, J. M. M., Angay, O., Gorelashvili, M. G., Semeniak, D., Pinnecker, J., Schmithausen, P., Meyer, I., Friedrich, M., Dütting, S. et al. (2017). Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat. Commun.* **8**, 127. doi:10.1038/s41467-017-00201-7
- Stenberg, P. E. and Levin, J. (1989). Mechanisms of platelet production. *Blood Cells* **15**, 23-47.
- Strassel, C., Brouard, N., Mallo, L., Receveur, N., Mangin, P., Eckly, A., Bieche, I., Tarte, K., Gachet, C. and Lanza, F. (2016). Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood* **127**, 2231-2240. doi:10.1182/blood-2015-09-670208
- Strassel, C., Gachet, C. and Lanza, F. (2018). On the way to in vitro platelet production. *Front. Med. (Lausanne)* **5**, 239. doi:10.3389/fmed.2018.00239
- Strassel, C., Magiera, M. M., Dupuis, A., Batzenschlager, M., Hovasse, A., Pleines, I., Guéguen, P., Eckly, A., Moog, S., Mallo, L. et al. (2019). An essential role for alpha4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Sci. Alliance* **2**, e201900309. doi:10.26508/lsa.201900309
- Sugimoto, N. and Eto, K. (2017). Platelet production from induced pluripotent stem cells. *J. Thromb. Haemost.* **15**, 1717-1727. doi:10.1111/jth.13736
- Tablin, F., Castro, M. and Leven, R. M. (1990). Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J. Cell Sci.* **97**, 59-70.
- Tamura, S., Suzuki-Inoue, K., Tsukiji, N., Shirai, T., Sasaki, T., Osada, M., Satoh, K. and Ozaki, Y. (2016). Podoplanin-positive periaarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. *Blood* **127**, 1701-1710. doi:10.1182/blood-2015-08-663708
- Tavassoli, M. and Aoki, M. (1981). Migration of entire megakaryocytes through the marrow-blood barrier. *Br. J. Haematol.* **48**, 25-29. doi:10.1111/j.1365-2141.1981.00025.x
- Thachil, J. (2009). The lung megakaryocytes and pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Med. Hypotheses* **72**, 291-293. doi:10.1016/j.mehy.2008.09.045
- Thon, J. N., Dykstra, B. J. and Beaulieu, L. M. (2017). Platelet bioreactor: accelerated evolution of design and manufacture. *Platelets* **28**, 472-477. doi:10.1080/09537104.2016.1265922
- Tijssen, M. R. and Ghevaert, C. (2013). Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 593-604. doi:10.1111/jth.12131
- Trowbridge, E. A., Martin, J. F. and Slater, D. N. (1982). Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb. Res.* **28**, 461-475. doi:10.1016/0049-3848(82)90163-3
- Vainchenker, W. and Raslova, H. (2019). Megakaryocyte polyploidization: role in platelet production. *Platelets* **31**, 707-716. doi:10.1080/09537104.2019.1667497
- Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Pique, C., Le Couedic, J. P., Norol, F., Larsen, A. K., Katz, A., Vainchenker, W. and Debili, N. (1998). Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* **91**, 3711-3723. doi:10.1182/blood.V91.10.3711
- Ward, C. M. and Ravid, K. (2020). Matrix mechanosensation in the erythroid and megakaryocytic lineages. *Cells* **9**, 894. doi:10.3390/cells9040894
- Weiss, C. N. and Ito, K. (2019). microRNA-22 promotes megakaryocyte differentiation through repression of its target, GFI1. *Blood Adv.* **3**, 33-46. doi:10.1182/bloodadvances.2018023804
- Woolthuis, C. M. and Park, C. Y. (2016). Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood* **127**, 1242-1248. doi:10.1182/blood-2015-07-607945
- Wright, J. H. (1910). The histogenesis of the blood platelets. *J. Morphol.* **21**, 263-278. doi:10.1002/jmor.1050210204
- Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K. L., Ema, H. and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112-1126. doi:10.1016/j.cell.2013.08.007
- Yamauchi, K. and Shimamura, K. (1994). Pulmonary fibrosis with megakaryocytoid cell infiltration and chronic myelogenous leukemia. *Leuk. Lymphoma* **15**, 253-259. doi:10.3109/10428199409049721
- Zucker-Franklin, D. and Philipp, C. S. (2000). Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am. J. Pathol.* **157**, 69-74. doi:10.1016/S0002-9440(10)64518-X

PUBLICATION 2

ARTICLE METHODOLOGIQUE ET VIDEO ACCEPTES

« Megakaryocyte culture in 3D methylcellulose-based hydrogel to improve cell maturation and study the impact of stiffness and confinement »

Julie Boscher¹, Christian Gachet¹, François Lanza¹, Catherine Léon¹

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, Strasbourg, France.

A paraître dans : Journal of Visualized Experiments 2021 Jul. Vidéo prévue pour Août

Megakaryocyte Culture in 3D Methylcellulose-Based Hydrogel to Improve Cell Maturation and Study the Impact of Stiffness and Confinement

Julie Boscher¹, Christian Gachet¹, François Lanza¹, Catherine Léon¹

¹ Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS

Corresponding Author

Catherine Léon

catherine.leon@efs.sante.fr

Citation

Boscher, J., Gachet, C., Lanza, F., Léon, C. Megakaryocyte Culture in 3D Methylcellulose-Based Hydrogel to Improve Cell Maturation and Study the Impact of Stiffness and Confinement. *J. Vis. Exp.* (), e62511, doi:10.3791/62511 (2021).

Date Published

July 18, 2021

DOI

10.3791/62511

URL

jove.com/t/62511

Abstract

The 3D environment leading to both confinement and mechanical constraints is increasingly recognized as an important determinant of cell behavior. 3D culture has thus been developed to better approach the *in vivo* situation. Megakaryocytes differentiate from hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in the bone marrow (BM). The BM is one of the softest tissues of the body, confined inside the bone. The bone being poorly extensible at the cell scale, megakaryocytes are concomitantly subjected to a weak stiffness and high confinement. This protocol presents a method for the recovery of mouse lineage negative (Lin-) HSPCs by immuno-magnetic sorting and their differentiation into mature megakaryocytes in a 3D medium composed of methylcellulose. Methylcellulose is non-reactive towards megakaryocytes and its stiffness may be adjusted to that of normal bone marrow or increased to mimic a pathological fibrotic marrow. The process to recover the megakaryocytes for further cell analyses is also detailed in the protocol. Although proplatelet extension is prevented within the 3D milieu, it is described below how to resuspend the megakaryocytes in liquid medium and to quantify their capacity to extend proplatelets. Megakaryocytes grown in 3D hydrogel have a higher capacity to form proplatelets compared to those grown in a liquid milieu. This 3D culture allows i) to differentiate progenitors towards megakaryocytes reaching a higher maturation state, ii) to recapitulate phenotypes that may be observed *in vivo* but go unnoticed in classical liquid cultures, and iii) to study transduction pathways induced by the mechanical cues provided by a 3D environment.

Introduction

Cells in the body experience a complex 3D microenvironment and are subjected to the interplay between chemical and mechanophysical cues including stiffness from the tissue and confinement due to neighboring cells and surrounding

matrix^{1,2,3}. The importance of stiffness and confinement for cell behavior has only been recognized in the last decades. In 2006, the seminal work from Engler et al.⁴ highlighted the importance of the mechanical environment for cell differentiation. The authors demonstrated that variation in cell substrate stiffness resulted in the orientation of stem cells towards various differentiation lineages. Since then, the impact of mechanical cues on cell fate and behavior has become increasingly recognized and studied. Despite it being one of the softest tissues of the organism, the bone marrow has a 3D structural organization that is confined inside the bone. Marrow stiffness, although technically difficult to measure precisely, is estimated to lie between 15 and 300 Pa^{5, 6}. Within the stroma, cells are tightly confined to one another. In addition, most of them are migrating toward the sinusoid vessels to enter the blood circulation. These conditions create additional mechanical constraints on adjacent cells, which have to adapt to these forces. Mechanical cues represent an important parameter whose consequences on megakaryocyte differentiation and proplatelet formation have just recently been explored. Although megakaryocytes can differentiate *in vitro* in traditional liquid culture, they do not reach the degree of maturation observed *in vivo*, in part due to the absence of the mechanical cues from the 3D environment⁷. Growing progenitors embedded in hydrogel brings 3D mechanical cues that are lacking in liquid milieu.

Hydrogels have been widely used for several decades in the hematological field, notably to grow cells in colony forming assays to quantify hematopoietic progenitors. However, such hydrogels have seldom been used to explore the biological impact of the 3D mechanical environment on maturation and differentiation of hematopoietic cells. Over the past few years our laboratory has developed a 3D

culture model using a methylcellulose-based hydrogel⁸. This nonreactive physical gel is a useful tool to mimic the physical constraints of the native megakaryocyte environment. It is derived from cellulose by replacement of hydroxyl residues (-OH) by methoxide groups (-OCH₃). Both the degree of methyl substitution and the methylcellulose concentration determine the hydrogel stiffness once it has jellified. During the development stage of this technique, it was demonstrated that a Young's modulus in the range of 30 to 60 Pa is the optimal gel stiffness for megakaryocyte growth⁹.

The following protocol describes a method to grow mouse megakaryocytic progenitors in a 3D methylcellulose hydrogel. It has been previously shown that compared with standard liquid culture, this hydrogel culture increases the degree of megakaryocyte polyploidization, improves the maturation and intracellular organization, and increases the capacity of megakaryocytes to extend proplatelets once resuspended in a liquid medium⁹. This manuscript describes in detail the protocol for the isolation of mouse bone marrow Lin⁻ cells and their embedding in a methylcellulose hydrogel for 3D culture as well as the quantification of their capacity to produce proplatelets and the recovery of the cells for further analyses.

Protocol

All experiments should be performed in compliance with institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. All protocols displayed in the video were carried out in strict accordance with the European law and the recommendations of the Review Board of the Etablissement Français du Sang (EFS). A first version of this protocol was originally published in 2018 in *Methods in Molecular Biology*⁸.

NOTE: Figure 1 presents a schematic view of the whole process. This process includes 1) bone dissection, marrow retrieval, and mechanical isolation of marrow cells, 2) magnetic sorting of lineage negative (Lin-) cells, 3) seeding in liquid or methylcellulose hydrogel, and 4) resuspension of megakaryocytes grown in 3D gel for examination of proplatelet formation in liquid medium.

1. Bone collection from adult mice

NOTE: In this section, it is important to minimize microbial contamination.

1. Prepare a 15 mL tube for bone collection with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 1% of the total volume of penicillin-streptomycin-glutamin (PSG) antibiotic mix (penicillin 10000 U/mL, streptomycin 100000 µg/mL and L-glutamin 29.2 mg/mL).

NOTE: If all the mice used have the same genotype, pool all bones in the same tube containing 1 mL of DMEM - PSG 1% per number of mice. Antibiotics are important to prevent possible bacteria proliferation during the time of bone sampling.

2. Fill a 50 mL tube with ethanol 70% for bone disinfection and another one for rinsing instruments during the procedure. Use sterilized dissection instruments.
3. Anesthetize the mice using isoflurane inhalation (4%) and rapidly proceed to cervical dislocation to euthanize the mice. Rapidly immerse the body in 70% ethanol to disinfect and avoid microbial contamination.
4. Rapidly dissect out the tibias and femurs.
5. Using a scalpel, cut away the epiphyses of the ankle side end for the tibia and of the hip side end for the femur.

6. Immerse the bones for one second in 70% ethanol before immersing them in DMEM medium containing 1% PSG.

2. Marrow dissociation and Lin- cells isolation

NOTE: This part of the protocol is performed under a laminar flow hood. For one culture, all the wells are part of the same experiment and cannot be considered as independent biological replicates. The cells from all mice are pooled together to ensure the homogeneity of all the wells and to be able to compare them to each other while eliminating possible inter-individual variability. For independent biological replicates, the culture must be repeated.

1. Place the bones in a Petri dish and rise them twice in sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) to remove potential contaminants.

2. Prepare DMEM - 1% PSG in a 50 mL tube.

NOTE: Provide 2 mL of DMEM - 1% PSG per mice used for the experiment.

3. Fill a 5 mL syringe equipped with a 21-gauge needle with DMEM - 1% PSG.
4. Holding the bone with forceps, introduce only the bevel of the needle at the knee side end.

NOTE: The knee side epiphysis should remain intact from the dissection, leaving a small cavity in its center through which to insert the needle. The remaining epiphysis will maintain the bone attached to the needle during flushing. Be careful not to introduce more than the bevel in the bone as it might squash and damage the marrow.

5. Quickly press the syringe plunger to flush the marrow out into a 50 mL tube.

NOTE: To avoid splashes and facilitate the marrow flush and liberation place the free end of the bone on the tube

wall, immersed in DMEM - 1% PSG. In practice, a volume between 500 μ L and 1 mL is generally sufficient to expel the marrow from the bone. When the marrow has been totally expelled, the bone has become white. In case the marrow has not been totally expelled from the diaphysis as judged by some remaining red color, it is possible to repeat the flush with fresh medium.

6. Repeat steps 2.4. and 2.5. for all bones, refilling the 5 mL syringe with DMEM - 1% PSG if necessary.

7. Use the same 5 mL syringe with the 21-gauge needle to transfer the total volume of medium containing flushed marrow into round bottomed 10 mL tubes.

NOTE: It is not absolutely necessary to switch to a round bottomed 10 mL tube but it makes it easier to proceed to the following dissociation steps. Do not hesitate to change syringe and/or needle if risk of contamination is suspected.

8. Proceed to cell dissociation by aspirating and expelling the medium and marrow cells successively two times through a 21-gauge needle, three times through a 23-gauge and once through a 25-gauge needle.

NOTE: Avoid air bubbles as it may be detrimental for the cells.

9. Transfer the suspension into 15 mL tubes.

10. Measure cell number and check the viability using an automated cell counter or a cell chamber for manual counting in the presence of trypan blue to exclude dead cells.

11. Centrifuge the 15 mL tubes for 7 min at 300 \times g. Using a 1 mL transfer pipette, carefully pipette out and discard the supernatant.

12. Isolate stem and progenitor cells by negative immunomagnetic sorting using a mouse hematopoietic cell isolation kit.

NOTE: The aim of this cell sorting is to retrieve the cells that are negative for all the selection antibodies (CD5, CD11b, CD19, CD45R/B220, Ly6G/C(Gr-1), TER119, 7-4) and therefore to eliminate the cells that are already engaged in a differentiation lineage other than the megakaryocytic one.

13. Following the kit instructions, resuspend the cellular pellet in freshly prepared M medium (PBS with 2% of the final volume of fetal bovine serum (FBS), EDTA 1 mM) to a concentration of 1×10^8 cells/mL and distribute the suspension in round bottomed 5 mL polystyrene tubes to a maximum volume of 2 mL.

14. Add to the polystyrene tubes: normal rat serum at a concentration of 50 μ L/mL as well as the biotinylated antibody mix (CD5, CD11b, CD19, CD45R/B220, Ly6G/C(Gr-1), TER119, 7-4) at a concentration of 50 μ L of mix per mL and homogenize by gently flicking the tubes.

NOTE: These antibodies will bind to cells already engaged into a differentiation pathway except the megakaryocytic pathway.

15. Incubate the tubes on ice for 15 min.

16. Add streptavidin-coated magnetic beads at a concentration of 75 μ L/mL and homogenize by gently flicking the tubes.

17. Incubate again on ice for 10 min.

18. If necessary, adjust to a final volume of 2.5 mL per tube with M medium.

19. Homogenize the suspension by gently flicking the tube just before placing them, without their caps, inside a magnet and wait for three minutes.

NOTE: The cells already engaged into a differentiation pathway and coated with magnetic beads will be retained on the wall of the tube inside the magnet.

20. Invert magnet and tube to transfer the tube content into a new round-bottomed 5 mL polystyrene tube.

NOTE: Do not take the tube out of the magnet for the transfer; it is done by inverting the magnet with the tube still in. Use a steady movement and do not shake the tube.

21. Discard the initial tube containing undesired magnetic-labeled cells and place the new one, without its cap, in the magnet for three more minutes.

22. Proceeding as in step 2.20, transfer the isolated Lin⁻ cells into a new 15 mL tube.

NOTE: If several 5 mL polystyrene tubes have been used for the previous steps, pool all the cells in the same 15 mL tube. The cells recovered after the cell sorting are hematopoietic stem cells and progenitors. The presence of thrombopoietin (TPO), the major physiological regulator of megakaryopoiesis¹⁰, will direct the cell differentiation toward the megakaryocytic cell line.

23. Measure the Lin⁻ cell number and viability as in step 2.10.

24. Calculate the required volume of cell suspension to centrifuge in order to have 1×10^6 viable cells x Well Number, Well Number being the number of wells to seed per condition.

25. Prepare one tube per condition with the appropriate volume of cell suspension and centrifuge at $300 \times g$ for 7 min.

26. For liquid cultures, discard the supernatant and resuspend the cell pellet in complete culture medium (DMEM, PSG 1% of the final volume, FBS 10% of the final volume, hirudin 100 U/mL, TPO 50 ng/mL) to achieve the final concentration of 2×10^6 viable cells/mL (equal to 1×10^6 cells per 500 μ L well). Incubate the cells at 37 °C under 5% CO₂. (= day 0 of culture)

NOTE: See the next paragraph for methylcellulose cultures. As an example, to prepare complete culture medium for one well, use 435 μ L of DMEM, 50 μ L of 100% FBS for 10% final, 5 μ L of 100% PSG for 1% final, 5 μ L of 10 000 U/mL for 100 U/mL final and 5 μ L of 5 μ g/mL TPO for 50 ng/mL final. 4-well or 24-well culture plates are typically used as their well diameter is a good fit for the 500 μ L needed per well.

3. Cell embedding in methylcellulose hydrogel

NOTE: Please note that the following protocol describes the method to obtain a single well of hydrogel cell culture, adapt to the number of wells needed.

1. Thaw 1 mL aliquots of 3% methylcellulose stock solution at room temperature. Prepare one separate extra aliquot of methylcellulose for syringe coating.

NOTE: At a concentration of 3%, methylcellulose remains liquid at room temperature (20-25 °C).

2. Coat a 1 mL Luer lock syringe equipped with an 18-gauge needle with methylcellulose by drawing 1 mL of methylcellulose from the extra aliquot. Totally expel the methylcellulose.

NOTE: This coating step ensures that the volume of methylcellulose collected in step 3.3 is exact.

3. With the same syringe and needle but using a new methylcellulose aliquot, draw the appropriate volume of methylcellulose (**Figure 2A**).

NOTE: To achieve a final concentration of 2% methylcellulose in a final volume of 500 μL per well, 333 μL of 3% methylcellulose is required.

4. Cautiously remove the needle. Using sterilized forceps, screw a Luer lock connector onto the end of the syringe (**Figure 2B-C**).
 5. Attach a second, non-coated, 1 mL Luer lock syringe to the Luer lock connector in order to connect the two syringes together (**Figure 2D**).
- NOTE:** There is no need to coat this second syringe.
6. Equally distribute the methylcellulose volume between the two syringes (**Figure 2E**) and put them aside until step 3.11.
 7. Prepare the concentrated DMEM culture medium so as to obtain in the final methylcellulose volume (step 3.11) a concentration identical to the one of the liquid culture medium for each compound (PSG 1% of the final volume, FBS 10% of the final volume, hirudin 100 U/mL, TPO 50 ng/mL).

1. Prepare 167 μL of concentrated culture medium per final well of 1×10^6 cells. This volume of medium is calculated so as to obtain a final methylcellulose concentration of 2%. The total volume in the well will be 500 μL (167 μL of cell suspension in concentrated culture medium + 333 μL of methylcellulose) and all the components will have a concentration identical to that in liquid wells.

2. As an example, to prepare complete culture medium for one well, use 102 μL of DMEM, 50 μL of 100% FBS for 10% final, 5 μL of 100% PSG for 1% final, 5 μL of 10 000 U/mL for 100 U/mL final and 5 μL of 5 $\mu\text{g/mL}$ TPO for 50 ng/mL final. It gives a volume of 167 μL used to resuspend the cells and with the addition of 333 μL of methylcellulose the final volume will be 500 μL .

8. After completing the centrifugation step 2.26, discard the supernatant and resuspend the cell pellet in the concentrated culture medium at a ratio of 1×10^6 cells per 167 μL .
9. Take back the syringes and disconnect one of them from the connector.
10. Pipette 167 μL of the cell suspension.
11. Add the cell suspension directly into the syringe connector (**Figure 2F**), making sure not to introduce air bubbles.

NOTE: While adding the cell suspension, slowly draw the syringe plunger simultaneously to free some space for the cell suspension.

12. Carefully reconnect the two syringes (**Figure 2G**) without losing any suspension in the screw thread.

NOTE: Prior to the reconnection, draw the plunger in order to leave the connector half empty and let enough space for the second syringe to connect without the suspension overflowing.

13. Slowly homogenize the methylcellulose medium with the cell suspension with ten back-and-forth plunger movements between the two syringes (**Figure 2H**).
14. Draw the total volume into one syringe and disconnect the two syringes, leaving the connector on the empty one.

15. Empty the content of the syringe into a well of a 4-well plate (**Figure 2I**).

16. Incubate the cells at 37 °C under 5% CO₂ (= day 0 of culture).

NOTE: It is possible to prepare two methylcellulose wells with one pair of syringes. Increase by two the volume of methylcellulose and the volume of cell suspension to have 2 x10⁶ cells. After completing step 3.13. distribute the volume equally between the two syringes to have 500 µL in each of them. Disconnect them and empty the one without the connector in a culture well. Reconnect the syringes to transfer the volume from the one that kept the connector to the other. Disconnect the syringes, the one with the 500 µL should not have the connector attached, and seed the cells in a second culture well. The 3% methylcellulose is purchased as a stock solution in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) while concentrated cells are suspended in DMEM. Comparative tests have been initially done to make sure that this mixed medium had no impact on the outcome of the experiment, especially compared to the liquid culture in 100% DMEM.

4. Cell Resuspension for Proplatelet Analysis

NOTE: Analysis of the capacity to form proplatelets has to be performed under comparable conditions between liquid and methylcellulose grown megakaryocytes. The physical constraints exerted by the methylcellulose hydrogel inhibit proplatelet extension. Therefore, methylcellulose-grown cells are resuspended in fresh liquid medium on day 3 of culture to allow them to extend proplatelets. Methylcellulose hydrogel is a physical hydrogel that is easily diluted upon liquid medium addition. Importantly, to avoid artifacts from resuspension and centrifugation, cells in the control liquid

medium condition have to be treated simultaneously in the same way as methylcellulose-grown cells. Refer to the schematic representation of the experiment (**Figure 1**).

1. Prepare 10 mL of DMEM - 1% PSG preheated at 37 °C in a 15 mL tube for each well to resuspend.

2. Cautiously resuspend the cells from each well in the 10 mL of DMEM - 1% PSG.

NOTE: Gently do several up-and-down movements to dilute the methylcellulose completely. For the liquid wells make sure to collect all the cells deposited at the bottom of the well.

3. Centrifuge the tubes 5 min at 300 × *g*.

4. Meanwhile prepare complete culture medium (DMEM, PSG 1% of the final volume, FBS 10% of the final volume, hirudin 100 U/mL, TPO 50 ng/mL).

NOTE: At this step each well is retrieved to be diluted by half, therefore prepare 1 mL of complete culture medium per well.

5. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in 1 mL of culture medium for each tube.

6. Reseed 500 µL of cell suspension per well in a 4 or 24-well plate and incubate at 37 °C under 5% CO₂.

NOTE: From one initial well, obtain 2 wells for proplatelet visualization in duplicate. Please note that as these duplicates originate from the same sample they cannot be considered as independent replicates.

7. 24 hours after reseeding, on day 4 of culture, randomly acquire 10 images per well using bright field microscopy and the 20× objective.

NOTE: The cells tend to group at the center of the well, make sure not to have too many cells on the field as it may render proplatelet visualization and quantification

difficult. Make sure to capture at least 5 megakaryocytes per field.

8. Count the total number of megakaryocytes and of megakaryocytes extending proplatelets in each image and calculate the proportion of megakaryocytes extending proplatelets.

NOTE: The quantification is not automated; perform cell counting manually. Counting can be facilitated by the use of the cell counter plugin of ImageJ to click on the cells in order to mark them as they are counted. 10 fields acquired per well and wells in duplicate represent approximately 150-300 megakaryocytes per condition.

5. Cell fixation and retrieval for future analyses

CAUTION: This protocol uses fixatives which must be handled under a fume hood, wearing protective equipment.

NOTE: The aim is to maintain intact the gel constraints applied on the cells until they are fully fixed. Therefore, and regardless of the fixative used, it must be added in the well on top of the methylcellulose, without disturbing the gel. The same protocol is applied to liquid cultures.

1. Add a volume of fixative solution equal to the seeded volume (500 μ L in this protocol), on top of the methylcellulose without disrupting the gel. Wait for the appropriate time according to the fixative used (at least 10 min).

NOTE: The fixative diffusion throughout the gel should be very rapid as revealed by a rapid change in the gel color (from pink to a yellow-orange shade). Paraformaldehyde (8% in DPBS, 500 μ L per well) is usually used for immunolabeling, while glutaraldehyde (5% in cacodylate buffer, 500 μ L per well) is used for electron microscopy analysis.

2. Using a P1000 pipette gently do several up-and-down pipettings with the fixative and the gel so as to homogeneously dilute the methylcellulose.
3. Using the same pipette and tip, transfer all the volume from the well into a 15 mL tube containing 10 mL of DPBS and homogenize.
4. Centrifuge the mixture at $300 \times g$ for 7 min.

NOTE: A second wash step might be needed to eliminate all the methylcellulose

5. Discard the supernatant and resuspend the megakaryocyte pellet in the appropriate medium according to the desired analysis (immunolabeling, flow cytometry⁹, electron microscopy ...) (for electron microscopy see also the paper method "*In situ* exploration of the major steps of megakaryopoiesis using transmission electron microscopy" in this JoVE issue).

Representative Results

Data obtained using this protocol were originally published in Blood in 2016⁹.

According to the protocol, the cells were seeded in either liquid or methylcellulose hydrogel medium. Cells in liquid medium have all sedimented at the bottom of the well, in contact with the stiff plastic surface and sometime with other cells. In contrast, cells embedded in methylcellulose hydrogel are distributed homogeneously in the gel and are isolated from neighboring cells (**Figure 3A**). Methylcellulose gel at a final concentration of 2% very slightly increases the mean megakaryocyte diameter compared to the liquid culture (**Figure 3B**), in accordance with the higher reported ploidy⁹. By contrast, increasing methylcellulose concentration by

0.5% impairs megakaryocyte differentiation as shown by a smaller mean diameter (**Figure 3B**).

A noticeable difference in megakaryocyte ultrastructure is observed between megakaryocytes differentiated in liquid culture and those differentiated *in vivo* within the bone marrow. A characteristic feature of mature megakaryocytes is a complex intracytoplasmic membrane network, the DMS (Demarcation Membrane System) which serves as a reservoir for the membrane of the future platelets. In mature megakaryocytes the DMS organizes to form intertwined membrane sheets which occupy most of the cytoplasm. By transmission electron microscopy (TEM), they appear to be closely apposed and delineate cytoplasmic territories (**Figure 3C** upper panel) (for the TEM procedure, see the paper method "*In situ* exploration of the major steps of megakaryopoiesis using transmission electron microscopy" in this same JOVE Issue). In liquid culture, DMS membranes have mostly the appearance of small round, oval, or elongated vesicles without delimitation of cytoplasmic territories (**Figure 3C** middle panel). By contrast, 2% methylcellulose culture promotes the organization of the DMS

in a majority of megakaryocytes, with membranes closely apposed and delimiting cytoplasmic territories, resembling the one *in situ* (**Figure 3C** lower panel). This result indicates that the 2% methylcellulose hydrogel culture allows for better megakaryocyte differentiation due to the mechanical constraints of the environmental medium.

After cell transfer into liquid medium at day 3, megakaryocytes begin to extend proplatelets after 4 h⁹. **Figure 4** shows the quantification of the proportion of megakaryocytes having extended proplatelets 24 h after resuspension in liquid milieu. Ten images were randomly acquired per well, using bright field microscopy and the 20× objective (**Figure 4A**). The quantification was performed blindly and manually using the cell counter plugin on Fiji (ImageJ) (**Figure 4B**). Because these are primary cell cultures, there is an inter-experiment variability but the protocol remains robust and offers a good reproducibility. In the liquid pre-culture condition, the proplatelet proportion should be between 10% and 20% whereas this proportion is doubled for the hydrogel pre-culture.

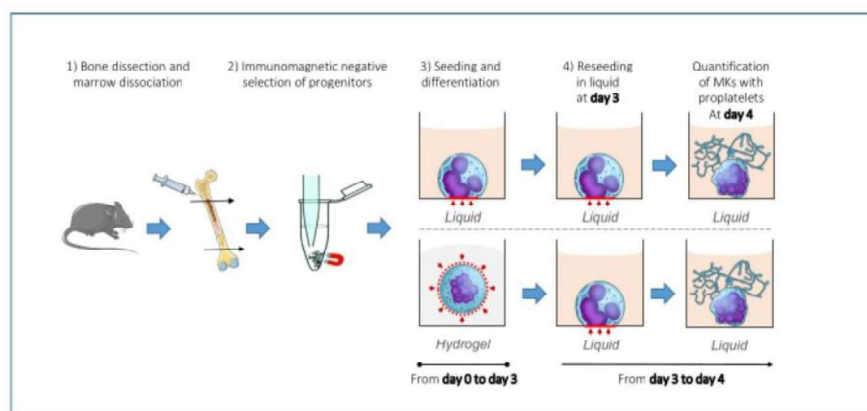


Figure 1. Schematic representation of the whole process. Bones are dissected out, marrow is flushed out and cells mechanically dissociated. Stem and progenitor cells of interest (Lin⁻ cells) are isolated by an immunomagnetic negative sorting procedure and seeded in either liquid or hydrogel medium (day 0). At day 3 of culture (which in total represents a duration of 4 days), both conditions are resuspended in separate fresh liquid culture milieu. This second culturing step is carried out from day 3 until day 4 of culture. The proportion of MKs extending proplatelets is measured at day 4 of culture. For visual clarity, one cell is schematized per well. The blue circle is depicting a single cell with its nucleus in purple. In the final step, both MKs are represented with proplatelet. The proportion of MKs forming proplatelets varies depending on liquid or methylcellulose pre-culture. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

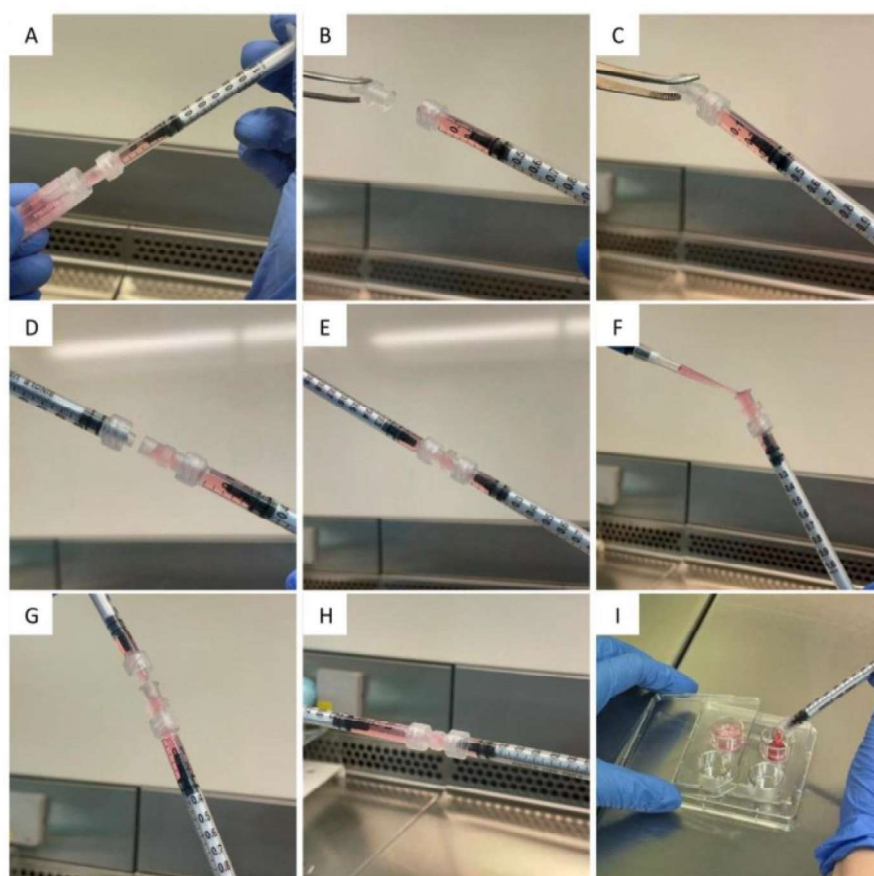


Figure 2. Cell embedding in methylcellulose hydrogel. After pre coating the syringes wall, (A) draw the appropriate volume of methylcellulose; (B, C) disconnect the needle and screw a connector onto the syringe; (D) push the methylcellulose halfway through the connector and attach a second syringe; (E) distribute equally the methylcellulose between the two syringes and disconnect them; (F) add the cell suspension to the syringe bearing the connector; (G) reconnect the two syringes; (H) homogenize by pushing the whole volume from one syringe to the other a few times; (I) seed the cells by expelling the whole volume into a culture dish. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

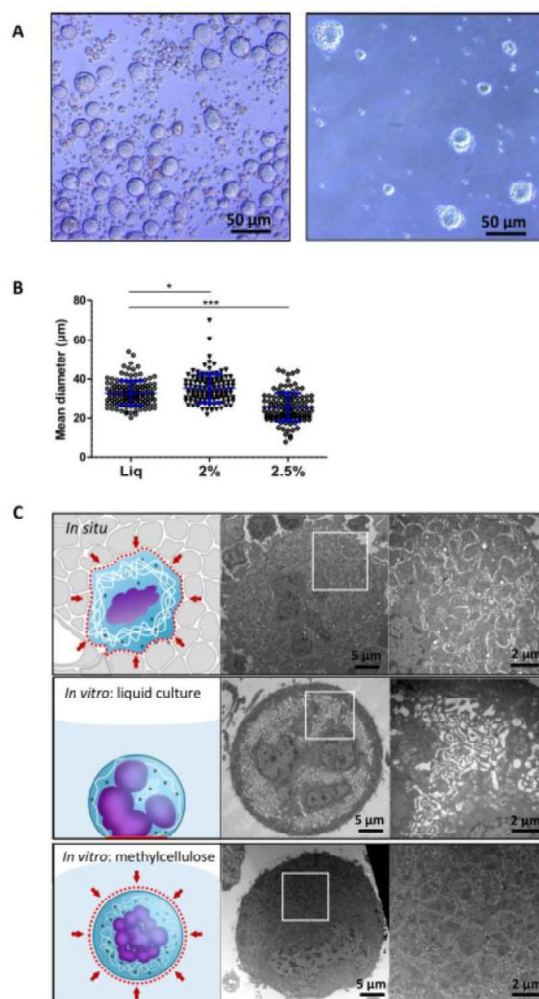


Figure 3. Megakaryocyte characteristics according to culture condition. (A) Representative images of megakaryocytes at day 3 of culture in liquid (left panel) or 2% methylcellulose hydrogel medium (right panel). Scale bar = 50 μm (B) Mean diameter of megakaryocytes grown in liquid medium, or in 2% or 2.5% methylcellulose hydrogel. Results are expressed as the mean \pm SD in 3 independent cultures, with a total of at least 100 megakaryocytes examined. *, $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$, using 1-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test. (graph adapted from Aguilar et al. 2016) (C) Schematic view (left) and representative electronic microscopy images (middle) of murine megakaryocytes; right panels, close up views from the white squares (scale bar = 5 μm for the middle electronic microscopy images and 2 μm for close up views). Upper panels are *in situ* megakaryocytes, middle represents megakaryocytes grown *in vitro* in liquid culture and lower panels are megakaryocytes grown in 3D methylcellulose hydrogel. These data were originally published in Blood Journal, DOI10.1007/978-1-4939-8585-2_9⁵. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

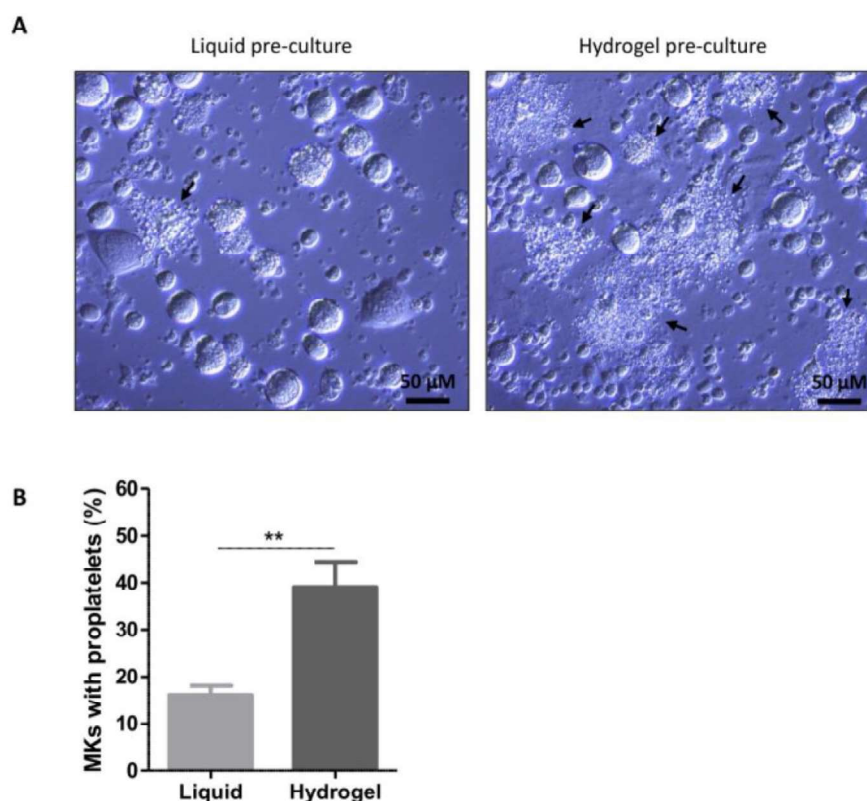


Figure 4. Representative results of proplatelet quantification. (A) representative images of megakaryocytes at day 4 of culture. Cells were incubated three days in liquid (**left**) or 2% methylcellulose hydrogel medium (**right**) followed by one day of resuspension in liquid medium. Black arrows indicate megakaryocytes extending proplatelets. (Scale bar = 50 μ m). (B) Representative quantification data of proplatelet formation. Proplatelet formation quantified at day 4 for megakaryocytes previously pre-cultured from day 0 to day 3 in liquid or 2% methylcellulose hydrogel medium. Results are expressed as the % of megakaryocytes extending proplatelets (mean \pm SD) and are from 3 independent experiments, with a total number of megakaryocytes examined per condition >750 (t-test, $p = 0.0023$). The mean proportion of megakaryocytes extending proplatelets is 16% in liquid condition and 39% for the methylcellulose hydrogel pre-culture. This result corresponds to the previously demonstrated and published effect of hydrogel pre-culture that increases proplatelet formation compared to liquid condition. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

In the previous decade, mechanobiology has raised more and more interest in many areas of biology. It is now commonly acknowledged that the mechanical environment surrounding

the cells does play a role in their behavior, emphasizing the importance to study how megakaryocytes sense and respond to extracellular mechanical cues. It is challenging to accurately measure the stiffness of the bone marrow tissue *in situ*¹¹, especially if we consider the hematopoietic

red marrow as it is located inside trabecular bones in large mammals while the more easily accessible marrow from the diaphysis is composed essentially of adipocytes (yellow marrow)¹². In the case of an isolated marrow from mice, where diaphysis contains essentially red marrow, another issue is that, once extracted from the bone, the tissue does not remain cohesive. However, Shin and collaborators managed to measure mouse diaphysis marrow stiffness using atomic force microscopy and found a value of $E_{\text{marrow}} = 0.3 \pm 0.1$ kPa, which places the marrow among the softest tissues⁶.

The interest of the procedure described here is to compare megakaryocyte behavior in liquid medium to that in the hydrogel. In liquid milieu, cells have all sedimented at the bottom of the well, in contact with the stiff plastic surface and sometime with other cells. In contrast, cells embedded in methylcellulose hydrogel are distributed homogeneously in the gel and are fully isolated from the other cells (**Figure 3A**). Hence they are submitted essentially to mechanical cues provided by the confinement, excluding juxtacrine communication. Paracrine stimulation cannot be totally excluded. Nonetheless, the cells embedded in the methylcellulose hydrogel are distant from one another contrary to the situation in the bone marrow and we can thus assume that if secreted substances reach neighboring cells, they might be very diluted.

The method is easy to set up and does not require specific skills. Methylcellulose is a physical gel whose polymer chains form non-covalent cross-linkages. Being liquid at low temperature, it jellifies when increasing the temperature (please see the article from Aguilar et al. 2016⁹ for more information about the characterization of the mechanical properties of the gel). This gel state can be easily reversed

following dilution in aqueous solution, which enables an easy recovery of the cells, whether fixed in gel or as live cells.

A critical factor here is the stiffness of the hydrogel. The appropriate methylcellulose volume should be very precisely dispensed as even a small change in the hydrogel concentration can have an important impact on the stiffness of the milieu and therefore on megakaryocyte maturation. For instance, it was previously shown that increasing methylcellulose concentration from 2 to 2.5% increased gel stiffness (Young's modulus) by 10 fold. One possible pitfall is that there is no easy quality control to verify precise rheological properties of the methylcellulose in each experimental well once it has been seeded with cells. Nonetheless, an essential criterion that will reassure about a correct gel concentration is the proper maturation of the megakaryocytes within the hydrogel, as reflected by their large size roughly similar to that in liquid medium. A decrease in their mean diameter could reflect a defective differentiation similar to what occurs when increasing stiffness with 2.5% methylcellulose (**Figure 3B**).

Another limitation of the method is that cell recovery from the hydrogel takes more time than in the classical culture as it is necessary to first dilute the gel before centrifugation. If methylcellulose needs to be totally removed, for instance to obtain cell lysate for further western blot or RNA isolation procedure, an additional washing step may be required, during which time modifications may occur in proteins or RNA (protein dephosphorylation, RNA degradation...).

A critical point to consider in the procedure is the cell count that has to be equal in each conditions. This is not that trivial since in the liquid culture, cells tend to sediment at the bottom of the well and some of them adhere on the plastic surface, which is not the case for cells in suspension in hydrogel.

One pitfall is an incomplete collection of the cells in the liquid condition, resulting in a different cell content between "liquid" and "hydrogel" condition after suspension in liquid medium at day 3. Such a difference may lead to discrepancies in the final data. As a checkpoint, a cell numeration can be done at this stage before reseeding the cells. It is preferable to do it manually using a Nageotte hemocytometer as it is especially appropriate for larger cells such as megakaryocytes.

As for any primary cell culture, there is a possible risk of contamination. Contamination is the most probable explanation to an unusually low proplatelet proportion in methylcellulose pre-culture condition, as a small contamination appears more difficult to detect than in liquid medium. Therefore, it can go unnoticed until proplatelet quantification, leading to misleading results. Good laboratory practices must be strictly observed especially during methylcellulose cell encapsulation that requires numerous and precise manipulations of syringes and connectors. The megakaryocyte viability should also be checked with Trypan blue using a Nageotte cell chamber for manual counting before reseeding at day 3.

Overall, the protocol provided here describes an *in vitro* model for comparison between classical liquid culture and a 3D culture using methylcellulose hydrogel. Of note, this culture protocol is described for mouse primary Lin⁻ cells and has not yet been adapted to human cells. This 3D model is a useful tool to investigate the impact of the mechanical environment on megakaryocyte behavior and maturation⁹. It is also possible to add compounds in the culture (even on the gel) to study the influence of drugs on megakaryocyte behavior/maturation and proplatelet formation. Finally, by reproducing the mechanical constraints that cells may encounter in the bone marrow, this culture system allows for the investigation

of abnormal phenotypes that could not be observed in classical liquid cultures as previously showed for *Myh9* knockout megakaryocytes^{9,13,14}.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fabien Pertuy and Alicia Aguilar who initially developed this technique in the lab, as well as Dominique Collin (Institut Charles Sadron - Strasbourg) who characterized the viscoelastic properties of the methylcellulose hydrogel. This work was supported by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique) and by an ARN grant (ANR-18-CE14-0037 PlatForMechanics). Julie Boscher is a recipient from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM grant number FDT202012010422).

References

1. Doolin, M.T., Moriarty, R.A., Stroka, K.M. Mechanosensing of Mechanical Confinement by Mesenchymal-Like Cells. *Frontiers in Physiology*. **11** (2020).
2. Wang, C. *et al.* Matrix Stiffness Modulates Patient-Derived Glioblastoma Cell Fates in Three-Dimensional Hydrogels. *Tissue Engineering Part A*. (2020).
3. Doyle, A.D., Yamada, K.M. Mechanosensing via cell-matrix adhesions in 3D microenvironments. *Experimental Cell Research*. **343** (1), 60-66 (2016).
4. Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. **126** (4), 677-689 (2006).

5. Choi, J.S., Harley, B.A.C. The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials*. **33** (18), 4460-4468 (2012).
6. Shin, J.-W. *et al.* Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell stem cell*. **14** (1), 81-93 (2014).
7. Boscher, J., Guinard, I., Eckly, A., Lanza, F., Léon, C. Blood platelet formation at a glance. *Journal of cell science*. **133** (20) (2020).
8. Aguilar, A., Boscher, J., Pertuy, F., Gachet, C., Léon, C. Three-dimensional culture in a methylcellulose-based hydrogel to study the impact of stiffness on megakaryocyte differentiation. *Methods in Molecular Biology*. **1812**, 139-153 (2018).
9. Aguilar, A. *et al.* Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood*. **128**, 2022-2032 (2016).
10. Hitchcock, I.S., Kaushansky, K. Thrombopoietin from beginning to end. *British Journal of Haematology*. **165** (2), 259-268 (2014).
11. Leiva, O., Leon, C., Kah Ng, S., Mangin, P., Gachet, C., Ravid, K. The role of extracellular matrix stiffness in megakaryocyte and platelet development and function. *American Journal of Hematology*. **93** (3), 430-441 (2018).
12. Jansen, L.E., Birch, N.P., Schiffman, J.D., Crosby, A.J., Peyton, S.R. Mechanics of intact bone marrow. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. **50**, 299-307 (2015).
13. Eckly, A. *et al.* Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood*. **113** (14), 3182-3189 (2009).
14. Eckly, A. *et al.* Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **8** (10), 2243-2251 (2010).

PUBLICATION 3
ARTICLE SCIENTIFIQUE

**« Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate *in vivo* and
in vitro proplatelet formation »**

Alicia Bornert ¹, Julie Boscher ¹, Fabien Pertuy ¹, Anita Eckly ¹, David Stegner ², Catherine Strassel ¹, Christian Gachet ¹, François Lanza ¹, Catherine Léon ¹

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, Strasbourg, France.

²University Hospital Würzburg and Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, Germany.

Publié dans :

Haematologica. 2021 May 1;106(5):1368-1380. doi: 10.3324/haematol.2019.239111.

« Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate *in vivo* and *in vitro* proplatelet formation »

INTRODUCTION

Les plaquettes proviennent des mégacaryocytes *via* l'extension de proplaquettes dans les vaisseaux sinusoïdes de la MO. *In vivo* le processus d'extension des proplaquettes diffère de celui observé *in situ* en culture. Cette différence soulève la problématique suivante : les mécanismes mis en avant *in vitro* s'appliquent-ils de façon identique *in vivo* ? Dans le cas de la culture *in vitro*, il a été démontré que les microtubules ainsi que l'actomyosine ont un rôle majeur dans la formation, l'allongement et la structure des proplaquettes de culture (cPPT). Dans ce travail auquel j'ai participé, nous avons évalué leurs rôles respectifs chez des souris vivantes en observant l'allongement des proplaquettes dites natives (nPPT) en temps réel au sein de la moelle *via* la technique de microscopie biphotonique.

Les données obtenues indiquent que la croissance des proplaquettes natives de souris sauvages (« wild type » (WT)) est entrecoupée de phases de pause et de rétraction. L'utilisation de souris inactivées pour le gène de la myosine-IIA, souris *Myh9*^{-/-}, a mis en évidence que l'absence de myosine-IIA abolit ces rétractions, avec pour conséquence une vitesse d'allongement doublée. Par ailleurs, de précédents travaux ont établi que les mégacaryocytes de souris déficientes en tubuline-β1 sont quasiment incapables d'étendre des proplaquettes *in vitro*, et les rares extensions formées sont morphologiquement anormales (Schwer et al., Curr. Biol. 2001). Or nos résultats *in vivo* révèlent une morphologie et une croissance normales des nPPT dans ces souris, même si elles sont diminuées en nombre, suggérant un rôle différent des microtubules *in vivo* et *in vitro*. Une autre différence observée entre *in vivo* et *in vitro* est la distribution cytoplasmique des microtubules. Dans les cPPT ils sont organisés en un faisceau courant le long de l'axe de la proplaquette. Cette organisation n'est pas retrouvée dans les nPPT *in situ*, où les microtubules ne sont pas fasciculés et apparaissent répartis de manière hétérogène. Chez les souris WT, la dépolymérisation des microtubules induite par l'injection de vincristine entraîne la rétraction totale des proplaquettes. En revanche, la vincristine n'empêche pas la croissance des proplaquettes dans les souris *Myh9*^{-/-}, suggérant qu'en absence de forces de contraction, la proplaquette est capable de s'allonger indépendamment de la présence des microtubules. En conclusion, nous montrons que le cytosquelette est différemment impliqué dans la formation des proplaquettes *in vitro* et *in vivo*. Les données suggèrent qu'*in vivo* les microtubules joueraient non pas un rôle moteur mais un rôle de soutien en s'opposant aux forces contraires exercées par l'actomyosine. La croissance des proplaquettes *in vivo* résulterait ainsi d'un équilibre entre des forces de rétraction *via* l'actomyosine et des forces protrusives, en partie hémodynamiques, qu'il reste à déterminer.



Ferrata Storti Foundation

Haematologica 2021
Volume 106(5):1368-1380

Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate *in vivo* and *in vitro* proplatelet formation

Alicia Bornert,¹ Julie Boscher,¹ Fabien Pertuy,¹ Anita Eckly,¹ David Stegner,² Catherine Strassel,¹ Christian Gachet,¹ François Lanza¹ and Catherine Léon¹

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S 1255, Strasbourg, France and ²Institute of Experimental Biomedicine, University Hospital Würzburg & Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany

ABSTRACT

Platelets are produced by bone marrow megakaryocytes through cytoplasmic protrusions, named native proplatelets (nPPT), into blood vessels. Proplatelets also refer to protrusions observed in megakaryocyte culture (cultured proplatelets [cPPT]) which are morphologically different. Contrary to cPPT, the mechanisms of nPPT formation are poorly understood. We show here in living mice that nPPT elongation is in equilibrium between protrusion and retraction forces mediated by myosin-IIA. We also found, using wild-type and β 1-tubulin-deficient mice, that microtubule behavior differs between cPPT and nPPT, being absolutely required *in vitro*, while less critical *in vivo*. Remarkably, microtubule depolymerization in myosin-deficient mice did not affect nPPT elongation. We then calculated that blood Stokes' forces may be sufficient to promote nPPT extension, independently of myosin and microtubules. Together, we propose a new mechanism for nPPT extension that might explain contradictions between severely affected cPPT production and moderate platelet count defects in some patients and animal models.

Correspondence:

CATHERINE LÉON
catherine.leon@efs.sante.fr

Received: September 23, 2019.

Accepted: April 14, 2020.

Pre-published: April 23, 2020.

<https://doi.org/10.3324/haematol.2019.239111>

©2021 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.



Introduction

Blood platelets are key elements of hemostasis for the prevention of bleeding and are produced by a unique mechanism. They arise from megakaryocytes (MK), specialized cells in the bone marrow.^{1,2} Upon differentiation from hematopoietic progenitors, MKs undergo endomitosis, leading to a giant cell, whose cytoplasm is filled by a highly developed intracellular membrane network called the demarcation membrane system (DMS).³ At a mature stage, MK lie adjacent to the bone marrow sinusoid vessels and initiate cytoplasmic protrusion through the vessel wall. These protrusions further elongate inside the blood circulation, attached to their mother cells. These extensions are named proplatelets (PPT) and are fueled by the DMS that acts as a membrane reservoir to allow PPT growth.⁴ Once inside the blood stream, PPT are released into the circulation as large fragments that have been proposed to further remodel in downstream organs to release bona fide platelets, small anucleated MK fragments having a discoid shape.^{2,5,6}

The first PPT term was proposed following *in situ* scanning electron microscopy (SEM) observation of "long intrasinusoidal "proplatelet" processes which originate from the cell body of extravascularly located megakaryocytes".⁷ Later on, *in vivo* observations by time lapse imaging in living animal confirmed the morphology of PPT as elongated protrusions in wild-type (WT) mice under physiological conditions.⁷⁻¹⁴ The same denomination was also given to the cytoplasmic MK extensions in culture or in bone marrow explants.^{8,15-19} Yet, the morphology of PPT observed *in vitro* strongly differs from that observed *in situ/in vivo*. Early *in vitro* observations of marrow explants^{8,15,16,20} and later of progenitor-differentiated MK in culture^{17,19,21} similarly recorded PPT presenting branched thin shafts (1-4 μ m in diameter) leading to an entanglement of PPT surrounding the MK body.¹⁷⁻¹⁹ These morphological differences between these two types of MK extensions raise the possibility that the mechanisms at stake could as well differ between *in vitro* cultured PPT (hereafter

referred as cPPT) and *in vivo* generated native PPTs (referred as nPPT).

While the mechanisms governing cPPT extension *in vitro* have been well documented, no study has clearly evaluated the *in vivo* cytoskeleton-based mechanisms regulating the extension of nPPT. Based on *in vitro* experiments, several cytoskeletal elements have been identified as playing a major role.^{22,23} Inside cPPT, the microtubules are organized as linear bundles of mixed polarity running along the shaft and ending as a coil in the cPPT bud, prefiguring the platelet marginal band.^{2,17,24} Incubating MK *in vitro* in the presence of microtubule depolymerizing drugs prevented *de novo* cPPT extension^{17,21,25,26} and retracted already formed cPPT.^{16,17,21} More recent work suggests that the sliding property of microtubules, rather than their proper polymerization, is the primary driver of cPPT extension.^{11,24} On the other hand, actin has been proposed to play a role in the branching process since F-actin depolymerization reduces the number of bifurcations,¹⁷ while myosin activity decreases the extension of cPPT and has no impact on their morphology except on the bud size.^{26,27}

In the present study we examined whether the mechanisms previously described *in vitro* also apply to the nPPT by genetically and pharmacologically manipulating cytoskeletal key components. We show that in the bone marrow of living mice, the previously *in vitro* described mechanism governing nPPT extension differs from the previously one described *in vitro*.

Methods

For details see the *Online Supplementary Appendix*. This study was approved by the Local Ethical Committee and experiments were performed according to the Agreement for Experimentation released by the French government (Agreement numbers: 2016090911005304 and 2018061211274514).

Intravital imaging

Intravital imaging was performed with either *mT/mG;Pff4-cre* mice²⁸ or following MK and nPPT staining by intravenous injection of an AF488-conjugated anti-GPIX antibody derivative.²⁹ Two-photon microscopy was performed by observation of skull bone marrow as described.²⁹ Anesthetized mice were observed for a maximum of 3 hours (h), during which time one to four nPPT could be recorded.

In vitro proplatelet formation

Bone marrow experiments were performed as described.²⁶ *In vitro* liquid culture of Lin⁻ mouse progenitors was performed as described previously.³⁰

Immunofluorescence and confocal observations

Bone marrow experiments were performed as described.²⁶ *In vitro* liquid culture of Lin⁻ mouse progenitors was performed as described previously.³⁰

Results

Distinct morphologies between *in vivo* native proplatelets and *in vitro* cultured proplatelets

As already shown by others,^{4,7,9,10,31,32} nPPT extending into bone marrow sinusoids are unbranched and elongated protrusions that appear mostly larger than cPPT. nPPT

extensions can be observed *in situ* in fixed tissues by GPIIb β immunolabeling or SEM (Figure 1Ai-iii; see also Figure 4C), clearly showing the slightly bulbous aspect of their ends (Figure 1A, ii and iii inset). As also previously shown by others, two-photon microscopy observations in living animal confirmed this elongated morphology, sometimes irregular with constriction zones, which extend over long distances (Figure 1Bi-iii; *Online Supplementary Video S1-3*; *Online Supplementary Figure S1A*). nPPT were rarely found to segment at their extremities, but rather broke off as long fragments subsequently further remodeled into individual platelets (*Online Supplementary Figure S1B*).

In contrast, the morphology of cPPT appears highly different. Using various microscopy techniques, cPPT observed *in vitro*, either from cultured MK or cultured marrow explants, present a regular thin shaft terminated by a bud (Figure 1Ci-iii). The cPPT shaft diameter is four-times smaller than the shafts measured on nPPT (Figure 1D), notwithstanding the different microscopy techniques used for their observations. The cPPT bud diameter is twice the size of the cPPT shaft (Figure 1D, left panel). Furthermore, the cPPT buds are already discoid as clearly visible by SEM (Figure 1Cii, arrows), prefiguring the future platelet, contrary to the nPPT ends (Figure 1Aii-iii).

These data that essentially confirm previous observations by others are presented for comparison purposes as these important PPT morphological differences between *in vitro* and *in vivo* observations suggest that the underlying mechanisms might be different. We therefore evaluated the role of the cytoskeleton in the dynamics of nPPT formation.

In vivo native proplatelet elongation dynamics are regulated by myosin IIA that opposes driving forces

As observed *in vivo* by two-photon microscopy, nPPT elongation is a dynamic and irregular process which proceeds through elongation periods interspersed with pause and retraction phases as exemplified in Figure 2A (red and blue traces) (see also the *Online Supplementary Figure S2B* for more tracings), resulting in high variability in elongation speed (*Online Supplementary Figure S2A*). We hypothesized that this irregular behavior resulted from opposing forces exerted by the cytoskeleton and that the myosin contractile cytoskeleton was a likely contributor. We previously showed that *Myh9*^{-/-} mice had a quantitative defect in cPPT formation in the explant marrow model, with fewer MK extending PPT which were also less complex compared to WT mice.²⁶ Here using intravital microscopy, we were nevertheless able to find *Myh9*^{-/-} extensions within sinusoids (Figure 2B). However, in contrast to WT nPPT, myosin-deficient cytoplasmic processes elongation occurred without any pause or retraction phases as exemplified in Figure 2C (*Online Supplementary Figure S2C*). Furthermore, the elongation speed was twice as high as that seen in WT nPPT, which might be explained by the absence of pauses and retractions (Figure 2D). Interestingly, *Myh9*^{-/-} cPPT were longer and thinner (Figure 2 E-F). Their mean length was increased by 49% in *Myh9*^{-/-} compared to WT nPPT and the shafts were 28% thinner. These findings suggest that myosin IIA, by increasing intracellular tension, renders the cytoplasmic extensions less stretchable and participates in the pauses and retractions observed under normal conditions.

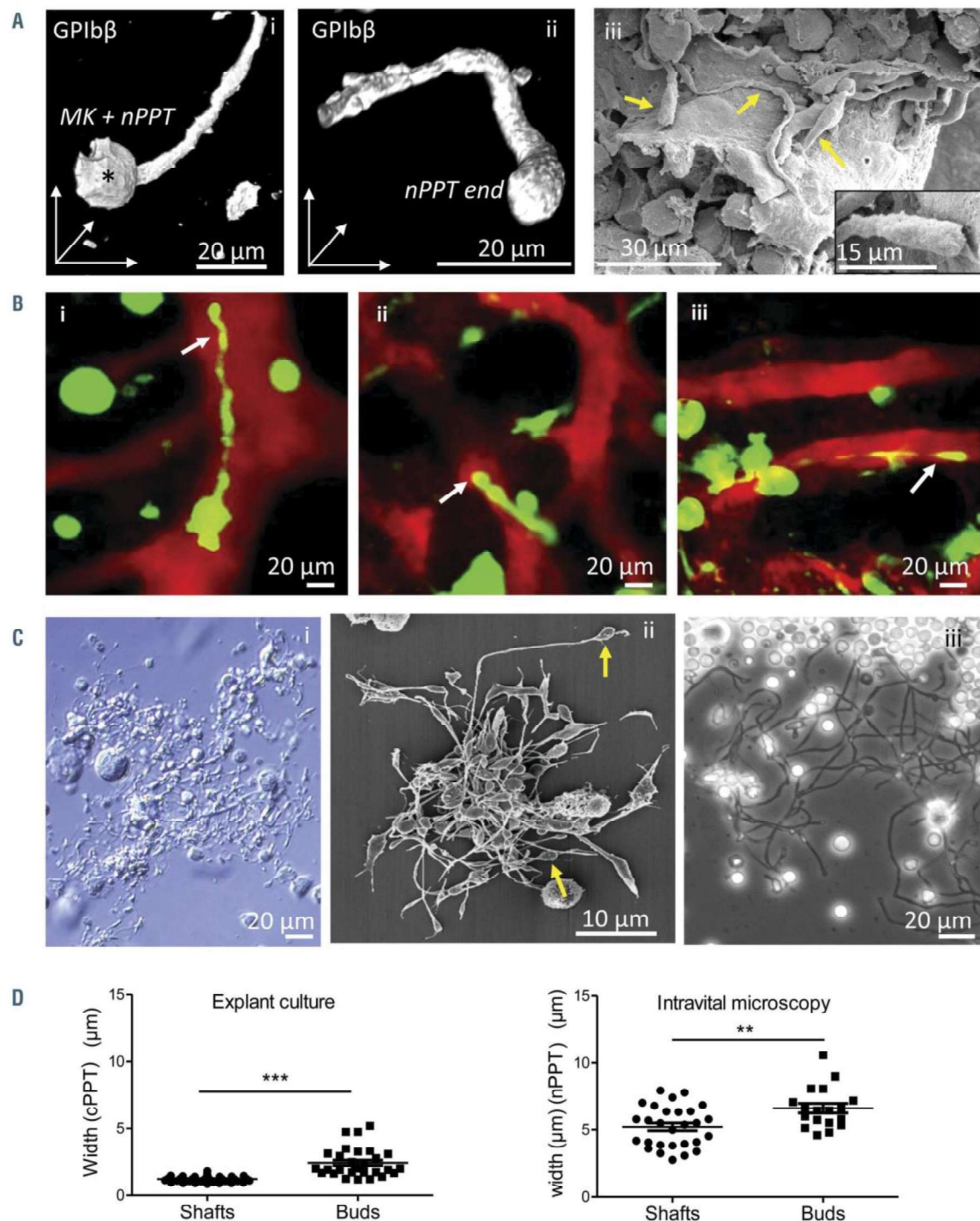


Figure 1. Native proplatelets generated in the bone marrow *in vivo* are morphologically different from cultured proplatelets. (A) Representative images of *in situ* bone marrow native proplatelets (nPPT): GPIIb/IIIa immunolabeling and confocal observation of a 30 µm-thick bone marrow section showing a portion of a long nPPT extending from the mother megakaryocyte (MK) (*) (i), and detail of a bulbous nPPT end (ii); images are 3D rendering using LASX software. (iii), several elongated nPPT (arrows) observed in a sinusoid vessel by scanning electron microscopy (SEM). Inset, magnification showing a bulbous nPPT end. Note the various nPPT shaft widths. Representative of at least three mice. (B) *In vivo* nPPT: z-projection images from time-lapse experiments showing the various morphologies of nPPT (arrows) extending within the bone marrow (BM) sinusoids. nPPT and MK are in green, sinusoid vessels are in red. Representative of at least 20 mice. (C) Representative images of *in vitro* cultured proplatelets (cPPT): cPPT produced by MK differentiated in culture from mouse BM progenitors, visualized by bright field microscopy at the bottom of the culture well before fixation (i) or after paraformaldehyde-fixation and SEM observation (ii); (iii), cultured proplatelets (cPPT) extending *in vitro* from a BM explant, observed by phase contrast microscopy. (D) Scatter plot representing cPPT shaft and terminal bud widths from explant BM measured on phase contrast images (left) (30–50 cPPT per group, data pooled from two individual BM explants) or nPPT shaft and terminal bud widths from *in vivo* recordings (right). Mean ± standard error of the mean from 18 to 28 values, pooled from 14 mice. Statistics analyzed using Mann-Whitney comparison test.

β 1-tubulin deficiency prevents proplatelet formation *in vitro* but not *in vivo*

Among other key cytoskeletal elements, microtubules have been shown to play an essential role in the dynamics of cPPT. In order to determine their role *in vivo*, we used mice deficient in β 1 tubulin (*Tubb1*^{-/-}), the major β tubulin isoform in platelets. MK from *Tubb1*^{-/-} mice were unable to

extend protrusions *in vitro* in a bone marrow explant assay (Figure 3A, upper panel) and only rare abnormally short and compact extensions were observed following *in vitro* differentiation of bone marrow progenitors (Figure 3A, lower panel inset), confirming previous results in fetal liver-derived MK.³³

In situ, examining the *Tubb1*^{-/-} bone marrow by immuno-

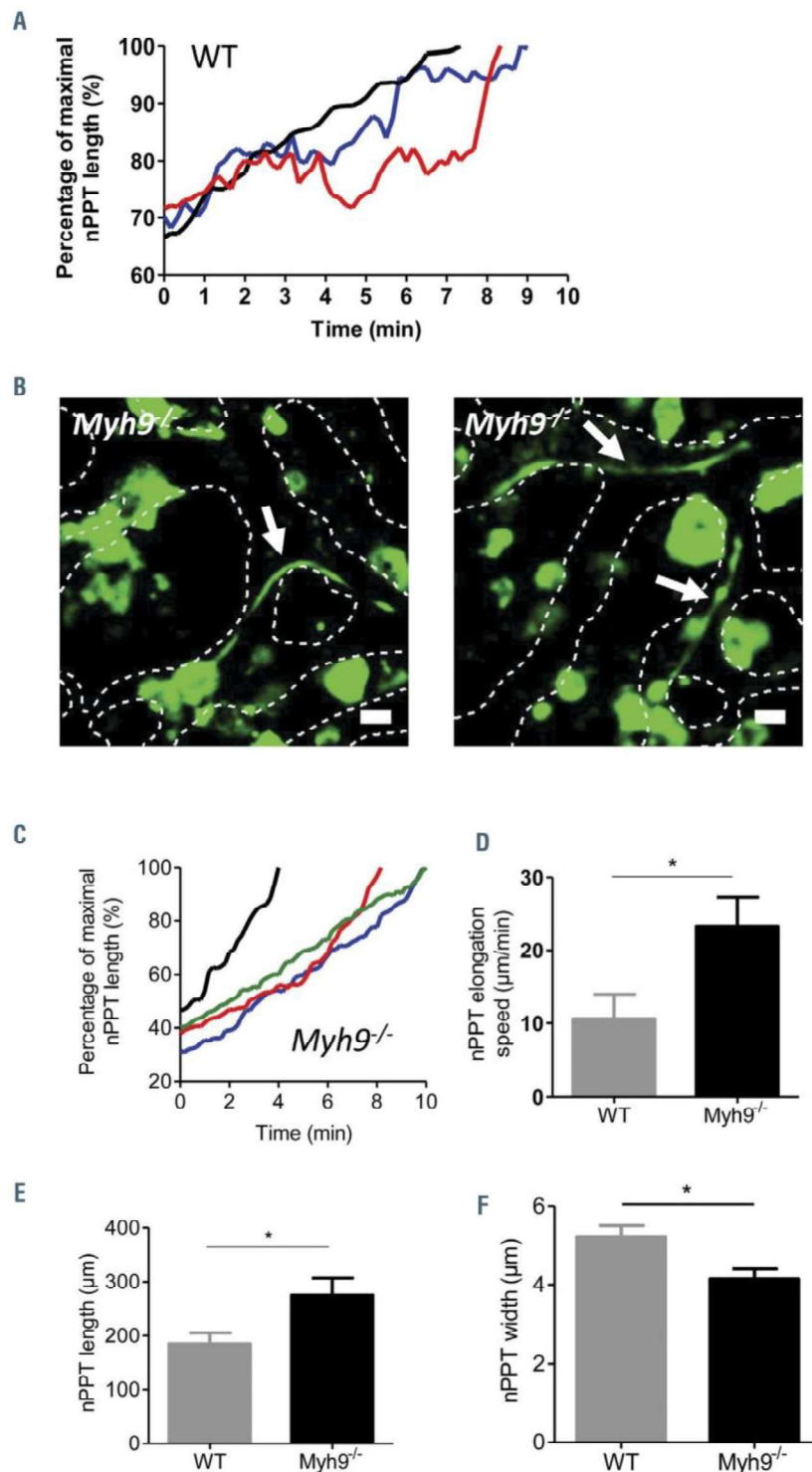


Figure 2. Myosin regulates native proplatelet elongation speed. (A) Normalized native proplatelet (nPPT) length (%) of three independent wild-type (WT) mice plotted over time, showing regular elongation (black line, max length=282.1 μm), pauses between elongation phases (blue line, max length=151.2 μm) or pause and retraction phases between elongation phases (red line, max length=85.6 μm). Representative of nPPT from at least 10 WT mice. (B) Two z-projection images showing long, thin nPPT in *Myh9*^{-/-} bone marrow sinusoids (arrows). Dotted lines represent the contours of the sinusoids. Scale bar =20 μm. Representative of at least 10 *Myh9*^{-/-} mice. (C) Normalized length (%) of four representative *Myh9*^{-/-} nPPT observed in three mice plotted over time, showing a continuous elongation, without pause or retraction (black line, max length=175.1 μm; green line, max length=221.2 μm; red line, max length=132.7 μm; blue line, max length=98.5 μm). (D) nPPT elongation speed. Data are 12 nPPT pooled from eight WT mice and 12 nPPT pooled from five *Myh9*^{-/-}. (E) nPPT length. Data are 25 nPPT from 14 WT mice and 13 nPPT from five *Myh9*^{-/-} mice. (F) nPPT width close to the base of PPT. Data are 28 nPPT from 19 WT mice and 17 nPPT from eight *Myh9*^{-/-} mice. (D-F) Bar graphs represent the mean ± standard error of the mean; P-values were calculated using Mann-Whitney test.

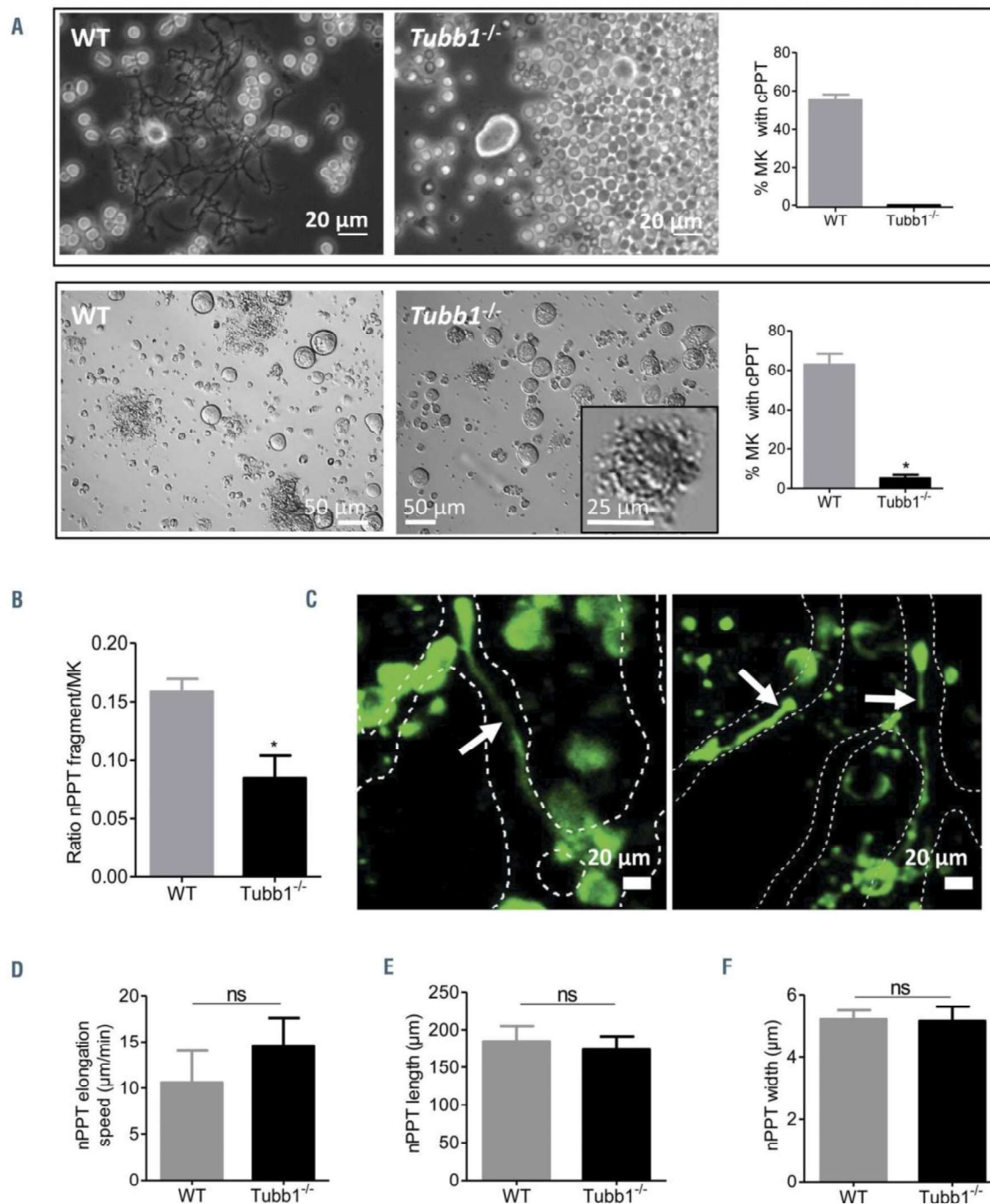


Figure 3. Strong discrepancy between *in vitro* cultured proplatelet formation and *in vivo* native proplatelet formation in *Tubb1*^{-/-} mice. (A) Upper panel, explant bone marrow culture experiment. Representative phase contrast images and quantification of the percent of megakaryocytes (MK) presenting with cultured proplatelets (cPPT) after 6 hours of culture showing total absence of *Tubb1*^{-/-} MK with protrusions (0%) while 55% of wild-type (WT) MK extended cPPT (mean \pm standard error of the mean [SEM], n=3 independent experiments). Lower panel, MK forming PPT after 4 days of Lin⁻ progenitor culture. Representative bright field images and quantification of the percent of MK presenting with cPPT (mean \pm SEM, n=4 independent experiments). Inset, rare *Tubb1*^{-/-} MK forming abnormal cPPT without shaft extensions. (B) Estimation of the nPPT formation capacity *in situ* by calculating the ratio of PPT fragments over the total number of MK observed in 30- μ m thick marrow sections. Bars are mean \pm SEM of three to four independent marrow sections from two mice, representing 374 and 687 MK for WT and *Tubb1*^{-/-}, respectively. (C) Two z-projection images of *in vivo* *Tubb1*^{-/-} native proplatelets (nPPT). Dotted lines delimit the sinusoids. Representative of at least 12 nPPT from five mice. (D) nPPT elongation speed. Data are mean \pm SEM of 16 nPPT pooled from eight WT mice and 12 nPPT pooled from four *Tubb1*^{-/-} mice. (E) nPPT length. Data are mean \pm SEM of 25 nPPT pooled from 14 WT mice and 16 nPPT pooled from five *Tubb1*^{-/-} mice. (F) nPPT width. Data are mean \pm SEM of 28 nPPT pooled from 19 WT mice and 16 nPPTs pooled from five *Tubb1*^{-/-} mice. Bar graphs represent the mean \pm SEM; all data analyzed using Mann-Whitney test. ns: not significant.

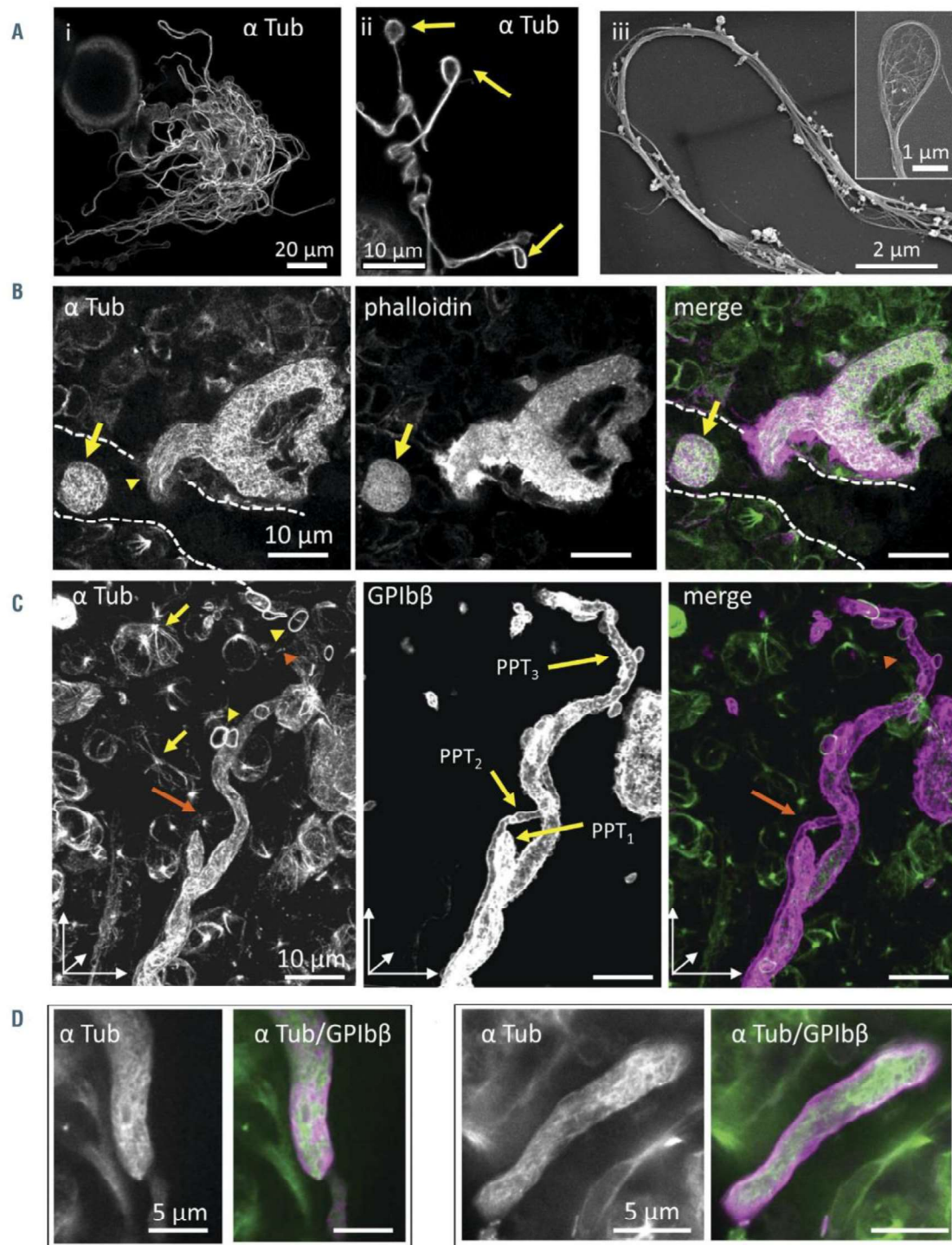


Figure 4. Microtubules are differentially distributed along proplatelets *in situ* compared to *in vitro*. (A) i-ii: cultured proplatelets (cPPT) from wild-type (WT) megakaryocytes (MK) differentiated in culture for 4 days, labeled with an antibody against α tubulin. iii: microtubule bundles within the cPPT shaft and coils in the bud (inset), observed by scanning electron microscopy (SEM) after the removal of the membrane by treatment with Triton X-100. (B) Confocal images of a nascent native proplatelets (nPPT) within bone marrow 30- μ m thick sections revealing an absence of microtubule bundle organization (antibodies against α tubulin in green) and F-actin (phalloidin labeling, in magenta). Dotted lines represent sinusoid vessel. Note the presence of an nPPT transversally sectioned (arrow) in the sinusoid, again lacking microtubule bundles. (C-E) *In situ* bone marrow nPPT immunolabeling with antibodies against α tubulin (green) and GPIIb/IIIa (magenta). (C) 3D visualization of z-stack (30 μ m thick) showing parts of three entangled nPPT after GPIIb/IIIa labeling, denoted PPT₁, PPT₂ and PPT₃. Tubulin labeling was discontinuous being weak to absent in certain portions of the nPPT. For example, labeling becomes weaker in the upper part of the longest nPPT (PPT₃) (orange arrowhead). Tubulin labeling in the thinnest nPPT (PPT₂) was hardly visible in our settings (orange arrow). Marginal band of platelets (yellow arrowheads) and mitotic spindles (yellow arrows) were well labeled denoting well-preserved microtubules. (D-E) Confocal single-plane images at higher magnification showing nPPT portions. Note that the microtubules are not arranged longitudinally. (B-E) Representative of four wild-type (WT) femur bone marrow from two mice.

labeling, we found that the number of MK was increased by around 75% compared to the WT mice (Online Supplementary Figure S3A), probably as a compensatory response to the thrombocytopenia (Online Supplementary Figure S3B). *Tubb1*^{-/-} mouse MK were able to extend protrusions in marrow sinusoids, although we found a 45% decrease in the number of nPPT extensions compared to WT nPPT, in agreement with the decreased number of circulating platelets (Figure 3B; Online Supplementary Figure S3B). *Tubb1*^{-/-} nPPT exhibited a fully normal morphology (Figure 3C) with a surprisingly normal elongation speed (Figure 3D) and a fully normal mean length and width (Figure 3E-F). These results indicate that while the absence of an essential tubulin isoform almost totally abrogates PPT formation *in vitro*, it partially affects the number of

PPT *in vivo* but not their elongation speed. Overall, this points to different mechanisms contributing to PPT extension when considering the *in vivo* situation with a less crucial importance of microtubules compared to *in vitro*.

Microtubules are non-uniformly distributed in proplatelets *in vivo*

Another difference between *in vivo* and *in vitro* was observed by looking at the cytoplasmic distribution of microtubules. Within cPPT obtained *in vitro*, microtubules are organized into a bundle running along the shaft as previously described¹⁷ and as illustrated in Figure 4A. We then explored their organization *in situ* under conditions that preserved microtubules as denoted by the intact marginal band of platelets and mitotic spindles in marrow cells (see

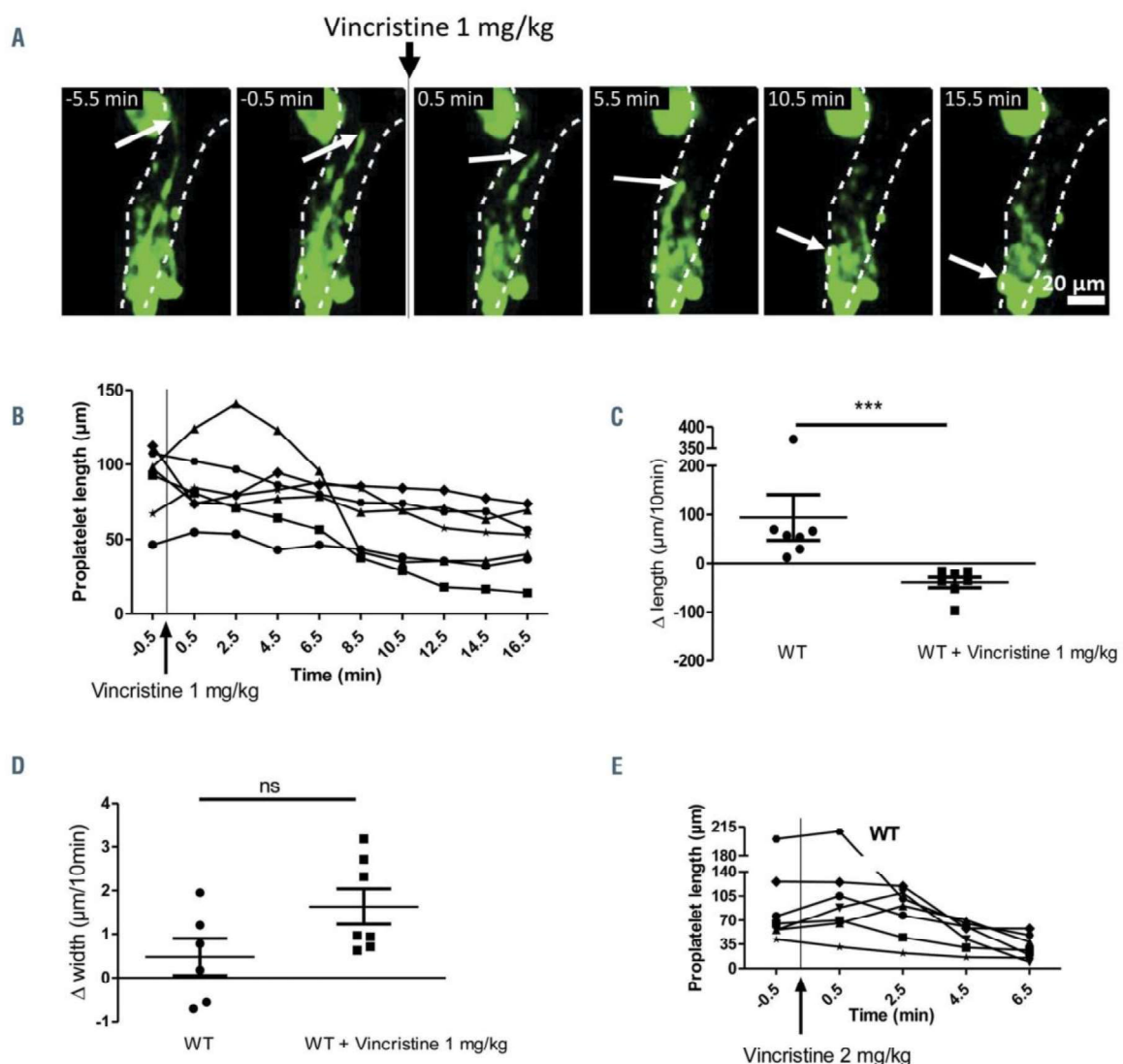


Figure 5. Vincristine infusion leads to shrinkage of preformed wild-type native proplatelets. A) Representative z-projection time-lapse images showing an native proplatelets (nPPT) before and after vincristine administration (1 mg/kg). (B) Length of individual nPPT plotted as a function of time before and after 1 mg/kg vincristine administration. Seven mice analyzed. (C) Scatter plot of nPPT length difference during a 10-minute observation showing elongation in the absence of vincristine and retraction following vincristine injection (from 0.5-10.5 min). Seven mice were analyzed for each condition. (D) Measurement of the difference in width close to the base during a 10-minute window showing small positive or negative variation in the absence of vincristine (left) and increasing width following vincristine injection (right). Seven mice were analyzed. (E) Doubling the vincristine dose administration accelerates nPPT shrinkage. Seven mice were analyzed. All data analyzed using Mann-Whitney test. ns: not significant.

on Figure 4C yellow arrowheads and arrows). As shown in Figure 4B (left, arrowhead), microtubules were not organized as bundles but aligned roughly parallel in the direction of the extension in nascent nPPT. This different microtubule organization suggests a different role in the process of nPPT extension. Of note, strong F-actin labeling was observed laterally at the site of transmigration, indicating also the importance of this cytoskeleton in this first step (Figure 4B, middle). Focusing on later stages in the elongated nPPT, we observed that again, unlike *in vitro*, the microtubules were not arranged in large bundles running along the extension, and microtubules were not longitudinally aligned in parallel but were found in various non-uniform orientations along the nPPT (Figure 4B arrow; Figure 4C-E; especially compare Figure 4Aii with Figure 4B-C which

have the same scale). As seen in Figure 4C showing a three-dimensional (3D) view of three portions of intertwined nPPT, the labelling was not always constant, being sometimes decreased (Figure 4C left, orange arrowhead) or even absent (Figure 4C left, orange arrow), suggesting few microtubules and mainly non-polymerized tubulin. Hence the difference between the *in vivo* and *in vitro* role of microtubules in the process of MK extension is further illustrated by the difference in microtubule organization/distribution within nascent and elongating nPPT compared to cPPT.

Administration of vincristine leads to shrinkage of preexisting wild-type proplatelets

In a second approach, and because *Tubb1*^{-/-} mice compensate the $\beta 1$ tubulin deficiency by overexpressing $\beta 2$

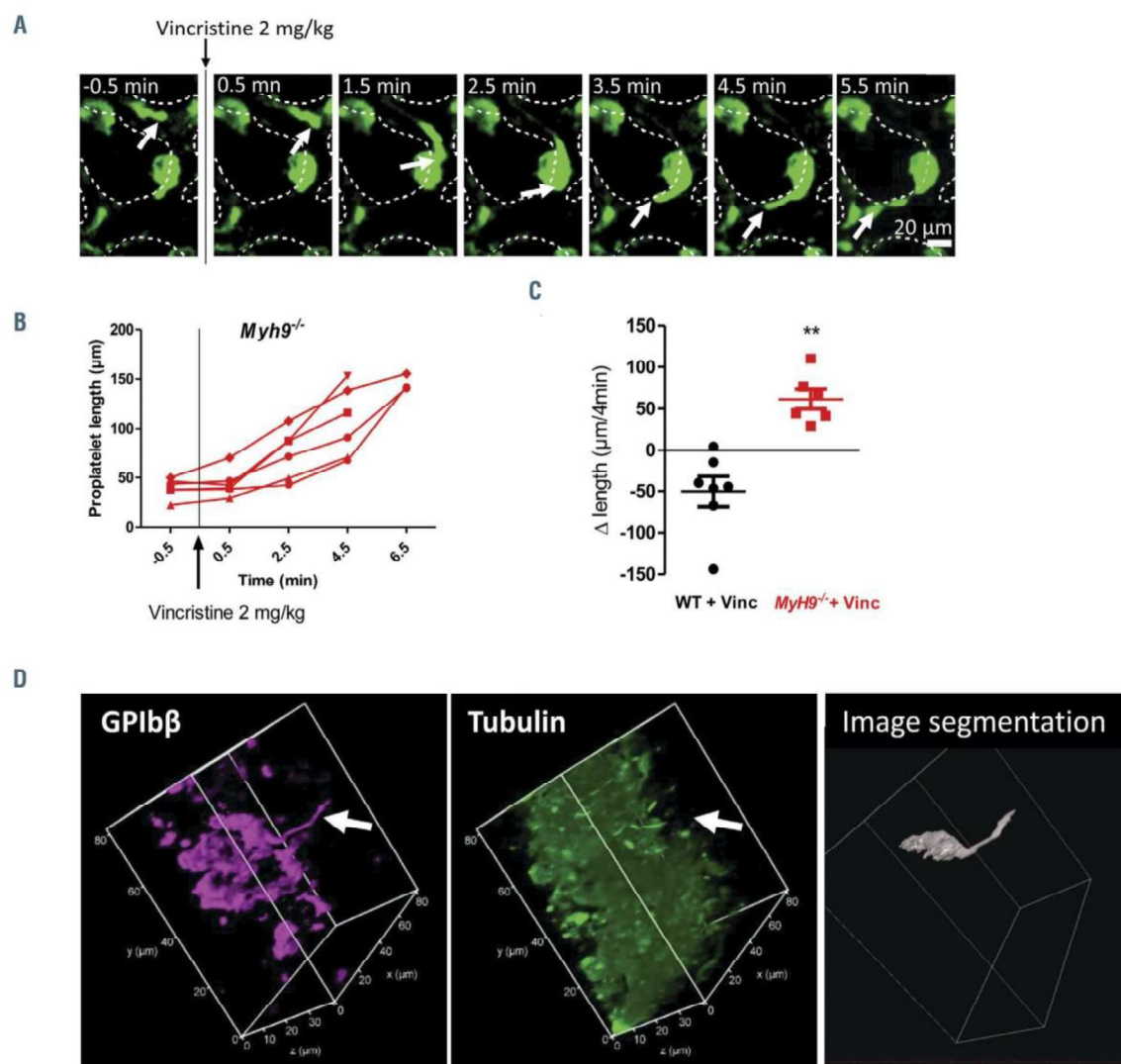


Figure 6. *Myh9*^{-/-} native proplatelets still elongate after vincristine administration. (A) Representative z-projection time-lapse images showing *Myh9*^{-/-} protrusions before and after vincristine administration. (B) Measurement of protrusions length in *Myh9*^{-/-} mice before and after 2 mg/kg vincristine administration plotted as a function of time. Note that some *Myh9*^{-/-} protrusions could not be recorded after 4.5 minutes since they escaped the observation field. Six mice were analyzed. (C) Measurement of the difference in length during a 4-minute window (0.5–4.5 minutes post 2 mg/kg vincristine injection), showing retraction in wild-type (WT) mice and elongation in *Myh9*^{-/-} mice. Seven WT mice and six *Myh9*^{-/-} mice analyzed, using Mann-Whitney statistical analysis. (D) Immunolabeling of bone marrow sections from *Myh9*^{-/-} mice injected with vincristine (1 mg/kg) 10 minutes prior to the removal of the femurs and fixation of the bone marrow, showing the absence of microtubule labeling in a long protrusion (arrow). Left, Magenta labeling showing GPIIb/3; center, green labeling showing α tubulin; images represent a 3D view. Right panel, 3D representation of the megakaryocytes (MK) extending the nPPT obtained by image segmentation and 3D reconstruction with AMIRA software.

and $\beta 5$ tubulin isotypes,³³ we pharmacologically depolymerized microtubules within preformed nPPT. Microtubule depolymerization was induced during the course of nPPT elongation by injecting the microtubule-depolymerizing drug vincristine into WT mice (1 mg/kg). At this dose, vincristine induces depolymerization of microtubules from the marginal band of circulating platelets and from marrow cells in the extravascular compartment (Online Supplementary Figure S4; Online Supplementary Figure S5). Time-lapse recordings showed that the majority of preformed nPPT underwent shrinkage within 10 minutes after vincristine administration as illustrated in Figure 5A and Online Supplementary Video S4, and quantified in Figure 5B-D. Most nPPT progressively became

shorter (Figure 5A-C) and increased their thickness, especially at their base (Figure 5D). In some cases, the shrank fragments were captured on time-lapse recordings while they were released into circulation. Doubling the vincristine dose (2 mg/kg) accelerated PPT shrinkage to as early as 2 minutes after drug administration (Figure 5E). These results indicate that the microtubule cytoskeleton is required to maintain the nPPT elongated morphology once it is formed.

Microtubules are dispensable for *Myh9*^{-/-} proplatelet elongation

Given that myosin IIA is required for the retraction phases observed in WT nPPT, we investigated whether

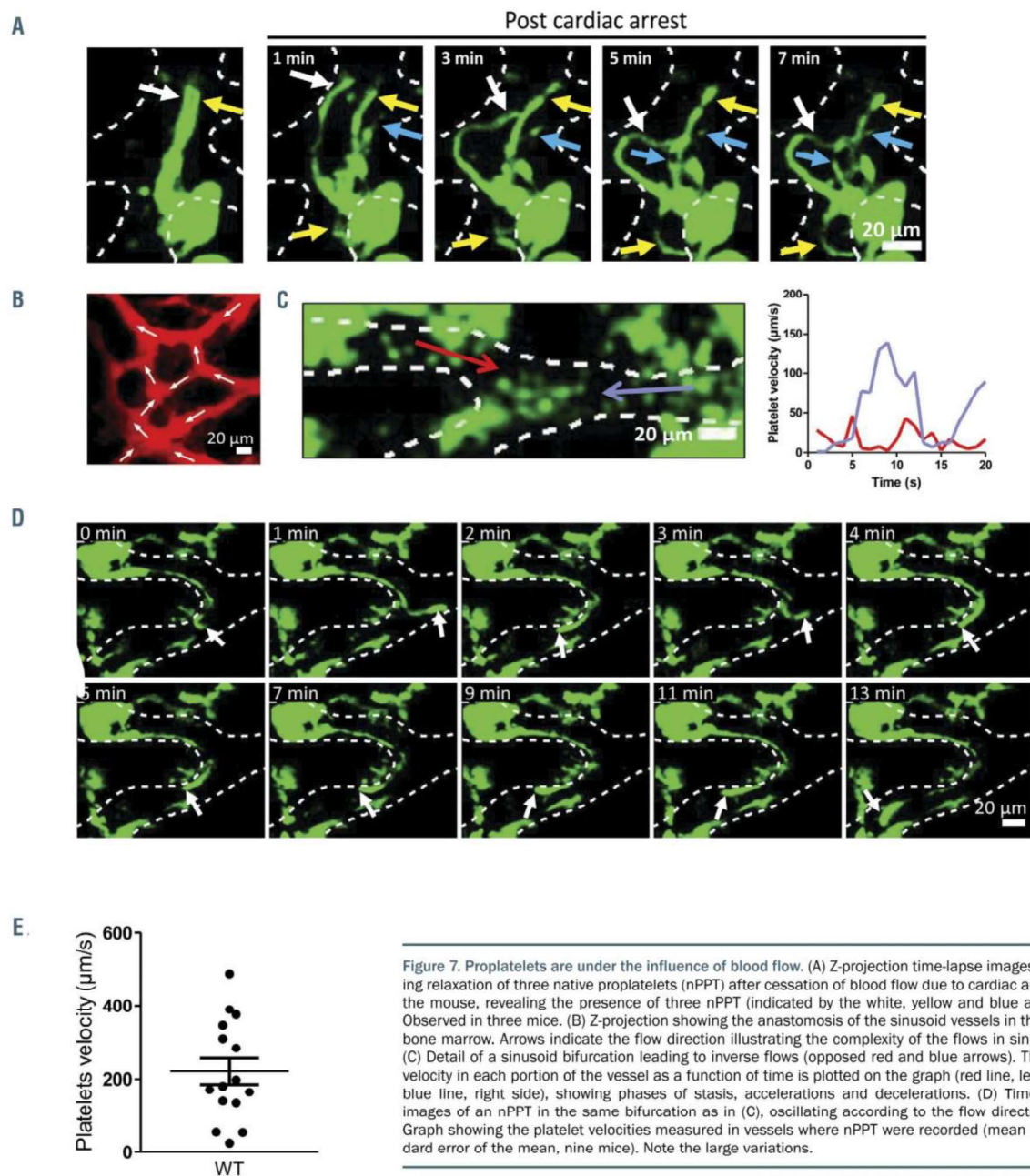


Figure 7. Proplatelets are under the influence of blood flow. (A) Z-projection time-lapse images showing relaxation of three native proplatelets (nPPT) after cessation of blood flow due to cardiac arrest of the mouse, revealing the presence of three nPPT (indicated by the white, yellow and blue arrows). Observed in three mice. (B) Z-projection showing the anastomosis of the sinusoid vessels in the skull bone marrow. Arrows indicate the flow direction illustrating the complexity of the flows in sinusoids. (C) Detail of a sinusoid bifurcation leading to inverse flows (opposed red and blue arrows). The flow velocity in each portion of the vessel as a function of time is plotted on the graph (red line, left side; blue line, right side), showing phases of stasis, accelerations and decelerations. (D) Time-lapse images of an nPPT in the same bifurcation as in (C), oscillating according to the flow direction. (E) Graph showing the platelet velocities measured in vessels where nPPT were recorded (mean \pm standard error of the mean, nine mice). Note the large variations.

the shrinkage observed after injection of vincristine was dependent on myosin contractility. Again, we previously controlled that microtubules from *Myh9*^{-/-} mouse platelets and MK were sensitive to vincristine-induced depolymerization (Online Supplementary Figure S4; Online Supplementary Figure S5). Strikingly, no PPT shrinkage occurred after vincristine administration in *Myh9*^{-/-} mice, rather the protrusions continued to elongate so rapidly that they often disappeared from the observation field within 10 minutes (Online Supplementary Video S5; Online Supplementary Figure S6). Increasing vincristine dose to 2 mg/kg did not modify this surprising behavior, as again none of the *Myh9*^{-/-} protrusions retracted, and elongation continued (Figure 6A-C).

Examination of the bone marrow sections by immunofluorescence microscopy showed that *Myh9*^{-/-} nPPT, like their WT counterparts, do not present a unique microtubule bundle (Online Supplementary Figure S7, to compare to Figure 4D-E). Treatment with vincristine did not prevent the observation of long GPIIb/3-positive protrusions despite the lack of visible microtubules (Figure 6D, arrow). These data indicate that the shrinkage following microtubule depolymerization is dependent on active myosin IIA.

Altogether these data show that in the absence of myosin IIA, microtubules were totally dispensable for nPPT elongation, indicating that elongation can be promoted by other driving forces, independent of microtubules.

Stokes' forces can contribute to native proplatelets elongation

Driving forces contributing to the elongation process could originate from blood flow. This hypothesis was initially supported by the observation that cessation of blood flow induced the relaxation of already preformed three nPTT that extended in the same flow line (Figure 7A; Online Supplementary Video S6), showing that blood flow maintains nPPT under tension.

Flows in sinusoids are complex due to the intricate anastomosis of the vasculature (Figure 7B). This was evidenced during the monitoring of platelet movements inside vessels of living mice as in some cases areas of inverse flows were observed (Figure 7C; Online Supplementary Video S7). In these areas, nPPT were tossed from one branch of a vessel to another, without PTT detachment (Figure 7D; Online Supplementary Video S8). Since they remain attached to the stationary MK in the bone marrow, nPPT are submitted to the fluid force of the flowing blood all along their shafts and buds. Assuming the nPPT end as a sphere, the force can be calculated using the Stokes' formula $F = 6\pi\eta LV$ where L is the radius of the sphere, V the velocity of the fluid and η the viscosity. The Stokes' force applied to the nPPT end was estimated based on the displacement of circulating platelets, recorded in vessels where nPPT were extended ($V = 213 \mu\text{m/s}$ (range: 24-488) (Figure 7E). The nPPT end having a mean radius of $4 \mu\text{m}$

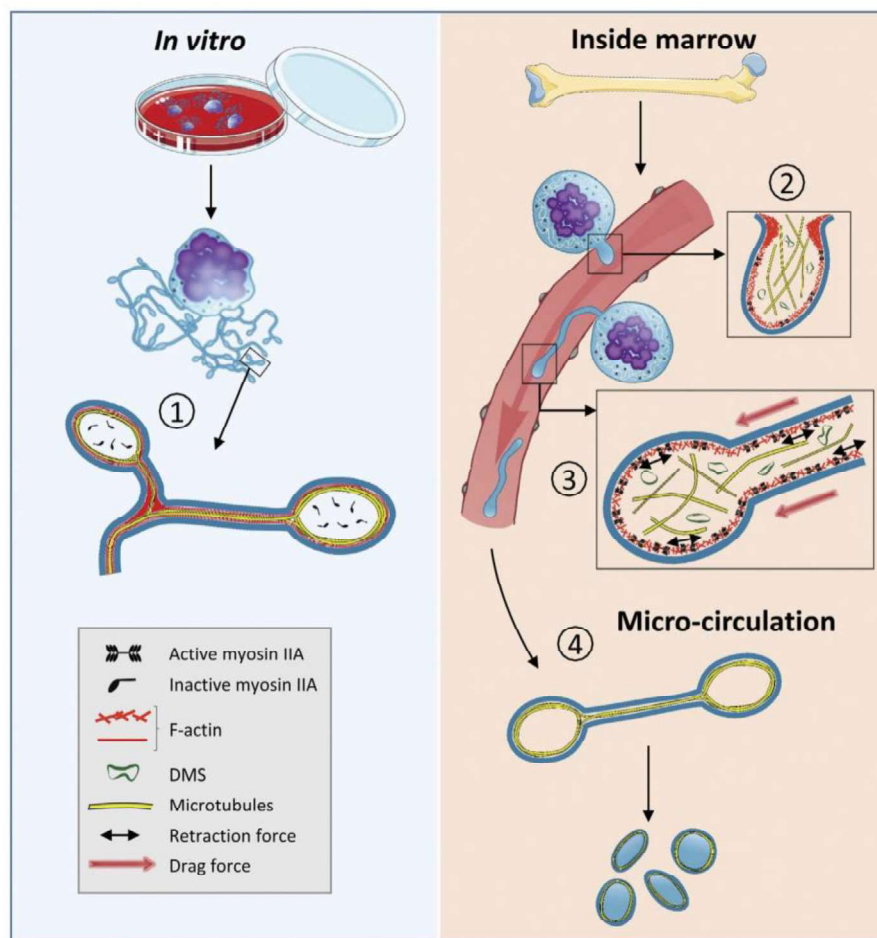


Figure 8. The proposed model depicting the cytoskeletal-based differences between *in vivo* and *in vitro* proplatelet formation. In cultured proplatelets (cPPT) generated *in vitro*, initiation and elongation depend essentially on the microtubule cytoskeleton organized as linear bundles along the PPT shafts and ending as a coil (1), already prefiguring the marginal band of the future platelets, while F-actin would promote branching. *In vivo*, the initiation of native proplatelets (nPPT) formation takes place in the marrow and depends on both actin and microtubule cytoskeletons (2). During nPPT elongation in the sinusoid circulation, microtubules do not form a unique bundle but are mostly isolated and play a critical role to counteract myosin-based nPPT retraction (3), while drag forces contribute to the protrusive forces. The released elongated nPPT fragments are further remodeled in the downstream microcirculation resulting in the final circulating platelets, possibly through microtubule-based mechanisms similar to *in vitro* mechanisms (4). DMS: demarcation membrane system.

(L) and the apparent viscosity η of the blood in microvessels varying from $2\text{--}4 \times 10^{-3}$ Pa.s,^{34,36} the Stokes' force is approximately 30–60 pN on the bud. This value can be considered as the minimal force as the Stokes' force is also applied all along the nPPT shaft. It is known from the literature that a force around 20–50 pN is usually required to extend membrane nanotubes in cells including blood cells such as neutrophils or erythrocytes.^{37–39} Hence the force exerted by the blood flow on the whole nPPT would be high enough to substantially contribute to nPPT extension.

Discussion

In this study we evaluated the mechanisms of nPPT formation as it occurs *in vivo* inside bone marrow sinusoid vessels. We found that the mechanisms differ from those taking place in order to produce cPPTs under *in vitro* conditions, especially with regards to the relative implication of two main cytoskeletal components, i.e., microtubules and myosin. We show that the non-continuous nPPT elongation process resulting from pause and retraction phases resulted from myosin IIA. MK are known to activate myosin IIA in response to local increase in shear.^{40,41} Blood flow within sinusoid vessels presents heterogeneous shear stresses ranging from zero to 10 dyn/cm^2 ,^{42,43} generating forces that are sufficient to trigger cellular mechanotransduction in endothelial cells.⁴⁴ Hence, depending on the flow forces, transient myosin activation could increase membrane tension to preserve its integrity. Conversely, a decreased myosin IIA activity would increase membrane compliance and stretching, promoting thinner and longer protrusions such as observed in *Myh9*^{−/−} mice. Another hypothesis could be that myosin-promoted pauses serve to slow down the extension process in order for DMS to properly enter the nPPT. In favor of this hypothesis, we observed *in situ* that myosin-deficient nPPT contain very few DMS membranes compared to WT ones (Online Supplementary Figure S8), which could also explain the thinner morphology of these *Myh9*^{−/−} nPPT.

Unexpectedly, the microtubule behavior was found to differ between nPPT and cPPT. This was first revealed in *Tubb1*^{−/−} mice *in vivo*. Although the number of MK extending nPPT was decreased, in agreement with the moderate thrombocytopenia, their morphology and elongation speed were fully normal. This was in stark contrast to the almost total inability of *Tubb1*^{−/−} MK to form cPPT *in vitro*. These findings are a further indication that the defects of *Tubb1*^{−/−} mice are exacerbated *in vitro* and they are clear evidence of mechanistic differences between the two environments.

Given these observations, we hypothesize that MK extensions generated *in vivo* are less dependent on microtubules than anticipated from cPPT produced *in vitro*. We observed that microtubules were present in the nascent nPPT, although not organized in bundles, as also previously mentioned in an earlier work.⁸ Their presence however suggested that they might still play a role in nPPT initiation, in agreement with the decreased number of *Tubb1*^{−/−} nPPT observed *in situ*. *In vivo*, the precise intracellular mechanisms controlling the initiation and transmural passage of nPPTs are still unknown. The first step of nPPT extension, which initiates in the marrow stroma and in the absence of blood forces, might require higher protrusive

forces to push against the endothelial barrier compared to liquid culture. It is most probable that both F-actin and microtubule cytoskeletons jointly play a role as we also observed strong F-actin accumulation in MK at the site where the nascent nPPT cross the vessel wall (Figure 4B). This F-actin accumulated in structures resembling shoulder-like structures which could correspond to the fibrillary-rich collars previously observed by Behnke and Forer and could be an anchorage point for facilitating the initial protrusion.^{31,4} At this stage, whether microtubules directly contribute together with F-actin to promote the initial pushing force for the transmural passage, or whether they are indirectly required to organize vesicle/organelle transport to bring essential components or play a role as information carriers for F-actin is not known.⁴⁵

Upon subsequent nPPT growth inside sinusoids, we observed a non-uniform distribution of microtubules inside elongated nPPT which clearly differs from the microtubule bundles uniformly lining the cPPT shafts and ending as coils observed *in vitro*. Although we were beyond the resolution limit to see microtubule arrangement in areas of strongest nPPT constriction *in situ*, these were clearly observed as unbundled in larger areas, in agreement with early observations by Behnke mentioning random arrangement in large clumps of MK cytoplasm released in sinusoids *in situ*.⁸ Radley and Scurfield also observed *in situ* that microtubules were aligned in constriction zones but splayed out on either side of the constriction.⁴⁶ These results confirm and extend those recently published by Brown *et al.* showing by tomography that *in situ*, microtubules were individual and randomly distributed in MK protrusions.⁴ Hence all the above data point to a different mechanism depending on whether MK extend protrusions *in vitro* or *in vivo*. However, microtubules are clearly important for maintaining the elongated nPPT structure in WT mice. This was evidenced here after inducing *in vivo* microtubule depolymerization on pre-existing nPPT.

A much unexpected observation in *Myh9*^{−/−} mice was the continuous growth of MK protrusions within sinusoids even when microtubules were depolymerized by vincristine. This indicated that under conditions where contractile forces are weakened, abrogating nPPT retraction, elongation of protrusions is still occurring. Hence, inside the blood vessels, microtubules would be less crucial for nPPT elongation. Isolated microtubules have a low pushing force in the range of 3–4 pN, while it has been demonstrated that organization in bundles increases their force-generating capacity in an additive fashion.^{47,49} While *in vitro* microtubule bundles could conceivably be the primary driving force for elongation, this is different *in vivo* where the essential role of microtubules would be to act as a backbone to transport constituents and to prevent and counteract myosin-mediated nPPT retraction. Of note, *Tubb1*^{−/−} platelets do not present abnormalities in their granule distribution (see the Online Supplementary Figure S3C) contrary to knockout mice having actomyosin impairments,^{52,50} showing that partial microtubule content is sufficient to promote normal organelle transport into the maturing MK and the nPPT.

Our finding then raised the question of the force promoting MK fragment elongation *in vivo*. Our data suggest that the main motor for nPPT elongation may come from hemodynamic forces. The importance of blood flow was

previously noted by data showing increased cPPT elongation velocity under flow compared to static conditions,^{11,51} and from our observations that nPPT always align in the direction of flow, especially visible upon inverse flows (Online Supplementary Video S8) or when flow stopped (Online Supplementary Video S6; Figure 7). Even with low blood flow velocities as in sinusoids, ranging from about ten to several hundred $\mu\text{m/s}$ ^{42,43} (Figure 7E), we calculated that the Stokes' force exerted on the nPPT end would be sufficient to stretch the membrane.³⁷⁻³⁹ The same force, applied all along the PPT shaft, would further increase the overall driving force and promote its extension. Taking into account the fact that DMS fuses with the plasma membrane all along the nPPT shaft as shown by Brown *et al.*,⁴ this continuous membrane replenishment most probably considerably decreases membrane tension as demonstrated in other systems,^{52,53} thus even further lowering the forces required for nPPT elongation.

Our findings do not exclude a key role of microtubules in the final platelet formation. We may speculate that this final nPPT remodeling into barbell platelets and final platelets could occur through microtubule-based mechanisms, similar to those previously established in liquid culture,^{6,11} leading to microtubule coils prefiguring the marginal band. In favor of this idea, Lefrançois *et al.* recently published some videos of free MK fragment remodeling in lung vessels that produced extensions strikingly resembling branched cPPT extended by MK in culture.⁵ In addition, we could observe that *in situ* barbell platelets and free nPPT fragments share a microtubule organization similar to cPPT including microtubules coils (personal observation and⁵⁴).

It is apparent from the present work added to earlier data, that the cytoplasmic processes of MK are structurally different *in vivo* and *in vitro* due to the different mechanisms leading to their extension. The question then arises as to the respective nomenclature of these extensions. Should the term PPT be used for extensions within the bone marrow or for the extensions observed in *in vitro* systems, or even for MK fragments released into the circulation and which are truly "pro"-platelets? Defining distinct nomenclatures for each of these structures might help to get a clearer picture of thrombopoiesis in pathophysiology compared to the *in vitro* platelet production process. We propose that large MK fragments extended *in vivo* are named "nPPT" for native PPT, as opposed to "cPPT" for cultured PPT present *in vitro*.

We therefore propose a model for the nPPT formation in the bone marrow that differs from the one established *in vitro*. *In vivo*, while microtubules may contribute to the

initial cytoplasmic extension of the nascent nPPT, they appear to be far less important for the elongation process once the nPPT is inside the blood flow. Microtubules rather play a role as a backbone to prevent nPPT retraction mediated by actomyosin contraction. nPPT elongation per se could proceed through blood drag forces that stretch nPPT plasma membrane as it is fueled by the DMS. We propose that this *in vivo* mechanism which occurs in the native and complex marrow environment, is bypassed in the liquid culture conditions. The *in vitro* microtubule-based mechanisms previously described potentially takes place at a later second time point, once nPPT have been released inside the blood circulation (Figure 8). Taken together, these data may explain why in some cases, strong discrepancies were observed between the capacity to extend cPPT, quantified *in vitro*, compared to the moderately decreased circulating platelet count.^{33,55,56} Our work may thus help to understand the mechanisms of thrombocytopenia in patients especially when mutations occur in cytoskeletal proteins.

Disclosures

No conflicts of interest to disclose.

Contributions

AB: conducted all intravital experiments and analyses; JB and CS: performed *in vitro* experiments; FP: developed the experimental intravital set up; AE: performed electron microscopy; DS: provided important key reagents; CG and FL: wrote the manuscript; CL: designed and analyzed experiments and wrote the manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank Florian Gaertner (IST, Austria) for his expert advice on two-photon microscopy experiments and Yves Lutz at the Imaging Center IGBMC (Illkirch, France) for his expertise and help with the two-photon microscope. We thank Josiane Weber for excellent technical help and Jean-Yves Rinkel for help in 3D reconstructions. We thank Ramesh Shivdasani for his generous gift of *Tubb1*^{-/-} mice. We thank Juliette Mulvihill for language editing. We thank ARME-SA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique) for support in the acquisition of the two-photon microscope.

Funding

AB was supported by a fellowship from EFS (APR2016). JB was a recipient of a FRM (foundation pour la Recherche Médicale) fellowship.

References

- Kaushansky K. Thrombopoiesis. *Semin Hematol.* 2015;52(1):4-11.
- Machlus KR, Thon JN, Italiano JE Jr. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br J Haematol.* 2014;165(2):227-236.
- Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood.* 2014;123(6):921-930.
- Brown E, Carlin LM, Lo Celso C, Poole AW. Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocytes migration into bone marrow blood vessels. *Life Sci Alliance.* 2018; 1(2):1-12.
- Lefrançois E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature.* 2017;544(7648):105-109.
- Thon JN, Italiano JE Jr. Does size matter in platelet production? *Blood.* 2012; 120(8):1552-1561.
- Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat.* 1976;145(2):183-205.
- Behnke O. An electron microscope study of the rat megakaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules. *J Ultrastruct Res.* 1969;26(1):111-129.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.* 2007; 317(5845): 1767-1770.
- Kowata S, Isogai S, Murai K, et al. Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow. *Thromb Haemost.* 2014; 112(4): 743-756.
- Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, et al. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood.* 2015;125(5):860-868.
- Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, et al. IL-1alpha induces thrombopoiesis

- through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol.* 2015;209(3):453-466.
13. Zhang L, Orban M, Lorenz M, et al. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med.* 2012;209(12):2165-2181.
 14. Zhang L, Urtz N, Gaertner F, et al. Sphingosine kinase 2 (Sphk2) regulates platelet biogenesis by providing intracellular sphingosine 1-phosphate (S1P). *Blood.* 2013;122(5):791-802.
 15. Leven RM, Yee MK. Megakaryocyte morphogenesis stimulated in vitro by whole and partially fractionated thrombocytopenic plasma: a model system for the study of platelet formation. *Blood.* 1987; 69(4):1046-1052.
 16. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood.* 1982;60(1):213-219.
 17. Italiano JE, Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1999; 147(6):1299-1312.
 18. Eckly A, Strassel C, Cazenave JP, Lanza F, Leon C, Gachet C. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol Biol.* 2012;788:175-192.
 19. Pouli D, Tozzi L, Alonzo CA, et al. Label free monitoring of megakaryocytic development and proplatelet formation in vitro. *Biomed Opt Express.* 2017;8(10):4742-4755.
 20. Thiery JP, Bessis M. Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1956;242(2):290-292.
 21. Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci.* 1990;97(Pt 1):59-70.
 22. Ghalloussi D, Dhenge A, Bergmeier W. New insights into cytoskeletal remodeling during platelet production. *J Thromb Haemost.* 2019;17(9).
 23. Poulter NS, Thomas SG. Cytoskeletal regulation of platelet formation: coordination of F-actin and microtubules. *Tint J Biochem Cell Biol.* 2015;66:69-74.
 24. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, et al. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood.* 2005;106(13): 4076-4085.
 25. Handagama PJ, Feldman BF, Jain NC, Farver TB, Kono CS. In vitro platelet release by rat megakaryocytes: effect of metabolic inhibitors and cytoskeletal disrupting agents. *Am J Vet Res.* 1987;48(7):1142-1146.
 26. Eckly A, Rinckel JY, Laeuffer P, et al. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J Thromb Haemost.* 2010;8(10):2243-2251.
 27. Eckly A, Strassel C, Freund M, et al. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood.* 2009;113(14):3182-3189.
 28. Pertuy F, Aguilar A, Strassel C, et al. Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage. *J Thromb Haemost.* 2015;13(1):115-125.
 29. Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, et al. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun.* 2017;8(1):127.
 30. Strassel C, Eckly A, Leon C, et al. Heparin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp Cell Res.* 2012;318(1):25-32.
 31. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl.* 1998;61:S3-23.
 32. Pertuy F, Eckly A, Weber J, et al. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood.* 2014;123(8):1261-1269.
 33. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE Jr, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol.* 2001;11(8):579-586.
 34. Popel AS, Johnson PC. Microcirculation and hemorheology. *Ann Rev Fluid Mech.* 2005;37:43-69.
 35. Pries AR, Secomb TW. Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(6):H2657-2664.
 36. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation.* 2005; 12(1):5-15.
 37. Borghi N, Brochard-Wyart F. Tether extrusion from red blood cells: integral proteins unbinding from cytoskeleton. *Biophys J.* 2007;93(4):1369-1379.
 38. Hochmuth RM, Marcus WD. Membrane tethers formed from blood cells with available area and determination of their adhesion energy. *Biophys J.* 2002;82(6):2964-2969.
 39. Shao JY, Hochmuth RM. Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes. *Biophys J.* 1996;71(5):2892-2901.
 40. Shin JW, Swift J, Spinler KR, Discher DE. Myosin-II inhibition and soft 2D matrix maximize multinucleation and cellular projections typical of platelet-producing megakaryocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(28):11458-11463.
 41. Spinler KR, Shin JW, Lambert MP, Discher DE. Myosin-II repression favors pre-proplatelets but shear activation generates platelets and fails in macrothrombocytopenia. *Blood.* 2015;125(3):525-533.
 42. Bixel MG, Kusumbe AP, Ramasamy SK, et al. Flow dynamics and HSPC homing in bone marrow microvessels. *Cell Rep.* 2017; 18(7):1804-1816.
 43. Mazo IB, von Andrian UH. Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *J Leukoc Biol.* 1999;66(1):25-32.
 44. Chao Y, Ye P, Zhu L, et al. Low shear stress induces endothelial reactive oxygen species via the AT1R/eNOS/NO pathway. *J Cell Physiol.* 2018;233(2):1384-1395.
 45. Dent EW, Baas PW. Microtubules in neurons as information carriers. *J Neurochem.* 2014;129(2):235-239.
 46. Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood.* 1980;56(6):996-999.
 47. Dogterom M, Yurke B. Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science.* 1997;278(5339):856-860.
 48. Kolomeisky AB, Fisher ME. Force-velocity relation for growing microtubules. *Biophys J.* 2001;80(1):149-154.
 49. Vleugel M, Kok M, Dogterom M. Understanding force-generating microtubule systems through in vitro reconstitution. *Cell Adh Migr.* 2016;10(5):475-494. through in vitro reconstitution. *Cell Adh Migr.* 2016;10(5):475-494.
 50. Bender M, Eckly A, Hartwig JH, et al. ADF/n-cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. *Blood.* 2010;116(10):1767-1775.
 51. Dunois-Larde C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Borde E, Baruch D. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood.* 2009;114(9):1875-1883.
 52. Gauthier NC, Masters TA, Sheetz MP. Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends Cell Biol.* 2012;22(10):527-535.
 53. Wang G, Galli T. Reciprocal link between cell biomechanics and exocytosis. *Traffic.* 2018;19(10):741-749.
 54. Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol.* 2010;47(3):220-226.
 55. Strassel C, Eckly A, Leon C, et al. Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica.* 2009;94(6):800-810.
 56. Strassel C, Magiera MM, Dupuis A, et al. An essential role for alpha4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Sci Alliance.* 2019; 2(1):e201900309.

PUBLICATION 4

ARTICLE SCIENTIFIQUE EN PREPARATION

« Loss of confinement promotes proplatelet formation through activation of mechanosensitive Trpv2, Trpv4 and Piezo receptors »

Julie Boscher¹ et al.

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, Strasbourg, France.

Article en préparation

« Loss of confinement promotes proplatelet formation through activation of mechanosensitive Trpv2, Trpv4 and Piezo receptors »

INTRODUCTION

Les mécanismes impliqués dans le processus de formation des plaquettes ne sont encore entièrement élucidés aujourd'hui. En particulier, l'étude des rôles des signaux mécaniques et de la mécanotransduction associée a été négligée dans ce domaine. Pourtant, ce processus entraîne des changements radicaux en termes de contraintes extracellulaires auxquelles les MK sont exposés. La différenciation et la maturation de ces derniers se font dans un environnement hautement confiné et avant de permettre l'extension proplaquettaire, la protrusion initiale est soumise à de fortes déformations membranaires lorsqu'elle traverse les pores transendothéliaux, pour finalement atteindre l'environnement sanguin non confiné. Seules quelques études indiquent que les MK sont capables de réagir aux changements mécaniques environnementaux. Le laboratoire a montré précédemment que les MK confinés dans un hydrogel 3D n'étaient pas de PPT. Une fois le confinement levé par le réensemencement des MK dans un milieu liquide, l'extension des proplaquettes a lieu avec une efficacité deux à trois fois supérieure par rapport à la culture liquide.

La mécanotransduction nécessite la perception des signaux mécaniques par des récepteurs mécanosensibles. Les canaux ioniques mécanosensibles étant connus pour jouer un rôle important dans la perception du confinement et des étirements de membrane, nous avons cherché à identifier leurs rôles possibles dans le processus de formation des proplaquettes lors de la perte de confinement.

L'utilisation d'un modèle *ex vivo* d'explant de moelle et d'un modèle de culture 3D de confinement / déconfinement, a tout d'abord indiqué que la formation de proplaquettes est très fortement altérée en absence de calcium extracellulaire indiquant son importance critique dans le processus. Des approches pharmacologiques ainsi que l'utilisation de souris KO ont permis d'identifier les canaux TRPV4 et TRPV2 ainsi que, plus modestement, les récepteurs Piezo comme des acteurs mécanosensibles importants de la formation des proplaquettes lorsque les MK passent d'un environnement confiné à non-confiné. Ces résultats indiquent que les signaux fournis par l'environnement mécanique constituent une partie importante des mécanismes qui contrôlent le processus global de biogenèse des plaquettes.

Loss of confinement promotes proplatelet formation through activation of mechanosensitive Trpv2, Trpv4 and Piezo receptors

Boscher et al.

1 Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, F-67000 Strasbourg, France

*Correspondence to: Catherine Léon, PhD

UMR_S1255 INSERM-Université de Strasbourg

Etablissement Français du Sang (EFS)

10, rue Spielmann, B.P. N°36

67065 Strasbourg Cedex, France

Tel: (33) 388 21 25 25

Fax: (33) 388 21 25 21

E-mail: catherine.leon@efs.sante.fr

Introduction

A daily production of 10^{11} blood platelets is needed to prevent bleedings. Platelets are produced by megakaryocytes (MKs), giant cells that arise from hematopoietic stem cells following steps of differentiation and maturation taking place in the bone marrow^{1,2}. Mature MKs are in contact with sinusoid vessels³, where they orchestrate the formation of platelets by first extending a cytoplasmic protrusion through the endothelial barrier^{4,5}. Once in the blood flow, the nascent protrusion elongates, sometimes over several hundred μm ^{1,6}, a structure referred as proplatelet. Once detached from the mother cell, proplatelets are ultimately remodeled by fragmentation into proper platelets in the downstream microcirculation^{1,7,8}. The molecular mechanisms involved during the whole process are still poorly understood, as attested by the low yield of *in vitro* platelet production⁹.

Especially, as MK grow well in liquid medium as non-adherent cells, the role of mechanical cues and associated mechanotransduction in platelet production has not been thoroughly tested. Yet, *in vivo*, radical changes in terms of extracellular constraints occur during the course of platelet biogenesis. MKs differentiate and mature in a highly confined environment and at final stages becomes sandwiched between hematopoietic cells in the stroma and the endothelial barrier of sinusoid vessels. The initial protrusion is subject to strong membrane deformations as it squeezes through narrow transendothelial pores during transmigration, and finally reach the unconfined blood environment^{1,5}. We previously showed that MKs confined in 3D inert hydrogel were prevented to extend proplatelets¹⁰. Once the confinement is relieved by reseeding MKs in liquid medium, proplatelet extension can take place reaching a two to three-fold higher efficiency compared to MKs grown in liquid culture, indicating a positive influence of extracellular constraints on MK differentiation and maturation¹⁰.

Mechanotransduction is initiated by sensing the mechanical cues by mechanosensitive (MS) receptors^{11,12}. These extracellular cues are then converted into intracellular signaling, allowing the cells to adapt rapidly to their new mechanobiological environment. MS ion channels are among the largest family of mechanoreceptors able to react to mechanical constraints applied on the plasma membrane, such as stretching, shear stress, pressure or tension^{11,12}. Platelets and MKs have been proposed to express a number of MS Ca^{2+} channels, including Piezo and transient receptor potential vanilloid (TRPV) receptors^{13,14}. The Piezo and TRPV receptor families are mechanically activated ion channels with high affinity for calcium, which however present distinct mechanotransduction profiles that may be also cell-type specific^{15,16}. Piezo receptors are directly activated by mechanical pressure, shear stress or membrane stretching¹⁷⁻¹⁹. Among the six members of the thermal sensing Trpv receptor subfamily, Trpv2 and Trpv4 are polymodal receptors that have also been linked to mechanosensing, responding directly or indirectly to shear stress, membrane stretching and hypotonic cell swelling²⁰⁻²³. To date, very few data, if any, are known regarding the role of MS ion channels in MK biology and platelet formation. One only study have found that Trpv4 is involved in stiffness sensing upon MK adhesion onto collagen IV, leading to integrin $\beta 1$ internalization¹³. In particular, we do not know whether and how these channels play a role upon changes of confinement during the process of proplatelet formation, independently of extracellular matrix-integrin engagement.

We herein set to decipher the role of mechanosensitive calcium channels in the process of proplatelet formation upon loss of confinement. We confirmed the presence of Piezo receptors in mature mouse MKs, as well as the presence of Trpv2 and Trpv4, and using an *ex vivo* model of marrow explant and a 3D culture model of confinement, we present evidence that both Trpv receptors, and to a lower extent Piezo receptors, are required for an optimal proplatelet extension by MKs upon loss of extracellular constraints.

Materials and Methods

Materials and Methods

Materials

Dapi, Permafluor, DMEM medium, penicillin, streptomycin and glutamine were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Recombinant human TPO (rhTPO), fetal bovine serum (FBS) and the mouse hematopoietic progenitor (Lin⁻) cell enrichment kit were purchased from Stem Cell Technologies (Vancouver, Canada). Recombinant hirudin rHV2-Lys47 (r-hirudin) was kindly provided by Transgène (Strasbourg, France). Methylcellulose was from R&D (Minneapolis, Minnesota, USA). The Trpv4 antagonist GSK2193874, the Trpv4 agonist GSK1016790A the Trpv2 antagonist SET2, Ruthenium Red and Gadolinium were from Tocris (Bio-Techne SAS, Noyal Châtillon sur Seiche, France).

Mice

Animal experiments were conducted in accordance with European law and the recommendations of the ethical committee of the Etablissement Français du Sang (EFS) regarding animal care and agreement for experimentation obtained from the French government. All mice used for the experiments (male or female) had a C57BL/6 background and were 2 to 4 months old. WT mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The *Trpv4*^{-/-} strain was kindly provided by Miguel Valverde's Laboratory of Molecular Physiology, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, (Barcelona, Spain). The floxed *Piezo1* and *Piezo2* mice were obtained from the Jackson Laboratory. They were crossed together and with mice expressing the cre recombinase under the control of the *Pf4* promoter to obtain mice with inactivation of both *Piezo1* and *Piezo2* in the MK lineage^{24,25} (named hereafter *Piezo1/2*^{-/-} mice).

MK culture and proplatelet quantification

Mouse bone marrow Lineage-negative cells (referred to as Lin⁻ cells) were cultured as described previously²⁶. Bone marrow cells were flushed from femurs and tibias from 8- to 12-week old male C57Bl/6 mice and successively passed through 21-, 23- and 25-gauge needles. The cells were spun down and nucleated cells were counted. Cells were pelleted at 300g for 7 min and resuspended at 1×10^8 cells/ml in PBS supplemented with 2% (v/v) FBS and 2 mM EDTA to perform the negative selection, according to the recommendations of the manufacturer (Stem Cell Technologies). The Lin⁻ population was adjusted to 2×10^6 cells/mL in DMEM containing 2 mM l-glutamine, penicillin/streptomycin, 10% FBS, 50 ng/mL TPO and 100 U/mL hirudin (complete medium). For culture in MC gels, cells were encapsulated in the gel at room temperature as described^{10,27}. Cultures were performed in 4-well tissue culture plates using 500 μ L of cell suspension in liquid medium or MC gel (2%) per well and were incubated at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere for up to 3 days to obtain mature MKs. To visualize and quantify MK forming proplatelets, cells were recovered from the gels after 3 days of culture by dilution of the MC gel, centrifugation and resuspension of the cell pellet in twice the initial volume of complete liquid medium and re-seeded in 24-well plates (500 μ L/well)^{10,27}. As a control, cells grown in liquid medium were recovered, resuspended and reseeded in the same manner. The proportion of MK forming proplatelets was determined 24 h after resuspension by counting the bottom of the wells, in a blind manner^{10,27}. In some cultures, and except mentioned otherwise, reagents were added to the medium on day 3 for 30 minutes prior to the dilution of the gel, during the resuspension of the cells, as well as during the following 24h culture in the liquid medium.

Bone marrow explant and proplatelet quantification.

For bone marrow explant experiments, marrows were flushed out of mouse femurs and cut into 0.5 mm-thick transverse sections. Sections were incubated in culture chamber up to 6h in Tyrode's albumin buffer, an iso-osmotic phosphate buffer at pH 7.35 containing calcium (2 mmol/L), magnesium (1 mmol/L), and glucose (0.1%, w/v) and supplemented with human serum albumin (HSA) (0.35%, w/v)²⁸, 5% mouse serum and antibiotics (1% PSG). In some cases, the Tyrode's buffer was deprived of calcium, and supplemented with vehicle or compound to be tested in a blind manner²⁹. Megakaryocytes were observed after 3 or 6 h at the periphery of the explant tissue, and the proportion of MK forming proplatelet is counted blind under the microscope.

Transmission electron microscopy (TEM)

Bone marrow was directly flushed in 2.5% glutaraldehyde and processed for TEM as described³⁰. Cells embedded in Epon were classically processed. Thin sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a JEOL transmission electron microscope (TEM).

Statistics.

Data are presented as scatter plot with mean \pm standard error of mean (sem). Comparison between 2 groups were performed using paired two-tailed Student's t-test (or unpaired for platelet count comparisons). Comparison between 3 or more groups were performed using one-way ANOVA with repeated measures and Newman-Keuls post-tests. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$; ns, $p > 0.05$.

Results

Critical role of mechanosensitive calcium channels in proplatelet extension upon loss of confinement

MKs do not extend proplatelets inside the marrow stroma, while once a cytoplasmic protrusion has entered the sinusoid vessel, it begins to elongate, forming proplatelets⁷. The bone marrow explant model mimics some of aspects of this process. In this model, marrow slices are incubated in a culture chamber and after a few hours, cells have migrated outside the tissue, allowing visualization of large MKs^{29,31} (Fig. 1A). Mature MKs are able to extend proplatelets only once they have lost tight contact with neighboring cells as they reach the outer of the tissue (Fig. 1A). Hence, we hypothesized that this cellular remodeling is under the control of mechanosensitive mechanisms. To evaluate this hypothesis, we performed bone marrow explant experiments in the presence of 6 mM EDTA to chelate extracellular calcium and prevent activation of MS calcium channels. Under this condition, proplatelet formation was totally abolished, whereas proplatelet formation was observed in 50 to 60 % of the MKs in the presence of calcium (Fig. 1B). To evaluate whether the total absence of extracellular Ca^{2+} could have been detrimental for the cell metabolism, we performed the assay under controlled low calcium concentrations by adding 13 mM citrate to the calcium-containing buffer²⁸. A dramatic decrease in proplatelet formation was again observed (Fig. 1C), confirming the requirement for extracellular Ca^{2+} and suggesting a role for calcium channels.

As a second approach to more distinctly decipher the role of extracellular calcium upon modification of mechanical cues, we further used a simplified model of 3D culture in methylcellulose (MC) hydrogel where cells are isolated and confined inside the gel (Fig. 1D). MC is inert vis-a-vis MKs and at the concentration used, it presents a stiffness around 60 Pa, in the same range as that of the bone marrow (300 Pa)¹⁰. As previously reported, growing hematopoietic progenitors in this 3D MC gel promoted a higher proplatelet formation once cells are placed back into a liquid medium (Fig. 1D-E)¹⁰. Here, we found that citrate, added to the MC gel during 30 min and upon MKs reseeding in liquid media, significantly decreased proplatelet formation (Fig. 1E). In contrast, similar addition of citrate had no

impact on cells grown in liquid media (Fig. 1E). Taken together, this suggested the requirement for extracellular calcium during the transition from the confined milieu towards the liquid one to extend proplatelets.

As the above data strongly suggested the involvement of MS calcium channels, we next sought to confirm these observations by selectively blocking MS calcium channels. We used ruthenium red and gadolinium that are known to have broad inhibition spectra against MS channels. Used in the model of explant marrow, both chemicals lead to a concentration-response inhibition of proplatelet formation (Fig. 2A-B). Of note, compared to the low calcium conditions, the inhibition was not complete. Overall, this suggested that proplatelet formation upon loss of confinement requires the presence of extracellular calcium, acting in part through the activation of mechanosensitive channels.

Critical role of Trpv4 in proplatelet formation upon loss of confinement.

We next sought to identify the channels that could be involved in inducing or facilitating proplatelet formation. We first focused our attention on Trpv4, a described stretch-activated MS receptor that was previously identified in human MKs¹³. Having confirmed its presence in mouse MKs (Suppl. Fig. S1), we evaluated its role by studying Trpv4-deficient mice. We found that proplatelet formation was decreased by 40% in bone marrow explants from these mice compared to wild type controls (Fig. 3A). Trpv4 inactivation is not specific of late stages of platelet formation, leaving open the possibility of an effect in upstream stages. To specifically evaluate the role of this receptor in the late stage where MKs extend proplatelets, we tested the impact of the Trpv4 antagonist GSK21 at this very moment. GSK21 dose-dependently decreased proplatelet formation in explants in a manner similar to the decrease observed in Trpv4 ko explants (Fig. 3B). Importantly, at the highest concentration used, GSK21 did not decrease proplatelet formation further in *Trpv4*^{-/-} mice, demonstrating its specificity (not shown). Conversely, GSK101, a Trpv4 agonist, induced a modest but significant increase in the number of

proplatelets (Fig. 3C). Overall, these data strongly suggest that Trpv4 activation positively regulates proplatelet formation when MKs leave the constraint inhibitory surrounding.

To evaluate its role independently on interactions with matrix or marrow cells, we tested the impact of Trpv4 blockade or invalidation on *in vitro* cultured MK, in absence of interaction with matrix proteins. Similarly to observations with citrate (Fig. 1E), we found that Trpv4 deficiency had no impact on proplatelet formation from MKs grown in liquid culture (Fig. 3D). In contrast, when MKs were previously grown in MC gel, Trpv4 deficiency decreased proplatelet formation by half (Fig. 3D). Similar data were obtained with GSK21 added 30 min before gel liquefaction and during the following 24h of culture (Fig. 3E). All the above data strongly indicate that Trpv4 favors proplatelet formation upon loss of confinement *via* its mechanosensing properties.

An important question is whether Trpv4 activation is involved at the very final stage of MK maturation when they are still confined or when MKs are exposed to an unconfined environment. To answer this, we added GSK21 either during only 30 min before hydrogel liquefaction, or only in the fresh liquid medium where MKs are reseeded. Interestingly, we found that both conditions led to similar inhibition of proplatelet formation (Fig. 3F), indicating that its activation is key, irrespective of whether it is activated inside the gel or once resuspended in liquid medium. Of note, the proplatelets obtained following Trpv4 inhibition or upon *Trpv4* deficiency exhibited a normal morphology, similar to that of control cells presented in Figure 1A.

As these data show that activation of the Trpv4 receptor is important for optimal proplatelet formation, provided that they have been differentiated in a constrained environment, we turned to the mice and evaluated the consequences of Trpv4 deficiency on platelet formation. Bone marrow MKs, observed by electron microscopy, had a normal morphology and ultrastructure (Suppl. Fig. S2). Surprisingly, the number of circulating platelets was fully normal (Fig. 3G). This may suggest that some *in vivo* compensation occur by other receptors or mechanisms.

Partial redundant role of Trpv2 and Trpv4 receptors in proplatelet formation

Since Trpv2 and Trpv4 belong to the same subfamily and have been described to be mechanosensitive, we wondered whether Trpv2 could also contribute to proplatelet formation. Using qRT-PCR, we found that Trpv2 was expressed in mouse MKs at a higher level than Trpv4 (Suppl. Fig. S1). We then evaluated its role using SET2, a recently described selective Trpv2 antagonist³² and observed a dose-dependent inhibition of proplatelet formation in explant marrows (Fig. 4A). Furthermore, we similarly observed a 50% decrease in PPT formation from MKs grown in 3D (Fig. 4B). Of note, a small decrease was also noted in liquid culture (Fig. 4B).

We then evaluated whether Trpv2 and Trpv4 could have an additive role. To that aim, we evaluated the effect of SET2 in *Trpv4*^{-/-} mice using the explant model. We found that blocking both receptors resulted in an additional impact on proplatelet formation (24%) compared to the absence of Trpv4 (39%) or blockade of Trpv2 alone (37%) (Fig. 4C). Similar observations were obtained by combining both Trpv2 and Trpv4 antagonists (Fig. 4D), or when using the 3D culture model (Fig. 4E).

Overall, these data clearly show that both Trpv2 and Trpv4 contribute to increase proplatelet formation when MKs have been differentiated in a confined/constraint environment.

Contribution of Piezo receptors to proplatelet formation

Blocking both TRPV receptors in the explant did not reach the level of inhibition observed with citrate (<10% proplatelets), suggesting the implication of other receptors. Hence, we evaluated the role of Piezo receptors as Piezo1 was recently proposed to be present in human platelets. We first confirmed the presence of both Piezo1 and Piezo2 mRNA in mature mouse MKs by *in situ* hybridization and qRT-PCR (Suppl. Fig. S3). As there is no available selective Piezo receptor antagonist, we used mice with selective inactivation of both Piezo1 and Piezo2 in MKs (*Piezo1/2*^{-/-}) (Suppl. Fig. S3). Absence of Piezo

receptors only modestly, though significantly, decreased proplatelet formation in explant marrow (Fig. 5A). This modest impact of Piezo receptors in our models is in accordance with the absence of modification in the number of circulating platelets in *Piezo1/2^{-/-}* mice (Fig. 5B). Hence, these data suggest either a modest role in platelet biogenesis, or almost full compensation by other MS channels. We checked this latter hypothesis by evaluating the impact of simultaneous blockage of Piezo and Trpv channels. We observed that *Piezo1/2^{-/-}* marrow incubated with a combination of Trpv2 and Trpv4 inhibitors prevented proplatelet formation to a higher extent compared to Trpv2/4 inhibition alone, strongly supporting the role of Piezo receptors, independently of Trpv2 or Trpv4. Interestingly, when all 3 channels are nonfunctional, some proplatelets appeared to be morphologically abnormal, with proplatelet shaft being larger than normal (Fig. 5D).

Discussion

Proplatelets are the obligatory intermediate between MKs and platelets, the final product that aims at preserving hemostasis. The role of the mechanical environment is poorly understood and we questioned here the role of mechanical cues in the process of proplatelet formation, when MK switch from a confined environment towards an unconfined one that is permissive for proplatelet formation. Here, we found that extracellular calcium was absolutely required for proplatelet extension, at least in part through opening of MS calcium channels Trpv2 and Trpv4, and to a lesser extent Piezo receptors.

The importance of calcium channels in MK and platelet formation has been poorly documented. Yet, numerous calcium-permeable ion channels, in addition to Piezo and Trpv2/4, are expressed in platelets and MK that could contribute to proplatelet formation as well, even independently on mechanical cues^{33,34}. One previous report suggested the involvement of store-operated calcium entry (SOCE) in regulating megakaryocyte functions, possibly through Orail1 or TRP1 channels that are present in MKs³⁵. Following MK adhesion, ADP is released that initiates phospholipase C and IP3 signaling, leading to calcium mobilization from intracellular stores that in turn promotes extracellular calcium entry through SOCE. While the role of TRPC in platelet function is not clear, STIM1 and ORAI1 play important role in platelet aggregation³⁶⁻³⁹. Hence, several calcium channels types may be involved in proplatelet formation, explaining our observations that low extracellular calcium led to a more dramatic decrease in proplatelets compared to blocking MS channels.

Only one study reported on a possible role of mechanosensitive channels in platelet formation. Abbonante and collaborators found that TRPV4 was preferentially activated when human MKs adhered onto soft 10 MPa surface coated with collagen IV, compared to stiffer 90 MPa surface, promoting internalization of β 1 integrin and proplatelet formation¹³. Our present data confirm the positive role of Trpv4 on proplatelet formation. Beyond a role following adhesion, and at variance with the study of Abbonante, we show here a role for mechanosensitive channels that is independent of matrix-integrin interaction. The effects were observed without addition of a matrix protein in the gel

assay and deficiency in integrin $\beta 1$ does not impact proplatelet formation in liquid or 3D gel (C.L. personal data). We additionally show that the related Trpv2 channel also positively contributes to the process, as well as the Piezo receptors.

In human, while no mutation has been identified for TRPV2, numerous mutations have been reported in TRPV4, causing autosomal dominant metatropic dysplasia, responsible for several manifestations which affect the skeletal system and the peripheral nervous system^{40,41}. While these mutations had not been associated with abnormal platelet count or function, a recent case report documented a heterozygous de novo variant in Trpv4 (c.1303 G > A, p.E435 K) associated with prolonged thrombocytosis reaching 3 times the upper limit of normal at the maximum recorded⁴². This mutation, suspected to be a gain-of-function variant, was lethal around 4 months of age. Although the direct link between the mutation and the thrombocytosis requires further documentation, our data showing increased proplatelet formation upon Trpv4 stimulation are in favor of a direct relationship. Regarding Piezo receptors, loss and gain-of-function mutations have been described for Piezo1 and Piezo2 receptors, without mention of any alteration in platelet count⁴³. This is in accordance with the normal platelet count in Piezo1/2^{-/-} mice and our data showing some functional redundancy between the 3 receptors.

Our present data may explain our previous observations showing a higher proplatelet formation capacity of MKs initially grown in constraint environment compared to liquid culture¹⁰. An important point is that we detected a role of Trpv2 and Trpv4 only when MKs were initially differentiated in a constraint environment, the bone marrow or the 3D culture. We may hypothesize that the confined milieu promotes either Trpv2 and Trpv4 overexpression, and/or their preferential redistribution to the plasma membrane. One key characteristic of Trpv2 and Trpv4 receptors is indeed their trafficking between the plasma membrane and intracellular compartments^{44,45}. Membrane translocation, allowing activation of the receptor, is mediated by various growth factors but also mechanical cues

that then activate RhoA and PI3K pathways^{21,44,46-50}. Hence, whether and how confinement promotes MK Trpv2 and Trpv4 upregulation or relocation at the plasma membrane will be further investigated.

A remaining question concerns the molecular pathways downstream activation of MS channels involved in promoting proplatelets. It is now well accepted that proplatelet extension is prevented by the activation of the RhoA/Rho kinase/myosin IIA pathway, while proplatelet elongation *in vitro* is dependent on microtubule polymerization and sliding^{51,52}, with F-actin being involved in proplatelet branching⁵². Although being poorly documented, one study reported a cross-talk between Trpv4 and microtubule dynamics⁵³. More data are available regarding cross-talk between MS channels and RhoGTPases or actin cytoskeleton, that could contribute to regulate the process^{16,54-56}.

The fact that at least three MS calcium channels contribute to proplatelet extension upon loss of confinement strongly highlights the importance of mechanosensing in this process. Their partial redundant role may explain why inactivation of Piezo1/2 or Trpv4 alone does not translate *in vivo* into decrease in platelet count. Platelet biogenesis comprises several stages in which the extracellular mechanical stresses change radically. Megakaryocyte differentiation first occurs in the highly confined bone marrow environment where MKs have to sustain important mechanical constraints. The surrounding cells that constantly migrate to enter the blood circulation exercise physical pressure on the MK membrane, and the passage through the vessel wall requires protrusions that push on the vessel surface to breach the endothelial lining and their squeezing to pass through the endothelial pores^{1,5}. Then, once in the circulation, these protrusions reach a liquid environment where the extracellular constraints are relieved and are in turn subjected to hemodynamic forces that contribute to proplatelet stretching and elongation⁷. Hence, it is possible that these three receptors are activated differentially in space and time, or that they are not activated in response to exactly the same mechanical signals. In favor of this latter hypothesis, there has been debate as whether TRPV are true direct MS channels^{15,57} and indirect activation has been recently suggested at least for Trpv4, contrary to Piezo receptors considered as true direct MS channels^{15,58}.

While Piezo receptors are considered as true direct MS channels, there has been debate in the literature regarding whether TRPV are true direct MS channels

In conclusion, we showed that MKs express several MS non-selective calcium channels including Piezo1, Piezo2, Trpv2 and Trpv4 that positively control proplatelet formation when MKs switch from a confined towards a non-confined environment. Our data argue for a crucial role of the mechanical cues as an important part of the mechanisms that control the overall process of platelet biogenesis. The identification of mechanosensitive receptors that contribute to each step of the process is an important challenge in the field of *in vitro* platelet production whose yields are still too low⁹. As mass production of *in vitro* platelets for transfusion is only viable on a large scale in liquid culture bioreactors, targeting mechanosensitive pathways to mimic confinement could substantially improve the process.

Figure legends

Figure 1. PPT extension upon deconfinement is dependent on extracellular calcium. A) Upper, schema of the explant model, consisting of bone marrow sections incubated in a culture chamber up to 6h to visualize MK forming proplatelets. Lower, phase contrast microscopy image showing a spherical MK at the periphery of the explant (arrow) and another MK having extended proplatelets (arrowhead). B) MK forming proplatelets (%) quantified in explant performed in the absence (ctrl) or presence of 6 mM EDTA; n=3 independent experiments. C) MK forming proplatelets (%) quantified in explant performed in the absence (ctrl) or presence of 0.38% citrate; n=3 independent experiments. D) Upper, schema of the liquid and 3D culture model; after 4 days of culture, MKs differentiated from Lin⁻ progenitor cells are seeded in liquid medium for 24h to evaluate proplatelet formation (day 4). Lower, bright field microscopy images from MK forming proplatelets (arrows) (left, MK from initial liquid pre-culture; right, MKs from initial 3D gel culture, showing higher MK forming proplatelet number). E) MK forming proplatelets (%) from liquid or MC gel Lin⁻ culture, in the presence or absence of citrate 0.38%; n=5 experiments.

Figure 2. PPT extension upon deconfinement is dependent on mechanosensitive channels. A) MK forming proplatelets (%) quantified in explant performed in the absence (ctrl) or presence of ruthenium red (1, 5 or 10 μ M); n=2-4 independent experiments. B) MK forming proplatelets (%) quantified in explant performed in the absence (ctrl) or presence of gadolinium (10, 50 or 150 μ M); n=3 independent experiments.

Figure 3. Involvement of mechanosensitive TRPV4 calcium channels. A) MK forming proplatelets (%) quantified in explant from WT or Trpv4^{-/-} mice; n=3 independent experiments. B) MK forming proplatelets (%) quantified in explant performed in the absence (ctrl) or presence of 500 nM or 1 μ M of the Trpv4 antagonist GSK2193874; n=3 independent experiments. C) MK forming proplatelets (%)

quantified in explant after 3 or 6h, performed in the absence (ctrl) or presence of the Trpv4 agonist GSK1016790A (500 nM); n=3 independent experiments. D) MK forming proplatelets (%) from liquid or MC gel culture of WT and *Trpv4*^{-/-} cells; n=3 independent experiments. E) MK forming proplatelets (%) from liquid or MC gel Lin⁻ culture, in the presence or absence of the TRPV4 antagonist GSK21 (200 nM); n=3 independent experiments. F) MK forming proplatelets (%) from liquid control (grey) or MC gel Lin⁻ culture. Comparison between GSK21 added either only at day 3 before MK reseeding in liquid (purple), or only after cell reseeding (green) or both (dark blue); n=3 independent experiments. G) Platelet count from WT and *Trpv4*^{-/-} mice; n=11 mice.

Figure 4. Involvement of mechanosensitive TRPV2 calcium channels. **A)** MK forming proplatelets (%) quantified in explant performed in the absence (ctrl) or presence of the TRPV2 antagonist SET2 (5, 25 or 50 μ M); n=3 independent experiments. **B)** MK forming proplatelets (%) from liquid or MC gel culture in the presence or absence of the TRPV2 antagonist SET2 (25 μ M); n=4 independent experiments. **C)** MK forming proplatelets (%) from WT or *Trpv4*^{-/-} bone marrow explant, in the presence or absence of the Trpv2 antagonist (50 μ M); n=3 independent experiments. **D)** MK forming proplatelets (%) from WT bone marrow explant, in the presence or absence of the Trpv2 antagonist (50 μ M), Trpv4 antagonists (500 nM), or both; n=3 independent experiments. **E)** MK forming proplatelets (%) from WT or *Trpv4*^{-/-} MC gel Lin⁻ culture, in the presence or absence of the TRPV2 antagonist (25 μ M); n=3 independent experiments.

Figure 5. Role of piezo receptors. **A)** MK forming proplatelets (%) quantified in explant from control Pf4-cre or Piezo DKO^{-/-} mice; n=5 independent experiments. **B)** Platelet count from Pf4-cre (n=28), Piezo1 (n=15), Piezo2 (n=21) and DKO mice (n=8). **C)** MK forming proplatelets (%) quantified in explant from control Pf4-cre, control in the presence of Trpv2 (50 μ M) and Trpv4 (500 nM) antagonist or Piezo DKO mice in the presence of both antagonists; n=3 experiments. **D)**, phase contrast micrographs

showing both abnormal and normal morphology of MK extending proplatelets when all 3 receptors are nonfunctional.

Figure 1. PPT extension upon deconfinement is dependent on extracellular calcium

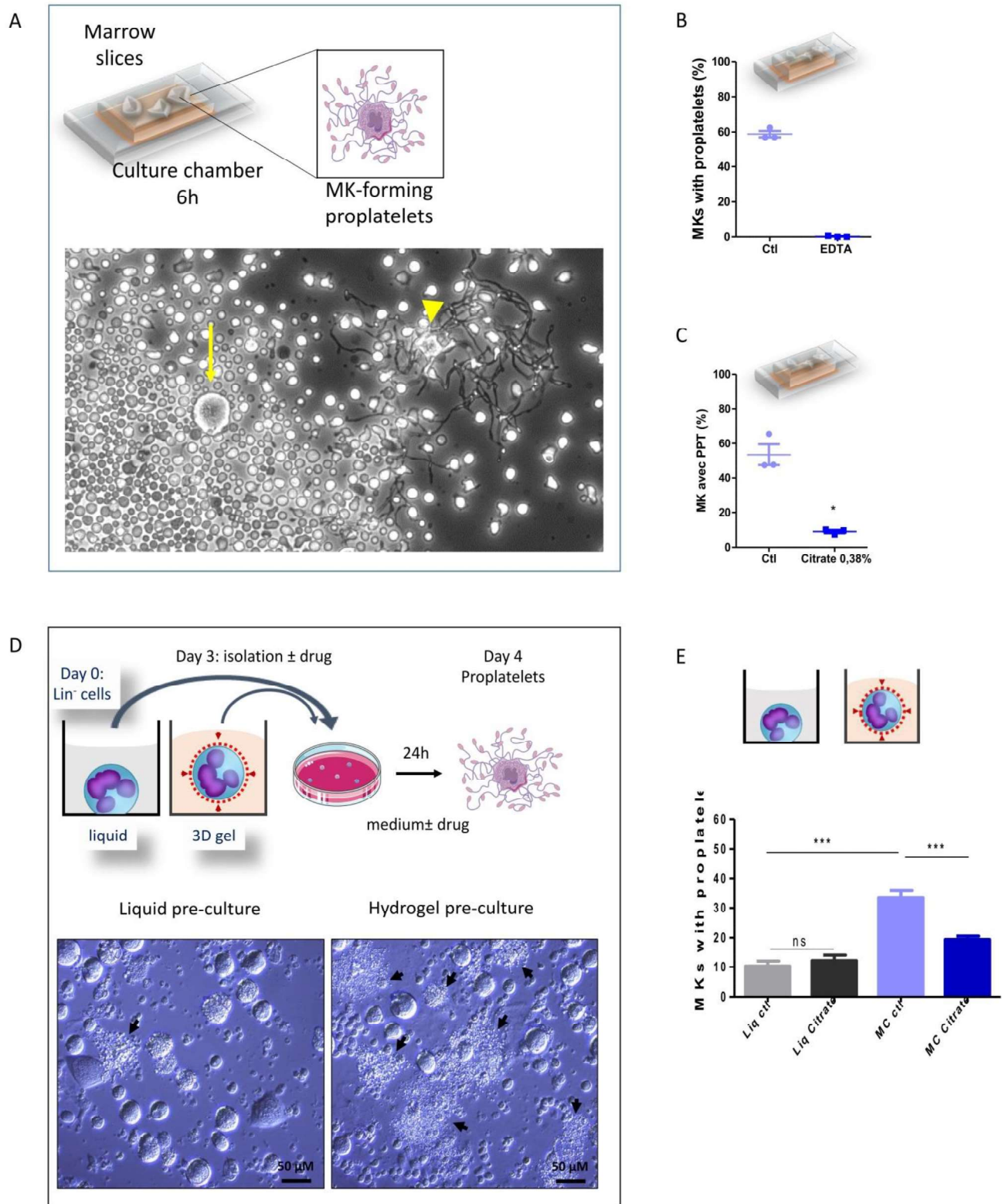


Figure 2. PPT extension upon deconfinement is dependent on mechanosensitive channels

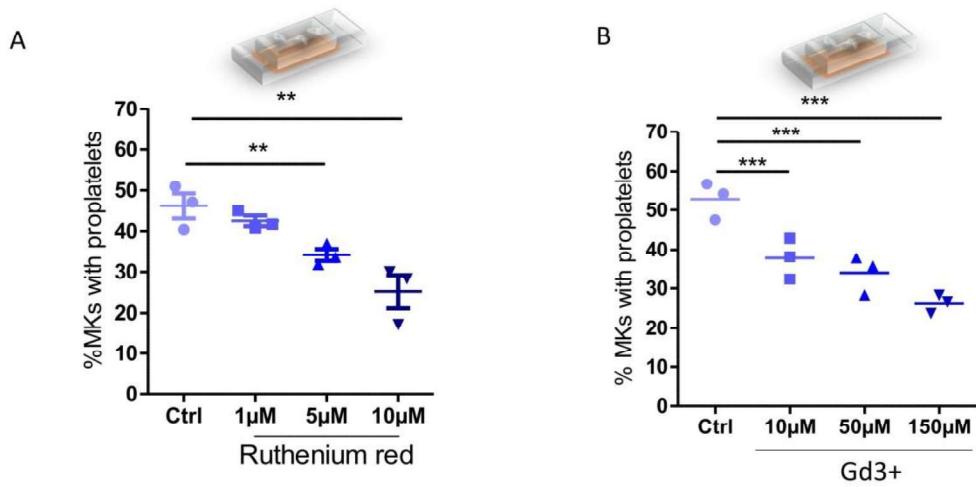


Figure 3. Involvement of mechanosensitive TRPV4 calcium channels

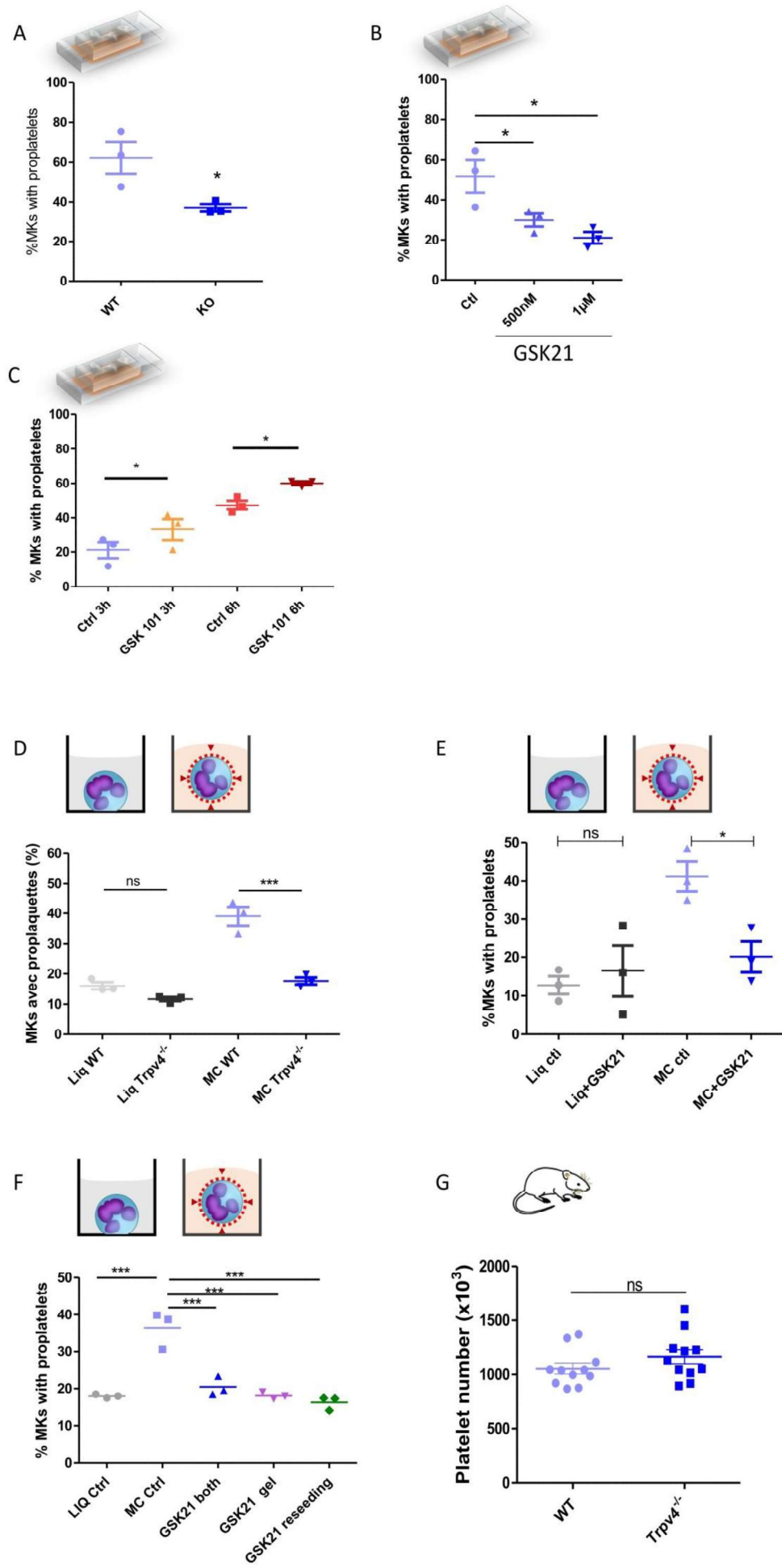
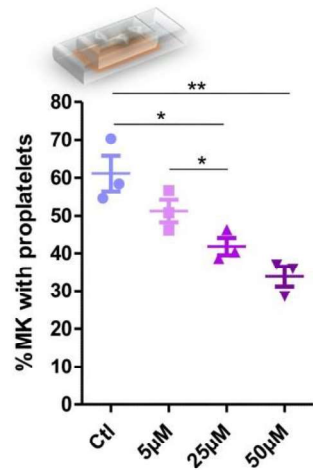
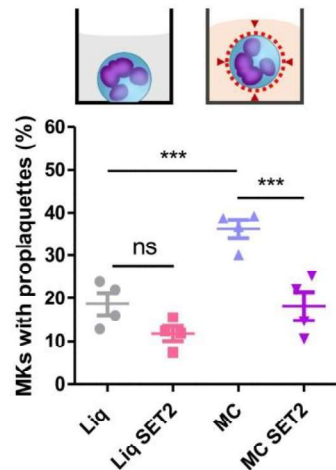


Figure 4. Involvement of mechanosensitive TRPV2 calcium channels

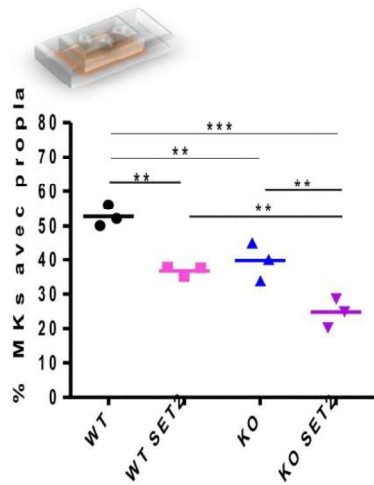
A



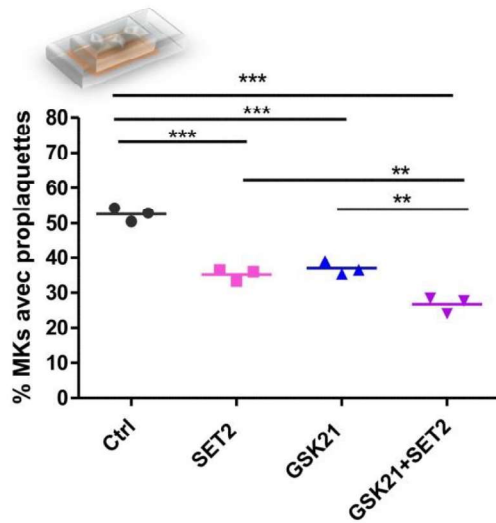
B



C



D



E

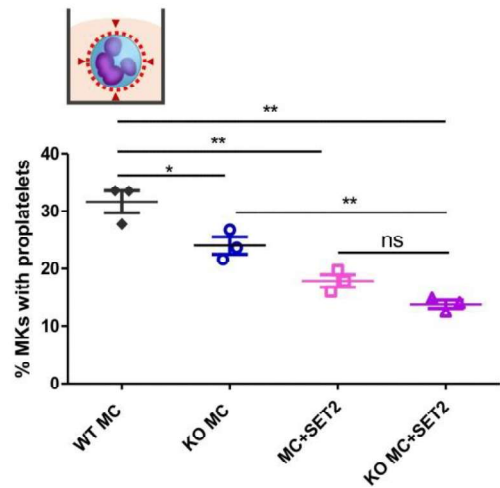
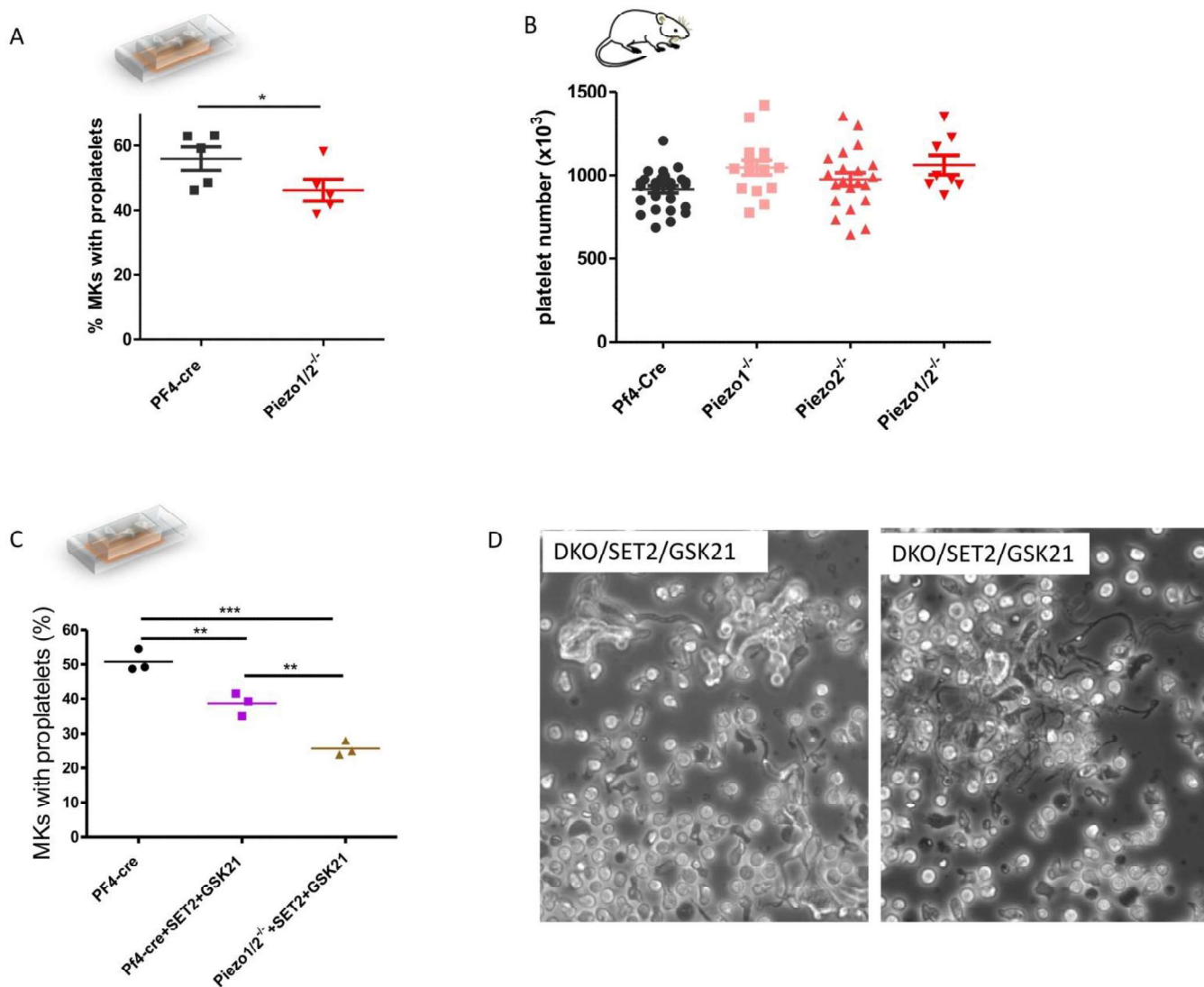
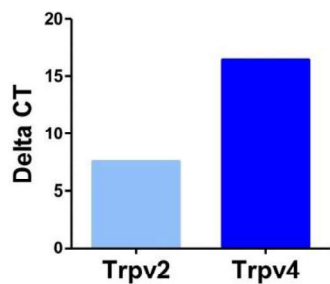


Figure 5. Role of piezo receptors

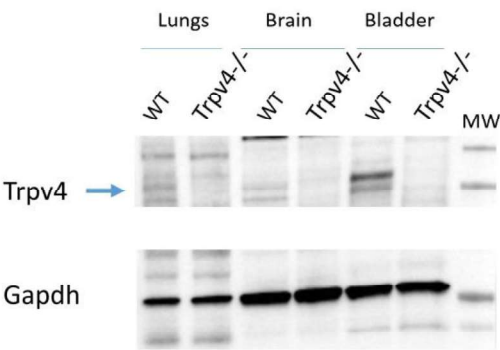


Supplemental Figure S1.

A. Presence of Trpv4, Trpv2, Piezo1 and Piezo2 mRNA in mouse MKs

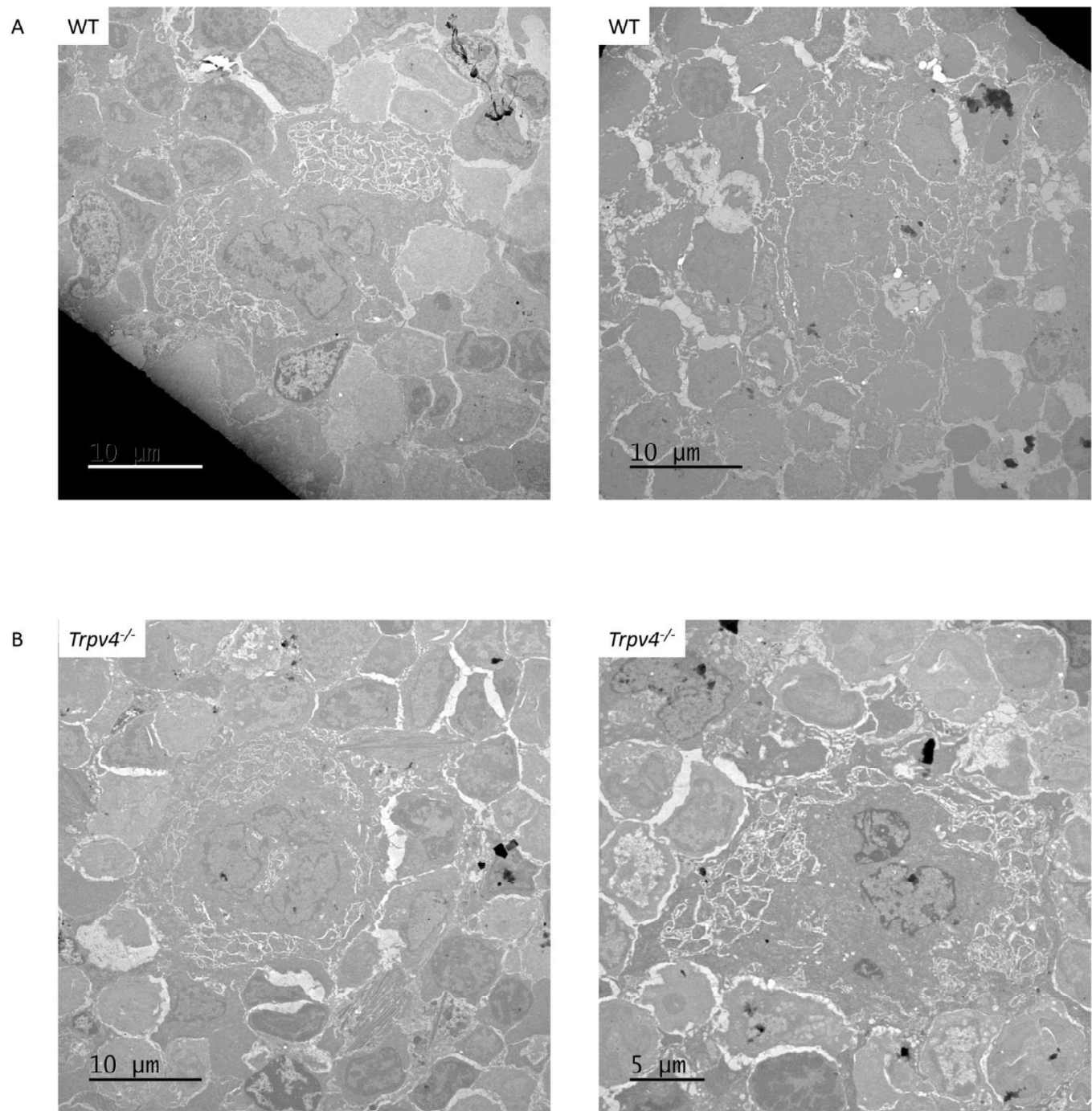


B. Absence of Trpv4 in *Trpv4*^{-/-} mouse tissues



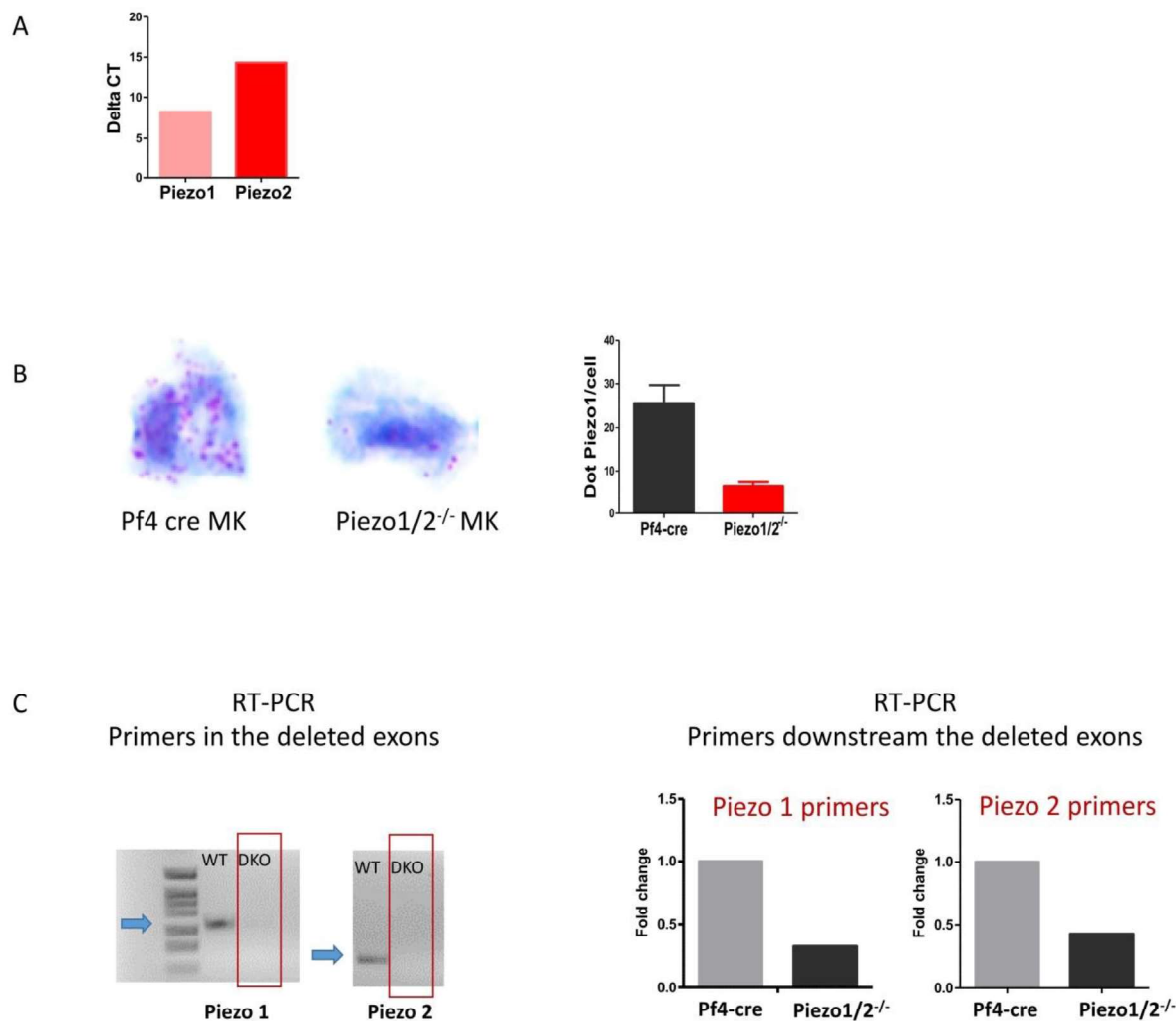
Supplemental Figure S1. Inactivation of Piezo1 and 2 in mouse MK. A) Amplification of Trpv2 and Trpv4 mRNA from mature MKs by qRT-PCR showing higher level of Trpv2 mRNA compared to Trpv4 ($\Delta\text{Ct Trpv2} < \Delta\text{Ct Trpv4}$) (ΔCt is $\text{Ct Trpv} - \text{Ct Gapdh}$); $n=1$. B) Western Blot showing presence of Trpv4 protein in lungs, brain and bladder from WT mice and its absence in *Trpv4*^{-/-} tissues.

Supplemental Figure S2. Normal MK morphology in *Trpv4*^{-/-} mice



Supplemental Figure S2. Ultrastructure of WT and *Trpv4*^{-/-} MK in situ. Observation by transmission electron microscopy of WT (A) and *Trpv4*^{-/-} (B) MK in bone marrow sections, showing normal ultrastructure in absence of the MS channel.

Supplemental Figure S3. Inactivation of Piezo1 and 2 in mouse MK



Supplemental Figure S3. Inactivation of Piezo1 and 2 in mouse MK. **A)** Amplification of Piezo1 and Piezo2 mRNA from mature MKs by qRT-PCR showing higher level of Piezo1 mRNA compared to Piezo2 ($\Delta\text{Ct Piezo1} < \Delta\text{Ct Piezo2}$) (ΔCt is $\text{Ct Piezo} - \text{Ct Gapdh}$); $n=1$. **B)** Left, Piezo1 mRNA was visualized in mature MKs by *in situ* hybridization using RNAscope (red dots in the cells). Note that a higher number of dots was present in the cytoplasm of control (Pf4-cre) compared to Piezo1/2^{-/-} MKs. Right, The quantification of positive dots was performed by manual counting of the number of dots per cells. 8 to 13 MKs analysed, showing decreased Piezo1 mRNA in the Piezo1/2^{-/-} MKs. Of note, the probes for RNAscope were positioned downstream the deleted exon, showing residual deleted mRNA. **C)** Left, RT-PCR performed in Piezo1/2^{-/-} MKs, showing presence of Piezo1 and Piezo2 in WT MK and absence in Piezo1/2^{-/-} mouse MK, using primers located in the floxed region (exon X-Y for Piezo1 and Z-T for Piezo2). Right, qRT-PCR showing strong decreased in Piezo1 and Piezo2 mRNA, using primers located downstream the floxed exons, suggesting instability for the deleted mRNA.

References

1. Boscher J, Guinard I, Eckly A, Lanza F, Leon C. Blood platelet formation at a glance. *J Cell Sci*. 2020;133(20).
2. Kaushansky K. Thrombopoiesis. *Semin Hematol*. 2015;52(1):4-11.
3. Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, Gorelashvili MG, Semeniak D, Pinnecker J, Schmithausen P, Meyer I, Friedrich M, Dutting S, Brede C, Beilhack A, Schulze H, Nieswandt B, Heinze KG. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun*. 2017;8(1):127.
4. Brown E, Carlin LM, Lo Celso C, Poole AW. Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocytes migration into bone marrow blood vessels. *Life-Science-Alliance*. 2018;1(2):1-12.
5. Eckly A, Scandola C, Oprescu A, Michel D, Rinckel JY, Proamer F, Hoffmann D, Receveur N, Leon C, Bear JE, Ghalloussi D, Harousseau G, Bergmeier W, Lanza F, Gaits-Iacovoni F, de la Salle H, Gachet C. Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids. *J Thromb Haemost*. 2020.
6. Kowata S, Isogai S, Murai K, Ito S, Tohyama K, Ema M, Hitomi J, Ishida Y. Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow. *Thromb Haemost*. 2014;112(4):743-756.
7. Bornert A, Boscher J, Pertuy F, Eckly A, Stegner D, Strassel C, Gachet C, Lanza F, Leon C. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica*. 2020.
8. Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passegue E, Looney MR. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544(7648):105-109.
9. Strassel C, Gachet C, Lanza F. On the Way to in vitro Platelet Production. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:239.
10. Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, Strassel C, Collin D, Gachet C, Lanza F, Leon C. Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood*. 2016;128(16):2022-2032.
11. Jin P, Jan LY, Jan YN. Mechanosensitive Ion Channels: Structural Features Relevant to Mechanotransduction Mechanisms. *Annu Rev Neurosci*. 2020;43:207-229.
12. Kefauver JM, Ward AB, Patapoutian A. Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels. *Nature*. 2020;587(7835):567-576.
13. Abbonante V, Di Buduo CA, Gruppi C, De Maria C, Spedden E, De Acutis A, Staii C, Raspanti M, Vozzi G, Kaplan DL, Moccia F, Ravid K, Balduini A. A new path to platelet production through matrix sensing. *Haematologica*. 2017;102(7):1150-1160.
14. Ilkan Z, Wright JR, Goodall AH, Gibbins JM, Jones CI, Mahaut-Smith MP. Evidence for shear-mediated Ca(2+) entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line. *J Biol Chem*. 2017;292(22):9204-9217.
15. Servin-Vences MR, Moroni M, Lewin GR, Poole K. Direct measurement of TRPV4 and PIEZO1 activity reveals multiple mechanotransduction pathways in chondrocytes. *Elife*. 2017;6.
16. Sianati S, Schroeter L, Richardson J, Tay A, Lamande SR, Poole K. Modulating the Mechanical Activation of TRPV4 at the Cell-Substrate Interface. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:608951.
17. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 2010;330(6000):55-60.
18. Syeda R, Florendo MN, Cox CD, Kefauver JM, Santos JS, Martinac B, Patapoutian A. Piezo1 Channels Are Inherently Mechanosensitive. *Cell Rep*. 2016;17(7):1739-1746.
19. Szczot M, Nickolls AR, Lam RM, Chesler AT. The Form and Function of PIEZO2. *Annu Rev Biochem*. 2021;90:507-534.
20. Ho TC, Horn NA, Huynh T, Kelava L, Lansman JB. Evidence TRPV4 contributes to mechanosensitive ion channels in mouse skeletal muscle fibers. *Channels (Austin)*. 2012;6(4):246-254.

21. Nagasawa M, Kojima I. Translocation of TRPV2 channel induced by focal administration of mechanical stress. *Physiol Rep*. 2015;3(2).
22. O'Neil RG, Heller S. The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch*. 2005;451(1):193-203.
23. Shibasaki K. TRPV4 ion channel as important cell sensors. *J Anesth*. 2016;30(6):1014-1019.
24. Pertuy F, Aguilar A, Strassel C, Eckly A, Freund JN, Duluc I, Gachet C, Lanza F, Leon C. Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage. *J Thromb Haemost*. 2015;13(1):115-125.
25. Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*. 2007;109(4):1503-1506.
26. Strassel C, Eckly A, Leon C, Moog S, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp Cell Res*. 2012;318(1):25-32.
27. Aguilar A, Boscher J, Pertuy F, Gachet C, Leon C. Three-Dimensional Culture in a Methylcellulose-Based Hydrogel to Study the Impact of Stiffness on Megakaryocyte Differentiation. *Methods Mol Biol*. 2018;1812:139-153.
28. Hechler B, Dupuis A, Mangin PH, Gachet C. Platelet preparation for function testing in the laboratory and clinic: Historical and practical aspects. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019;3(4):615-625.
29. Guinard I, Lanza F, Gachet C, Leon C, Eckly A. Proplatelet Formation Dynamics of Mouse Fresh Bone Marrow Explants. *J Vis Exp*. 2021(171).
30. Scandola C, Erhardt M, Rinckel JY, Proamer F, Gachet C, Eckly A. Use of electron microscopy to study megakaryocytes. *Platelets*. 2020;31(5):589-598.
31. Thiery JP, Bessis M. [Mechanism of platelet genesis; in vitro study by cinemicrophotography]. *Rev Hematol*. 1956;11(2):162-174.
32. Chai H, Cheng X, Zhou B, Zhao L, Lin X, Huang D, Lu W, Lv H, Tang F, Zhang Q, Huang W, Li Y, Yang H. Structure-Based Discovery of a Subtype-Selective Inhibitor Targeting a Transient Receptor Potential Vanilloid Channel. *J Med Chem*. 2019;62(3):1373-1384.
33. Mahaut-Smith MP. The unique contribution of ion channels to platelet and megakaryocyte function. *J Thromb Haemost*. 2012;10(9):1722-1732.
34. Wright JR, Amisten S, Goodall AH, Mahaut-Smith MP. Transcriptomic analysis of the ion channelome of human platelets and megakaryocytic cell lines. *Thromb Haemost*. 2016;116(2):272-284.
35. Di Buduo CA, Moccia F, Battiston M, De Marco L, Mazzucato M, Moratti R, Tanzi F, Balduini A. The importance of calcium in the regulation of megakaryocyte function. *Haematologica*. 2014;99(4):769-778.
36. Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bosl M, Stoll G, Nieswandt B. Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood*. 2009;113(9):2056-2063.
37. Galan C, Zbidi H, Bartegi A, Salido GM, Rosado JA. STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets. *Arch Biochem Biophys*. 2009;490(2):137-144.
38. Hassock SR, Zhu MX, Trost C, Flockerzi V, Authi KS. Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood*. 2002;100(8):2801-2811.
39. Varga-Szabo D, Authi KS, Braun A, Bender M, Ambily A, Hassock SR, Gudermann T, Dietrich A, Nieswandt B. Store-operated Ca(2+) entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch*. 2008;457(2):377-387.
40. Kang SS, Shin SH, Auh CK, Chun J. Human skeletal dysplasia caused by a constitutive activated transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) cation channel mutation. *Exp Mol Med*. 2012;44(12):707-722.
41. Nilius B, Voets T. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO Rep*. 2013;14(2):152-163.

42. Thom CS, Brandsma E, Lambert MP. Thrombocytosis in an infant with a TRPV4 mutation: a case report. *Platelets*. 2021;32(3):429-431.
43. Alper SL. Genetic Diseases of PIEZO1 and PIEZO2 Dysfunction. *Curr Top Membr*. 2017;79:97-134.
44. Donate-Macian P, Enrich-Bengoia J, Degano IR, Quintana DG, Peralvarez-Marín A. Trafficking of Stretch-Regulated TRPV2 and TRPV4 Channels Inferred Through Interactomics. *Biomolecules*. 2019;9(12).
45. Grove LM, Mohan ML, Abraham S, Scheraga RG, Southern BD, Crish JF, Naga Prasad SV, Olman MA. Translocation of TRPV4-PI3Kγ complexes to the plasma membrane drives myofibroblast transdifferentiation. *Sci Signal*. 2019;12(607).
46. Baratchi S, Almazi JG, Darby W, Tovar-Lopez FJ, Mitchell A, McIntyre P. Shear stress mediates exocytosis of functional TRPV4 channels in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(3):649-666.
47. Baratchi S, Keov P, Darby WG, Lai A, Khoshmanesh K, Thurgood P, Vahidi P, Ejendal K, McIntyre P. The TRPV4 Agonist GSK1016790A Regulates the Membrane Expression of TRPV4 Channels. *Front Pharmacol*. 2019;10:6.
48. Baratchi S, Knoerzer M, Khoshmanesh K, Mitchell A, McIntyre P. Shear Stress Regulates TRPV4 Channel Clustering and Translocation from Adherens Junctions to the Basal Membrane. *Sci Rep*. 2017;7(1):15942.
49. Jin M, Wu Z, Chen L, Jaimes J, Collins D, Walters ET, O'Neil RG. Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS One*. 2011;6(2):e16713.
50. Michalick L, Kuebler WM. TRPV4-A Missing Link Between Mechanosensation and Immunity. *Front Immunol*. 2020;11:413.
51. Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, Wu S, Mazutis L, Deschmann E, Sola-Visner M, Italiano JE, Hartwig JH. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood*. 2015;125(5):860-868.
52. Italiano JE, Jr., Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*. 1999;147(6):1299-1312.
53. Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T. Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS One*. 2010;5(7):e11654.
54. Lakk M, Krizaj D. TRPV4-Rho signaling drives cytoskeletal and focal adhesion remodeling in trabecular meshwork cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021;320(6):C1013-C1030.
55. Lavanderos B, Silva I, Cruz P, Orellana-Serradell O, Saldias MP, Cerda O. TRP Channels Regulation of Rho GTPases in Brain Context and Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:582975.
56. McCray BA, Diehl E, Sullivan JM, Aisenberg WH, Zaccor NW, Lau AR, Rich DJ, Goretzki B, Hellmich UA, Lloyd TE, Sumner CJ. Neuropathy-causing TRPV4 mutations disrupt TRPV4-RhoA interactions and impair neurite extension. *Nat Commun*. 2021;12(1):1444.
57. Christensen AP, Corey DP. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):510-521.
58. Nikolaev YA, Cox CD, Ridone P, Rohde PR, Cordero-Morales JF, Vasquez V, Laver DR, Martinac B. Mammalian TRP ion channels are insensitive to membrane stretch. *J Cell Sci*. 2019;132(23).

DISCUSSION GENERALE

Au cours de la mégacaryopoïèse au sein de la MO, les CSH vont progressivement s'engager, proliférer puis se différencier en progéniteurs mégacaryocytaires qui, après maturation, vont émettre des proplaquettes au travers des vaisseaux sinusoides et libérer les plaquettes dans la circulation sanguine. La maturation des mégacaryocytes comme la formation de proplaquettes sont deux phénomènes largement influencés par le microenvironnement. La connaissance des acteurs composant ce microenvironnement est à ce jour encore incomplète, ce qui représente notamment un frein pour reproduire efficacement la thrombopoïèse *in vitro*. Le microenvironnement regroupe divers facteurs dont les éléments cellulaires, les facteurs solubles, les protéines de matrice extracellulaire mais également les facteurs mécaniques. Mon projet de thèse s'est précisément axé sur l'étude de l'impact des contraintes mécaniques sur la thrombopoïèse. Les contraintes mécaniques s'exerçant *in situ* ont longtemps été ignorées mais sont désormais de plus en plus prises en compte et intégrées dans les études pour permettre la compréhension des phénomènes dans leur ensemble sans s'affranchir de ces composantes importantes que sont les forces mécaniques. Dernièrement, quelques papiers ont révélé l'importance de l'environnement mécanobiologique, en terme de topographie et de confinement, pour la maturation des mégacaryocytes de culture et l'émission de proplaquettes (Aguilar et al. 2016; Christian A. Di Buduo et al. 2015; Pietrzyk-Nivau et al. 2015). Dans la continuité de ces travaux, mon projet de thèse avait pour objectif d'identifier les mécanismes mis en œuvre par les mégacaryocytes pour s'adapter à des changements de contraintes mécaniques, avec un objectif plus global qui était de comprendre comment le mégacaryocyte, et par extension les proplaquettes, intègrent les différences de forces mécaniques subies au cours de la formation des plaquettes. La biogenèse plaquettaire comprend en effet plusieurs étapes au cours desquelles les contraintes mécaniques extracellulaires changent radicalement. La différenciation des mégacaryocytes se produit initialement dans l'environnement très confiné de la MO, où les MK doivent supporter d'importantes contraintes mécaniques : i) les cellules environnantes, qui migrent constamment pour entrer dans la circulation sanguine, exercent une pression physique sur la membrane des MK ; ii) le passage à travers la paroi du vaisseau nécessite des protrusions qui poussent activement sur la surface des cellules endothéliales pour favoriser la fusion des membranes basales et apicales et ainsi former un pore ; iii) la progression des protrusions à travers ces pores de moins d'1 μm de diamètre ($838 \pm 65 \text{ nm}$) entraîne inévitablement tour à tour, et selon l'endroit considéré du MK, étirement et compression de la membrane plasmique (Anita Eckly et al. 2020); iv) une fois dans la circulation, ces protrusions atteignent un environnement liquide où les contraintes de confinement sont relâchées, mais où l'influence des forces hémodynamiques va contribuer à l'étirement et à l'allongement des proplaquettes.

Mécanismes de formation des PPT *in vivo*

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec une post-doctorante de l'équipe sur le projet d'étude de la formation des proplaquettes *in vivo* (Bornert et al. 2020). L'objectif de ce travail était de mieux caractériser l'élongation des nPPT et de valider ou d'infirmer la similitude des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus entre les conditions *in situ* et *in vivo*. Ce travail a ainsi permis de proposer un nouveau mécanisme pour l'extension des nPPT, qui pourrait expliquer les contradictions avec la production de cPPT. En effet, les résultats obtenus ont permis de démontrer que l'élongation de la nPPT est la résultante d'un équilibre entre des forces de protrusion et les forces de rétraction médiées par la myosine-IIA. Nous avons également constaté que l'implication des microtubules diffère entre cPPT et nPPT, étant absolument nécessaire *in vitro* et moins critique *in vivo*.

In vivo, les mécanismes intracellulaires précis contrôlant l'initiation de la protrusion cytoplasmique et le passage transendothélial restent encore à clarifier. La première étape de l'extension des nPPT débute dans le tissu médullaire en l'absence de forces hémodynamiques. Il semble probable que cette étape nécessite une force protrusive importante pour pousser contre la barrière endothéliale. Même si leur organisation diffère de celle observée *in vitro*, nos observations montrant la présence de microtubules dans les nPPT, organisés de manière individuelle mais tous orientés dans le sens de la protrusion naissante, suggèrent que les microtubules pourraient jouer un rôle dans l'initiation de la protrusion. Cette hypothèse est en accord avec la diminution du nombre de proplaquettes observées *in situ* chez les souris *Tubb1*^{-/-}. Une hypothèse possible est que les microtubules contribuent, conjointement avec les filaments d'actine, à fournir la force de poussée permettant la formation d'une protrusion initiale. Par la suite, lors de l'élongation, leur distribution est non uniforme avec des microtubules dispersés dans les zones plus larges de PPT et alignés dans le sens de l'élongation au niveau des zones de constriction (Behnke 1969; Brown et al. 2018; J. M. Radley and Scurfield 1980). Comme nous l'avons mis en évidence après avoir induit une dépolymérisation des microtubules sur des nPPT préexistantes, les microtubules sont clairement importants pour le maintien de la structure allongée des PPT *in situ*. Ils sont également nécessaires par leur rôle de « rail » pour organiser le transport de vésicules et organelles, permettant l'alimentation en composants nécessaires à la future plaquette comme c'est le cas *in vitro* (J. E. J. Italiano, Patel-Hett, and Hartwig 2007).

De plus, nos résultats n'excluent pas un rôle des microtubules qui soit important et similaire au mécanisme *in vitro* lors des étapes plus tardives de la formation des plaquettes. En effet, une fois libérés dans la circulation, les fragments proplaquettaires se remodelent pour former les plaquettes

à proprement parler. Nous pouvons spéculer que ce remodelage final, aboutissant aux plaquettes, se produit *via* des mécanismes dépendants des microtubules, similaires à ceux précédemment établis en culture liquide. En faveur de cette hypothèse, on observe la présence de microtubules organisés en faisceaux le long des fragments proplaquettaires circulants et des « haltères », ressemblant aux faisceaux de microtubules présents le long des proplaquettes *in vitro* (Thon and Italiano 2010; et observations du laboratoire).

Nous avons également montré que la myosine, *in vivo*, jouerait un rôle de frein concernant l'élongation des proplaquettes, l'élongation étant en équilibre entre les forces protrusives et la myosine qui tend à rétracter la protrusion. L'activation transitoire de la myosine pourrait se faire suivant l'intensité des forces de cisaillement. Cela permettrait de préserver l'intégrité de la membrane des PPT en augmentant la tension membranaire en cas de contraintes de cisaillement élevées. Inversement, une diminution de l'activité de la myosine IIA augmenterait la capacité d'étirement de la membrane, favorisant des PPT plus fines et plus longues, comme cela est observé chez les souris *Myh9^{-/-}*. La tension membranaire est probablement également dépendante des événements de fusion entre le DMS et la membrane plasmique tout au long de l'axe de la nPPT (Brown et al. 2018). Ce réapprovisionnement continu de la membrane diminue vraisemblablement la tension membranaire, réduisant de ce fait les forces requises pour l'élongation. Ainsi, une autre hypothèse pourrait être que les phases de pause provoquées par la myosine servent à ralentir le processus d'extension permettant ainsi le bon déroulement de l'entrée du DMS dans la nPPT et sa fusion à la membrane. En faveur de cette hypothèse, les observations *in situ* indiquent que les nPPT déficientes en myosine contiennent très peu de membranes de DMS.

Nous proposons donc le modèle suivant : *in vivo*, les microtubules pourraient contribuer à la formation de l'extension cytoplasmique initiale de la nPPT naissante. Ils semblent être beaucoup moins importants pour l'étape d'élongation une fois que la PPT se trouve dans le flux sanguin mais jouent plutôt un rôle structural empêchant la rétraction médiée par la contraction de l'actomyosine. Les observations faites indiquent que les nPPT s'alignent toujours dans la direction de l'écoulement sanguin et nous avons calculé que les forces de frottement peuvent être une source nécessaire et suffisante de forces protrusives pour l'extension des nPPT. Ainsi, l'allongement se ferait, du moins en partie, par le biais des forces hémodynamiques qui étirent la membrane plasmique de la nPPT lorsqu'elle est alimentée par le DMS. Nous proposons que ce mécanisme, à l'œuvre *in vivo*, soit contourné dans les conditions de culture liquide qui ne permettent pas de récapituler tous les aspects mécaniques de l'environnement médullaire tel qu'il est *in situ*. A travers cette étude, on comprend aisément l'importance que peuvent avoir les signaux mécaniques sur les cellules ; celles-ci vont s'adapter d'une manière ou d'une autre à leur présence ou leur absence. Si l'on considère la

situation *in vitro*, les microtubules vont fournir une force de protrusion au niveau intracellulaire, dans un contexte où les forces hémodynamiques, donc les forces protrusives extracellulaires, sont absentes, « l'objectif » final du MK restant dans tous les cas l'extension de longues protrusions en vue de former les plaquettes.

Implication de canaux calciques mécanosensibles

Si les mécanismes d'extension des proplaquettes selon les forces extracellulaires en présence peuvent être à ce point différents, on peut aisément imaginer que les MK par eux-mêmes soient des cellules particulièrement sensibles aux signaux mécaniques extracellulaires et équipés de manière adéquate pour ressentir ces différents signaux. Les travaux menés juste avant le début de ma thèse par Alicia Aguilar ont montré en effet que les mégacaryocytes se différenciaient différemment en milieu liquide ou en milieux confiné. Alicia a mis au point un système de culture de progéniteurs mégacaryocytaires murins en hydrogel tridimensionnel modélisant le confinement rencontré par les MK au sein de la moelle. L'utilisation de ce système a permis de démontrer l'impact positif du confinement sur la maturation des mégacaryocytes, à travers notamment la relocalisation nucléaire du facteur de transcription mécanosensible MKL1. Ce travail a également mis en évidence l'importance de la transition d'un milieu contraint (l'hydrogel) à un milieu non confiné (le milieu de culture liquide). En effet, les PPT ne se développent pas en hydrogel 3D, alors qu'elles se forment dès 4h après l'isolement de ces MK en milieu liquide.

La majeure partie de mon travail de thèse fut ainsi consacrée à l'étude des processus mécanosensibles mis en œuvre par le mégacaryocyte pour réagir au changement de ses contraintes environnementales et produire des PPT. Nous avons découvert que le calcium extracellulaire était absolument indispensable à l'extension des proplaquettes et qu'il agissait, au moins en partie, *via* l'ouverture de canaux calciques mécanosensibles TRPV2 et TRPV4 ainsi que des récepteurs Piezo. Le rôle partiellement redondant de ces mécanosenseurs peut expliquer pourquoi l'inactivation de Piezo1/2 ou de TRPV4 seuls ne se traduit pas *in vivo* par une diminution de la numération plaquettaire. Le fait que trois canaux calciques mécanosensibles, et peut-être plus, contribuent à l'extension des proplaquettes lors de la perte du confinement souligne la dimension mécano-dépendante de ce processus. Nous l'avons vu, la biogenèse des plaquettes peut être décomposée en plusieurs étapes au cours desquelles les contraintes mécaniques en place varient : d'un environnement confiné au sein du tissu médullaire à un milieu liquide, en passant par l'extension des protrusions cytoplasmiques à travers la paroi du vaisseau qui nécessite une poussée puis une compression pour se faufiler à travers les pores endothéliaux. Il est donc possible que les récepteurs

que nous avons identifiés ne soient pas tous activés en réponse aux mêmes signaux mécaniques et/ou qu'ils soient activés de manière différentielle dans l'espace et le temps.

Un autre aspect important qui reste pour l'instant en suspens concerne les signaux précis responsables de l'activation des canaux TRPV2/4. Il serait possible que les TRPV ne soient pas directement activés par les forces mécaniques provenant de l'environnement extérieur de la cellule mais plutôt de façon secondaire notamment *via* une action mécanique venant du cytosquelette ou un second messenger généré suite à l'application de forces mécaniques (H. Xu et al. 2003). Un récent travail du groupe de Boris Martinac suggère que de nombreux canaux de la famille TRP, dont TRPV4, sont insensibles à la tension induite par l'étirement de la membrane cellulaire et, par conséquent, sont plus susceptibles d'être activés par des composants en aval et d'agir comme amplificateurs des cascades de signalisation mécanosensibles intracellulaires (Martinac and Poole 2018; Nikolaev et al. 2019). Le sujet est encore débattu dans la littérature et reste à être clarifié.

Le rôle de TRPV2 et TRPV4 a été révélé uniquement lorsque les mégacaryocytes étaient initialement différenciés dans un environnement contraint (en explant de moelle ou dans l'hydrogel de MC). Au vu de ce résultat, deux pistes de réflexion sont envisagées ; par rapport à un milieu liquide, le milieu confiné pourrait i) favoriser l'expression de TRPV2 et TRPV4 ou ii) entraîner leur relocalisation préférentielle vers la membrane plasmique, les rendant ainsi disponibles pour réagir aux changements de contraintes environnementales. C'est pourquoi les points importants qu'il reste à clarifier sont 1) de savoir si et comment le confinement pourrait réguler l'expression de TRPV2 et TRPV4 ; les travaux de Aguilar *et al.* ont en effet montré l'activation du facteur de transcription MKL1 lorsque les MK sont cultivés en hydrogel 3D, et des travaux préliminaires que j'ai effectué suggèrent également la relocalisation nucléaire de YAP, un autre facteur de transcription mécanosensible. Toutefois à l'heure actuelle, aucune publication ne mentionne que ces facteurs de transcription réguleraient l'expression de canaux mécanosensibles ; 2) de savoir si le confinement permettrait leur relocalisation à la membrane plasmique ; il est en effet documenté que les récepteurs TRPV2 et TRPV4 transitent entre la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires, la translocation membranaire permettant l'activation du récepteur (Doñate-Macián et al. 2019; Grove et al. 2019). Cette translocation peut être régulée par divers facteurs de croissance mais aussi par des signaux mécaniques qui activent ensuite les voies RhoA et PI3K, autant de pistes à explorer pour comprendre nos observations.

Comment l'activation de canaux mécanosensibles favoriserait-elle l'émission des proplaquettes ? Il est connu que l'émission des proplaquettes *in vitro* est intimement liée à l'activité des microtubules, *i.e.* polymérisation et glissement, alors que les filaments d'actine favoriseraient les

ramifications des proplaquettes. Actuellement, la littérature est relativement pauvre concernant de possibles cross-talk entre TRPV2/4 ou Piezo et microtubules, mais plusieurs travaux rapportent un rôle de ces canaux dans la régulation des RhoGTPases et l'activité de polymérisation d'actine (Lakk and Križaj 2021; Lavanderos et al. 2020). Il serait donc particulièrement intéressant de creuser ces aspects afin de pouvoir comprendre les mécanismes par lesquels TRPV2, TRPV4 et les récepteurs Piezo favorisent l'extension des PPT.

L'importance des canaux calciques dans la mégacaryopoïèse et la formation des plaquettes reste encore relativement peu documentée. Pourtant, outre Piezo et TRPV2/4, d'autres canaux ioniques perméables au calcium sont exprimés par les MK et les plaquettes et pourraient contribuer à la formation des PPT, et ce même indépendamment de signaux mécaniques (M. Mahaut-Smith 2012; J. Wright et al. 2016). Des travaux précédents ont notamment suggéré l'implication de Store-Operated Calcium Entry (SOCE), soit l'activation de canaux et l'entrée de calcium extracellulaire dans le cytoplasme en réaction à la libération de stocks intracellulaires. De cette façon, les canaux Orail1, STIM1 ou TRPC1 interviendraient dans la régulation des fonctions des mégacaryocytes (Christian Andrea Di Buduo et al. 2014). Par conséquent, il semble que plusieurs types de canaux calciques puissent être impliqués dans la formation des proplaquettes, ce qui explique nos observations selon lesquelles un faible taux de calcium extracellulaire a conduit à une diminution plus dramatique des proplaquettes par rapport au blocage des canaux mécanosensibles que nous avons identifiés. De plus, le calcium a certainement d'autres implications au-delà de son action *via* les canaux mécanosensibles. Au niveau des plaquettes en particulier, une augmentation de la concentration calcique est un événement de signalisation essentiel pour la plupart des réponses fonctionnelles pendant l'activation des plaquettes, y compris les réarrangements du cytosquelette et la signalisation des intégrines (Z. Li et al. 2010; Varga-Szabo, Braun, and Nieswandt 2009).

Dans leur article, Aguilar *et al.* ont également observé une dilatation du réseau de membranes du DMS, dépendante de la rigidité du milieu. Il ne semble pas impossible que ce remaniement puisse jouer un rôle dans la formation des proplaquettes. Des résultats préliminaires que nous avons obtenus en reconstruction 3D par microscopie FIB-SEM (Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy), encore non publiés, suggèrent qu'il pourrait s'agir d'un remodelage dynamique avec segmentation membranaire du réseau DMS. Il est envisageable qu'une telle réorganisation puisse avoir lieu afin de faciliter la fusion des fragments du DMS à la membrane plasmique des PPT en formation de manière à promouvoir leur élongation. Ces observations pourraient suggérer l'implication de mécanismes de fission/fusion membranaire et peut-être ainsi l'intervention de protéines impliquées dans le remodelage membranaire. La dynamine, une GTPase intervenant dans la fission membranaire et connue pour jouer un rôle dans la maturation

mégacaryocytaire est un candidat potentiel qu'il pourrait être intéressant d'étudier dans ce contexte (Bender et al., 2015).

Concernant les limites de ce travail, il est important de mentionner que les données ont été obtenues *ex vivo* (explants de moelle) et *in vitro*. Même si nous nous sommes attachés à recréer le changement de confinement, et sachant les différences possibles de mécanismes entre *in vivo* et *in vitro*, il sera nécessaire de valider le rôle de ces récepteurs *in vivo*. Du fait de leur redondance, nous envisageons pour cela le blocage simultané de Piezo, TRPV2 et TRPV4 par administration d'antagonistes des récepteurs TRPV dans les souris Piezo1/2^{-/-}. Dans le contexte *in vivo*, contrairement au modèle de culture 3D, plusieurs mécanismes coexistent certainement en plus des forces mécaniques. Il est fort probable qu'il y ait un dialogue entre différents signaux qui agissent ainsi de concert pour contribuer à la formation des proplaquettes *in situ*. Il est notamment connu que TRPV4 interagit avec intégrines (Abbonante et al. 2017; Matthews et al. 2010). Par ailleurs, nos données ont été entièrement obtenues à l'aide de matériel biologique murin. Il sera important de tester ces modélisations 3D, et le rôle des canaux TRPV2/4 et Piezo sur cellules humaines pour pouvoir en tirer des conclusions quant aux perspectives possibles chez l'Homme.

Perspectives de ce travail

Les perspectives globales de ce travail sont premièrement et principalement fondamentales. En effet, mon projet s'inscrit dans l'un des grands objectifs du laboratoire qui est la compréhension des processus de formation des plaquettes sanguines. Outre l'aspect fondamental, comprendre comment les plaquettes sont produites pourra avoir des répercussions importantes dans le domaine de la santé, à la fois en transfusion mais également dans le traitement des patients thrombopéniques.

D'un point de vue transfusionnel

A l'heure actuelle, les transfusions plaquettaires reposent intégralement sur les dons de sang. En effet, même s'il est possible d'obtenir des plaquettes *in vitro*, le rendement n'est pas encore suffisant pour une possible utilisation à visée transfusionnelle. La meilleure compréhension des différents mécanismes intervenant dans la formation des plaquettes sanguines est essentielle si l'on veut pouvoir optimiser ce phénomène *in vitro*. De façon plus spécifique, mon travail de thèse permet

de mieux comprendre le rôle de la composante mécanique de l'environnement dans la mégacaryopoïèse. La mise en évidence de l'importance de l'activation des voies de mécanotransduction dans la formation des proplaquettes pourrait être un point clé dans la compréhension des mécanismes de la thrombopoïèse. A long terme, nous pouvons imaginer que ces connaissances participeront au raffinement des systèmes de synthèse de plaquettes *in vitro*. En effet, si des systèmes de culture à grande échelle en milieu confiné en 3D sont difficilement envisageables d'un point de vue pratique et économique, il pourrait être possible de moduler pharmacologiquement les voies de mécanotransduction les plus pertinentes. Mimer les voies naturellement activées par les forces mécaniques au sein de la moelle permettrait ainsi d'optimiser la différenciation et la maturation des MK, ainsi que l'émission des proplaquettes. On peut en effet faire l'hypothèse que produire des MK plus proches de ceux différenciés *in situ* permettra d'obtenir un rendement de plaquettes plus important, envisageable pour des applications transfusionnelles. L'avantage des plaquettes générées *in vitro* est qu'elles pourraient être produites à partir des cellules du patient lui-même, garantissant une compatibilité totale. Cependant, l'objectif à long terme n'est pas de remplacer totalement les plaquettes issues de dons par des plaquettes de culture. Ça n'est pas envisageable en termes de coût, de complexité et de temps de production. Il est plus réaliste d'imaginer des utilisations soit à but transfusionnel préventif notamment lors des chimiothérapies, soit à visée thérapeutique car les plaquettes ont également la capacité de pouvoir stocker et transporter des médicaments. Il s'agit là bien évidemment d'une perspective à long terme de l'ensemble des différents travaux menés au laboratoire.

D'un point de vue médical

Une meilleure compréhension de la formation des plaquettes en conditions physiologiques peut également permettre de trouver de nouveaux gènes impliqués dans les défauts de production de plaquettes. Il ne faut pas oublier qu'environ la moitié des patients thrombopéniques d'origine congénitale sont non étiquetés, et si nos travaux chez la souris se confirment chez l'homme, il pourrait être intéressant d'inclure les canaux mécanosensibles dans les protocoles de recherche de gènes mutés chez ces patients. Comme mentionné précédemment, un rapport récent associe un phénotype de thrombocytose à une mutation du gène TRPV4 détectée chez un bébé (Thom, Brandsma, and Lambert 2020). Enfin, découvrir de nouveaux mécanismes dans le processus physiologique de biogénèse des plaquettes pourrait également permettre d'envisager des approches innovantes dans le traitement des patients thrombopéniques.

Au-delà de la thématique de l'hématologie, mon projet relève du domaine de la mécanobiologie. Depuis une dizaine d'années, la communauté scientifique prend conscience que ces paramètres, jusque-là plutôt ignorés, peuvent avoir un impact important sur le comportement des cellules. C'est le cas pour les mégacaryocytes. Ces observations pourraient revêtir une importance particulière dans l'approche thérapeutique de certaines pathologies où l'environnement en terme de contraintes mécaniques est perturbé. C'est notamment le cas des myélofibroses par exemple, où la composition de la MO change et le milieu devient plus rigide, ce qui est associé à des défauts de production plaquettaire, ou à l'inverse lors des traitements myélosuppresseurs qui diminuent le confinement des cellules médullaires. La connaissance du comportement des MK selon la rigidité de leur milieu pourrait permettre de moduler plus finement les traitements selon les différentes conditions pathologiques.

ANNEXES

Table récapitulative des gènes mutés identifiés dans les thrombopénies héréditaires

Issu de la revue bibliographique : Boscher et al. 2020. "Blood Platelet Formation at a Glance." Journal of cell science

Supplementary table 1: Gene mutated in inherited thrombocytopenia

Gene	Human Disease	#N°OMIM	References
Cytoskeleton			
<i>MYH9</i>	MYH9-RD	#600208 #155100 #152640 #605249 #153650	(Balduini et al., 2011; Pecci et al., 2014; Saposnik et al., 2014)
<i>FLNA</i>	FLNA-RT		(Nurden et al., 2011b; Vassallo et al., 2020)
<i>WAS</i>	Wiskott-Aldrich syndrome X-linked thrombocytopenia (THC1)	#301000 #313900	(Buchbinder et al., 2014; Massaad et al., 2013)
<i>ACTN1</i>	ACTN1-RT	#615193	(Faleschini et al., 2018; Kunishima et al., 2013)
<i>TUBB1</i>	TUBB1-RT	# 613112	(Kunishima et al., 2009; Kunishima et al., 2014)
<i>TUBA4</i>	TUBA4-RT		(Strassel et al., 2019)
<i>DIAPH1</i>	DFNA1	# 124900	(Karki et al., 2020; Nurden et al., 2018; Stritt et al., 2016b)
<i>TPM4</i>	TPM4-RD		(Pleines et al., 2017)
<i>ARPC1B</i>	ARPC1B-RT		(Brigida et al., 2018)
TP0-cMPL axis			
<i>MPL</i>	CAMT	#604498	(Geddis, 2011; Ihara et al., 1999; Varghese et al., 2014)
<i>THPO</i>	THPO-RT		(Noris et al., 2018; Savoia et al., 2007)
Transcription / nuclear factors			
<i>GATA1</i>	GATA1-RD (XLT; XLTT)	#300367 #314050	(Ciovacco et al., 2008; Millikan et al., 2011)
<i>RUNX1</i>	FPD/AML	#601399	(Morgan and Daly, 2017; Schlegelberger and Heller, 2017)
<i>ETV6</i>	ETV6-RT/THC5	#616216	(Karastaneva et al., 2020; Melazzini et al., 2016; Noetzli et al., 2015; Poggi et al., 2017)
<i>GFI1B</i>	GFI1b-RT	#187900	(Beauchemin et al., 2019; Rabbolini et al., 2017; Stevenson et al., 2013)
<i>HOXA11</i>	RUSAT1	#605432	(Horvat-Switzer and Thompson, 2006; Thompson and Nguyen, 2000)
<i>MECOM</i>	RUSAT2	# 616738	(Germeshausen et al., 2018; Niihori et al., 2015)

<i>Δ11q23/FLII</i>	Paris-Trousseau Jacobsen syndrome	#188025 #600588 #147791	(Breton-Gorius et al., 1995; Favier et al., 2015)
<i>FLII</i>	FLII-RT	# 617443	(Stevenson et al., 2015; Vo et al., 2017)
<i>SALL4</i>	IVIC syndrome	# 147750	(Paradisi and Arias, 2007)
<i>RBM8A</i>	TAR	#274000	(Albers et al., 2012; Boussion et al., 2020)
<i>NFE2</i>	NFE2-RT		(Luk et al., 2020)
<i>IKZF5</i>	IKZF5-RT		(Lentaigne et al., 2019)

Kinases/phosphatases

<i>PRKACG</i>	PRKACG-RT	#616176	(Manchev et al., 2014)
<i>SRC</i>	SRC-RT/THC6	# 616937	(Turro et al., 2016)
<i>PTPRJ</i>	PTPRJ-RT		(Marconi et al., 2019)
<i>ANKRD26</i>	ANKRD26-RD/THC2	# 188000	(Bluteau et al., 2014; Ferrari et al., 2017; Noris et al., 2011)
<i>MASTL</i>	Autosomal dominant thrombocytopenia		(Hurtado et al., 2018)

Others

<i>GPIBA</i>	Bernard-Soulier syndrome	#231200	(Bury et al., 2019; Mekchay et al., 2019; Nurden, 2014; Savoia et al., 2014)
<i>GPIBB</i>	Platelet-type VWD	#231200	
<i>GP9</i>		#231200	
<i>ITGA2B</i>	ITGA2B/ITGB3-RT		(Bury et al., 2016; Favier et al., 2018; Ghevaert et al., 2008; Kunishima et al., 2011; Nurden et al., 2011a)
<i>ITGB3</i>			(Levin et al., 2015)
<i>FYB1</i>	CARST/THC3		(Stritt et al., 2016a)
<i>TRPM7</i>	TRPM7-RT		
<i>NBEAL2</i>	Grey platelet syndrome	#139090	(Bottega et al., 2013; Di Buduo et al., 2016; Gunay-Aygun et al., 2011; Kahr et al., 2011)
<i>SLFN14</i>	SFLN14-RT	# 616913	(Fletcher et al., 2015; Stapley et al., 2020)
<i>CYCS</i>	CYCS-RT/THC4	#612004	(Ledgerwood et al., 2019; Morison et al., 2008; Ong et al., 2017)
<i>GNE</i>	GNE-RT		(Izumi et al., 2014)
<i>STIM1</i>	Stormorken syndrome York platelet syndrome	# 185070	(Bohm and Laporte, 2018; Lacruz and Feske, 2015; Misceo et al., 2014; Morin et al., 2020)
<i>ORAI1</i>	Stormorken syndrome		(Bohm and Laporte, 2018; Lacruz and Feske, 2015; Morin et al., 2020)
<i>ABCG5</i>	ABCG-RT		(Sun et al., 2020)
<i>ABCG8</i>	ABCG-RT		(Sun et al., 2020)
<i>VWF</i>	Type 2B VWF		(Nurden et al., 2009; Nurden et al., 2006)
<i>GALE</i>	GALE-RT		(Seo et al., 2019)
<i>KDSR</i>	KDSR-RT	# 617526	(Takeichi et al., 2017)

References

- Albers, C. A., Paul, D. S., Schulze, H., Freson, K., Stephens, J. C., Smethurst, P. A., Jolley, J. D., Cvejic, A., Kostadima, M., Bertone, P. et al. (2012). Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet* **44**, 435-9, S1-2.
- Balduini, C. L., Pecci, A. and Savoia, A. (2011). Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol* **154**, 161-74.
- Beauchemin, H., Shooshtharizadeh, P., Pinder, J., Dellaire, G. and Moroy, T. (2019). Dominant negative Gfi1b mutations cause moderate thrombocytopenia and an impaired stress thrombopoiesis associated with mild erythropoietic abnormalities in mice. *Haematologica*.
- Bluteau, D., Balduini, A., Balayn, N., Currao, M., Nurden, P., Deswarte, C., Leverger, G., Noris, P., Perrotta, S., Solary, E. et al. (2014). Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J Clin Invest* **124**, 580-91.
- Bohm, J. and Laporte, J. (2018). Gain-of-function mutations in STIM1 and ORAI1 causing tubular aggregate myopathy and Stormorken syndrome. *Cell Calcium* **76**, 1-9.
- Bottega, R., Pecci, A., De Candia, E., Pujol-Moix, N., Heller, P. G., Noris, P., De Rocco, D., Podda, G. M., Glembofsky, A. C., Cattaneo, M. et al. (2013). Correlation between platelet phenotype and NBEAL2 genotype in patients with congenital thrombocytopenia and alpha-granule deficiency. *Haematologica* **98**, 868-74.
- Boussion, S., Escande, F., Jourdain, A. S., Smol, T., Brunelle, P., Duhamel, C., Alembik, Y., Attie-Bitach, T., Baujat, G., Bazin, A. et al. (2020). TAR syndrome: Clinical and molecular characterization of a cohort of 26 patients and description of novel noncoding variants of RBM8A. *Hum Mutat* **41**, 1220-1225.
- Breton-Gorius, J., Favier, R., Guichard, J., Cherif, D., Berger, R., Debili, N., Vainchenker, W. and Douay, L. (1995). A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood* **85**, 1805-14.
- Brigida, I., Zoccolillo, M., Cicalese, M. P., Pfajfer, L., Barzaghi, F., Scala, S., Oleaga-Quintas, C., Alvarez-Alvarez, J. A., Sereni, L., Giannelli, S. et al. (2018). T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. *Blood* **132**, 2362-2374.
- Buchbinder, D., Nugent, D. J. and Fillipovich, A. H. (2014). Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl Clin Genet* **7**, 55-66.
- Bury, L., Falcinelli, E., Chiasserini, D., Springer, T. A., Italiano, J. E., Jr. and Gresele, P. (2016). Cytoskeletal perturbation leads to platelet dysfunction and thrombocytopenia in variant forms of Glanzmann thrombasthenia. *Haematologica* **101**, 46-56.
- Bury, L., Malara, A., Momi, S., Petito, E., Balduini, A. and Gresele, P. (2019). Mechanisms of thrombocytopenia in platelet-type von Willebrand disease. *Haematologica* **104**, 1473-1481.
- Ciovacco, W. A., Raskind, W. H. and Kacena, M. A. (2008). Human phenotypes associated with GATA-1 mutations. *Gene* **427**, 1-6.
- Di Buduo, C. A., Alberelli, M. A., Glembofsky, A. C., Podda, G., Lev, P. R., Cattaneo, M., Landolfi, R., Heller, P. G., Balduini, A. and De Candia, E. (2016). Abnormal proplatelet formation and emperipoiesis in cultured human megakaryocytes from gray platelet syndrome patients. *Sci Rep* **6**, 23213.
- Faleschini, M., Melazzini, F., Marconi, C., Giangregorio, T., Pippucci, T., Cigalini, E., Pecci, A., Bottega, R., Ramenghi, U., Siitonen, T. et al. (2018). ACTN1 mutations lead to a benign form of platelet macrocytosis not always associated with thrombocytopenia. *Br J Haematol* **183**, 276-288.
- Favier, M., Bordet, J. C., Favier, R., Gkalea, V., Pillois, X., Rameau, P., Debili, N., Alessi, M. C., Nurden, P., Raslova, H. et al. (2018). Mutations of the integrin alphaIIb/beta3 intracytoplasmic salt bridge cause macrothrombocytopenia and enlarged platelet alpha-granules. *Am J Hematol* **93**, 195-204.

- Favier, R., Akshoomoff, N., Mattson, S. and Grossfeld, P.** (2015). Jacobsen syndrome: Advances in our knowledge of phenotype and genotype. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **169**, 239-50.
- Ferrari, S., Lombardi, A. M., Putti, M. C., Bertomoro, A., Cortella, I., Barzon, I., Girolami, A. and 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* **28**, 621-624.
- Fletcher, S. J., Johnson, B., Lowe, G. C., Bem, D., Drake, S., Lordkipanidze, M., Guñu, I. S., Dawood, B., Rivera, J., Simpson, M. A. et al.** (2015). SLFN14 mutations underlie thrombocytopenia with excessive bleeding and platelet secretion defects. *J Clin Invest* **125**, 3600-5.
- Geddis, A. E.** (2011). Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer* **57**, 199-203.
- Germeshausen, M., Ancliff, P., Estrada, J., Metzler, M., Ponstingl, E., Rutschle, H., Schwabe, D., Scott, R. H., Unal, S., Wawer, A. et al.** (2018). MECOM-associated syndrome: a heterogeneous inherited bone marrow failure syndrome with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood Adv* **2**, 586-596.
- Ghevaert, C., Salsmann, A., Watkins, N. A., Schaffner-Reckinger, E., Rankin, A., Garner, S. F., Stephens, J., Smith, G. A., Debili, N., Vainchenker, W. et al.** (2008). A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the α IIb β 3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. *Blood* **111**, 3407-14.
- Gunay-Aygun, M., Falik-Zaccai, T. C., Vilboux, T., Zivony-Elboun, Y., Gumruk, F., Cetin, M., Khayat, M., Boerkoel, C. F., Kfir, N., Huang, Y. et al.** (2011). NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet* **43**, 732-4.
- Horvat-Switzer, R. D. and Thompson, A. A.** (2006). HOXA11 mutation in amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis syndrome inhibits megakaryocytic differentiation in vitro. *Blood Cells Mol Dis* **37**, 55-63.
- Hurtado, B., Trakala, M., Ximenez-Embun, P., El Bakkali, A., Partida, D., Sanz-Castillo, B., Alvarez-Fernandez, M., Maroto, M., Sanchez-Martinez, R., Martinez, L. et al.** (2018). Thrombocytopenia-associated mutations in Ser/Thr kinase MASTL deregulate actin cytoskeletal dynamics in platelets. *J Clin Invest* **128**, 5351-5367.
- Ihara, K., Ishii, E., Eguchi, M., Takada, H., Suminoe, A., Good, R. A. and Hara, T.** (1999). Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3132-6.
- Izumi, R., Niihori, T., Suzuki, N., Sasahara, Y., Rikiishi, T., Nishiyama, A., Nishiyama, S., Endo, K., Kato, M., Warita, H. et al.** (2014). GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord* **24**, 1068-72.
- Kahr, W. H., Hinckley, J., Li, L., Schwartz, H., Christensen, H., Rowley, J. W., Pluthero, F. G., Urban, D., Fabbro, S., Nixon, B. et al.** (2011). Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet* **43**, 738-40.
- Karastaneva, A., Nebral, K., Schlagenhauf, A., Baschin, M., Palankar, R., Juch, H., Heitzer, E., Speicher, M. R., Hofler, G., Grigorow, I. et al.** (2020). Novel phenotypes observed in patients with ETV6-linked leukaemia/familial thrombocytopenia syndrome and a biallelic ARID5B risk allele as leukaemogenic cofactor. *J Med Genet* **57**, 427-433.
- Karki, N. R., Ajebo, G., Savage, N. and Kutlar, A.** (2020). DIAPH1 Mutation as a Novel Cause of Autosomal Dominant Macrothrombocytopenia and Hearing Loss. *Acta Haematol*, 1-4.
- Kunishima, S., Kashiwagi, H., Otsu, M., Takayama, N., Eto, K., Onodera, M., Miyajima, Y., Takamatsu, Y., Suzumiya, J., Matsubara, K. et al.** (2011). Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* **117**, 5479-84.
- Kunishima, S., Kobayashi, R., Itoh, T. J., Hamaguchi, M. and Saito, H.** (2009). Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood* **113**, 458-61.

- Kunishima, S., Nishimura, S., Suzuki, H., Imaizumi, M. and Saito, H.** (2014). TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol* **92**, 276-82.
- Kunishima, S., Okuno, Y., Yoshida, K., Shiraishi, Y., Sanada, M., Muramatsu, H., Chiba, K., Tanaka, H., Miyazaki, K., Sakai, M. et al.** (2013). ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* **92**, 431-8.
- Lacruz, R. S. and Feske, S.** (2015). Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann N Y Acad Sci* **1356**, 45-79.
- Ledgerwood, E. C., Dunstan-Harrison, C., Ong, L. and Morison, I. M.** (2019). CYCS gene variants associated with thrombocytopenia. *Platelets* **30**, 672-674.
- Lentaigne, C., Greene, D., Sivapalaratnam, S., Favier, R., Seyres, D., Thys, C., Grassi, L., Mangles, S., Sibson, K., Stubbs, M. et al.** (2019). Germline mutations in the transcription factor IKZF5 cause thrombocytopenia. *Blood* **134**, 2070-2081.
- Levin, C., Koren, A., Pretorius, E., Rosenberg, N., Shenkman, B., Hauschner, H., Zalman, L., Khayat, M., Salama, I., Elpeleg, O. et al.** (2015). Deleterious mutation in the FYB gene is associated with congenital autosomal recessive small-platelet thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* **13**, 1285-92.
- Luk, A. D. W., Yang, X., Alcasabas, A. P., Hao, R. C., Chan, K. W., Lee, P. P., Yang, J., Chan, G. C., So, J. C., Yang, W. et al.** (2020). NF-E2 mutation as a novel cause for inherited thrombocytopenia. *Br J Haematol* **189**, e41-e44.
- Manchev, V. T., Hilpert, M., Berrou, E., Elaib, Z., Aouba, A., Boukour, S., Souquere, S., Pierron, G., Rameau, P., Andrews, R. et al.** (2014). A new form of macrothrombocytopenia induced by a germ-line mutation in the PRKACG gene. *Blood* **124**, 2554-63.
- Marconi, C., Di Buduo, C. A., LeVine, K., Barozzi, S., Faleschini, M., Bozzi, V., Palombo, F., McKinstry, S., Lassandro, G., Giordano, P. et al.** (2019). Loss-of-function mutations in PTPRJ cause a new form of inherited thrombocytopenia. *Blood* **133**, 1346-1357.
- Massaad, M. J., Ramesh, N. and Geha, R. S.** (2013). Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci* **1285**, 26-43.
- Mekchay, P., Ingrungruenglert, P., Suphapeetiporn, K., Sosothikul, D., Ji-Au, W., Maneesri Le Grand, S., Israsena, N. and Rojnuckarin, P.** (2019). Study of Bernard-Soulier Syndrome Megakaryocytes and Platelets Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Thromb Haemost* **119**, 1461-1470.
- Melazzini, F., Palombo, F., Balduini, A., De Rocco, D., Marconi, C., Noris, P., Gnan, C., Pippucci, T., Bozzi, V., Faleschini, M. et al.** (2016). Clinical and pathogenic features of ETV6-related thrombocytopenia with predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **101**, 1333-1342.
- Millikan, P. D., Balamohan, S. M., Raskind, W. H. and Kacena, M. A.** (2011). Inherited thrombocytopenia due to GATA-1 mutations. *Semin Thromb Hemost* **37**, 682-9.
- Misceo, D., Holmgren, A., Louch, W. E., Holme, P. A., Mizobuchi, M., Morales, R. J., De Paula, A. M., Stray-Pedersen, A., Lyle, R., Dalhus, B. et al.** (2014). A dominant STIM1 mutation causes Stormorken syndrome. *Hum Mutat* **35**, 556-64.
- Morgan, N. V. and Daly, M. E.** (2017). Gene of the issue: RUNX1 mutations and inherited bleeding. *Platelets* **28**, 208-210.
- Morin, G., Biancalana, V., Echaniz-Laguna, A., Noury, J. B., Lornage, X., Moggio, M., Ripolone, M., Violano, R., Marcorelles, P., Marechal, D. et al.** (2020). Tubular aggregate myopathy and Stormorken syndrome: Mutation spectrum and genotype/phenotype correlation. *Hum Mutat* **41**, 17-37.
- Morison, I. M., Cramer Borde, E. M., Cheesman, E. J., Cheong, P. L., Holyoake, A. J., Fichelson, S., Weeks, R. J., Lo, A., Davies, S. M., Wilbanks, S. M. et al.** (2008). A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nat Genet* **40**, 387-9.

- Niihori, T., Ouchi-Uchiyama, M., Sasahara, Y., Kaneko, T., Hashii, Y., Irie, M., Sato, A., Saito-Nanjo, Y., Funayama, R., Nagashima, T. et al. (2015). Mutations in MECOM, Encoding Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *Am J Hum Genet* **97**, 848-54.
- Noetzi, L., Lo, R. W., Lee-Sherick, A. B., Callaghan, M., Noris, P., Savoia, A., Rajpurkar, M., Jones, K., Gowan, K., Balduini, C. et al. (2015). Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **47**, 535-538.
- Noris, P., Marconi, C., De Rocco, D., Melazzini, F., Pippucci, T., Loffredo, G., Giangregorio, T., Pecci, A., Seri, M. and Savoia, A. (2018). A new form of inherited thrombocytopenia due to monoallelic loss of function mutation in the thrombopoietin gene. *Br J Haematol* **181**, 698-701.
- Noris, P., Perrotta, S., Seri, M., Pecci, A., Gnan, C., Loffredo, G., Pujol-Moix, N., Zecca, M., Scognamiglio, F., De Rocco, D. et al. (2011). Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood* **117**, 6673-80.
- Nurden, A. T. (2014). Platelet membrane glycoproteins: a historical review. *Semin Thromb Hemost* **40**, 577-84.
- Nurden, A. T., Federici, A. B. and Nurden, P. (2009). Altered megakaryocytopoiesis in von Willebrand type 2B disease. *J Thromb Haemost* **7 Suppl 1**, 277-81.
- Nurden, A. T., Pillois, X., Fiore, M., Heilig, R. and Nurden, P. (2011a). Glanzmann thrombasthenia-like syndromes associated with Macrothrombocytopenias and mutations in the genes encoding the α IIb β 3 integrin. *Semin Thromb Hemost* **37**, 698-706.
- Nurden, P., Debili, N., Couprie, I., Bryckaert, M., Youlyouze-Marfak, I., Sole, G., Pons, A. C., Berrou, E., Adam, F., Kauskot, A. et al. (2011b). Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood* **118**, 5928-37.
- Nurden, P., Debili, N., Vainchenker, W., Bobe, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Combrie, R., Fressinaud, E., Meyer, D., Nurden, A. T. et al. (2006). Impaired megakaryocytopoiesis in type 2B von Willebrand disease with severe thrombocytopenia. *Blood* **108**, 2587-95.
- Nurden, P., Nurden, A., Favier, R. and Gleyze, M. (2018). Management of pregnancy for a patient with the new syndromic macrothrombocytopenia, DIAPH1-related disease. *Platelets* **29**, 737-738.
- Ong, L., Morison, I. M. and Ledgerwood, E. C. (2017). Megakaryocytes from CYCS mutation-associated thrombocytopenia release platelets by both proplatelet-dependent and -independent processes. *Br J Haematol* **176**, 268-279.
- Paradisi, I. and Arias, S. (2007). IVIC syndrome is caused by a c.2607delA mutation in the SALL4 locus. *Am J Med Genet A* **143**, 326-32.
- Pecci, A., Klersy, C., Gesele, P., Lee, K. J., De Rocco, D., Bozzi, V., Russo, G., Heller, P. G., Loffredo, G., Ballmaier, M. et al. (2014). MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* **35**, 236-47.
- Pleines, I., Woods, J., Chappaz, S., Kew, V., Foad, N., Ballester-Beltran, J., Aurbach, K., Lincetto, C., Lane, R. M., Schevzov, G. et al. (2017). Mutations in tropomyosin 4 underlie a rare form of human macrothrombocytopenia. *J Clin Invest* **127**, 814-829.
- Poggi, M., Canault, M., Favier, M., Turro, E., Saultier, P., Ghalloussi, D., Baccini, V., Vidal, L., Mezzapesa, A., Chelghoum, N. et al. (2017). Germline variants in ETV6 underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34+ progenitors. *Haematologica* **102**, 282-294.
- Rabbolini, D. J., Morel-Kopp, M. C., Ward, C. M. and Stevenson, W. S. (2017). GFI1B variants associated with thrombocytopenia. *Platelets* **28**, 525-527.
- Sapoznik, B., Binard, S., Fenneteau, O., Nurden, A., Nurden, P., Hurtaud-Roux, M. F., Schlegel, N. and French, M. Y. H. n. (2014). Mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in a large French cohort of MYH9-Related Disorders. *Mol Genet Genomic Med* **2**, 297-312.

- Savoia, A., Dufour, C., Locatelli, F., Noris, P., Ambaglio, C., Rosti, V., Zecca, M., Ferrari, S., di Bari, F., Corcione, A. et al.** (2007). Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical and biological consequences of five novel mutations. *Haematologica* **92**, 1186-93.
- Savoia, A., Kunishima, S., De Rocco, D., Zieger, B., Rand, M. L., Pujol-Moix, N., Caliskan, U., Tokgoz, H., Pecci, A., Noris, P. et al.** (2014). Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat* **35**, 1033-45.
- Schlegelberger, B. and Heller, P. G.** (2017). RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Semin Hematol* **54**, 75-80.
- Seo, A., Gulsuner, S., Pierce, S., Ben-Harosh, M., Shalev, H., Walsh, T., Krasnov, T., Dgany, O., Doulatov, S., Tamary, H. et al.** (2019). Inherited thrombocytopenia associated with mutation of UDP-galactose-4-epimerase (GALE). *Hum Mol Genet* **28**, 133-142.
- Stapley, R. J., Pisareva, V. P., Pisarev, A. V. and Morgan, N. V.** (2020). SLFN14 gene mutations associated with bleeding. *Platelets* **31**, 407-410.
- 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 al.** (2013). GFI1B mutation causes a bleeding disorder with abnormal platelet function. *J Thromb Haemost* **11**, 2039-47.
- Stevenson, W. S., Rabbolini, D. J., Beutler, L., Chen, Q., Gabrielli, S., Mackay, J. P., Brighton, T. A., Ward, C. M. and Morel-Kopp, M. C.** (2015). Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in FLI1. *Blood* **126**, 2027-30.
- Strassel, C., Magiera, M. M., Dupuis, A., Batzenschlager, M., Hovasse, A., Pleines, I., Gueguen, P., Eckly, A., Moog, S., Mallo, L. et al.** (2019). An essential role for alpha4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Sci Alliance* **2**.
- Stritt, S., Nurden, P., Favier, R., Favier, M., Ferioli, S., Gotru, S. K., van Eeuwijk, J. M., Schulze, H., Nurden, A. T., Lambert, M. P. et al.** (2016a). Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg(2+) homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nat Commun* **7**, 11097.
- Stritt, S., Nurden, P., Turro, E., Greene, D., Jansen, S. B., Westbury, S. K., Petersen, R., Astle, W. J., Marlin, S., Bariana, T. K. et al.** (2016b). A gain-of-function variant in DIAPH1 causes dominant macrothrombocytopenia and hearing loss. *Blood* **127**, 2903-14.
- Sun, W., Zhang, T., Zhang, X., Wang, J., Chen, Y., Long, Y., Zhang, G., Wang, Y., Chen, Y., Fang, T. et al.** (2020). Compound heterozygous mutations in ABCG5 or ABCG8 causing Chinese familial Sitosterolemia. *J Gene Med*, e3185.
- Takeichi, T., Torrelo, A., Lee, J. Y. W., Ohno, Y., Lozano, M. L., Kihara, A., Liu, L., Yasuda, Y., Ishikawa, J., Murase, T. et al.** (2017). Biallelic Mutations in KDSR Disrupt Ceramide Synthesis and Result in a Spectrum of Keratinization Disorders Associated with Thrombocytopenia. *J Invest Dermatol* **137**, 2344-2353.
- Thompson, A. A. and Nguyen, L. T.** (2000). Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nat Genet* **26**, 397-8.
- Turro, E., Greene, D., Wijgaerts, A., Thys, C., Lentaigne, C., Bariana, T. K., Westbury, S. K., Kelly, A. M., Selleslag, D., Stephens, J. C. et al.** (2016). A dominant gain-of-function mutation in universal tyrosine kinase SRC causes thrombocytopenia, myelofibrosis, bleeding, and bone pathologies. *Sci Transl Med* **8**, 328ra30.
- Varghese, L. N., Zhang, J. G., Young, S. N., Willson, T. A., Alexander, W. S., Nicola, N. A., Babon, J. J. and Murphy, J. M.** (2014). Functional characterization of c-Mpl ectodomain mutations that underlie congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Growth Factors* **32**, 18-26.
- Vassallo, P., Westbury, S. K. and Mumford, A. D.** (2020). FLNA variants associated with disorders of platelet number or function. *Platelets*, 1-4.
- Vo, K. K., Jarocha, D. J., Lyde, R. B., Hayes, V., Thom, C. S., Sullivan, S. K., French, D. L. and Poncz, M.** (2017). FLI1 level during megakaryopoiesis affects thrombopoiesis and platelet biology. *Blood* **129**, 3486-3494.



Chapter 9

Three-Dimensional Culture in a Methylcellulose-Based Hydrogel to Study the Impact of Stiffness on Megakaryocyte Differentiation

Alicia Aguilar, Julie Boscher, Fabien Pertuy, Christian Gachet, and Catherine Léon

Abstract

The differentiation and maturation of megakaryocytes (MKs) occurs in a 3D environment where the cells must constantly adapt to the external physical and mechanical constraints during their development and migration to sinusoid vessels. In this chapter, we present a method for culture of mouse MKs from bone marrow hematopoietic progenitor cells in a methylcellulose 3D medium with a stiffness mimicking that of bone marrow. In addition, we describe how the MKs can be recovered to allow for analysis of their differentiation and maturation state by transmission electron microscopy, immunofluorescence or flow cytometry techniques and to evaluate their ability to form proplatelets. This approach allows (1) generation of MKs with a morphology that more closely resembles the MKs that differentiate in vivo, (2) recovery of megakaryocyte phenotypes sometimes observed in vivo but not found in classical liquid cultures, and (3) study of mechanotransduction pathways induced by the stiffness of the medium.

Key words Megakaryocyte, Proplatelets, Lin⁻ bone marrow progenitors, 3D hydrogel culture, Methylcellulose, Stiffness

1 Introduction

The importance of substrate stiffness for cell differentiation has become increasingly recognized since the seminal work of Engler et al. [1]. Consequently, the mechanisms whereby cells sense the three-dimensional (3D) topology of their environment is an emerging field of study [2]. Like other tissues, bone marrow has a 3D structure and despite its being one of the softest tissues of the organism, its stiffness has been estimated to lie between 15 and 300 Pa [3, 4]. The cells are in close contact with one another and most of them are migrating to the sinusoid vessels to enter the blood circulation. This inevitably generates additional external constraints on adjacent cells, which have to adjust to these forces.

It is now known that cells respond to external forces by modulating their cytoskeleton and transcriptional program to adapt to their physical environment. Thus, growing hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in traditional liquid cultures would appear to be a simplistic approach, as is clearly evidenced by the different ultrastructural morphology of MKs from in vitro cultures as compared to MKs differentiated in situ (Fig. 1a, b).

To better mimic the physical constraints of the native environment, we have developed a 3D culture model using a methylcellulose-based hydrogel. Hydrogels have been employed in the hematological field for several decades. Derived from cellulose by replacement of some hydroxyl residues ($-\text{OH}$) by methoxide groups ($-\text{OCH}_3$), methylcellulose forms a nonreactive physical gel which tends to solidify with increasing temperature, depending on its concentration and degree of methyl substitution. Such hydrogels have been widely used to grow hematopoietic cells for colony forming assays to quantify numbers of hematopoietic progenitors. Despite this historical application, the biological significance of the mechanical impact of hydrogels in cell culture has only recently been appreciated and their use to improve and better understand the differentiation of the hematopoietic lineage is still in its infancy.

In this chapter, we describe a method to grow mouse Lin^- HSPCs in a 3D methylcellulose hydrogel in order to improve their MK differentiation. We have shown that a gel stiffness with a Young's modulus in the range of 30–60 Pa is optimal for megakaryocyte growth. Compared with standard liquid culture, this increases polyploidization, improves the development and structuration of the demarcation membrane system (Fig. 1c), and enhances the capacity of the cells to extend proplatelets once resuspended in a liquid medium [5]. In addition, by recreating the mechanical constraints which cells may encounter in the bone marrow, we have shown that this culture system can help to reveal the abnormal phenotype of *Myb9* knockout MKs observed in situ (“leaky” morphology, decreased proplatelet formation) but not in classical liquid cultures [5–7].

We present methods for the isolation of mouse bone marrow Lin^- cells, their embedding in a methylcellulose hydrogel for 3D culture and recovery of the MKs for analysis by confocal fluorescence imaging, transmission electron microscopy and flow cytometry, and determination of their proplatelet formation capacity.

2 Materials

2.1 General Equipment

1. A laminar flow hood.
2. A centrifuge (Megafuge 1.0, Heraeus, or equivalent).
3. Transfer pipettes.

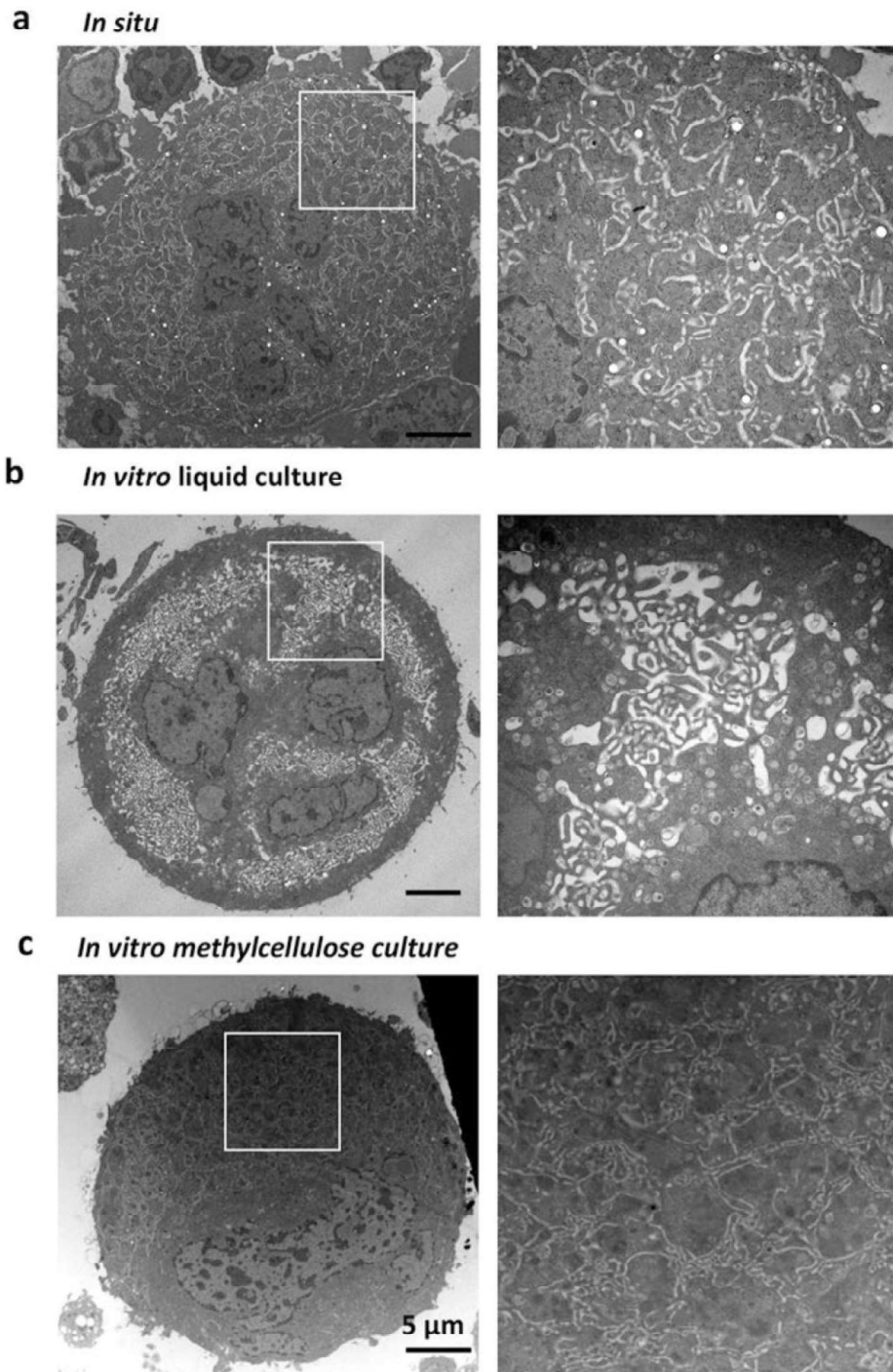


Fig. 1 Ultrastructure of murine megakaryocytes. Megakaryocyte from native marrow (upper panels), liquid culture (middle), and methylcellulose culture (lower panels). Right panels, close up view of the cytoplasm from the megakaryocyte in the left panels (white squares). This research was originally published in *Blood* (Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, Strassel C, Collin D, Gachet C, Lanza F, Leon C. Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood*. 2016;128:2022-2032. © the American Society of Hematology)

4. Micropipettes P2, P10, P200, and P1000.
5. A fume hood and protective equipment for fixatives.
6. A CO₂ cell culture incubator.
7. A water bath.

2.2 Collection and Dissociation of Bone Marrow

1. Sterile dissection instruments (forceps, scissors, scalpels).
2. 70% ethanol in water.
3. DMEM 1× (Gibco, Life Technologies).
4. Stock penicillin, streptomycin, and glutamine (PSG): supplied as a 100× concentrated 100 mL stock containing 10,000 units/mL penicillin, 10,000 µg/mL streptomycin and 29.2 mg/mL glutamine; (Gibco, Life Technologies).
5. Sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco, Life Technologies).
6. 5 mL syringes with 21-gauge needles and 50 mL plastic tubes for flushing of femurs.
7. 23-gauge needles, 25-gauge needles and round bottomed 10 mL plastic tubes for marrow dissociation.
8. An ADAM automated cell counter, slides (AccuChip 2×, Digital Bio) and AccuStain solutions T and N (Digital Bio). Alternatively, a Thoma cell counting chamber and trypan blue to count viable cells.

2.3 Lin⁻ Magnetic Sorting

1. Round bottomed 5 mL polystyrene tubes.
2. M Medium: DPBS, 2% FBS (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), 1 mM EDTA.
3. Normal rat serum (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada).
4. EasySep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell isolation Kit (Stem Cell Technologies) with biotinylated antibodies (CD5, CD11b, CD19, CD45R/B220, Ly6G/C(Gr-1), TER119, 7-4) and streptavidin-coated magnetic beads. Alternatively, other negative Lin⁻ selection can be used, provided that megakaryocyte progenitors are not removed.
5. Easy EasySep™ magnet (Stem Cell Technologies).

2.4 Methylcellulose Encapsulation

1. DMEM 1× (Gibco, Life Technologies).
2. Penicillin, streptomycin, and glutamine (PSG) 100× stock (Gibco, Life Technologies).
3. TPO (rhTPO, Stem Cell Technologies): 5 µg/mL stock.
4. r-hirudin (rHV2-Lys47, Transgène, Strasbourg, France): 10,000 U/mL stock.
5. Fetal bovine serum (FBS; Hyclone, GE Healthcare Life Sciences).

6. Complete culture medium: DMEM, 1% PSG, 10% FBS, 50 ng/mL TPO, 100 U/mL hirudin.
7. Concentrated complete culture medium. For each 500 μ L final volume, prepare 167 μ L of concentrated complete medium: 102 μ L DMEM, 50 μ L FBS, 5 μ L TPO stock, 5 μ L hirudin stock, and 5 μ L 100 \times PSG stock. For more than one culture well, increase the volumes proportionally.
8. 3% methylcellulose (MC) stock solution in IMDM medium (R&D Minneapolis, Minnesota, USA) (*see Note 1*). Divide into 1 mL aliquots in 1 mL cryotubes (ClearLine, Biosigma) and store at -20°C .
9. 1 mL Luer lock syringes equipped with 18-gauge needles to collect the methylcellulose.
10. Luer lock syringe connectors (Fisher Scientific).
11. 4-well dishes or alternatively 24-well dishes (ThermoScientific).

2.5 Cell Resuspension

1. 15 mL plastic tubes.
2. DPBS to dilute the methylcellulose.
3. Complete DMEM culture medium (*see* Subheading 2.4, step 6) for cell resuspension in 4-well dishes to visualize proplatelets.

2.6 Cell Fixation for Electron Microscopy

1. Glutaraldehyde (25% aqueous solution; Electron Microscopy Sciences (EMS), USA) stored at $+4^{\circ}\text{C}$.
2. Cacodylate buffer: dissolve 21.4 g dimethylarsinic acid sodium salt trihydrate and 20 g sucrose in 1 L H_2O . Under constant agitation add 1 mL of 1 M CaCl_2 and 1 mL of 1 M MgCl_2 . The pH is adjusted to 7.3 and the osmolarity to 306 mOsm/L with approximately equal amounts (13 mL) of 1 M MgCl_2 and 1 M CaCl_2 . The final solution is clear and once filtered (0.2 μm) is stable at $+4^{\circ}\text{C}$ for up to several weeks.
3. Glutaraldehyde fixative solution: 5% glutaraldehyde (final concentration) in cacodylate buffer. Warning: fixative vapors and projections are very harmful to the eyes, nose, and throat and must be handled under a chemical hood, wearing protective equipment.
4. Agarose type LM-3 low melting point agar (EMS).
5. A heated centrifuge (2–16 KCH, Sigma, France).
6. Razor blades.

2.7 Cell Fixation and Cytospinning for Immunolabeling

1. A cytospin centrifuge (Cytospin 4, ThermoScientific) equipped with cytofunnels (Microm Microtech), filter cards, and cytoclips.
2. Paraformaldehyde (EMS) stored protected from the light.

3. Paraformaldehyde fixative solution: 8% paraformaldehyde in PBS.
4. Polylysine slides (ThermoScientific).
5. Dakopen (Dako) to delimitate the cell area.

2.8 Cell Recovery for Flow-Cytometric Analysis

1. 28 kPa ESS-coated dishes (Ibidi).

3 Methods

3.1 Removal of Femurs and Tibias, Extraction of Bone Marrow, Cell Dissociation, and Immunomagnetic Cell Sorting

Bone dissection must be performed under aseptic conditions to avoid bacterial contamination, and marrow flushing and cell dissociation must be carried out under a laminar flow hood.

1. Before starting, add 15 mL of DMEM medium containing 1% PSG to a 50 mL tube to collect the bones (*see Note 2*).
2. Throughout the procedure, frequently disinfect all instruments in 70% (v/v) ethanol to avoid microbial contamination. Use cervical dislocation or other approved methods (in line with local and national ethical guidelines) to euthanize the mouse and immerse the body in 70% ethanol before removing the femurs and tibias under aseptic conditions. Rapidly dissect out the femurs and tibias and remove the adherent tissue. Gently cut away the epiphyses using a sharp scalpel and briefly rinse the bones in 70% ethanol before immersing them in DMEM medium with 1% PSG (*see Note 3*).
3. Under the laminar flow hood, rinse the bones twice in sterile DPBS before starting to remove the marrow cells. Holding the bone with forceps, flush the marrow into a 50 mL tube using a 5 mL syringe with a 21-gauge needle, filled with DMEM medium containing 1% PSG. Introduce the extremity of the needle (just the bevel) into the opening of the bone and press the plunger with a quick movement and of sufficient force to flush out the marrow. Use 1 mL per tibia and reuse the medium for femurs.
4. Distribute the total volume of medium containing flushed marrow into round bottomed 10 mL tubes. Dissociate the marrow cells by passing the cell suspension 3 times through a 21-gauge needle, 3 times through a 23-gauge needle and finally once through a 25-gauge needle. Transfer the suspension into 15 mL tubes (*see Note 4*).
5. Measure the cell concentration and viability using an automated cell counter (*see Note 5*).

6. Centrifuge the 15 mL tubes for 7 min at $300 \times g$ and discard the supernatants. Following the instructions of the EasySep™ Mouse Hematopoietic Cell Isolation Kit, resuspend the cellular pellet in M medium to a concentration of 1×10^8 cells/mL. Put the suspension in a round bottomed 5 mL polystyrene tube, to a maximum volume of 2 mL.
7. The stem and progenitor cells are isolated by negative immunomagnetic selection. Add blocking normal rat serum (50 μ L/mL) and label nonhematopoietic stem cells and nonprogenitor cells by adding biotinylated antibodies (CD5, CD11b, CD19, CD45R/B220, Ly6G/C(Gr-1), TER119, 7–4) (50 μ L/mL). Incubate the cells on ice for 15 min. Add streptavidin-coated magnetic beads (75 μ L/mL) and incubate again on ice for 10 min. If necessary, adjust the volume to 2.5 mL with M medium. Place the tube without its cap inside the EasySep™ magnet and incubate for 3 min. Keeping the tube inside the magnet, transfer its contents into a new round-bottomed 5 mL polystyrene tube. This is done by inverting both the tube and the magnet with a gentle but regular movement. Discard the initial tube and place the new tube containing cells, without its cap, in the magnet for 3 min more. Transfer the isolated Lin[−] cells into a new 15 mL tube by gently and regularly inverting both the tube and the magnet.
8. Measure the Lin[−] cell concentration and viability.
9. Lin[−] cells are grown at a final concentration of 2×10^6 viable cells/mL under both liquid and methylcellulose conditions. Calculate the required volume of cell suspension to achieve the final concentration (1×10^6 cells per 500 μ L well). Centrifuge the cells at $300 \times g$ for 7 min. For liquid cultures, discard the supernatant and resuspend the cell pellet in complete culture medium. Incubate the cells at 37 °C under 5% CO₂ in 4-well culture plates (500 μ L per well).

3.2 Cell Embedding in the Methylcellulose Hydrogel

1. Thaw two 1 mL aliquots of 3% MC stock solution in IMDM (1 mL for syringe coating and 1 mL for cell encapsulation) (*see Note 6*).
2. Draw 1 mL of MC into a 1 mL Luer lock syringe equipped with an 18-gauge needle to coat the walls of the syringe (Fig. 2a). Totally expel the MC.
3. Using the same syringe and needle, aspirate the appropriate volume of MC (333 μ L is required per well for a total volume of 500 μ L to achieve a final concentration of 2% MC).
4. Remove the needle, put a Luer lock connector on the end of the syringe (Fig. 2b) and attach a second, noncoated, 1 mL Luer lock syringe to the first one (Fig. 2c, d).

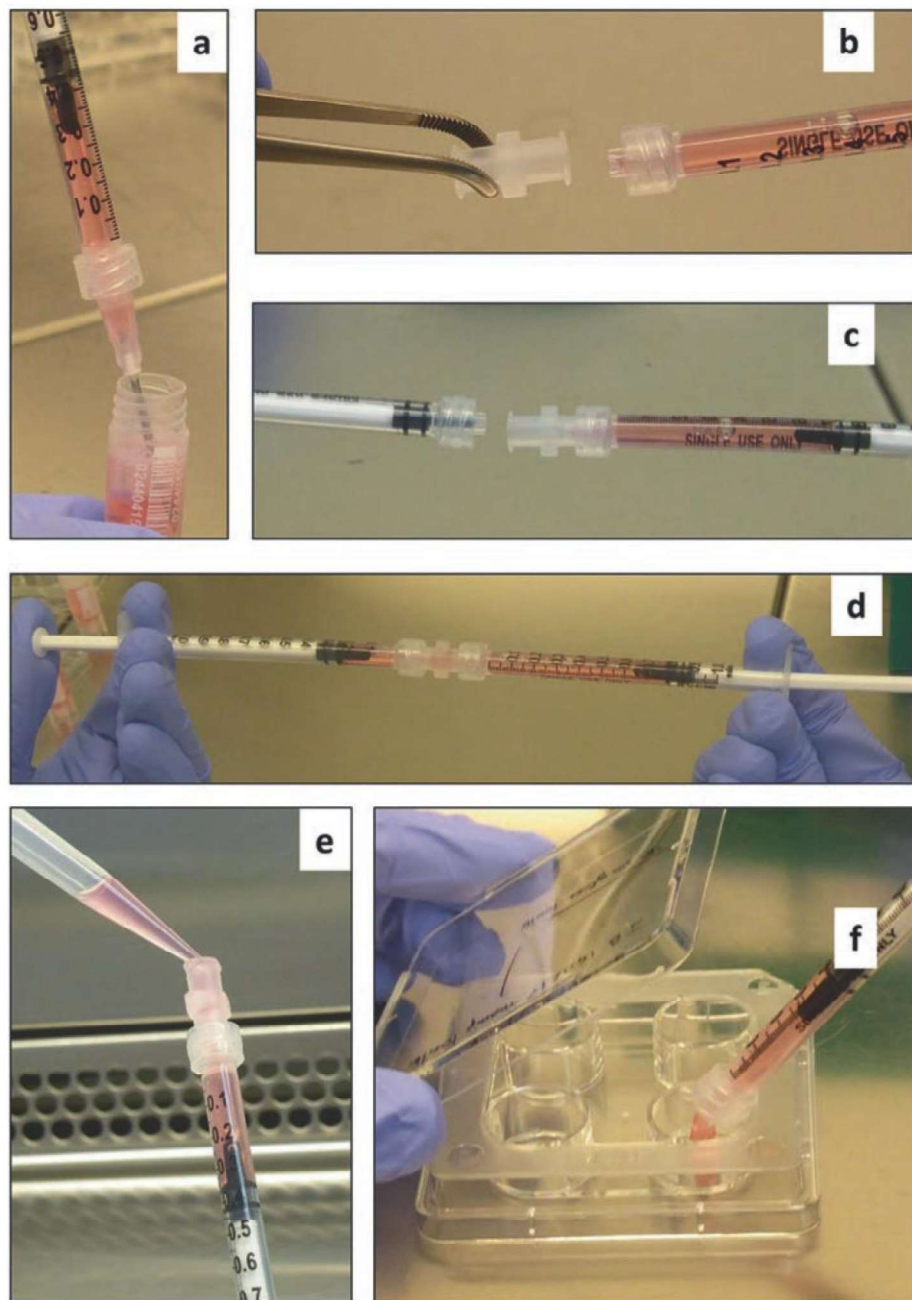


Fig. 2 Illustrative guide to the preparation of methylcellulose-based cultures. Refer to Subheading 3.2 for descriptions

5. Distribute the volume of MC equally between the two syringes and disconnect them.
6. Prepare the concentrated cell resuspension medium (**item 5**, Subheading 2.4), 167 μL per 500 μL in each well. This volume of medium is calculated so as to obtain a final MC concentration of 2% (corresponding to a 1.5-fold dilution of the initial 3% MC solution). For more than one culture well, increase the volumes proportionally.

7. Prepare the cell suspension. Calculate the required volume of cell suspension to achieve a final concentration of 2×10^6 cells/mL or 1×10^6 cells per 500 μ L well. Centrifuge the cells at $300 \times g$ for 7 min. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in concentrated complete DMEM medium so as to obtain an initial cell concentration of 6×10^6 cells/mL (*see Note 7*).
8. For each well, very carefully draw 167 μ L of cell suspension into one syringe directly through the connector (Fig. 2e) and reconnect the two syringes (*see Note 8*).
9. Homogenize the cells by mixing the MC medium and the cell suspension with back-and-forth movements between the two syringes (*see Note 9*).
10. Draw the cells and medium into one syringe and disconnect the two syringes, leaving the connector on the empty syringe. Carefully expel the contents of the other syringe (MC medium and cells) into one well of a 4-well plate (Fig. 2f).
11. Incubate at 37 °C under 5% CO₂.

3.3 Cell Analyses

This procedure uses a fixative which must be handled under a fume hood, wearing protective equipment.

3.3.1 In Situ Cell Fixation and Recovery for Electron Microscopy

1. Preheat the glutaraldehyde fixative solution (Subheading 2.6, item 3) to 37 °C so as to minimize fixation artifacts. Fix the cells directly in the hydrogel by gently layering an equal volume (500 μ L in this protocol) of fixative solution on top of the gel (2.5% glutaraldehyde final concentration), without disrupting the hydrogel (*see Note 10*). Incubate for 1 h at room temperature.
2. Using a transfer pipette, transfer the total content of the well (500 μ L hydrogel plus 500 μ L fixative) into 10 mL of cacodylate buffer (*see Note 11*) in a 15 mL tube. Carefully mix with several up-and-down pipettings so as to homogeneously dilute the methylcellulose gel without harming the cells.
3. Centrifuge the mixture at $300 \times g$ for 7 min.
4. Discard the supernatant, add 1 mL of cacodylate buffer and transfer the cell suspension to a 1.5 mL Eppendorf tube. Continue with steps 5–12 to prepare for electron microscopy or keep the cells at 4 °C.
5. Wash the cell pellet 3 times by centrifugation in cacodylate buffer and incubate the samples in a water bath at 43 °C.
6. Prepare a 2% (w/v) solution of agarose by dissolving agar powder in boiling cacodylate buffer and let the agar temperature equilibrate at 43 °C.
7. Using a warm transfer pipette, resuspend the cells in the warm agarose.

8. Centrifuge the cell suspension in agarose at $16,000 \times g$ and 37°C for 2 min.
9. Place the tubes on ice to let the agarose solidify.
10. With a razor blade cut the plastic Eppendorf tube above the cell pellet and then cut the cell pellet into four blocks.
11. Put the blocks in small bottles filled with cacodylate buffer.
12. Proceed to post fixation and inclusion in an Epon resin using classical procedures. A detailed description of Epon inclusion and sectioning may be found within a previous volume in this series (Platelets and Megakaryocytes Volume 3, Chapter 13 “Characterization of Megakaryocyte Development in the Native Bone Marrow Environment”) [8].

3.3.2 *In Situ Cell Fixation and Recovery for Immunolabeling*

This procedure uses a fixative which must be handled under a fume hood, wearing protective equipment.

1. Preheat the paraformaldehyde fixative solution (Subheading 2.7, item 3) to 37°C . Fix the cells directly in the hydrogel by gently layering an equal volume of fixative solution (i.e. $500\ \mu\text{L}$ in this protocol) on top of the gel (4% paraformaldehyde final concentration), without disrupting the hydrogel (*see Note 10*). Incubate for 20 min at room temperature.
2. Using a transfer pipette, transfer both the hydrogel and fixative (1 mL) from each well into 10 mL of DPBS and put it in a 15 mL tube. Carefully mix with several up-and-down pipettings so as to homogeneously dilute the methylcellulose gel without harming the cells. Centrifuge the mixture at $300 \times g$ for 7 min.
3. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in 10 mL of DPBS (*see Note 12*). Centrifuge the cells again at $300 \times g$ for 7 min.
4. Discard the supernatant and resuspend the pellet in a volume of DPBS equal to that of the initial gel (in this protocol $500\ \mu\text{L}$ per culture well).
5. Prepare the cytofunnels. Attach the cytofunnels and filter cards with cytoclips to appropriately annotated slides and place them in the cytospin centrifuge (Fig. 3a–c).
6. Carefully homogenize the cell suspension. Pipette $100\ \mu\text{L}$ of cell suspension into each cytofunnel, so that 4–5 slides are obtained for one $500\ \mu\text{L}$ culture well. Cytospin at 500 rpm for 5 min, discard the cytofunnels and recover the slides (Fig. 3d). Using a marker, immediately draw a line around the cell spot on the back of each slide and encircle the cells with Dakopen for further immunolabeling (Fig. 3c), before immersing the slide in DPBS (*see Notes 13 and 14*). Proceed to immunolabeling or keep the slides at 4°C immersed in DPBS in a horizontal position for up to a few days.

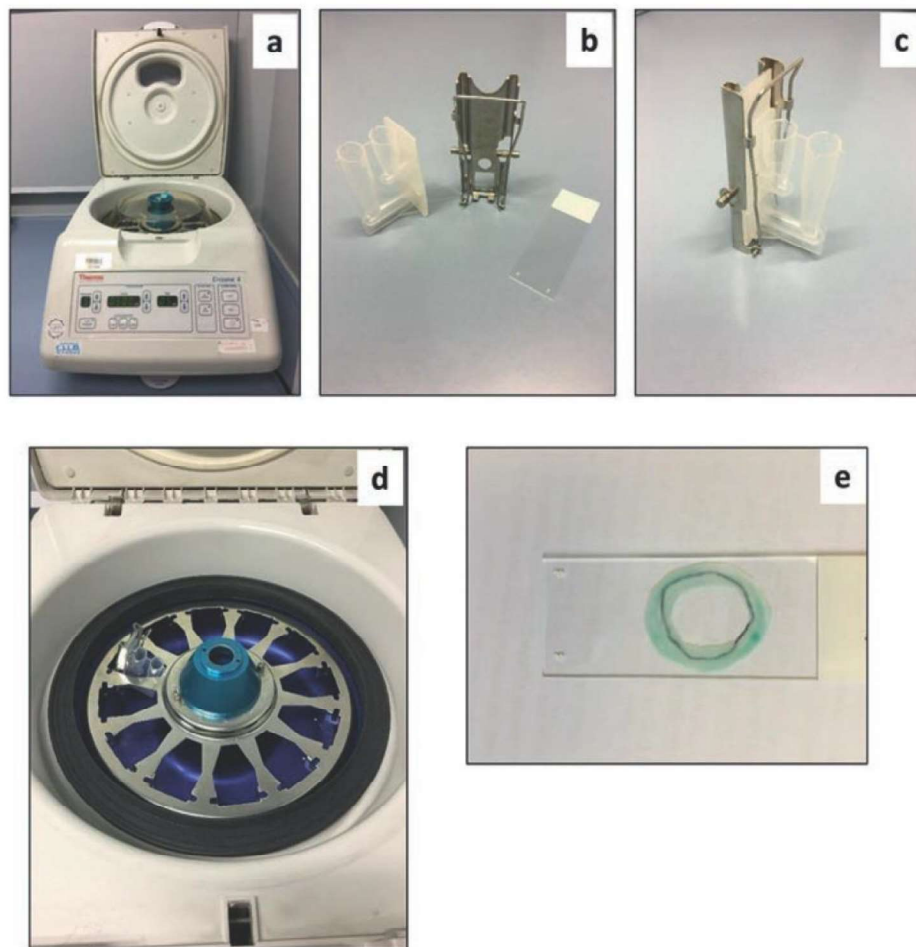


Fig. 3 Illustrative guide to cytopspin the cells from cultures for immunolabelling. Refer to Subheading 3.3.2 for descriptions

3.3.3 Cell Recovery for Flow-Cytometric Analyses

1. Using a transfer pipette, transfer the hydrogel from each well (500 μ L) into 10 mL of PBS and place it in a 15 mL tube. Carefully mix with several up-and-down pipettings so as to homogeneously dilute the methylcellulose gel without harming the cells.
2. Centrifuge the mixture at $300 \times g$ for 7 min. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in 10 mL of PBS (*see Note 12*). Centrifuge the cells at $300 \times g$ for 7 min.
3. Resuspend the cell pellet in an appropriate volume to perform immunolabeling for flow-cytometric analyses.

3.3.4 Cell Resuspension for Proplatelet Analysis

The physical constraints exerted by the methylcellulose hydrogel tend to inhibit the extension of proplatelets. In order to analyze proplatelet formation under conditions comparable to those of liquid cultures, the cells have to be reseeded in a liquid medium. The cells are resuspended on day 3 of culture, when the control

cells in liquid culture have not yet extended proplatelets; otherwise centrifugation could alter already extended proplatelets and bias the final results. Accordingly, be sure to proceed in exactly the same manner with all samples, including the cells from any control liquid culture wells (*see* Subheading 3.3.5), so as to have truly comparable controls. The entire procedure is performed under sterile conditions using a laminar flow hood.

1. Prewarm complete culture medium (Subheading 2.4, item 6) to 37 °C.
2. Prepare 10 mL of DPBS at 37 °C in a 15 mL tube for each 500 µL well to reseed.
3. Very gently resuspend the cells from each well in the 10 mL of DPBS. Several up-and-down movements are necessary to dilute the methylcellulose.
4. Centrifuge the tubes at $300 \times g$ for 5 min.
5. Discard the supernatants and resuspend each pellet in 1 mL of culture medium (*see* Note 12).
6. Reseed 500 µL of cell suspension per well of 4- or 24-well plates and incubate at 37 °C under 5% CO₂ (i.e., from one initial well, obtain 2 wells for proplatelet visualization in duplicate).
7. On day 4, i.e., 24 h after reseeding, randomly acquire images from the bottom of each well using bright field microscopy and the 20× objective (Fig. 4). Usually 10 fields/well are acquired,

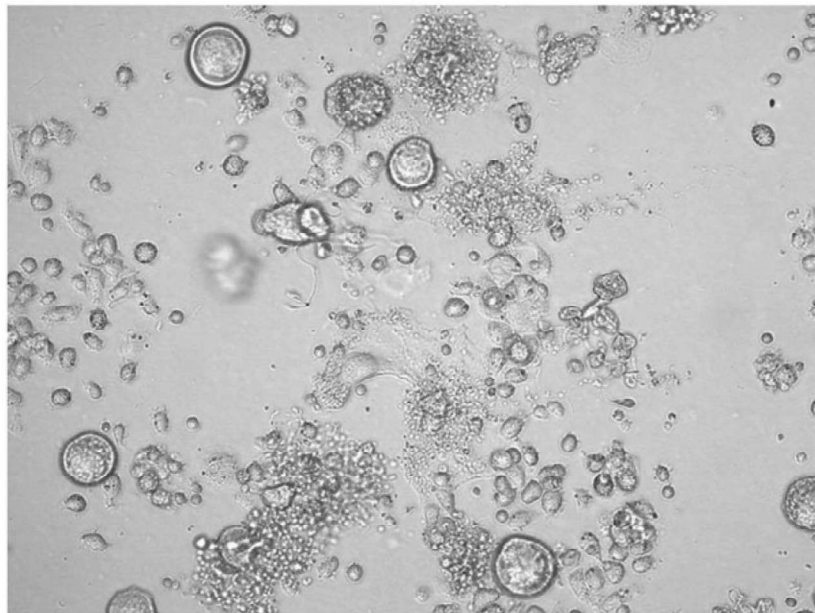


Fig. 4 Typical appearance of cells resuspended after culture in methylcellulose for assessment of proplatelet formation. Megakaryocytes were grown 3 days in MC hydrogel, resuspended and reseeded for 24 h in liquid medium before pictures are taken to examine for proplatelet formation. *See* Subheading 3.3.4 for further detail

representing approximately 150–300 megakaryocytes per condition (two wells). The number of MKs extending proplatelets is counted on each photograph and the proportion of MKs extending proplatelets is calculated based on these two wells.

3.3.5 Comparison of MKs Grown in Liquid and Methylcellulose Cultures

Methylcellulose cultures are performed in classical 4- or 24-well culture dishes in a volume of 500 μL (*see Note 15*). Conventional liquid cultures can also be performed in classical 4- or 24-well culture dishes, in a volume of 500 μL , similarly to methylcellulose cultures. However, for some experiments, it may be important to recover all cell types and adherent cells may be lost in classical culture dishes. To limit cell adhesion so that all the cells are recovered, including adherent remaining stromal cells (*see Note 16*), cell culture in liquid medium can be performed in 28 kPa ESS-coated dishes. These dishes accommodate a total volume of 2 mL.

4 Notes

1. The viscoelastic properties, and hence the stiffness, of methylcellulose vary according to the degree of substitution of hydroxyl residues by methyl residues, the length of the polymer chains, the concentration of the polymer and the temperature. We characterized the viscoelastic properties of methylcellulose from R&D and found that at 37 °C and an optimal concentration of 2%, the stiffness, evaluated by measuring the elastic modulus (Young's modulus), lies in the range of 30–60 Pa. These properties may vary according to the source of methylcellulose and this should be taken into consideration as small variations may affect the final stiffness and hence the differentiation process.
2. It is better to warm the medium to 37 °C before the experiment.
3. You do not need to cut all the epiphyses. To facilitate marrow flushing, cut only the epiphyses of the ankle side end for the tibia and of the hip side end for the femur. This will allow the needle to be retained by the epiphysis of the knee side end of each bone and will decrease the risk of ejecting the bone from the needle during flushing.
4. Place the end of the needle on the tube wall while dissociating the flushed marrow to avoid the formation of air bubbles and thereby the creation of shear stress.
5. An ADAM automated cell counter is used with AccuChips and AccuStain solutions T and N to count viable cells. Alternatively, another automated cell counter may be used, or a Thoma cell

chamber for manual counting in the presence of trypan blue to exclude dead cells.

6. Use two different aliquots of methylcellulose, one to coat and one to fill the syringe, because the MC used for coating will contain undesirable bubbles after its ejection.
7. Be sure to discard all the supernatant because the volume of liquid added to the methylcellulose changes its concentration. To obtain an optimal concentration of 2% starting from an initial concentration of 3% MC, the total volume of liquid is 167 μL for 333 μL of MC medium. This allows one to prepare 500 μL of MC medium at a concentration of 2%, containing cells at a final concentration of 2×10^6 cells/mL or 1×10^6 cells/500 μL well.
8. Make sure you do not introduce air bubbles into the syringe when adding the cell suspension. Carefully reconnect the syringes without losing any MC medium or cell suspension in the screw thread.
9. Mix back and forth about ten times to homogenize. Do not mix too vigorously as this will create undesirable small air bubbles.
10. Do not disturb the hydrogel so as to maintain its stiffness intact until the cells are fixed. The fixative diffuses very rapidly throughout the gel, as revealed by its rapid change in color.
11. From this moment on, it is important to use cacodylate buffer rather than PBS to avoid adding phosphates, which are undesirable for further processing for electron microscopy.
12. Note that some methylcellulose may not be fully diluted or may remain on the bottom wall of the tube and be pelleted during centrifugation. In this case, discard the liquid above the cell and MC pellet, leaving about 2 mL so as not to lose cells. Add a further 10 mL of buffer to resuspend the cells and dilute and eliminate all the MC after a second round of centrifugation.
13. DPBS is added to prevent dehydration and maintain the cell structure.
14. Dispose of the cytofunnels and filter cards in sealed disposable bags to avoid the dispersion of fixative vapors.
15. In classical dishes and liquid cultures, adherent cells stay attached to the plastic bottom after their sedimentation, whereas in methylcellulose cultures all the cells are recovered because they remain in suspension. To recover all the cells from the control liquid cultures, in order to obtain comparable numbers of cells from the MC and liquid cultures for flow-cytometric analyses, we use ESS-coated dishes for the control cultures to prevent adherence of the cells.

16. In ESS-coated dishes, the cells are seeded at 2×10^6 cells/mL as in classical liquid cultures, but the seeding volume is 2 mL because the surface of the dishes is larger than that of the wells of 4-well plates.

Acknowledgments

The authors wish to thank Juliette Mulvihill for reviewing the language part of the manuscript. This work was supported by INSERM, EFS Grand-Est and the Société Française d'Hématologie. *Disclosure of conflict of interests:* The authors have no conflict of interests.

References

1. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126(4):677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
2. Jansen KA, Donato DM, Balcioglu HE, Schmidt T, Danen EH, Koenderink GH (2015) A guide to mechanobiology: where biology and physics meet. *Biochim Biophys Acta* 1853(11 Pt B):3043–3052. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.007>
3. Choi JS, Harley BA (2012) The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials* 33(18):4460–4468. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.010>
4. Shin JW, Buxboim A, Spinler KR, Swift J, Christian DA, Hunter CA, Leon C, Gachet C, Dingal PC, Ivanovska IL, Rehfeldt F, Chasis JA, Discher DE (2014) Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 14(1):81–93. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.10.009>
5. Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, Strassel C, Collin D, Gachet C, Lanza F, Leon C (2016) Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood* 128(16):2022–2032. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-699959>
6. Eckly A, Rinckel JY, Laeuffer P, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C, Leon C (2010) Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J Thromb Haemost* 8(10):2243–2251. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04009.x>
7. Eckly A, Strassel C, Freund M, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C, Leon C (2009) Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood* 113(14):3182–3189
8. Eckly A, Strassel C, Cazenave JP, Lanza F, Léon C, Gachet C (2012) Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol Biol* 788:175–192

Combined deficiency of RAB32 and RAB38 in the mouse mimics Hermansky-Pudlak syndrome and critically impairs thrombosis

Alicia Aguilar, Josiane Weber, Julie Boscher, Monique Freund, Catherine Ziessel, Anita Eckly, Stéphanie Magnenat, Catherine Bourdon, Béatrice Hechler, Pierre H. Mangin, Christian Gachet, François Lanza, and Catherine Léon

Université de Strasbourg, INSERM, Etablissement Français du Sang Grand Est, BPPS UMR-S 1255, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France

Key Points

- Contrary to rat platelets, mouse platelets express both RAB32 and RAB38 that play fully redundant roles for dense granule biogenesis.
- Combined RAB32 and RAB38 deficiency mimics severe Hermansky-Pudlak syndrome with albinism and profound defects in hemostasis.

The biogenesis of lysosome related organelles is defective in Hermansky-Pudlak syndrome (HPS), a disorder characterized by oculocutaneous albinism and platelet dense granule (DG) defects. The first animal model of HPS was the fawn-hooded rat, harboring a spontaneous mutation inactivating the small guanosine triphosphatase *Rab38*. This leads to coat color dilution associated with the absence of DGs and lung morphological defects. Another RAB38 mutant, the *cht* mouse, has normal DGs, which has raised controversy about the role of RAB38 in DG biogenesis. We show here that murine and human, but not rat, platelets also express the closely related RAB32. To elucidate the parts played by RAB32 and RAB38 in the biogenesis of DGs in vivo and their effects on platelet functions, we generated mice inactivated for *Rab32*, *Rab38*, and both genes. Single *Rab38* inactivation mimicked *cht* mice, whereas single *Rab32* inactivation had no effect in DGs, coat color, or lung morphology. By contrast, *Rab32/38* double inactivation mimicked severe HPS, with strong coat and eye pigment dilution, some enlarged lung multilamellar bodies associated with a decrease in the number of DGs. These organelles were morphologically abnormal, decreased in number, and devoid of 5-hydroxytryptamine content. In line with the storage pool defect, platelet activation was affected, resulting in severely impaired thrombus growth and prolongation of the bleeding time. Overall, our study demonstrates the absence of impact of RAB38 or RAB32 single deficiency in platelet biogenesis and function resulting from full redundancy, and characterized a new mouse model mimicking HPS devoid of DG content.

Introduction

Platelet granules critically contribute to hemostasis and thrombosis through the release of various soluble factors.¹ The α granules mainly contain proteins involved in coagulation and tissue repair. Dense granules (DGs, also called δ -granules) contain high concentrations of small nonprotein molecules such as nucleotides, pyrophosphates, and polyphosphates, as well as calcium and magnesium.²⁻⁴ Following strong platelet activation, the contents of α granules and DGs are released to amplify the platelet responses. Defects in DG formation (δ storage pool diseases, δ -SPD) or in platelet secretion are associated with bleeding disorders. Inherited δ -SPD represent a heterogeneous group presenting with either an isolated platelet function defect or more complex symptoms, as in Hermansky-Pudlak syndrome (HPS).⁵⁻⁷ In addition to the bleeding disorder, HPS is associated with oculocutaneous albinism and variable other serious complications such as immune deficiency or lung fibrosis depending whether the mutated gene also affects other organelles and cell types.^{7,8}

DGs belong to the family of lysosome related organelles (LRO), characterized by an acidic pH and the presence of lysosomal-associated membrane proteins (LAMPs), but their biogenesis differs from ubiquitous lysosomes. Because LROs also include, among others, the melanosomes in melanocytes, it has long been suggested that melanosomes and DGs share similar biogenesis routes. This hypothesis was supported by the identification of mutated genes responsible for both albinism and platelet granule defects in HPS syndrome.⁹⁻¹¹ DGs are synthesized in stage I megakaryocytes (MKs) and arise from late endosomal/multivesicular bodies (MVBs), the precursors of α granules and DGs and of lysosomes connecting the endocytic and biosynthetic pathways.^{12,13} In the early/recycling endosomes, cargos are sorted using ubiquitously expressed machinery and adaptor protein (AP) complexes associated with clathrin-coated vesicles, which tether and fuse with the maturing granules. RAB proteins are key mediators of vesicular trafficking. RAB38 and the closely related molecule RAB32^{14,15} are expressed in a tissue-specific manner and have been proposed to confer cell-type specificity on LROs, notably on melanosomes.^{10,11,16} This is consistent with the phenotype of the fawn-hooded rat, one of the first rodent models of HPS. The fawn-hooded rat carries a null mutation in *Rab38* and exhibits a diluted coat color resulting from impaired melanosome biogenesis, associated with lung defects and a bleeding phenotype resulting from δ -SPD in the absence of DGs.¹⁷⁻²⁰ This has long suggested that RAB38 is the major RAB directing cargos to maturing DGs. However, a spontaneous mutation which arose in the murine RAB38-GTPase domain (chocolate [*cht*] mouse) was found to cause slight pigment dilution and defective lung lamellar bodies biogenesis but no bleeding phenotype with absolutely normal DGs²¹⁻²³ suggesting a hypomorphic mutation.

RAB32 and RAB38 have been well investigated in melanosome biogenesis, where they direct the transport of cargos to maturing melanosomes through interaction with a number of intracellular partners involved in trafficking.^{9,11} Deficiencies in RAB32 and RAB38 proteins or defects in their GTPase activity are responsible for mistrafficking of melanosomal resident proteins, which results in melanosome malformation and reduced melanin pigment synthesis.^{9,11,24-26} The mechanisms of DG biogenesis have been less extensively studied, mainly because of the difficulty of manipulating MKs. Using a megakaryoblastic cell line, Di Pietro et al proposed a similar role for RAB32 and RAB38 in the transport and tethering of cargo-containing vesicles and/or their fusion with immature DGs.^{16,27} These studies were conducted in vitro in a cancer cell line, however. Thus, the question remained open as to their actual role in the in vivo setting, especially in view of the different phenotypes of fawn-hooded rats and *cht* mice.

This was evaluated by generating mice inactivated for *Rab32* and *Rab38*, following our observation that, contrary to rat platelets, mouse and human platelets also express RAB32 in addition to RAB38. In addition, we showed that inactivation of both genes is required to mimic severe HPS, these mice presenting with oculocutaneous albinism, lung morphology abnormalities, and defective DG formation, demonstrating that RAB32 and RAB38 play redundant roles in DGs biogenesis. In line with the DG defects, these mice exhibited a strong impairment in hemostasis and thrombus formation, representing a new mouse model mimicking severe HPS.

Materials and methods

Materials and animals

Materials and animals are listed in the supplemental Data.

Washed platelet preparation, aggregation, and quantification of granule contents

Platelets were washed in Tyrode's albumin buffer as previously described.²⁸ Aggregation was measured turbidimetrically using a 4-channel APACT 4004 aggregometer (ELITECH, France). To quantify total platelet factor-4 (PF4) and 5-hydroxytryptamine (5-HT), platelets were lysed by 5 successive cycles of freezing and thawing. To quantify secreted granule secretion, platelets were stimulated with the indicated dose of agonist and centrifuged after 3 minutes. PF4 and 5-HT were quantified in the supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Nucleotides were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC; Agilent 1260 Infinity) using a Zorbax SAX 1.6 \times 250-mm column (Agilent Technologies). β -hexosaminidase was measured as a marker of lysosome content²⁹ in sera from both wild-type (WT) and inactivation of single or both RAB proteins (DKO) mice.

Immunofluorescence on megakaryocytes and confocal observations

RAB32, RAB38, 5-HT, and von Willebrand factor (VWF) immunolabeling were performed on MKs differentiated in liquid culture for 4 days using standard protocols and observed by confocal microscopy (detailed in the supplemental Methods).

Western blotting and immunolabeling

In western blotting experiments, platelets, tissues, or Lin⁻ cells were lysed in the presence of 1% sodium dodecyl sulfate and proteins were separated by electrophoresis and immunoblotted with the indicated antibodies. For immunolabeling, megakaryocytes were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), cytospun, and labeled with appropriate antibodies.

Lung histology

Twenty eight- to 31-week-old mice were euthanized and the lungs and heart were dissected en bloc. The lungs were inflated with 4% PFA fixative administration through the trachea and immediately separated, the right lobe immersed in PFA for histology and the left lobes immersed in glutaraldehyde 2.5% for transmission electron microscopy (TEM) (see supplemental Methods). For histology, paraffin-embedded lung tissue was sectioned (5- μ m-thick sections) and stained with either Masson trichrome or hematoxylin and eosin staining. Alveolar space and multilamellar bodies were quantified using ImageJ software.

Flow cytometry for measurement of integrin α IIb β 3 activation, P-selectin, and LAMP1 exposure and mepacrine loading capacity

Washed platelets (5×10^7 /mL) were stimulated with thrombin and subsequently blocked with hirudin (100 U/mL), colabeled with anti-GPIIb β antibody and JonA-PE (1/50, recognizing activated α IIb β 3) or P-selectin (5 μ g/mL) or LAMP1 (1/100). The mepacrine loading capacity was evaluated by incubating resting or 1 U/mL thrombin prestimulated platelets with mepacrine (10 μ M) for 30 minutes.

Amounts of incorporated mepacrine were quantified on the basis of flow cytometry measurements (BD Fortessa).

Whole blood perfusion

Platelet thrombus formation was studied by perfusing collagen-coated capillaries with hirudin-anticoagulated blood as described previously,³⁰ and examination of the capillaries was done by scanning electron microscopy or differential interferential contrast.

Bleeding time and thrombosis models

The bleeding time was measured as described previously.³¹ A model of thromboembolism was performed *in vivo* by injecting tissue factor (TF, 165 μ L/kg) into the jugular vein of anesthetized animals within an infusion time frame of 3 to 4 seconds. Viability was monitored during the 30 minutes following TF injection. The same dose of TF was used to measure platelet consumption, quantified as the difference between the platelet counts before and 2 minutes after TF injection.³² Two models of mural thrombosis were used, 1 triggered by laser-induced localized deep injury of the mesenteric arterioles, as previously described,³³ and detailed in the supplemental Data. The second one was induced by exterior application of FeCl₃ 7.5% on the carotid artery, as described elsewhere.³⁴ The lesion was performed laterally to measure thrombus height growth in real time. Details are provided in the supplemental Data.

Results

RAB32 and RAB38 are expressed in human and mouse platelets, whereas RAB32 is absent from rat platelets

RAB32 and RAB38 were both found to be expressed in human and mouse platelets as observed by western blot and by reverse transcription-polymerase chain reaction analyses (Figure 1A). In contrast, RAB32 protein or messenger RNA (mRNA) was not detected in rat platelets (Figure 1A). To make sure that this was not unique to a specific rat strain, we compared platelets from Wistar and OFA albino rats, and also from a Brown Norway background, a non-agouti brown rat, and found the same results. RAB32 was nevertheless expressed in other tissues in the rat such as in the kidney, spleen, lungs, and skin (supplemental Figure 1A). Hence our data suggest that even if RAB32 is dispensable for the biogenesis of DGs in the rat, the possibility remains of a role in human and mouse platelets.

Consistent with this hypothesis, we found that RAB32 and RAB38 expression are present throughout murine MK differentiation (supplemental Figure 1B). We observed MK at a stage where maturing granules are present and found that VWF-positive α granules are not or only marginally labeled with either Rab32 or Rab38. By contrast, the majority of 5-HT⁺ granules were also labeled for RAB38 or RAB32 (Figure 1B), in accordance with a role for RAB32 and RAB38 in DG but not α granule biogenesis. Other vesicles were labeled for RAB38 and RAB32, which could represent early immature DGs or transport vesicles. To further study the role of RAB32 and RAB38 in DG formation, we generated mice in which *Rab32* or *Rab38* were inactivated.

Effect of *Rab32* and *Rab38* inactivation on coat pigmentation, lung structure, and granule content

Rab38^{-/-} mice were crossed with *Rab32*^{-/-} mice to obtain inactivation of single or both RAB proteins [DKO: *Rab32*^{-/-}; *Rab38*^{-/-}] (Figure 2A). Heterozygous genotypes expressed intermediate levels of RAB32 or RAB38 (Figure 2A). Inactivation of *Rab32* and/or *Rab38* did not lead to compensatory overexpression of other RAB proteins in platelets (supplemental Figure 2). *Rab32* inactivation had no impact on coat color, whereas *Rab38* inactivation led to a light pigment dilution, similar to the *cht* mice (Figure 2B). However, severe eye and coat color dilution were observed in DKO mice, presenting a light beige pigmentation and red eyes. In contrast, mice heterozygous for *Rab32* and deficient in *Rab38* [*Rab32*^{+/-}; *Rab38*^{-/-}] had an intermediate coat color, whereas [*Rab32*^{-/-}; *Rab38*^{+/-}] animals displayed less pigment dilution, very close to that of the *cht*²¹ or *Rab38*^{-/-} mice. Thus, RAB38 and RAB32 were found to be partially redundant for mouse coat color, RAB38 nevertheless appearing to predominate over RAB32.

Because it was previously reported that RAB38-deficient animals presented with lung defects,^{18,20,23} we next examined lung tissue in our knockout (KO) strains. Histological observations showed that *Rab38*^{-/-} and DKO, but not *Rab32*^{-/-} mice, had impaired lung alveolar structure. Although no clear increase in collagen was detected with Masson trichrome staining, we observed epithelium damage as evidenced by significant thickening of alveolar septa of *Rab38*^{-/-} and DKO lungs, compared with WT and *Rab32*^{-/-} mice, suggesting that RAB38 plays a predominant role over RAB32 in lung physiology (supplemental Figure 3A-B). By TEM, we closely observed alveolar type II cells containing the lamellar bodies and found that *Rab38*^{-/-} and DKO presented with some enlarged lamellar bodies (supplemental Figure 3C-D).

The hallmark of HPS is oculocutaneous albinism coupled with defective platelet DG content, so we next examined platelet DG 5-HT and nucleotide content. 5-HT storage was almost abolished in DKO platelets, whereas [*Rab32*^{+/-}; *Rab38*^{-/-}] and [*Rab32*^{-/-}; *Rab38*^{+/-}] mice presented a 32% and a 40% decrease in platelet 5-HT content, respectively (Figure 3A). The 5-HT concentration was unaltered in single knockout and double heterozygous platelets (Figure 3A). Platelets contain 2 major compartments for adenosine triphosphate (ATP) and adenosine 5'-diphosphate (ADP), the cytosol, and the DGs. We measured the total nucleotide content of platelets using HPLC. As shown in Figure 3A, DKO mouse platelets displayed a total 75% decrease in ADP and 50% decrease in ATP content. The ATP/ADP ratio was therefore twice that of WT mice (mean ratio \pm standard error of the mean [SEM]: 3.05 \pm 0.06 for WT [*n* = 14] vs 6.33 \pm 0.24 for DKO [*n* = 3]), in line with δ -SPD. Once again, [*Rab32*^{+/-}; *Rab38*^{-/-}] and [*Rab32*^{-/-}; *Rab38*^{+/-}] animals had an intermediate phenotype, with \sim 30% and 45% decreases in platelet ADP content, respectively, and 17% and 20% decreases in platelet ATP content, respectively, whereas single KO had normal nucleotide content.

On the other hand, total platelet PF4, P-selectin and fibrinogen levels were normal, whatever the genotype of the mice (Figure 3B). VWF was likewise detected in DKO platelets by immunolabeling and found to be present in similar amounts as in WT platelets (data not shown), confirming that neither RAB protein plays a significant

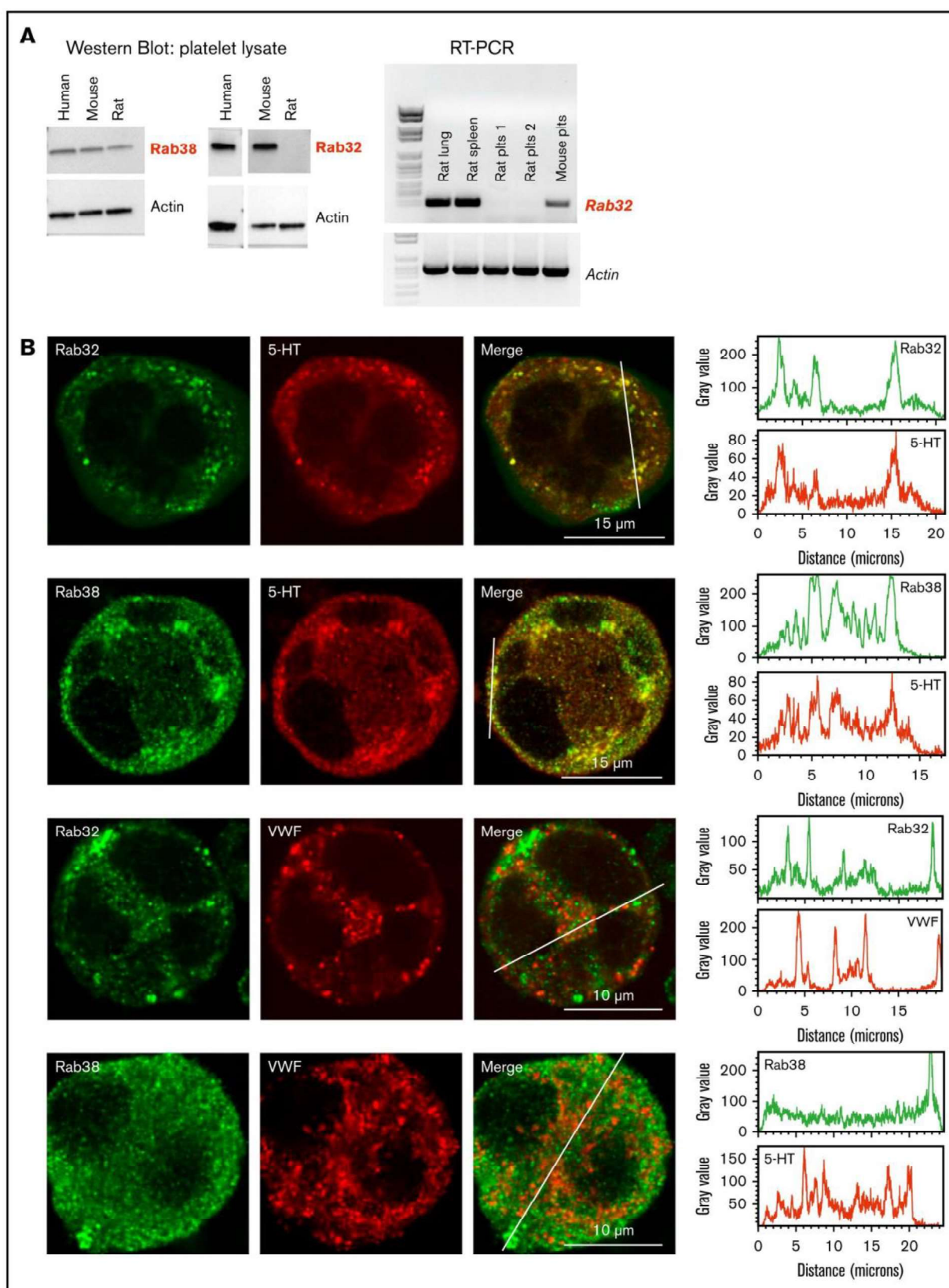


Figure 1. Expression of RAB38 and RAB32 proteins in MKs and platelets. (A, left panel) Western blots of human, mouse, and rat total platelet (Plts) lysates (10 μg) showing expression of RAB38 in all 3 species but not of RAB32 in rat platelets. Actin was present as a loading control. Representative blots from 3 independent experiments.

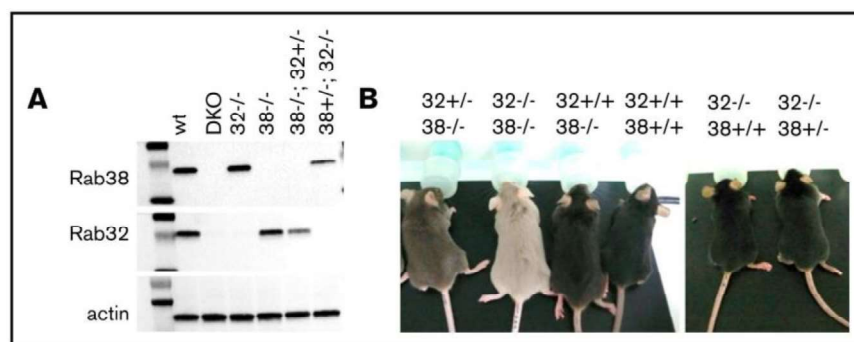


Figure 2. Impact of *Rab32* and/or *Rab38* inactivation on coat pigmentation. (A) Western blots showing the absence of RAB32 and RAB38 in *Rab32*^{-/-} and *Rab38*^{-/-} mouse platelets, respectively, and in DKO mouse platelets, and partial RAB32 and RAB38 expression in [*Rab38*^{-/-}; *Rab32*^{+/-}] and [*Rab38*^{+/-}; *Rab32*^{-/-}] mouse, respectively. Representative of 3 independent western blots. (B) Different coat color dilution according to the mouse genotype.

part in α granule biogenesis. Furthermore, β -hexosaminidase used as a marker of lysosomes was not decreased and was even slightly increased in DKO mice, indicating that lysosome biogenesis was not negatively impaired (Figure 3C). Finally, blood parameters were normal in the different combinations of genotypes (supplemental Table 1).

Altogether, we show that *Rab32/38* DKO mice fully mimic HPS and that, unlike in the case of coat color and lung physiology, RAB32 and RAB38 seem to play equally redundant roles in the biogenesis of DGs.

RAB32 and RAB38 are required for dense granule formation

We next investigated whether the absence of DG contents was the result of the absence of DG compartments or reflected only their defective storage capacity. As seen on TEM images, DG formation in DKO mouse platelets was strongly impaired, with only a few granules being observed. Furthermore, these DGs presented an abnormal dense core having a very small, linear, or poorly condensed appearance (Figure 4A, right), in contrast to normal DGs having a typical "bull's-eye" morphology³⁵ (Figure 4A, left). No morphological defect in platelet DGs was observed in single knockout or in [*Rab32*^{+/-}; *Rab38*^{-/-}] or [*Rab32*^{-/-}; *Rab38*^{+/-}] mice (data not shown). Because empty or immature granules may not be identified by TEM, mepacrine uptake was quantified as a measure of DG amount.^{36,37} Mepacrine uptake was decreased by 45% in resting DKO platelets compared with WT (Figure 4B). As a control, we observed that thrombin preactivated platelets incorporated minor amount of mepacrine, irrespective of their genotype (Figure 4B). Altogether, these data indicate that DKO platelets combine a decreased DG number and an impaired granule content. We then used focused ion beam (FIB)/scanning electron microscopy analysis and 3-dimensional (3D) reconstruction³⁸ to determine the exact number of DGs per platelet, even if empty. We counted 17.6 ± 1.4 DG (mean \pm SEM) in WT platelets, consistent with our previous observations of a higher number of DGs in mouse than in human platelets (A.E., personal observations). A 70% decrease in the total number of DGs in DKO platelets (5.2 ± 0.5 DG/DKO platelet) was observed (Figure 4C). These morphological

defects seemed to be restricted to DGs because α granules had a normal appearance (supplemental Figure 4A). A similar deficiency in DG biogenesis was already observed at the MK stage in the bone marrow by TEM analysis (supplemental Figure 4B). However, MVB were morphologically similar in DKO and WT MKs differentiated in vitro from Lin⁻ cells (Figure 4D), suggesting that RAB32 and RAB38 intervene in DG biogenesis downstream of MVB compartmentalization. These observations indicate that RAB32 and RAB38 are both required to initiate the formation of DG compartments and for their maturation in terms of storage contents.

Severely impaired hemostasis and thrombosis in *Rab32/Rab38*-deficient mice

The main function of the secretion of DG content is to recruit other circulating platelets to the site of injury and amplify platelet activation. As patients with DG deficiencies have a compromised hemostatic capacity,^{1,7,39} we evaluated hemostasis and thrombosis. Hemostasis evaluated in a tail bleeding assay appeared unaffected in *Rab32* or *Rab38* single knockout mice, in accordance with data in *cht* mouse.²¹ In contrast, a marked increase in bleeding time was recorded in DKO animals with no cessation after 30 minutes (Figure 5A). No intermediate phenotype was observed in [*Rab32*^{-/-}; *Rab38*^{+/-}] or [*Rab32*^{+/-}; *Rab38*^{-/-}] mice, indicating that their partial 5-HT and ADP content was sufficient to prevent excessive bleeding.

We next examined the *Rab* knockouts in in vivo thrombosis models. Mice inactivated for both *Rab32* and *Rab38* were resistant to thromboembolism induced by tissue factor administration (Figure 5B), in accordance with the important role of DG content in this model.³² Thrombosis resulting from vessel injury was also severely impaired in DKO mice, as observed in a model of localized deep laser-induced injury of the mesenteric arteriole vessel wall³³ (Figure 5C). Finally, we also asked how DKO may behave in a model of FeCl₃-induced injury in the carotid, generating a more severe lesion and hence a much larger thrombus.⁴⁰ FeCl₃ was applied laterally, allowing to visualize platelet accumulation and thrombus growth into the vessel lumen³⁴ (Figure 5D). There, thrombosis was profoundly impaired with absolutely no thrombus growth in DKO mice (Figure 5D, red line), whereas only the intermediate genotypes

Figure 1. (continued) (A, right panel) Reverse transcription polymerase chain reaction amplification of mRNA from rat lung, spleen, and platelets and mouse platelets, indicating absence of RAB32 mRNA in rat platelets. Rat plts 1: OFA rat; rat plts 2: Wistar rat. (B) Confocal images of immunolabeled mouse MKs. Left panels show RAB32 or RAB38 labeling (green), 5-HT or VWF labeling (red), and the merged images. Right panels show for each labeling a line scan of the fluorescence intensity along the drawing line visualized in the merged images. Bar, 5 μ m. Images are representative of at least 3 independent labeling experiments.

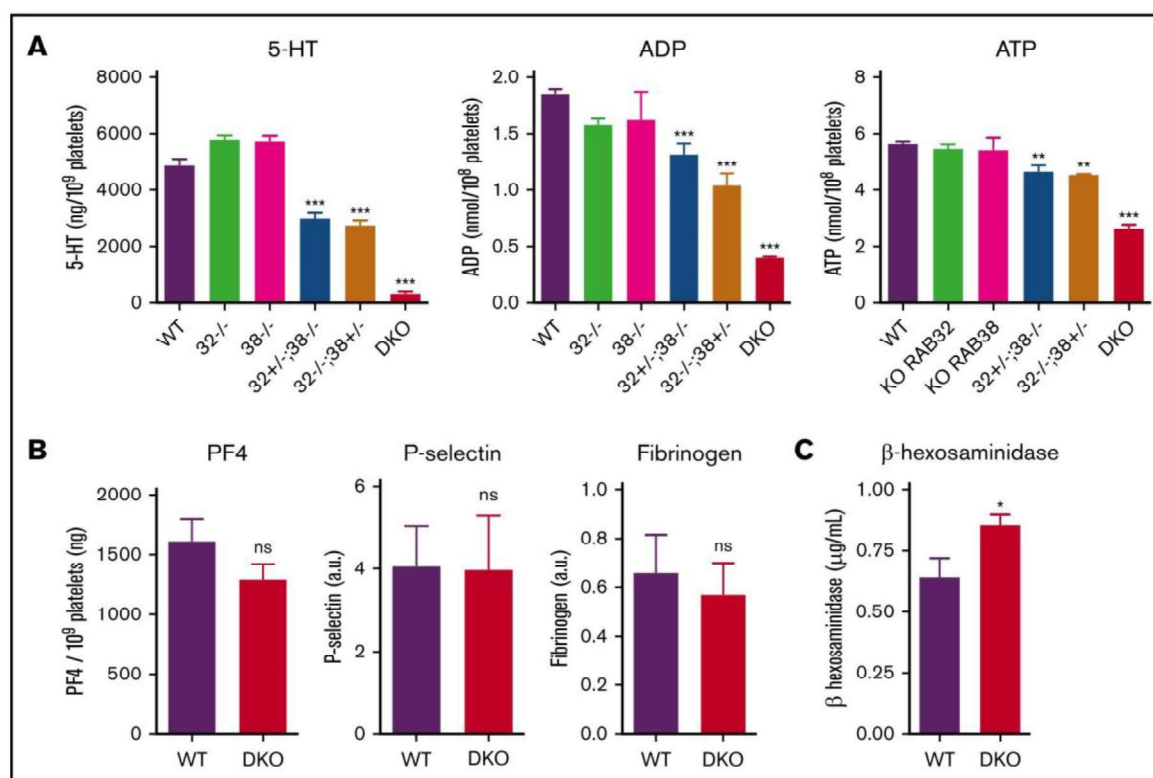


Figure 3. Impact of *Rab32* and/or *Rab38* inactivation on platelet granule content. (A) Quantification of DG constituents in mouse whole platelet lysates: 5-HT measured by ELISA (left); ADP (middle) and ATP (right) measured by HPLC separation. Results are the mean \pm SEM in at least 3 mice; $^{**}P < .01$, $^{***}P < .0001$ using 1-way analysis of variance (ANOVA). (B) Quantification of α granule constituents in mouse whole platelet lysates: PF4 (left) measured by ELISA, P-selectin (middle) and fibrinogen (right) measured by western blotting (mean \pm SEM, $n = 3$; not significant [ns] using Student *t* test). (C) Quantification of β -hexosaminidase in mouse sera as a measure of lysosome content (mean \pm SEM, $n = 5$, $^{*}P < .05$ using Student *t* test).

[*Rab32*^{-/-}; *Rab38*^{+/-}] and *Rab32*^{-/-} also showed a tendency, though not significant compared with the WT, to reduced thrombus size. No difference was observed between WT and single KO mice. The mean \pm SEM thrombus area at 600 seconds was $240 \times 10^3 \pm 42 \times 10^3$, 77 ± 17 , 117×10^3 , 326×10^3 , $196 \times 10^3 \pm 56 \times 10^3$, and $114 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ for WT, DKO, *Rab32*^{-/-}, *Rab38*^{-/-} [*Rab32*^{+/-}; *Rab38*^{-/-}], and [*Rab32*^{-/-}; *Rab38*^{+/-}] mice, respectively; only the differences between DKO and WT, [*Rab32*^{+/-}; *Rab38*^{-/-}] and *Rab38*^{-/-} were significant ($P < .05$ using Kruskal-Wallis test with Dunn's posttest).

Impaired platelet functions

To dissect the defective steps in thrombus formation, we next examined platelet aggregation under flow using hirudin-anticoagulated blood perfused through collagen-coated glass capillaries at an arterial shear rate of 1500 seconds⁻¹. Platelets from WT mice adhered and formed compact aggregates as expected. By contrast, DKO mice formed only a layer over the surface with no growth in height (Figure 6A), reminiscent of the thrombosis behavior. This suggested that the initial phase of platelet attachment was normal, but followed by a major defect in thrombus growth, raising the hypothesis of a defect in $\alpha\text{IIb}\beta3$ integrin activation in the DKO mice resulting from defective DG content release. Similar results were observed by performing in vitro platelet aggregation. Although ADP response was fully normal, as expected because it is not dependent of DG secretion when using washed

platelets (not shown), the responses to collagen or thrombin were decreased at low agonist concentrations and overcome when increasing concentrations (Figure 6B).

To further evaluate platelet functions, we measured JonA-PE labeling as a marker of $\alpha\text{IIb}\beta3$ integrin activation in thrombin-stimulated platelets over 300 s at concentrations ranging from 0.05 to 1 U/mL. We observed strongly reduced JonA-PE labeling at all-time points and concentrations in platelets from DKO mice compared with WT mice (Figure 7A). We next established that integrin activation could be rescued by exogenously added ADP at all-time points and for both thrombin concentrations (Figure 7B) ($P < .001$ between DKO and DKO+ADP). Under the same activation conditions, no critical defect in platelet P-selectin exposure was observed in DKO platelets (Figure 7C), and addition of ADP did not modify the response whatever the genotype (Figure 7D), suggesting that α granule release is not affected by DG defects as also indicated by the normal PF4 release (supplemental Figure 5). By contrast, lysosome exocytosis evaluated by LAMP1 externalization was found to be significantly decreased in DKO platelets compared with WT (Figure 7E) and only partially recovered by exogenously added ADP (Figure 7F).

Discussion

The spontaneous *Rab38* null mutation of the fawn-hooded rat, resulting in pigment dilution and defective DG biogenesis, was the

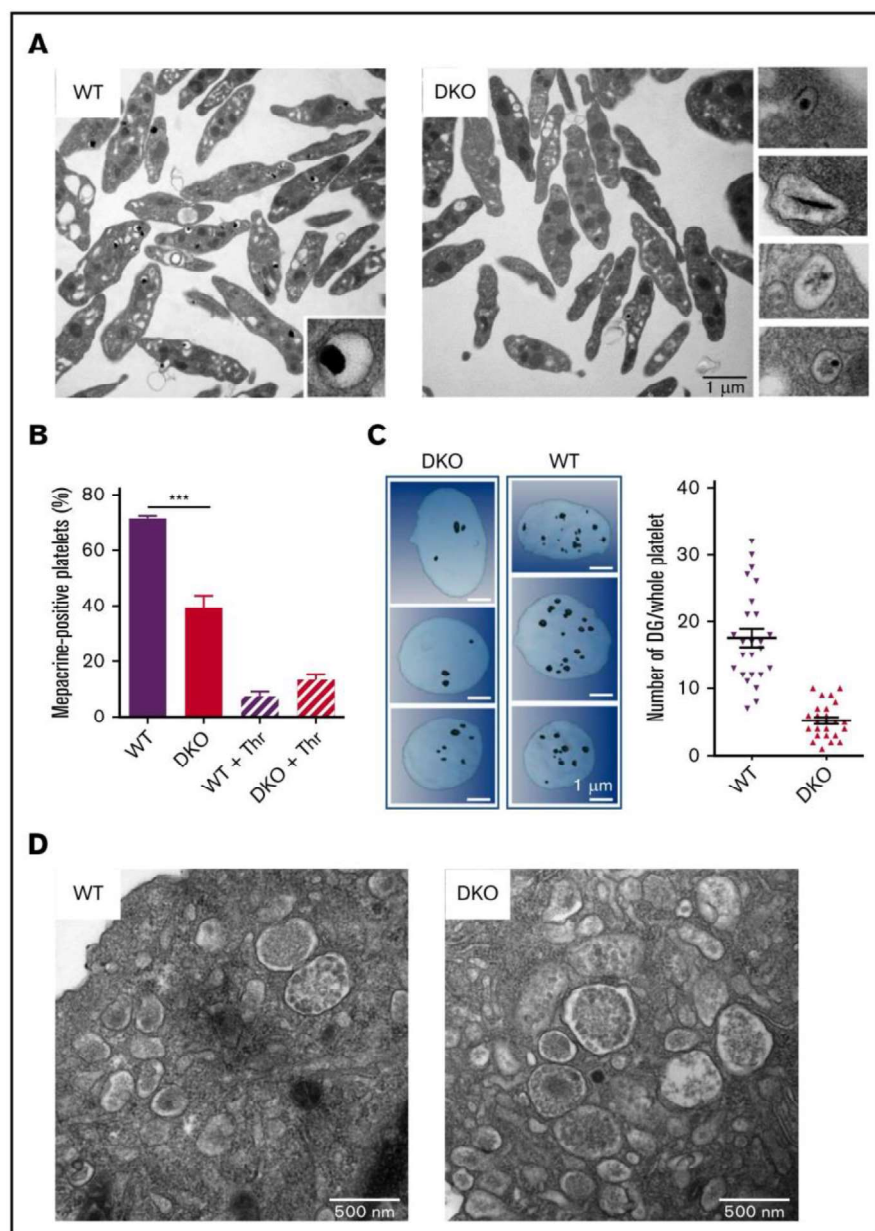


Figure 4. Decreased number and abnormal DGs in *Rab32/Rab38* DKO mouse platelets. (A) TEM images showing the ultrastructure of WT and DKO platelets. Right, the close-up views illustrate the various abnormal DG morphologies in DKO mice. Images are representative of at least 3 independent platelet preparations. Scale bar, 1 μ m. (B) Evaluation of mepacrine uptake by WT and DKO platelets. Bar graph represents the percentage of mepacrine-positive resting or degranulated platelets (prestimulation with 1 U/mL thrombin) following incubation with 10 μ M mepacrine for 30 minutes (*n* = 3 independent experiments). ****P* < .001 using 1-way ANOVA. (C) FIB/scanning electron microscopy images and 3D reconstructions of whole platelets. (Right panel) Dark spots represent DGs reconstructed by drawing the granule membranes on each slice. Note the heterogeneity of the size of the DGs in both genotypes. (Left panel) Quantification of the number of DGs per platelet using 3D FIB/scanning electron microscopy reconstructions (*n* = 25). (D) TEM images showing the presence of normal MVBs in DKO mouse MKs differentiated in culture from Lin[−] cells compared with WT. Images are representative of at least 20 MKs. Scale bars, 500 nm.

first animal model of HPS available. Later, a *Rab38* mutation in *cht* mouse was described, without DG anomalies.²¹ We provide an explanation for these discrepancies by showing that rat platelets do not express the RAB32 protein or mRNA. In contrast, human and mouse platelets express both RAB38 and RAB32. The absence of RAB32 in rat platelets has never been documented to date. One previous publication mentioned the presence in rat platelets of a putative immunoreactive long form of RAB32 having a molecular mass of 52 kDa instead of 25 kDa.⁴¹ This would be difficult to reconcile with the fact that RAB32 and RAB38 are paralogs.^{14,15} Using 2 different RAB32 antibodies, we found no evidence for this long form of the protein. Hence, DG biogenesis in rat platelets would appear to depend solely on RAB38, unlike in mouse and human platelets.

To investigate *in vivo* the respective roles of RAB32 and RAB38 in DG biogenesis and platelet functions in species expressing both

proteins (in the platelet lineage), we generated mouse lines deficient in RAB32, RAB38, and both proteins. Our data support a full redundancy between the 2 RABs for DG biogenesis, which was unexpected from the reported higher expression of RAB32 over RAB38.⁴² This was not the case for other LROs because we observed that RAB38 plays a more important role in the biogenesis of melanosomes and multilamellar bodies compared with RAB32, in accordance with studies using cultured melanocytes^{9,11} and previous data in the *cht* mice and fawn-hooded rats, which both present pigmentation and lung defects.^{20,22,43}

Up to now, 10 genes have been identified as causative for HPS in humans, whose mutation predicts the severity and diversity of symptoms.^{8,16,44,45} Yet, there is still a number of patients presenting with HPS of unknown origin. The identification of most of the

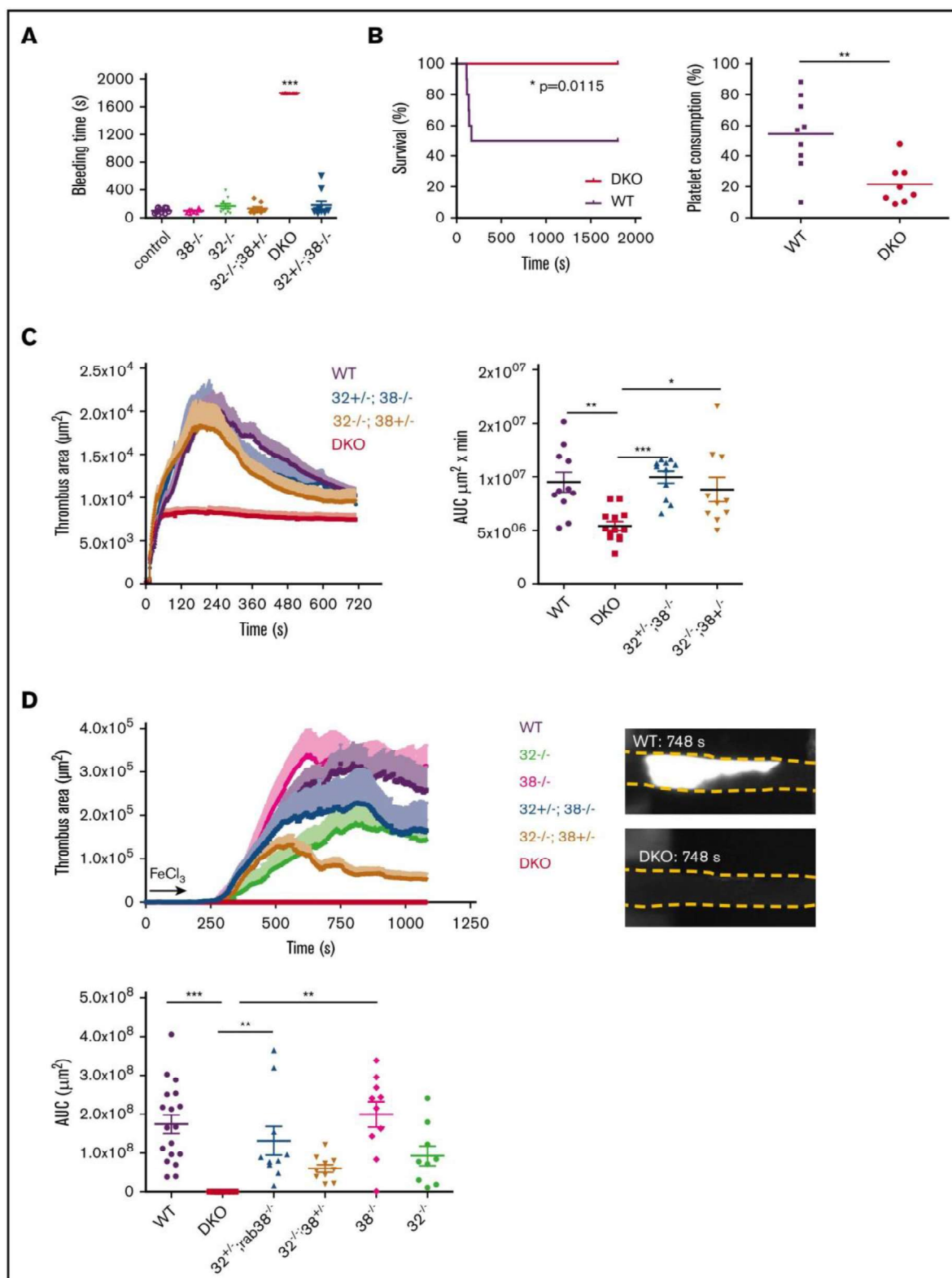


Figure 5. Defective hemostasis and thrombus growth in DKO mice. (A) Bleeding time measured as the time to the first cessation of bleeding. For DKO mice, bleeding was manually stopped at 1800 seconds; n = 10-12 mice, scatter plot with mean ± SEM, each dot corresponds to an individual mouse, ****P* < .0001 with Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test. (B) TF-induced thromboembolism experiments. (Left panel) Percentage survival following tissue factor injection, n = 10 mice; statistics using a log-rank (Mantel-Cox) test. (Right panel) Individual and mean percentage of platelet consumption, n = 8-9 mice; ***P* < .01 using Student *t* test. (C) Laser-induced

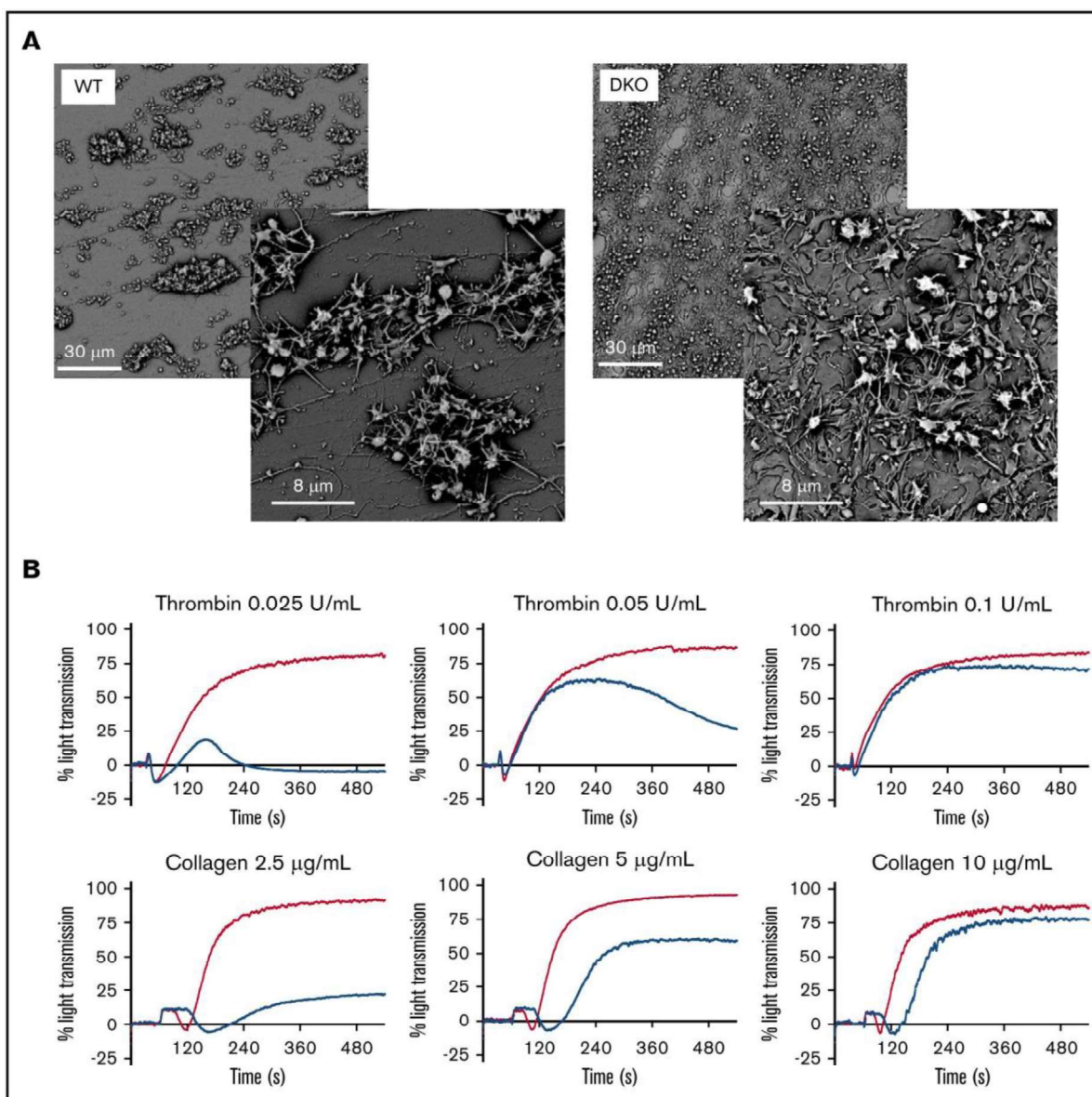


Figure 6. Defective platelet aggregate formation in DKO mice. (A) Whole blood anticoagulated with hirudin was perfused through glass capillaries coated with collagen I fibers for 5 minutes at a shear rate of $1500 \text{ seconds}^{-1}$. Scanning electron microscopy images that are representative of at least 3 independent experiments. (B) Aggregation tracings of WT (red) and DKO (blue) washed platelets stimulated with various concentrations of agonists as indicated. Representative of at least 4 independent experiments.

genes involved in human HPS have been greatly facilitated by the availability of HPS mouse disease models.^{16,46} Our observations that, contrary to the rat, RAB38 can be compensated by RAB32 for DG biogenesis in mouse and probably also in human might explain why no mutation in the *Rab38* gene has yet been reported in patients with HPS.⁴⁷

Known mutations in HPS affect proteins involved in multisubunit protein complexes. Among these, the BLOC3, composed of HPS1 and HPS4 subunits, works as a guanine exchange factor for RAB32 and RAB38.^{25,48} It is thus tempting to suppose that the DKO mouse model could correspond to the HPS1 and HPS4 form of the human disease. HPS1 and HPS4 are typically characterized by

Figure 5. (continued) mesenteric arteriole injury. (Left panel) Curves representing the mean \pm SEM thrombus area at each time point of 10 to 13 vessels observed from 7 to 9 mice. (Right panel) Bar graph of the area under the curve (AUC) of the individual curves corresponding to the graph shown in left. $**P < .001$, Kruskal-Wallis test. (D) FeCl_3 -induced carotid artery injury. FeCl_3 was applied to the lateral side of the carotid for 150 seconds (arrow), after which thrombus growth was visualized from the top. (Upper left panel) Curves representing the mean \pm SEM thrombus area at each time point, $n = 10$ mice. (Upper right panel) Representative top view showing the fluorescent platelet accumulation at the peak thrombus formation in WT mice (748 seconds) (upper image) and the absence of platelet accumulation in DKO mice (lower image). (Lower panel) Scatter bar graph of the AUC; $**P < .001$, $***P < .0001$ using Kruskal-Wallis test and Dunn's posttests.

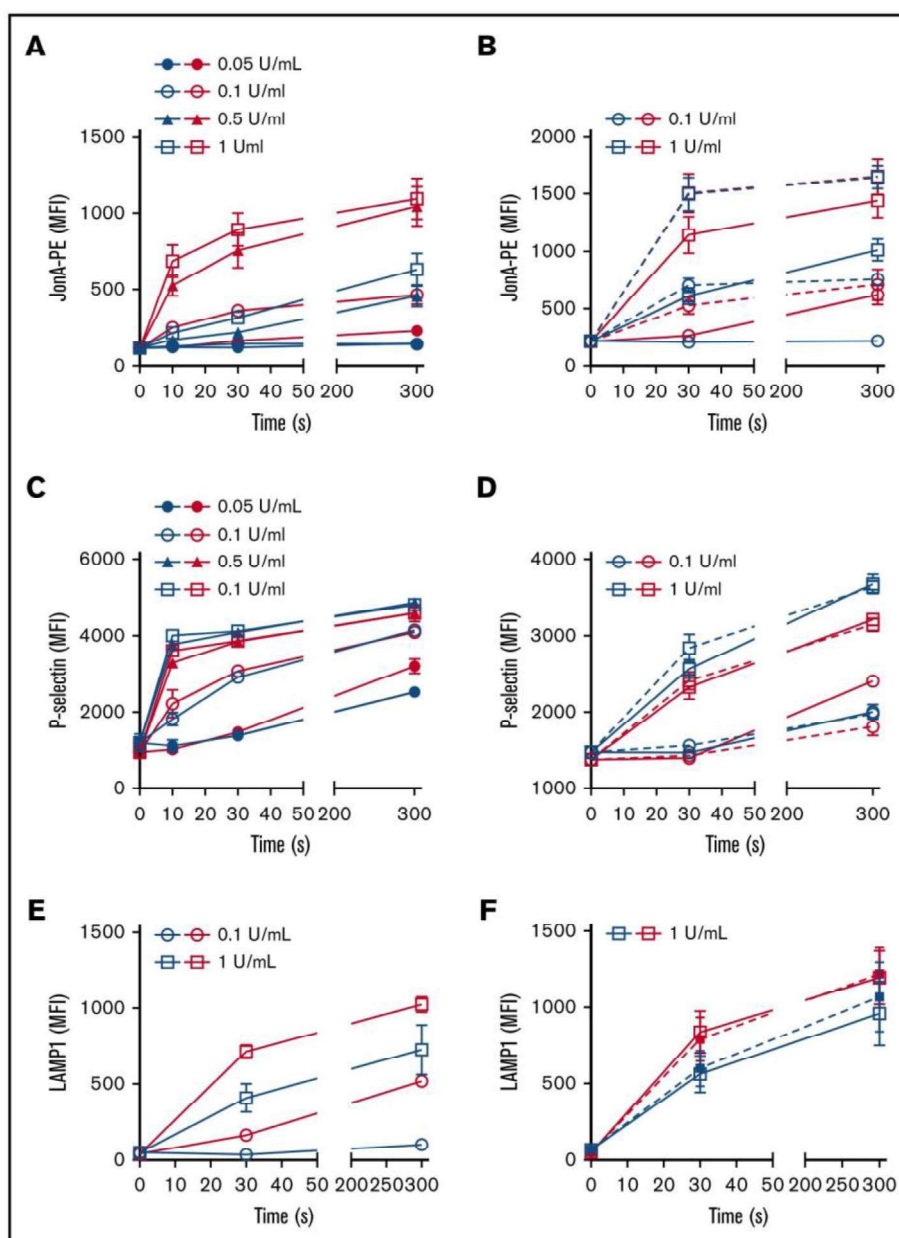


Figure 7. Thrombin-induced integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activation, P-selectin exposure and LAMP1 exposure. (A-F) Washed platelets were stimulated with increasing thrombin concentrations and periods of time (numbers in graph legend indicate the final thrombin concentration) and analyzed by flow cytometry. Red symbols, WT; blue symbols, DKO. All graphs represent mean \pm SEM for $n = 3$ independent experiments. Statistical analyses were performed using 2-way ANOVA, Bonferroni posttest, to compare differences between WT and DKO in similar stimulation conditions. (A) $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin activation as measured by JonA-PE labeling and represented as mean fluorescence intensity. At each time point and for all thrombin concentrations, DKO platelet JonA-PE labelings were significantly different from WT ones ($P < .001$), except after stimulation with 0.05 U/mL thrombin for 10 seconds, where there was no difference. (B) $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin activation in the presence (dotted lines) or absence (straight lines) of ADP (10 μM). The presence of ADP significantly increases JonA-PE labeling in DKO mice compared with absence of ADP for all conditions ($P < .001$). (C) P-selectin exposure at the surface of platelets. No significant difference was observed between WT and DKO platelets, except after stimulation with 0.05 U/mL thrombin for 300 seconds ($P < .01$). (D) P-selectin exposure in the presence (dotted lines) or absence (straight lines) of ADP (10 μM). The presence of ADP did not increase P-selectin exposure. No significant difference between WT and DKO platelets. (E, left) LAMP1 platelet surface exposure. LAMP1 exposure is significantly decreased in DKO platelets compared with WT ($P < .001$) except for 0.1 U/mL thrombin at 30 seconds. (F) Exogenous addition of 10 μM ADP (dotted lines) only partially rescued DKO platelet LAMP1 exposure in response to 1 U/mL thrombin.

varying oculocutaneous albinism, bleeding problems from defective DG biogenesis, and often lethal progressive lung fibrosis resulting from defective alveolar type II cells,⁴⁹ which closely resembles the

reported DKO phenotype. However, spontaneous mouse mutants for HPS1 (*Hps1^{ep/ep}*) and HPS4 (*Hps4^{le/le}*), do not exactly phenotypically mimic *Rab32/Rab38* DKO mice. Although both

Hps1^{ep/ep} and *Hps4^{le/le}* mutant mice display an important DG storage defect, they surprisingly have very mild coat color dilution almost exclusively visible on the ears and tail extremity.^{46,50} The observed discrepancy between *Hps* mutant mice and our DKO mice could suggest that RABs play roles independent of BLOC-3 that may account for the more severe pigmentation defect we observed. This is a likely possibility because, in melanocytes, RAB32 and RAB38 also interact with BLOC-2, AP-3, and AP-1, all proteins involved in the transport of cargos to melanosomes.⁹ In addition, we cannot exclude additional roles for RAB32 and RAB38, independent of protein trafficking.²³ Of note, RAB32 has been described as an A-kinase anchoring protein acting at the surface of human mitochondria⁵¹ and xenopus melanosome.⁵² These differences indicate that care must be taken not to consider all HPS mouse models as identical. They also point to the utility of our DKO mice as a model mimicking severe HPS, which would be especially useful to study the mechanisms leading to the biogenesis of other LROs or to evaluate the effect of treatments.

Thus, the severe hemostasis and thrombosis phenotypes in RAB32- and RAB38-deficient mice appear in line with the DG biogenesis defect. Interestingly, we observed that in DKO mice, thrombi were totally unable to grow in height, although platelets were able to adhere to the site of lesion. This was confirmed in vitro where platelets from DKO mice did not form compact aggregates on collagen under flow conditions. Accordingly, we observed a strong decrease in α IIb β 3 integrin activation in DKO platelets, explaining the platelet behavior. The defect in integrin activation was fully recovered by exogenously added ADP, suggesting that it results essentially from the absence of amplification responses by DG-secreted agonists. In addition, we observed that lysosome secretion was affected in DKO, whereas no clear defect in α granule secretion was evidenced. These data are in accordance with works from Meng et al, who evaluated light-ear mice (*Hps4^{le/le}*), showing defective platelet LAMP1 surface exposure but normal P-selectin exposure at thrombin concentration ≥ 0.05 U/mL.⁵⁰ This indicates that α -granules exocytosis at these thrombin concentrations is independent of RAB32/38. LAMP1 exposure in DKO mice was hardly compensated by ADP suggesting that RAB32 and RAB38

are involved in their secretion machinery, or alternatively that some LAMP1 is also normally expressed at the DG membrane, and thus decreased in DKO-activated platelets.

In conclusion, we showed that unlike in the rat, RAB32 and RAB38 proteins are fully redundant and specific for DG biogenesis in the mouse. Deletion of both *Rab32* and *Rab38* genes reproduces a mouse HPS model with hypopigmentation of eyes and hair, associated with lung abnormalities and decreased DGs in platelets that are totally devoid of 5-HT and lack of nucleotides, mimicking severe human HPS disease. This animal model will be a useful tool to study the role of these 2 related RABs in other LROs and to address the role of DG content in the increasing diversity of platelet-mediated processes.

Acknowledgments

The authors thank Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript.

This study was supported by the Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique and the European Union through the European Regional Development Fund. A.A. was supported by a French government fellowship.

Authorship

Contribution: A.A., F.L., C.G., and C.L. designed the research; A.A., J.W., J.B., C.Z., A.E., S.M., and C.B. conducted the experiments; M.F., B.H., and P.H.M. supervised experiments; and C.L., F.L., B.H., P.H.M., and C.G. wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: M.F., 0000-0003-2128-8114; C.G., 0000-0003-1303-4210; F.L., 0000-0002-5802-4748; C.L., 0000-0002-8597-9929.

Correspondence: Catherine Léon, UMR_S1255 INSERM–Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang, 10 rue Spielmann, B.P. N 36, 67065 Strasbourg Cedex, France; e-mail: catherine.leon@efs.sante.fr.

References

1. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-273.
2. Holmsen H, Weiss HJ. Secretory storage pools in platelets. *Annu Rev Med*. 1979;30(1):119-134.
3. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res*. 1999;95(1):1-18.
4. Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem*. 2004;279(43):44250-44257.
5. Gunay-Aygun M, Huizing M, Gahl WA. Molecular defects that affect platelet dense granules. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(5):537-547.
6. Masliah-Planchon J, Darnige L, Bellucci S. Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br J Haematol*. 2013;160(1):5-11.
7. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br J Haematol*. 2014;165(2):165-178.
8. El-Chemaly S, Young LR. Hermansky-Pudlak syndrome. *Clin Chest Med*. 2016;37(3):505-511.
9. Bultema JJ, Ambrosio AL, Burek CL, Di Pietro SM. BLOC-2, AP-3, and AP-1 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles. *J Biol Chem*. 2012;287(23):19550-19563.
10. Bultema JJ, Di Pietro SM. Cell type-specific Rab32 and Rab38 cooperate with the ubiquitous lysosome biogenesis machinery to synthesize specialized lysosome-related organelles. *Small GTPases*. 2013;4(1):16-21.

11. Wasmeier C, Romao M, Plowright L, Bennett DC, Raposo G, Seabra MC. Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes. *J Cell Biol*. 2006;175(2):271-281.
12. Heijnen HF, Debili N, Vainchencker W, Breton-Gorius J, Geuze HJ, Sixma JJ. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood*. 1998;91(7):2313-2325.
13. Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*. 2000;95(12):4004-4007.
14. Coppola U, Annona G, D'Aniello S, Ristatore F. Rab32 and Rab38 genes in chordate pigmentation: an evolutionary perspective. *BMC Evol Biol*. 2016;16(1):26.
15. Klöpper TH, Kienle N, Fasshauer D, Munro S. Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol*. 2012;10(1):71.
16. Ambrosio AL, Di Pietro SM. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. *Platelets*. 2017;28(2):138-146.
17. Ninkovic I, White JG, Rangel-Filho A, Datta YH. The role of Rab38 in platelet dense granule defects. *J Thromb Haemost*. 2008;6(12):2143-2151.
18. Oiso N, Riddle SR, Serikawa T, Kuramoto T, Spritz RA. The rat Ruby (R) locus is Rab38: identical mutations in Fawn-hooded and Tester-Moriyama rats derived from an ancestral Long Evans rat sub-strain. *Mamm Genome*. 2004;15(4):307-314.
19. Rangel-Filho A, Lazar J, Moreno C, Geurts A, Jacob HJ. Rab38 modulates proteinuria in model of hypertension-associated renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(2):283-292.
20. Osanai K. Rab38 mutation and the lung phenotype. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):E2203.
21. Loftus SK, Larson DM, Baxter LL, et al. Mutation of melanosome protein RAB38 in chocolate mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(7):4471-4476.
22. Osanai K, Oikawa R, Higuchi J, et al. A mutation in Rab38 small GTPase causes abnormal lung surfactant homeostasis and aberrant alveolar structure in mice. *Am J Pathol*. 2008;173(5):1265-1274.
23. Bowman SL, Bi-Karchin J, Le L, Marks MS. The road to LROs: insights into lysosome-related organelles from Hermansky-Pudlak syndrome and other rare diseases. *Traffic*. 2019;20(6):404-435.
24. Bultema JJ, Boyle JA, Malenke PB, et al. Myosin vc interacts with Rab32 and Rab38 proteins and works in the biogenesis and secretion of melanosomes. *J Biol Chem*. 2014;289(48):33513-33528.
25. Gerondopoulos A, Langemeyer L, Liang JR, Linford A, Barr FA. BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr Biol*. 2012;22(22):2135-2139.
26. Marubashi S, Shimada H, Fukuda M, Ohbayashi N. RUTBC1 functions as a GTPase-activating protein for Rab32/38 and regulates melanogenic enzyme trafficking in melanocytes. *J Biol Chem*. 2016;291(3):1427-1440.
27. Ambrosio AL, Boyle JA, Di Pietro SM. Mechanism of platelet dense granule biogenesis: study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system. *Blood*. 2012;120(19):4072-4081.
28. Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*. 2004;272:13-28.
29. Ren Q, Wimmer C, Chicka MC, et al. Munc13-4 is a limiting factor in the pathway required for platelet granule release and hemostasis. *Blood*. 2010;116(6):869-877.
30. Strassel C, Nonne C, Eckly A, et al. Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):241-247.
31. Léon C, Eckly A, Hechler B, et al. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood*. 2007;110(9):3183-3191.
32. Léon C, Freund M, Ravanat C, Baurand A, Cazenave JP, Gachet C. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation*. 2001;103(5):718-723.
33. Hechler B, Nonne C, Eckly A, et al. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost*. 2010;8(1):173-184.
34. Alame G, Mangin PH, Freund M, et al. EP217609, a neutralisable dual-action FIIa/FXa anticoagulant, with antithrombotic effects in arterial thrombosis. *Thromb Haemost*. 2015;113(2):385-395.
35. White JG. Structural defects in inherited and giant platelet disorders. *Adv Hum Genet*. 1990;19:133-234.
36. Reddington M, Novak EK, Hurley E, Medda C, McGarry MP, Swank RT. Immature dense granules in platelets from mice with platelet storage pool disease. *Blood*. 1987;69(5):1300-1306.
37. Hanby HA, Bao J, Noh JY, et al. Platelet dense granules begin to selectively accumulate mepacrine during proplatelet formation. *Blood Adv*. 2017;1(19):1478-1490.
38. Pertuy F, Eckly A, Weber J, et al. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood*. 2014;123(8):1261-1269.
39. White JG. Platelet granule disorders. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1986;4(4):337-377.
40. Eckly A, Hechler B, Freund M, et al. Mechanisms underlying FeCl3-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(4):779-789.
41. Bao X, Faris AE, Jang EK, Haslam RJ. Molecular cloning, bacterial expression and properties of Rab31 and Rab32. *Eur J Biochem*. 2002;269(1):259-271.

42. Zeiler M, Moser M, Mann M. Copy number analysis of the murine platelet proteome spanning the complete abundance range. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(12):3435-3445.
43. Lyerla TA, Rusiniak ME, Borchers M, et al. Aberrant lung structure, composition, and function in a murine model of Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285(3):L643-L653.
44. Ammann S, Schulz A, Krägeloh-Mann I, et al. Mutations in AP3D1 associated with immunodeficiency and seizures define a new type of Hermansky-Pudlak syndrome. *Blood*. 2016;127(8):997-1006.
45. Wei AH, Li W. Hermansky-Pudlak syndrome: pigmentary and non-pigmentary defects and their pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26(2):176-192.
46. Li W, Rusiniak ME, Chintala S, Gautam R, Novak EK, Swank RT. Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles. *BioEssays*. 2004;26(6):616-628.
47. Suzuki T, Miyamura Y, Matsunaga J, et al. Six novel P gene mutations and oculocutaneous albinism type 2 frequency in Japanese albino patients. *J Invest Dermatol*. 2003;120(5):781-783.
48. 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.
49. Young LR, Gulleman PM, Short CW, et al. Epithelial-macrophage interactions determine pulmonary fibrosis susceptibility in Hermansky-Pudlak syndrome. *JCI Insight*. 2016;1(17):e88947.
50. Meng R, Wu J, Harper DC, et al. Defective release of α granule and lysosome contents from platelets in mouse Hermansky-Pudlak syndrome models. *Blood*. 2015;125(10):1623-1632.
51. Alto NM, Soderling J, Scott JD. Rab32 is an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*. 2002;158(4):659-668.
52. Park M, Serpinskaya AS, Papalopulu N, Gelfand VI. Rab32 regulates melanosome transport in *Xenopus* melanophores by protein kinase a recruitment. *Curr Biol*. 2007;17(23):2030-2034.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbonante, Vittorio et al. 2017. "A New Path to Platelet Production through Matrix Sensing." *Haematologica* 102(7): 1150–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28411253> (November 8, 2018).
- Adamo, L et al. 2009. "Biomechanical Forces Promote Embryonic Haematopoiesis." *Nature* 459(7250): 1131–35. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19440194/> (July 29, 2021).
- Agool, Ali et al. 2011. "Radionuclide Imaging of Bone Marrow Disorders." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 38(1): 166–78.
- Aguilar, Alicia et al. 2016. "Importance of Environmental Stiffness for Megakaryocyte Differentiation and Proplatelet Formation." *Blood* 128: 2022–32.
- . 2019a. "Combined Deficiency of RAB32 and RAB38 in the Mouse Mimics Hermansky-Pudlak Syndrome and Critically Impairs Thrombosis." *Blood Advances* 3(15): 2368–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31399401> (April 28, 2020).
- . 2019b. "Combined Deficiency of RAB32 and RAB38 in the Mouse Mimics Hermansky-Pudlak Syndrome and Critically Impairs Thrombosis." *Blood Advances* 3(15): 2368–80.
- Aitsebaomo, Julius, Andrea L Portbury, Jonathan C Schisler, and Cam Patterson. 2008. "Brothers and Sisters: Molecular Insights into Arterial-Venous Heterogeneity." *Circulation research* 103(9): 929–39.
- Akashi, Koichi, David Traver, Toshihiro Miyamoto, and Irving L. Weissman. 2000. "A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages." *Nature* 404(6774): 193–97.
- Ali, Nadir, Asif Nadeem, et al. 2006. "Dengue Fever in Malaria Endemic Areas." *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 16(5): 340–42.
- Ali, Nadir, Masood Anwar, Irfan Majeed, and Waheed Uz Zaman Tariq. 2006. "Chicken Pox Associated Thrombocytopenia in Adults." *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 16(4): 270–72.
- Almeida, Filipe V. et al. 2015. "The Cytolinker Plectin Regulates Nuclear Mechanotransduction in Keratinocytes." *Journal of Cell Science* 128(24): 4475–86. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26527396/> (June 21, 2021).
- Angelopoulou, Maria et al. 2003. "Cotransplantation of Human Mesenchymal Stem Cells Enhances Human Myelopoiesis and Megakaryocytopoiesis in NOD/SCID Mice." *Experimental Hematology* 31(5): 413–20.
- Antkowiak, A. et al. 2016. "Cdc42-Dependent F-Actin Dynamics Drive Structuration of the Demarcation Membrane System in Megakaryocytes." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14(6): 1268–84. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26991240/> (June 2, 2021).
- Aragona, Mariaceleste et al. 2013. "A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors." *Cell* 154: 1047–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042> (October 5, 2017).
- Arnold, D. M. et al. 2013. "A Systematic Evaluation of Laboratory Testing for Drug-Induced Immune

- Thrombocytopenia." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11(1): 169–76. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23121994/> (June 3, 2021).
- Arsenovic, Paul T. et al. 2016. "Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension." *Biophysical Journal* 110(1): 34–43. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26745407/> (June 21, 2021).
- Asada, Noboru et al. 2017. "Differential Cytokine Contributions of Perivascular Haematopoietic Stem Cell Niches." *Nature cell biology* 19(3): 214–23.
- Asada, Noboru, Shoichiro Takeishi, and Paul S Frenette. 2017. "Complexity of Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche." *International journal of hematology* 106(1): 45–54.
- Aschoff, Ludwig. 1893. "Ueber Capilläre Embolie von Riesenkernhaltigen Zellen." *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 134(1): 11–25. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01924893> (May 18, 2021).
- Asgari, Meisam et al. 2017. "In Vitro Fibrillogenesis of Tropocollagen Type III in Collagen Type I Affects Its Relative Fibrillar Topology and Mechanics." *Scientific Reports* 7(1). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28469139/> (March 31, 2021).
- Asghar, Adil, Ravi Kant Narayan, Ashutosh Kumar, and Shagufta Naaz. 2020. "The Transcortical Vessel Is Replacement of Cortical Capillary or a Separate Identity in Diaphyseal Vascularity." *Anatomy and Cell Biology* 53(1): 107–10. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/32274255/> (March 25, 2021).
- Ashkin, A., J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu. 1986. "Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles." In *Optical Angular Momentum*, CRC Press, 196–98. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19730608/> (April 1, 2021).
- Athanassiou, G., and D. Deligianni. 2001. "Adhesion Strength of Individual Human Bone Marrow Cells to Fibronectin. Integrin B1-Mediated Adhesion." In *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, J Mater Sci Mater Med, 965–70. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15348349/> (April 1, 2021).
- Athirasala, Avathamsa, Nivi Hirsch, and Amnon Buxboim. 2017. "Nuclear Mechanotransduction: Sensing the Force from Within." *Current Opinion in Cell Biology* 46: 119–27. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28641092/> (June 22, 2021).
- Avecilla, Scott T. et al. 2004. "Chemokine-Mediated Interaction of Hematopoietic Progenitors with the Bone Marrow Vascular Niche Is Required for Thrombopoiesis." *Nature Medicine* 10(1): 64–71. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/14702636/> (April 26, 2021).
- Balduini, A. et al. 2008. "Adhesive Receptors, Extracellular Proteins and Myosin IIA Orchestrate Proplatelet Formation by Human Megakaryocytes." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6(11): 1900–1907. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/18752571/> (March 24, 2021).
- Balduini, Carlo L., and Patrizia Noris. 2014. "Platelet Count and Aging." *Haematologica* 99(6): 953–55. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24881040/> (June 8, 2021).
- Baratchi, Sara et al. 2017. "Shear Stress Regulates TRPV4 Channel Clustering and Translocation from Adherens Junctions to the Basal Membrane." *Scientific Reports* 7(1).
- Barbui, Tiziano et al. 2018. "The 2016 WHO Classification and Diagnostic Criteria for Myeloproliferative Neoplasms: Document Summary and in-Depth Discussion." *Blood cancer journal* 8(2): 15. <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0054-y>.

- Basant, Angika, and Michael Glotzer. 2018. "Spatiotemporal Regulation of RhoA during Cytokinesis." *Current Biology* 28(9): R570–80. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/29738735/> (June 1, 2021).
- Bassilana, Frederic, Mark Nash, and Marie-Gabrielle Ludwig. 2019. "Adhesion G Protein-Coupled Receptors: Opportunities for Drug Discovery." *Nature reviews. Drug discovery* 18(11): 869–84.
- Becker, Robert P., and Peter P.H. De Bruyn. 1976. "The Transmural Passage of Blood Cells into Myeloid Sinusoids and the Entry of Platelets into the Sinusoidal Circulation; a Scanning Electron Microscopic Investigation." *American Journal of Anatomy* 145(2): 183–205. <https://onlinelibrary-wiley-com.scd-rproxy.u-strasbg.fr/doi/full/10.1002/aja.1001450204> (May 18, 2021).
- Beckmann, Julia et al. 2007. "Asymmetric Cell Division within the Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Compartment: Identification of Asymmetrically Segregating Proteins." *Blood* 109(12): 5494–5501. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17332245/> (April 26, 2021).
- Begonja, Antonija Jurak et al. 2015. "FlnA Binding to PACSIN2 F-BAR Domain Regulates Membrane Tubulation in Megakaryocytes and Platelets." *Blood* 126(1): 80–88. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25838348/> (June 2, 2021).
- Behnke, Olav. 1969. "An Electron Microscope Study of the Rat Megakaryocyte. II. Some Aspects of Platelet Release and Microtubules." *Journal of ultrastructure research* 26(1): 111–29. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/5775369/> (July 27, 2021).
- Behnke, Olav, and Arthur Forer. 1998. "From Megakaryocytes to Platelets: Platelet Morphogenesis Takes Place in the Bloodstream." *European Journal of Haematology, Supplement* 60(61): 3–24. <https://onlinelibrary-wiley-com.scd-rproxy.u-strasbg.fr/doi/full/10.1111/j.1600-0609.1998.tb01052.x> (May 18, 2021).
- Behrens, Kira, and Warren S. Alexander. 2018. "Cytokine Control of Megakaryopoiesis." *Growth Factors* 36(3–4): 89–103. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08977194.2018.1498487> (February 10, 2020).
- Belamarich, Frank A., Margaret H. Fusari, David Shepro, and Marja Kien. 1966. "In Vitro Studies of Aggregation of Non-Mammalian Thrombocytes." *Nature* 212(5070): 1579–80. <https://www.nature.com/articles/2121579a0> (June 8, 2021).
- Belloc, F. et al. 1985. "Fibrinogen Synthesis by Megakaryocyte Rich Human Marrow Cell Concentrates." *Thrombosis Research* 38(4): 341–51. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/3892760/> (March 22, 2021).
- Bender, Markus et al. 2015. "Microtubule Sliding Drives Proplatelet Elongation and Is Dependent on Cytoplasmic Dynein." *Blood* 125(5): 860–68. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25411426/> (May 18, 2021).
- Bentfeld-Barker, ME, and DF Bainton. 1982. "Identification of Primary Lysosomes in Human Megakaryocytes and Platelets." *Blood* 59(3): 472–81.
- Berdyshev, Evgeny V. et al. 2005. "Quantitative Analysis of Sphingoid Base-1-Phosphates as Bisacetylated Derivatives by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Analytical Biochemistry* 339(1): 129–36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15766719/> (June 8, 2021).
- Bershadsky, Alexander D., Nathalie Q. Balaban, and Benjamin Geiger. 2003. "Adhesion-Dependent Cell Mechanosensitivity." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19: 677–95. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/14570586/> (June 10, 2021).

- Berthier, Rolande et al. 1998. "Adhesion of Mature Polyploid Megakaryocytes to Fibronectin Is Mediated by B1 Integrins and Leads to Cell Damage." *Experimental Cell Research* 242(1): 315–27. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9665829/> (June 23, 2021).
- Besancenot, Rodolphe et al. 2014. "JAK2 and MPL Protein Levels Determine TPO-Induced Megakaryocyte Proliferation vs Differentiation." *Blood* 124(13): 2104–15.
- Bianchi, Elisa et al. 2016. "Genomic Landscape of Megakaryopoiesis and Platelet Function Defects." *Blood* 127(10): 1249–59. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/10/1249/1391798/1249.pdf> (June 7, 2021).
- Bianco, Paolo. 2011. 117 *Blood Bone and the Hematopoietic Niche: A Tale of Two Stem Cells*. Blood. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21406722/> (March 25, 2021).
- Binnig, G., C. F. Quate, and Ch Gerber. 1986. "Atomic Force Microscope." *Physical Review Letters* 56(9): 930–33. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/10033323/> (March 31, 2021).
- Birbrair, Alexander, and Paul S. Frenette. 2016. 1370 *Annals of the New York Academy of Sciences Niche Heterogeneity in the Bone Marrow*. Blackwell Publishing Inc.
- Bixel, M. Gabriele et al. 2017. "Flow Dynamics and HSPC Homing in Bone Marrow Microvessels." *Cell Reports* 18(7): 1804–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.042> (April 2, 2021).
- Bizzozzero, Julius. 1882. "Ueber Einen Neuen Formbestandtheil Des Blutes Und Dessen Rolle Bei Der Thrombose Und Der Blutgerinnung - Untersuchungen." *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 90(2): 261–332. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01931360> (June 8, 2021).
- Blin, Antoine et al. 2016. "Microfluidic Model of the Platelet-Generating Organ: Beyond Bone Marrow Biomimetics." *Scientific Reports* 6. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26898346/> (May 18, 2021).
- Boneu, B., and Jean-Pierre Cazenave. 1997. *Introduction à l'étude de l'hémostase et de La Thrombose - 2ème Édition*. I. ed. Laboratoire Millot. <https://www.amazon.fr/Introduction-à-létude-lhémostase-thrombose/dp/B0014L9NB6> (June 8, 2021).
- Bonnans, Caroline, Jonathan Chou, and Zena Werb. 2014. "Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(12): 786–801. [/pmc/articles/PMC4316204/](http://pmc/articles/PMC4316204/) (March 24, 2021).
- Bornert, Alicia et al. 2020. "Cytoskeletal-Based Mechanisms Differently Regulate in Vivo and in Vitro Proplatelet Formation." *Haematologica* 106(5): haematol.2019.239111. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/32327502/> (May 17, 2021).
- Boscher, Julie et al. 2020. "Blood Platelet Formation at a Glance." *Journal of cell science* 133(20). <https://jcs-biologists-org.scd-rproxy.u-strasbg.fr/content/133/20/jcs244731> (November 25, 2020).
- Le Bousse-Kerdilès, Marie Caroline. 2012. "Primary Myelofibrosis and the 'Bad Seeds in Bad Soil' Concept." *Fibrogenesis and Tissue Repair* 5(SUPPL.1). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23259918/> (May 30, 2021).
- Brangwynne, Clifford P. et al. 2006. "Microtubules Can Bear Enhanced Compressive Loads in Living Cells Because of Lateral Reinforcement." *Journal of Cell Biology* 173(5): 733–41. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16754957/> (June 19, 2021).
- Brown, Edward et al. 2018. "Multiple Membrane Extrusion Sites Drive Megakaryocyte Migration into

- Bone Marrow Blood Vessels." *Life Science Alliance* 1(2): e201800061. <http://www.life-science-alliance.org/lookup/doi/10.26508/lsa.201800061> (October 18, 2018).
- Brummendorf, Tim H. et al. 1998. "Asymmetric Cell Divisions Sustain Long-Term Hematopoiesis from Single- Sorted Human Fetal Liver Cells." *Journal of Experimental Medicine* 188(6): 1117–24. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9743530/> (April 26, 2021).
- Bruns, I et al. 2014. "Megakaryocytes Regulate Hematopoietic Stem Cell Quiescence through CXCL4 Secretion." *Nature medicine* 20(11): 1315–20. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25326802/> (July 28, 2021).
- De Bruyn, Peter P.H., Philip C. Breen, and Thurlo B. Thomas. 1970. "The Microcirculation of the Bone Marrow." *The Anatomical Record* 168(1): 55–68.
- Bryder, D, DJ Rossi, and IL Weissman. 2006. "Hematopoietic Stem Cells: The Paradigmatic Tissue-Specific Stem Cell." *The American journal of pathology* 169(2): 439–43. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16877336/> (July 29, 2021).
- Di Buduo, Christian A. et al. 2015. "Programmable 3D Silk Bone Marrow Niche for Platelet Generation Ex Vivo and Modeling of Megakaryopoiesis Pathologies." *Blood* 125(14): 2254–64.
- . 2021. "Latest Culture Techniques: Cracking the Secrets of Bone Marrow to Mass-Produce Erythrocytes and Platelets <i>Ex Vivo</i>." *Haematologica*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33472355/> (March 17, 2021).
- Di Buduo, Christian Andrea et al. 2014. "The Importance of Calcium in the Regulation of Megakaryocyte Function." *Haematologica* 99(4): 769–78.
- Bunn, H. Franklin, and Jon C. Aster. 2017. *Pathophysiology of Blood Disorders, 2e*. McGraw-Hill Education LLC.
- Bunting, Stuart et al. 1997. "Normal Platelets and Megakaryocytes Are Produced in Vivo in the Absence of Thrombopoietin." *Blood* 90(9): 3423–29.
- Burridge, Keith. 2018. "Focal Adhesions: A Personal Perspective on a Half Century of Progress." *The FEBS journal* 284(20): 3355–61.
- Calderwood, David A., Sanford J. Shattil, and Mark H. Ginsberg. 2000. "Integrins and Actin Filaments: Reciprocal Regulation of Cell Adhesion and Signaling." *Journal of Biological Chemistry* 275(30): 22607–10. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/10801899/> (June 23, 2021).
- Camacho, Natalia et al. 2010. "Dominant TRPV4 Mutations in Nonlethal and Lethal Metatropic Dysplasia." *American Journal of Medical Genetics, Part A* 152(5): 1169–77. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20169191/> (October 20, 2020).
- Capodanno, D., J. L. Ferreira, and D. J. Angiolillo. 2013. "Antiplatelet Therapy: New Pharmacological Agents and Changing Paradigms." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11(SUPPL.1): 316–29. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23809135/> (June 7, 2021).
- Carrelha, Joana et al. 2018. "Hierarchically Related Lineage-Restricted Fates of Multipotent Haematopoietic Stem Cells." *Nature* 554(7690): 106–11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29298288/> (March 20, 2020).
- Cazenave, JP, MA Packham, MA Guccione, and JF Mustard. 1973. "Effects of Penicillin G on Platelet Aggregation, Release, and Adherence to Collagen." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 142(1): 159–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4683235/> (July 6, 2021).

- Chachisvilis, Mirianas, Yan Liang Zhang, and John A. Frangos. 2006. "G Protein-Coupled Receptors Sense Fluid Shear Stress in Endothelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(42): 15463–68. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17030791/> (June 10, 2021).
- Chai, Hao et al. 2019. "Structure-Based Discovery of a Subtype-Selective Inhibitor Targeting a Transient Receptor Potential Vanilloid Channel." *Journal of Medicinal Chemistry* 62(3): 1373–84. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (March 15, 2021).
- Chambliss, Allison B. et al. 2013. "The LINC-Anchored Actin Cap Connects the Extracellular Milieu to the Nucleus for Ultrafast Mechanotransduction." *Scientific Reports* 3. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23336069/> (June 21, 2021).
- Chang, Y., D. Bluteau, N. Debili, and William Vainchenker. 2007. "From Hematopoietic Stem Cells to Platelets." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(SUPPL. 1): 318–27. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17635743/> (May 15, 2020).
- Chao, Yuelin et al. 2018. "Low Shear Stress Induces Endothelial Reactive Oxygen Species via the AT1R/ENOS/NO Pathway." *Journal of Cellular Physiology* 233(2): 1384–95. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28518223/> (April 2, 2021).
- Chaudhuri, Ovijit et al. 2020. "Effects of Extracellular Matrix Viscoelasticity on Cellular Behaviour." *Nature* 584(7822): 535–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32848221> (September 4, 2020).
- Chen, Christopher S. 2008. "Mechanotransduction - A Field Pulling Together?" *Journal of Cell Science* 121(20): 3285–92. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/18843115/> (June 10, 2021).
- Chen, Christopher S, John Tan, and Joe Tien. 2004. "Mechanotransduction at Cell-Matrix and Cell-Cell Contacts." *Annual Review of Biomedical Engineering* 6: 275–302. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15255771/> (June 21, 2021).
- Chen, Shilei et al. 2016. "Sympathetic Stimulation Facilitates Thrombopoiesis by Promoting Megakaryocyte Adhesion, Migration, and Proplatelet Formation." *Blood* 127(8): 1024–35. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26644453/> (May 27, 2021).
- . 2018. "IGF-1 Facilitates Thrombopoiesis Primarily through Akt Activation." *Blood* 132(2): 210–22. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/29802222/> (April 28, 2021).
- Chen, Xiaojie, Nicole Alessandri-Haber, and Jon D. Levine. 2007. "Marked Attenuation of Inflammatory Mediator-Induced C-Fiber Sensitization for Mechanical and Hypotonic Stimuli in TRPV4-/- Mice." *Molecular Pain* 3. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17967183/> (June 23, 2021).
- Chen, Yolande et al. 2013. "Loss of the F-BAR Protein CIP4 Reduces Platelet Production by Impairing Membrane-Cytoskeleton Remodeling." *Blood* 122(10): 1695–1706. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23881916/> (June 2, 2021).
- Chen, Zhao et al. 2007. "The May-Hegglin Anomaly Gene MYH9 Is a Negative Regulator of Platelet Biogenesis Modulated by the Rho-ROCK Pathway." *Blood* 110(1): 171–79.
- Cheng, Ee-Chun et al. 2009. "Role for MKL1 in Megakaryocytic Maturation." *Blood* 113: 2826–34. <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/113/12/2826.full.pdf> (May 22, 2017).
- Cheng, Ee Chun et al. 2009. "Role for MKL1 in Megakaryocytic Maturation." *Blood* 113(12): 2826–34. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19136660/> (June 16, 2021).

- Cheng, Linzhao, Pankaj Qasba, Padmavathy Vanguri, and Mark A Thiede. 2000. "Human Mesenchymal Stem Cells Support Megakaryocyte and Pro-Platelet Formation From CD34 Hematopoietic Progenitor Cells." *J. Cell. Physiol* 184: 58–69.
- Chitu, Violeta, and E. Richard Stanley. 2015. "PACSIN2: A BAR-Rier Forming the Megakaryocyte DMS." *Blood* 126(1): 5–6. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26138537/> (June 2, 2021).
- Cho, Sangkyun, Jerome Irianto, and Dennis E. Discher. 2017. "Mechanosensing by the Nucleus: From Pathways to Scaling Relationships." *Journal of Cell Biology* 216(2): 305–15. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28043971/> (June 21, 2021).
- Choi, E S et al. 1995. "Platelets Generated in Vitro from Proplatelet-Displaying Human Megakaryocytes Are Functional." *Blood* 85(2): 402–13.
- Chow, Andrew et al. 2013. "CD169 + Macrophages Provide a Niche Promoting Erythropoiesis under Homeostasis and Stress." *Nature Medicine* 19(4): 429–36. <https://www.nature.com/articles/nm.3057> (January 20, 2021).
- Christensen, Adam P., and David P. Corey. 2007. "TRP Channels in Mechanosensation: Direct or Indirect Activation?" *Nature Reviews Neuroscience* 8(7): 510–21. www.nature.com/reviews/neuro (October 14, 2020).
- Clapham, David E. 2003. "TRP Channels as Cellular Sensors." *Nature* 426(6966): 517–24. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/14654832/> (June 23, 2021).
- Clapham, David E, David Julius, Craig Montell, and Günter Schultz. 2005. "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels." *Pharmacological reviews* 57(4): 427–50.
- Clara-Trujillo, Sandra, Gloria Gallego Ferrer, and José Luis Gómez Ribelles. 2020. "In Vitro Modeling of Non-Solid Tumors: How Far Can Tissue Engineering Go?" *International Journal of Molecular Sciences* 21(16): 1–31. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/32796596/> (March 25, 2021).
- Cline, J. M., and R. R. Maronpot. 1985. "Variations in the Histologic Distribution of Rat Bone Marrow Cells with Respect to Age and Anatomic Site." *Toxicologic Pathology* 13(4): 349–55.
- Cortin, Valérie et al. 2005. "Efficient in Vitro Megakaryocyte Maturation Using Cytokine Cocktails Optimized by Statistical Experimental Design." *Experimental Hematology* 33(10): 1182–91. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16219540/> (July 4, 2021).
- Coste, Bertrand et al. 2010. "Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels." *Science (New York, N.Y.)* 330(6000): 55–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813920> (February 26, 2018).
- Coşkun, Süleyman et al. 2014. "Development of the Fetal Bone Marrow Niche and Regulation of HSC Quiescence and Homing Ability by Emerging Osteolineage Cells." *Cell Reports* 9(2): 581–90. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25310984/> (May 19, 2021).
- Coutu, Daniel L., Konstantinos D. Kokkalias, Leo Kunz, and Timm Schroeder. 2017. "Three-Dimensional Map of Nonhematopoietic Bone and Bone-Marrow Cells and Molecules." *Nature Biotechnology* 35(12): 1202–10. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/29131149/> (March 17, 2021).
- Cramer, Elisabeth M. et al. 1997. "Ultrastructure of Platelet Formation by Human Megakaryocytes Cultured with the Mpl Ligand." *Blood* 89(7): 2336–46.

- Cramer, Louise P., Margaret Siebert, and Timothy J. Mitchison. 1997. "Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force." *Journal of Cell Biology* 136(6): 1287–1305. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9087444/> (June 21, 2021).
- Crisp, Melissa et al. 2006. "Coupling of the Nucleus and Cytoplasm: Role of the LINC Complex." *Journal of Cell Biology* 172(1): 41–53. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16380439/> (June 21, 2021).
- Cui, Yidan et al. 2015. "Cyclic Stretching of Soft Substrates Induces Spreading and Growth." *Nature Communications* 6(1): 1–8. www.nature.com/naturecommunications (June 16, 2021).
- Cumano, Ana et al. 2001. "Intraembryonic, but Not Yolk Sac Hematopoietic Precursors, Isolated before Circulation, Provide Long-Term Multilineage Reconstitution." *Immunity* 15(3): 477–85.
- Daly, Martina E. 2011. "Determinants of Platelet Count in Humans." *Haematologica* 96(1): 10–13. www.icmje.org (May 17, 2021).
- Damann, Nils, Thomas Voets, and Bernd Nilius. 2008. "TRPs in Our Senses." *Current Biology* 18(18). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/18812089/> (June 23, 2021).
- Das, Arupratan, Robert S Fischer, Duoqia Pan, and Clare M Waterman. 2016. "YAP Nuclear Localization in the Absence of Cell-Cell Contact Is Mediated by a Filamentous Actin-Dependent, Myosin II- and Phospho-YAP-Independent Pathway during Extracellular Matrix Mechanosensing." *The Journal of biological chemistry* 291(12): 6096–6110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26757814> (November 10, 2017).
- Delmas, Patrick, and Bertrand Coste. 2013. "Mechano-Gated Ion Channels in Sensory Systems." *Cell* 155(2): 278. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24120130/> (June 10, 2021).
- Demange, Elise et al. 2013. "Survival of Cord Blood Haematopoietic Stem Cells in a Hyaluronan Hydrogel for Ex Vivo Biomimicry." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 7(11): 901–10. <https://onlinelibrary-wiley-com.scd-rproxy.u-strasbg.fr/doi/full/10.1002/term.1482> (July 4, 2021).
- Deutsch, Varda R., and Aaron Tomer. 2006. "Megakaryocyte Development and Platelet Production." *British Journal of Haematology* 134(5): 453–66. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2006.06215.x> (May 22, 2017).
- Diaz, MF et al. 2015. "Biomechanical Forces Promote Blood Development through Prostaglandin E2 and the CAMP-PKA Signaling Axis." *The Journal of experimental medicine* 212(5): 665–80. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25870199/> (July 29, 2021).
- Ding, Lei, Thomas L. Saunders, Grigori Enikolopov, and Sean J. Morrison. 2012. "Endothelial and Perivascular Cells Maintain Haematopoietic Stem Cells." *Nature* 481(7382): 457–62. <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/> (January 19, 2021).
- Discher, Dennis E., Paul Janmey, and Yu Li Wang. 2005. "Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate." *Science* 310(5751): 1139–43. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16293750/> (June 10, 2021).
- Discher, Dennis E., David J. Mooney, and Peter W. Zandstra. 2009. "Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells." *Science* 324(5935): 1673–77. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19556500/> (June 10, 2021).
- Doñate-Macián, Pau et al. 2019. "Trafficking of Stretch-Regulated TRPV2 and TRPV4 Channels

- Inferred through Interactomics." *Biomolecules* 9(12). /pmc/articles/PMC6995547/ (March 15, 2021).
- Doobaree, Indraraj Umesh et al. 2019. "Primary Immune Thrombocytopenia (ITP) Treated with Romiplostim in Routine Clinical Practice: Retrospective Study from the United Kingdom ITP Registry." *European journal of haematology* 102(5): 416–23. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/30758874/> (July 29, 2021).
- Drury, D. R., and Philip D. McMaster. 1929. "THE LIVER AS THE SOURCE OF FIBRINOGEN." *The Journal of Experimental Medicine* 50(5): 569. /pmc/articles/PMC2131651/?report=abstract (August 2, 2021).
- Du, Jing et al. 2011. "Integrin Activation and Internalization on Soft ECM as a Mechanism of Induction of Stem Cell Differentiation by ECM Elasticity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(23): 9466–71.
- Le Duc, Quint et al. 2010. "Vinculin Potentiates E-Cadherin Mechanosensing and Is Recruited to Actin-Anchored Sites within Adherens Junctions in a Myosin II-Dependent Manner." *Journal of Cell Biology* 189(7): 1107–15. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20584916/> (June 22, 2021).
- Dunois-Lardé, Claire et al. 2009. "Exposure of Human Megakaryocytes to High Shear Rates Accelerates Platelet Production." *Blood* 114(9): 1875–83. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19525480/> (May 18, 2021).
- Dupont, Sirio et al. 2011. "Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction." *Nature* 474: 179–83. <https://www.nature.com/nature/journal/v474/n7350/pdf/nature10137.pdf> (May 22, 2017).
- Dütting, Sebastian et al. 2017. "A Cdc42/RhoA Regulatory Circuit Downstream of Glycoprotein Ib Guides Transendothelial Platelet Biogenesis." *Nature Communications* 8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643773/> (June 8, 2021).
- Eckly, A. et al. 2010. "Proplatelet Formation Deficit and Megakaryocyte Death Contribute to Thrombocytopenia in Myh9 Knockout Mice." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8(10): 2243–51.
- Eckly, Anita et al. 2009. "Abnormal Megakaryocyte Morphology and Proplatelet Formation in Mice with Megakaryocyte-Restricted MYH9 Inactivation." *Blood* 113(14): 3182–89. <https://ashpublications.org/blood/article/113/14/3182/24828/Abnormal-megakaryocyte-morphology-and-proplatelet> (January 4, 2021).
- . 2012. "Characterization of Megakaryocyte Development in the Native Bone Marrow Environment." *Methods in Molecular Biology* 788(March 2016): 175–92.
- . 2014. "Biogenesis of the Demarcation Membrane System (DMS) in Megakaryocytes." *Blood* 123(6): 921–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152908> (May 10, 2017).
- . 2020. "Megakaryocytes Use in Vivo Podosome-like Structures Working Collectively to Penetrate the Endothelial Barrier of Bone Marrow Sinusoids." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18(11): 2987–3001. <https://onlinelibrary-wiley-com.scd-rproxy.u-strasbg.fr/doi/full/10.1111/jth.15024> (May 18, 2021).
- Eisbacher, M. et al. 2003. "Protein-Protein Interaction between Fli-1 and GATA-1 Mediates Synergistic Expression of Megakaryocyte-Specific Genes through Cooperative DNA Binding." *Molecular and Cellular Biology* 23(10): 3427–41.
- El-Badri, N. S., B. Y. Wang, Cherry, and R. A. Good. 1998. "Osteoblasts Promote Engraftment of

- Allogeneic Hematopoietic Stem Cells." *Experimental Hematology* 26(2): 110–16. <https://europepmc.org/article/med/9472800> (January 19, 2021).
- Ema, Hideo, and Hiromitsu Nakauchi. 2000. "Expansion of Hematopoietic Stem Cells in the Developing Liver of a Mouse Embryo." *Blood* 95(7): 2284–88. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/10733497/> (May 19, 2021).
- Engler, Adam J., Shamik Sen, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher. 2006. "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." *Cell* 126(4): 677–89.
- Eto, Koji, and Shinji Kunishima. 2016. "Linkage between the Mechanisms of Thrombocytopenia and Thrombopoiesis." *Blood* 127(10): 1234–41. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26787737/> (June 7, 2021).
- Even-Ram, Sharona et al. 2007. "Myosin IIA Regulates Cell Motility and Actomyosin-Microtubule Crosstalk." *Nature Cell Biology* 9(3): 299–309. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17310241/> (June 21, 2021).
- Everaerts, Wouter, Bernd Nilius, and Grzegorz Owsianik. 2010. "The Vanilloid Transient Receptor Potential Channel TRPV4: From Structure to Disease." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 103(1): 2–17. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19835908/> (March 23, 2021).
- Fang, Xiang Zhi et al. 2021. "Structure, Kinetic Properties and Biological Function of Mechanosensitive Piezo Channels." *Cell and Bioscience* 11(1). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/33422128/> (June 21, 2021).
- Farrens, David L. et al. 1996. "Requirement of Rigid-Body Motion of Transmembrane Helices for Light Activation of Rhodopsin." *Science* 274(5288): 768–70. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/8864113/> (July 5, 2021).
- Fedorchak, Gregory R., Ashley Kaminski, and Jan Lammerding. 2014. "Cellular Mechanosensing: Getting to the Nucleus of It All." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 115(2–3): 76–92. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25008017/> (June 21, 2021).
- Ferguson, Gabriel B., and Julian A. Martinez-Agosto. 2014. "Yorkie and Scalloped Signaling Regulates Notch-Dependent Lineage Specification during Drosophila Hematopoiesis." *Current Biology* 24(22): 2665–72. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25454586/> (June 15, 2021).
- Filippi, Marie-Dominique. 2015. "Immunobiology: Neutrophil Actin Regulation: MKL1 Is in Control." *Blood* 126(13): 1519. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/264582329/> (August 4, 2021).
- Flaumenhaft, Robert, and Anish Sharda. 2018. "The Life Cycle of Platelet Granules." *F1000Research* 7. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/29560259/> (April 27, 2021).
- Fletcher, Daniel A., and R. Dyche Mullins. 2010. "Cell Mechanics and the Cytoskeleton." *Nature* 463(7280): 485–92. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20110992/> (June 21, 2021).
- Fouchard, Jonathan, Démosthène Mitrossilis, and Atef Asnacios. 2011. "Acto-Myosin Based Response to Stiffness and Rigidity Sensing." *Cell Adhesion and Migration* 5(1): 16–19. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20818154/> (June 21, 2021).
- Fox, Norma E., and Kenneth Kaushansky. 2005. "Engagement of Integrin A4β1 Enhances Thrombopoietin-Induced Megakaryopoiesis." *Experimental Hematology* 33(1): 94–99. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15661402/> (June 23, 2021).

- Franchini, Massimo, Dino Veneri, and Giuseppe Lippi. 2017. "Thrombocytopenia and Infections." *Expert Review of Hematology* 10(1): 99–106. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27936979/> (June 3, 2021).
- Friedenstein, A., J. F. Gorskaja, and N. Kulagina. 1976. "Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs." *undefined*.
- Gachet, C. 2015. "Antiplatelet Drugs: Which Targets for Which Treatments?" *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13(S1): S313–22. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26149041/> (June 7, 2021).
- Galbraith, Catherine G., Kenneth M. Yamada, and Michael P. Sheetz. 2002. "The Relationship between Force and Focal Complex Development." *Journal of Cell Biology* 159(4): 695–705. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12446745/> (June 23, 2021).
- Gao, Yuan et al. 2012. "Role of RhoA-Specific Guanine Exchange Factors in Regulation of Endomitosis in Megakaryocytes." *Developmental Cell* 22(3): 573–84. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22387001/> (April 27, 2021).
- Ge, Jingpeng et al. 2015. "Architecture of the Mammalian Mechanosensitive Piezo1 Channel." *Nature* 527(7576): 64–69. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26390154/> (June 22, 2021).
- Geddis, Amy E., Norma E. Fox, Eugene Tkachenko, and Kenneth Kaushansky. 2007. "Endomitotic Megakaryocytes That Form a Bipolar Spindle Exhibit Cleavage Furrow Ingression Followed by Furrow Regression." *Cell Cycle* 6(4): 455–60. <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20http://www.landbioscience.com/journals/cc/abstract.php?id=3837> (April 27, 2021).
- Geiger, Benjamin, Joachim P. Spatz, and Alexander D. Bershadsky. 2009. "Environmental Sensing through Focal Adhesions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(1): 21–33. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19197329/> (June 10, 2021).
- Gekas, Christos, Francoise Dieterlen-Lièvre, Stuart H. Orkin, and Hanna K.A. Mikkola. 2005. "The Placenta Is a Niche for Hematopoietic Stem Cells." *Developmental Cell* 8(3): 365–75.
- Georges, Penelope C et al. 2007. "Increased Stiffness of the Rat Liver Precedes Matrix Deposition: Implications for Fibrosis." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 293(6): G1147-54.
- Ghalloussi, Dorsaf, Ankita Dhenge, and Wolfgang Bergmeier. 2019. "New Insights into Cytoskeletal Remodeling during Platelet Production." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 17(9): 1430–39. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/31220402/> (May 18, 2021).
- di Giacomo, Fabio et al. 2012. "Heparan Sulfate Mimetics Can Efficiently Mobilize Long-Term Hematopoietic Stem Cells." *Haematologica* 97(4): 491–99. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22180429/> (March 24, 2021).
- Gianelli, Umberto et al. 2012. "The European Consensus on Grading of Bone Marrow Fibrosis Allows a Better Prognostication of Patients with Primary Myelofibrosis." *Modern Pathology* 25(9): 1193–1202. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22627739/> (April 5, 2021).
- . 2017. "The Myeloproliferative Neoplasms, Unclassifiable: Clinical and Pathological Considerations." *Modern Pathology* 30(2): 169–79. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27739437/> (April 5, 2021).
- Gilles, Laure et al. 2009. "MAL/SRF Complex Is Involved in Platelet Formation and Megakaryocyte

- Migration by Regulating MYL9 (MLC2) and MMP9." *Blood* 114(19): 4221–32. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19724058/> (June 16, 2021).
- Goldman, Robert D., Boris Grin, Melissa G. Mendez, and Edward R. Kuczmarski. 2008. "Intermediate Filaments: Versatile Building Blocks of Cell Structure." *Current Opinion in Cell Biology* 20(1): 28–34. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/18178072/> (June 21, 2021).
- Goncharova, Valentina et al. 2012. "Hyaluronan Expressed by the Hematopoietic Microenvironment Is Required for Bone Marrow Hematopoiesis." *Journal of Biological Chemistry* 287(30): 25419–33. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22654110/> (March 24, 2021).
- Goodell, Margaret A. et al. 1996. "Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells That Are Replicating in Vivo." *Journal of Experimental Medicine* 183(4): 1797–1806. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/8666936/> (April 26, 2021).
- De Graaf, Carolyn A. et al. 2010. "Regulation of Hematopoietic Stem Cells by Their Mature Progeny." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(50): 21689–94. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21115812/> (January 21, 2021).
- de Graaf, Carolyn A., and Donald Metcalf. 2011. "Thrombopoietin and Hematopoietic Stem Cells." *Cell Cycle* 10(10): 1582–89. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.10.10.15619> (March 18, 2020).
- Greenberg, Michael J., Göker Arpağ, Erkan Tüzel, and E. Michael Ostap. 2016. "A Perspective on the Role of Myosins as Mechanosensors." *Biophysical Journal* 110(12): 2568–76. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27332116/> (June 21, 2021).
- Grove, LM et al. 2019. "Translocation of TRPV4-PI3Ky Complexes to the Plasma Membrane Drives Myofibroblast Transdifferentiation." *Science signaling* 12(607). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/31719171/> (July 27, 2021).
- Grüneboom, Anika et al. 2019. "A Network of Trans-Cortical Capillaries as Mainstay for Blood Circulation in Long Bones." *Nature Metabolism* 1(2): 236–50. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/31620676/> (March 25, 2021).
- Gu, Yu Chen et al. 2003. "Laminin Isoform-Specific Promotion of Adhesion and Migration of Human Bone Marrow Progenitor Cells." *Blood* 101(3): 877–85. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12393739/> (March 24, 2021).
- Gumbiner, B., B. Stevenson, and A. Grimaldi. 1988. "The Role of the Cell Adhesion Molecule Uvomorulin in the Formation and Maintenance of the Epithelial Junctional Complex." *The Journal of cell biology* 107(4): 1575–87. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/3049625/> (June 22, 2021).
- Gumbiner, Barry M. 2005. "Regulation of Cadherin-Mediated Adhesion in Morphogenesis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6(8): 622–34. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16025097/> (June 22, 2021).
- Guo, Tianyu et al. 2015. "Megakaryopoiesis and Platelet Production: Insight into Hematopoietic Stem Cell Proliferation and Differentiation." *Stem cell investigation* 2: 3.
- Gurevitch, Olga, Shimon Slavin, and Anatol G Feldman. 2007. "Conversion of Red Bone Marrow into Yellow - Cause and Mechanisms." *Medical Hypotheses* 69(3): 531–36. <http://intl.elsevierhealth.com/journals/mehy> (April 28, 2020).
- Gurkan, Umut Atakan, and Ozan Akkus. 2008. "The Mechanical Environment of Bone Marrow: A

- Review." *Annals of Biomedical Engineering* 36(12): 1978–91.
- Gurney, Austin L., Karen Carver-Moore, Frederic J. De Sauvage, and Mark W. Moore. 1994. "Thrombocytopenia in C-Mpl-Deficient Mice." *Science* 265(5177): 1445–47.
- Guthold, M. et al. 2007. "A Comparison of the Mechanical and Structural Properties of Fibrin Fibers with Other Protein Fibers." *Cell Biochemistry and Biophysics* 49(3): 165–81. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/17952642/> (March 22, 2021).
- H, Niazi et al. 2019. "Murine Platelet Production Is Suppressed by S1P Release in the Hematopoietic Niche, Not Facilitated by Blood S1P Sensing." *Blood advances* 3(11): 1702–13. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/31171507/> (July 6, 2021).
- Haas, Simon et al. 2015. "Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors." *Cell stem cell* 17(4): 422–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299573> (March 20, 2020).
- Hagiwara, T et al. 1996. "Expression of Adhesion Molecules on Cytoplasmic Processes of Human Megakaryocytes." *Experimental hematology* 24(6): 690–95.
- Halder, Georg, Sirio Dupont, and Stefano Piccolo. 2012. "Transduction of Mechanical and Cytoskeletal Cues by YAP and TAZ." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(9): 591–600. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/22895435/> (June 15, 2021).
- Haliloglu, Goknur et al. 2017. "Recessive PIEZO2 Stop Mutation Causes Distal Arthrogryposis with Distal Muscle Weakness, Scoliosis and Proprioception Defects." *Journal of Human Genetics* 62(4): 497–501. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/27974811/> (June 22, 2021).
- Hamann, Jörg et al. 2015. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G Protein-Coupled Receptors." *Pharmacological reviews* 67(2): 338–67.
- Handagama, P., R. M. Scarborough, M. A. Shuman, and D. F. Bainton. 1993. "Endocytosis of Fibrinogen into Megakaryocyte and Platelet α -Granules Is Mediated by α (IIb)B3 (Glycoprotein IIb-IIIa)." *Blood* 82(1): 135–38.
- Handel, T. M. et al. 2005. "Regulation of Protein Function by Glycosaminoglycans - As Exemplified by Chemokines." *Annual Review of Biochemistry* 74: 385–410. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/15952892/> (March 24, 2021).
- Harburger, David S., and David A. Calderwood. 2009. "Integrin Signalling at a Glance." *Journal of Cell Science* 122(2): 159–63. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/19118207/> (June 23, 2021).
- Hardouin, Pierre, Tareck Rharass, and Stéphanie Lucas. 2016. "Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue?" *Frontiers in Endocrinology* 7: 85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27445987> (April 28, 2020).
- Harper, Alan G.S., and Stewart O. Sage. 2016. "TRP-Na⁺/Ca²⁺exchanger Coupling." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer New York LLC, 67–85. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/27161225/> (June 23, 2021).
- Hartsock, Robert J. et al. 1965. "Normal Variations with Aging of the Amount of Hematopoietic Tissue in Bone Marrow from the Anterior Iliac Crest: A Study Made from 177 Cases of Sudden Death Examined by Necropsy." *American Journal of Clinical Pathology* 43(4): 326–31.
- Herrmann, Harald et al. 2007. "Intermediate Filaments: From Cell Architecture to Nanomechanics." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:7 8(7): 562–73.

- <https://www.nature.com/articles/nrm2197> (July 30, 2021).
- Hirata, Hiroaki, Hitoshi Tatsumi, Kimihide Hayakawa, and Masahiro Sokabe. 2015. "Non-Channel Mechanosensors Working at Focal Adhesion-Stress Fiber Complex." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 467(1): 141–55. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24965068/> (June 21, 2021).
- Hitchcock, Ian S., and Kenneth Kaushansky. 2014. "Thrombopoietin from Beginning to End." *British Journal of Haematology* 165(2): 259–68. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24499199/> (March 9, 2021).
- Hosokawa, A., and T. Otani. 1997. "Ultrasonic Wave Propagation in Bovine Cancellous Bone." *The Journal of the Acoustical Society of America* 101(1): 558–62. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9000743/> (April 1, 2021).
- Howell, W. H., and D. D. Donahue. 1937. "The Production of Blood Platelets in the Lungs." *Journal of Experimental Medicine* 65(2): 177–204. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19870594/> (May 18, 2021).
- Huang, Hui et al. 2009. "Differentiation-Dependent Interactions between RUNX-1 and FLI-1 during Megakaryocyte Development." *Molecular and Cellular Biology* 29(15): 4103–15. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19470763/> (April 28, 2021).
- Huang, Hui, and Alan B Cantor. 2009. "Common Features of Megakaryocytes and Hematopoietic Stem Cells: What's the Connection?" *Journal of Cellular Biochemistry* 107(5): 857–64.
- Huang, Xiangwei et al. 2012a. "Matrix Stiffness-Induced Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Intrinsic Mechanotransduction." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47(3): 340–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461426> (May 29, 2017).
- . 2012b. "Matrix Stiffness-Induced Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Intrinsic Mechanotransduction." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 47(3): 340–48. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22461426/> (June 14, 2021).
- Huizing, M., Y. Anikster, and W. A. Gahl. 2001. "Hermansky-Pudlak Syndrome and Chediak-Higashi Syndrome: Disorders of Vesicle Formation and Trafficking." *Thrombosis and Haemostasis* 86(1): 233–45.
- Humphries, Jonathan D., Adam Byron, and Martin J. Humphries. 2006. "Integrin Ligands at a Glance." *Journal of Cell Science* 119(19): 3901–3. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16988024/> (June 23, 2021).
- Hung, WS et al. 2012. "The Endocytic Adaptor Protein Disabled-2 Is Required for Cellular Uptake of Fibrinogen." *Biochimica et biophysica acta* 1823(10): 1778–88. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22705885/> (July 29, 2021).
- Huveneers, Stephan, and Johan de Rooij. 2013. "Mechanosensitive Systems at the Cadherin-f-Actin Interface." *Journal of Cell Science* 126(2): 403–13. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23524998/> (June 21, 2021).
- Hynes, Richard O. 2002. "Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines." *Cell* 110(6): 673–87. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12297042/> (June 23, 2021).
- . 2004. "The Emergence of Integrins: A Personal and Historical Perspective." *Matrix Biology* 23(6): 333–40. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15533754/> (June 23, 2021).
- . 2009. 326 Science *The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils*. NIH Public Access.

/pmc/articles/PMC3536535/ (March 24, 2021).

- Ichikawa, Motoshi et al. 2004. "AML-1 Is Required for Megakaryocytic Maturation and Lymphocytic Differentiation, but Not for Maintenance of Hematopoietic Stem Cells in Adult Hematopoiesis." *Nature Medicine* 10(3): 299–304.
- Ilkan, Zeki et al. 2017. "Evidence for Shear-Mediated Ca²⁺ Entry through Mechanosensitive Cation Channels in Human Platelets and a Megakaryocytic Cell Line." *Journal of Biological Chemistry* 292(22): 9204–17. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28416610/> (March 15, 2021).
- Inoue, S., and D. G. Osmond. 2001. "Basement Membrane of Mouse Bone Marrow Sinusoids Shows Distinctive Structure and Proteoglycan Composition: A High Resolution Ultrastructural Study." *Anatomical Record* 264(3): 294–304. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/11596011/> (March 25, 2021).
- Iskratsch, Thomas, Haguy Wolfenson, and Michael P. Sheetz. 2014. "Appreciating Force and Shape — the Rise of Mechanotransduction in Cell Biology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(12): 825–33. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm3903> (June 1, 2017).
- Italiano, J E et al. 1999. "Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes." *The Journal of cell biology* 147(6): 1299–1312. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601342> (October 10, 2018).
- Italiano, J E Jr, S Patel-Hett, and J H Hartwig. 2007. "Mechanics of Proplatelet Elaboration." *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5 Suppl 1: 18–23.
- Itkin, Tomer et al. 2016. "Distinct Bone Marrow Blood Vessels Differentially Regulate Haematopoiesis." *Nature* 532(7599): 323–28. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27074509/> (July 6, 2021).
- Ito, Yukitaka et al. 2018. "Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production." *Cell* 174: 636–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.011> (October 18, 2018).
- Ivanovska, Irena L., Jae Won Shin, Joe Swift, and Dennis E. Discher. 2015. 25 Trends in Cell Biology *Stem Cell Mechanobiology: Diverse Lessons from Bone Marrow*. Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.04.003> (March 31, 2021).
- Iyer, K. Venkatesan, S. Pulford, A. Mogilner, and G. V. Shivashankar. 2012. "Mechanical Activation of Cells Induces Chromatin Remodeling Preceding MKL Nuclear Transport." *Biophysical Journal* 103(7): 1416–28. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23062334/> (June 16, 2021).
- Jaffar, Jade et al. 2018. "Greater Cellular Stiffness in Fibroblasts from Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 315(1): L59–65.
- Jansen, Lauren E. et al. 2015. "Mechanics of Intact Bone Marrow." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 50: 299–307. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26189198/> (March 16, 2021).
- Johnson, Ben, Sarah J. Fletcher, and Neil V. Morgan. 2016. "Inherited Thrombocytopenia: Novel Insights into Megakaryocyte Maturation, Proplatelet Formation and Platelet Lifespan." *Platelets* 27(6): 519–25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27025194/> (June 3, 2021).
- Johnson, Randy, and Georg Halder. 2014. "The Two Faces of Hippo: Targeting the Hippo Pathway for Regenerative Medicine and Cancer Treatment." *Nature reviews. Drug discovery* 13(1): 63.

/pmc/articles/PMC4167640/ (August 4, 2021).

- Julien, Emmanuelle, Reine El Omar, and Manuela Tavian. 2016. "Origin of the Hematopoietic System in the Human Embryo." *FEBS Letters* 590(22): 3987–4001.
- Junt, Tobias et al. 2007. "Dynamic Visualization of Thrombopoiesis within Bone Marrow." *Science* 317(5845): 1767–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17885137> (October 10, 2018).
- Jurado, Jaime, Joaquín de Navascués, and Nicole Gorfinkiel. 2016. "α-Catenin Stabilises Cadherin-Catenin Complexes and Modulates Actomyosin Dynamics to Allow Pulsatile Apical Contraction." *Journal of cell science* 129(24): 4496–4508.
- Kaminski, Ashley, Gregory R. Fedorchak, and Jan Lammerding. 2014. "The Cellular Mastermind(?) - Mechanotransduction and the Nucleus." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 126: 157–203. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25081618/> (June 21, 2021).
- Kanchanawong, Pakorn et al. 2010. "Nanoscale Architecture of Integrin-Based Cell Adhesions." *Nature* 468(7323): 580–84.
- Kariyazono, H et al. 1997. "Inhibitory Effects of Antibiotics on Platelet Aggregation in Vitro." *Human & experimental toxicology* 16(11): 662–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9426368/> (July 6, 2021).
- Kashiwakura, Ikuo et al. 2006. "The Effects of Glycosaminoglycans on Thrombopoietin-Induced Megakaryocytopoiesis." *Haematologica* 91(4): 445–51.
- Katayama, Yoshio et al. 2006. "Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow." *Cell* 124(2): 407–21. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16439213/> (May 27, 2021).
- Kaushansky, Kenneth. 2006. "Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors." *New England Journal of Medicine* 354(19): 2034–45. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMr052706> (March 18, 2020).
- Kawasaki, Akira et al. 2001. "Downregulation of an AIM-1 Kinase Couples with Megakaryocytic Polyploidization of Human Hematopoietic Cells." *Journal of Cell Biology* 152(2): 275–87. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/11266445/> (June 1, 2021).
- Keller, Gordon, and Ralph Snodgrass. 1990. "Life Span of Multipotential Hematopoietic Stem Cells in Vivo." *Journal of Experimental Medicine* 171(5): 1407–18. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/2159048/> (April 26, 2021).
- Khalilgharibi, Nargess et al. 2016. "The Dynamic Mechanical Properties of Cellularised Aggregates." *Current Opinion in Cell Biology* 42: 113–20. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27371889/> (June 19, 2021).
- Khatau, Shyam B. et al. 2009. "A Perinuclear Actin Cap Regulates Nuclear Shape." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(45): 19017–22. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19850871/> (June 21, 2021).
- Kieffer, N. et al. 1991. "Adhesive Properties of the B3 Integrins: Comparison of GP IIb-IIIa and the Vitronectin Receptor Individually Expressed in Human Melanoma Cells." *Journal of Cell Biology* 113(2): 451–61.
- Kiel, Mark J. et al. 2005. "SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells." *Cell* 121(7): 1109–21. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15989959/> (April 26, 2021).

- Kim, Soo Hyun, Jeremy Turnbull, and Scott Guimond. 2011. "Extracellular Matrix and Cell Signalling: The Dynamic Cooperation of Integrin, Proteoglycan and Growth Factor Receptor." *Journal of Endocrinology* 209(2): 139–51. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21307119/> (March 25, 2021).
- Klein, G. 1995. "The Extracellular Matrix of the Hematopoietic Microenvironment." *Experientia* 51(9–10): 914–26. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/7556572/> (March 24, 2021).
- Kopp, Hans Georg, Scott T. Avecilla, Andrea T. Hooper, and Shahin Rafii. 2005. "The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization." *Physiology* 20(5): 349–56. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16174874/> (May 30, 2021).
- Kosaki, Goro. 2005. "In Vivo Platelet Production from Mature Megakaryocytes: Does Platelet Release Occur via Proplatelets?" *International Journal of Hematology* 81(3): 208–19. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15814332/> (May 17, 2021).
- Kosaki, Goro, and Junichi Kambayashi. 2011. "Thrombocytopoiesis by Megakaryocyte; Interpretation by Proplatelet Hypothesis." *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* 87(5): 254–73. [/pmc/articles/PMC3165905/](https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15814332/) (May 17, 2021).
- Kowata, Shugo et al. 2014. "Platelet Demand Modulates the Type of Intravascular Protrusion of Megakaryocytes in Bone Marrow." *Thrombosis and Haemostasis* 112(10): 743–56. <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH14-02-0123> (October 10, 2018).
- Kricun, Morrie E. 1985. "Red-Yellow Marrow Conversion: Its Effect on the Location of Some Solitary Bone Lesions." *Skeletal Radiology* 14(1): 10–19. <http://link.springer.com/10.1007/BF00361188> (April 28, 2020).
- Kunisaki, Yuya et al. 2013. "Arteriolar Niches Maintain Haematopoietic Stem Cell Quiescence." *Nature* 502(7473): 637–43. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24107994/> (March 25, 2021).
- Kunishima, Shinji et al. 2013. "ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia." *American Journal of Human Genetics* 92(3): 431–38. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23434115/> (June 4, 2021).
- Kusuluri, Deva K et al. 2021. "Adhesion G Protein-Coupled Receptor VLGR1/ADGRV1 Regulates Cell Spreading and Migration by Mechanosensing at Focal Adhesions." *iScience* 24(4): 102283.
- Kuter, David J. et al. 2007. "Bone Marrow Fibrosis: Pathophysiology and Clinical Significance of Increased Bone Marrow Stromal Fibres." *British Journal of Haematology* 139(3): 351–62. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17910625/> (April 5, 2021).
- Kuter, David J. 2015. "Managing Thrombocytopenia Associated with Cancer Chemotherapy." *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 29(4): 282–94.
- Kyriakides, Themis R. et al. 2003. 101 Blood *Megakaryocytes Require Thrombospondin-2 for Normal Platelet Formation and Function*. Blood. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12732502/> (April 2, 2021).
- Ladoux, Benoit et al. 2010. "Strength Dependence of Cadherin-Mediated Adhesions." *Biophysical Journal* 98(4): 534–42. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20159149/> (June 22, 2021).
- Lakk, M, and D Križaj. 2021. "TRPV4-Rho Signaling Drives Cytoskeletal and Focal Adhesion Remodeling in Trabecular Meshwork Cells." *American journal of physiology. Cell physiology*

- 320(6): C1013–30. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/33788628/> (July 27, 2021).
- Lam, Masha S H. 2010. "Review Article: Second-Generation Thrombopoietin Agents for Treatment of Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Adults." *Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners* 16(2): 89–103.
- Lammerding, Jan et al. 2006. "Lamins a and C but Not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics." *Journal of Biological Chemistry* 281(35): 25768–80. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16825190/> (June 21, 2021).
- Lanza, François. 2006. "Bernard-Soulier Syndrome (Hemorrhagiparous Thrombocytic Dystrophy)." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1(1). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17109744/> (June 7, 2021).
- De Larouzière, Vanina et al. 1998. "Inverse Immunostaining Pattern for Synthesized versus Endocytosed Alpha- Granule Proteins in Human Bone Marrow Megakaryocytes." *British Journal of Haematology* 101(4): 618–25. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9674731/> (May 30, 2021).
- Larson, Mark K, and Steve P Watson. 2006. "Regulation of Proplatelet Formation and Platelet Release by Integrin $\text{AIIb}\beta 3$." *Blood* 108(5): 1509–14. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/108/5/1509/472726/zh801706001509.pdf> (March 22, 2021).
- Lavanderos, B et al. 2020. "TRP Channels Regulation of Rho GTPases in Brain Context and Diseases." *Frontiers in cell and developmental biology* 8. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/33240883/> (July 27, 2021).
- Lecine, Patrick et al. 1998. "Mice Lacking Transcription Factor NF-E2 Provide in Vivo Validation of the Proplatelet Model of Thrombocytopoiesis and Show a Platelet Production Defect That Is Intrinsic to Megakaryocytes." *Blood* 92(5): 1608–16. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9716588/> (April 28, 2021).
- Leddy, Holly A, Amy L McNulty, Farshid Guilak, and Wolfgang Liedtke. 2014. "Unraveling the Mechanism by Which TRPV4 Mutations Cause Skeletal Dysplasias." *Rare Diseases* 2(1): e962971. <http://pmc/articles/PMC4755236/> (July 30, 2021).
- Lee-Thedieck, C., and J. P. Spatz. 2014. "Biophysical Regulation of Hematopoietic Stem Cells." *Biomaterials Science* 2(11): 1548–61. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/32481942/> (April 26, 2021).
- Lefrançois, Emma et al. 2017. "The Lung Is a Site of Platelet Biogenesis and a Reservoir for Haematopoietic Progenitors." *Nature* 544(7648): 105–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28329764> (October 18, 2018).
- Leiva, O. et al. 2017. "The Role of the Extracellular Matrix in Primary Myelofibrosis." *Blood Cancer Journal* 7(2): 1–9.
- Leiva, Orly et al. 2018. "The Role of Extracellular Matrix Stiffness in Megakaryocyte and Platelet Development and Function." *American journal of hematology* 93(3): 430–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29247535> (April 23, 2019).
- Léon, Catherine et al. 2007. "Megakaryocyte-Restricted MYH9 Inactivation Dramatically Affects Hemostasis While Preserving Platelet Aggregation and Secretion." *Blood* 110(9): 3183–91. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17664350/> (June 2, 2021).

- . 2012. “Romiplostim Administration Shows Reduced Megakaryocyte Response-Capacity and Increased Myelofibrosis in a Mouse Model of MYH9-RD.” *Blood* 119(14): 3333–41.
- Leven, RM, and MK Yee. 1987. “Megakaryocyte Morphogenesis Stimulated in Vitro by Whole and Partially Fractionated Thrombocytopenic Plasma: A Model System for the Study of Platelet Formation.” *Blood* 69(4): 1046–52.
- Levin, Jack et al. 1999. “Pathophysiology of Thrombocytopenia and Anemia in Mice Lacking Transcription Factor NF-E2.” *Blood* 94(9): 3037–47.
- . 2007. “The Evolution of Mammalian Platelets.” *Platelets*: 3–22.
- Levine, RF, KC Hazzard, and JD Lamberg. 1982. “The Significance of Megakaryocyte Size.” *Blood* 60(5): 1122–31.
- Li, Huiyuan, Haifeng Zhao, Donghai Wang, and Renchi Yang. 2011. “MicroRNA Regulation in Megakaryocytopoiesis.” *British Journal of Haematology* 155(3): 298–307.
- Li, Jing et al. 2014. “Piezo1 Integration of Vascular Architecture with Physiological Force.” *Nature* 515(7526): 279–82. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25119035/> (June 22, 2021).
- Li, Z, MK Delaney, KA O’Brien, and K Du. 2010. “Signaling during Platelet Adhesion and Activation.” *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30(12): 2341–49. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21071698/> (July 27, 2021).
- Lichtman, Marshall A., Jack K. Chamberlain, William Simon, and Patricia A. Santillo. 1978. “Parasinusoidal Location of Megakaryocytes in Marrow: A Determinant of Platelet Release.” *American Journal of Hematology* 4(4): 303–12. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/717392/> (May 18, 2021).
- Licup, Albert James et al. 2015. “Stress Controls the Mechanics of Collagen Networks.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(31): 9573–78. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26195769/> (March 31, 2021).
- Liedtke, Wolfgang et al. 2000. “Vanilloid Receptor-Related Osmotically Activated Channel (VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor.” *Cell* 103(3): 525–35. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/11081638/> (October 14, 2020).
- Liu, Fei et al. 2015. “Mechanotransduction through YAP and TAZ Drives Fibroblast Activation and Fibrosis.” *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 308(4): L344–57.
- Liu, Yan Jun et al. 2015. “Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells.” *Cell* 160(4): 659–72. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25679760/> (March 31, 2021).
- Lo, Chun Min, Hong Bei Wang, Micah Dembo, and Yu Li Wang. 2000. “Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate.” *Biophysical Journal* 79(1): 144–52. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/10866943/> (June 10, 2021).
- Lombardi, Maria L. et al. 2011. “The Interaction between Nesprins and Sun Proteins at the Nuclear Envelope Is Critical for Force Transmission between the Nucleus and Cytoskeleton.” *Journal of Biological Chemistry* 286(30): 26743–53. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21652697/> (June 21, 2021).
- Lombardi, Maria L, and Jan Lammerding. 2011. “Keeping the LINC: The Importance of Nucleo-Cytoskeletal Coupling in Intracellular Force Transmission and Cellular Function.” *Biochemical*

- Society Transactions* 39(6): 1729–34.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4589539/pdf/nihms-724976.pdf> (May 29, 2017).
- Lordier, Larissa et al. 2010. “Aurora B Is Dispensable for Megakaryocyte Polyploidization, but Contributes to the Endomitotic Process.” *Blood* 116(13): 2345–55.
<http://ashpublications.org/blood/article-pdf/116/13/2345/1328697/zh803910002345.pdf> (April 27, 2021).
- Lordier, Larissa, Jiajia Pan, et al. 2012. “Presence of a Defect in Karyokinesis during Megakaryocyte Endomitosis.” *Cell Cycle* 11(23): 4385–89. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23159853/> (April 27, 2021).
- Lordier, Larissa, Dominique Bluteau, et al. 2012. “RUNX1-Induced Silencing of Non-Muscle Myosin Heavy Chain IIB Contributes to Megakaryocyte Polyploidization.” *Nature Communications* 3. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22395608/> (April 27, 2021).
- Lorthongpanich, Chanchao et al. 2017. “The Hippo Pathway Regulates Human Megakaryocytic Differentiation.” *Thrombosis and Haemostasis* 117(1): 116–26. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27786336/> (June 15, 2021).
- . 2020. “Effect of YAP/TAZ on Megakaryocyte Differentiation and Platelet Production.” *Bioscience Reports* 40(8). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/32779719/> (September 7, 2020).
- Louache, F. et al. 1991. “Fibrinogen Is Not Synthesized by Human Megakaryocytes.” *Blood* 77(2): 311–16. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/1985697/> (May 30, 2021).
- Loukin, Stephen et al. 2010. “Wild-Type and Brachyolmia-Causing Mutant TRPV4 Channels Respond Directly to Stretch Force.” *Journal of Biological Chemistry* 285(35): 27176–81.
<http://www.jbc.org> (October 14, 2020).
- Loukin, Stephen H., Zhenwei Su, and Ching Kung. 2009. “Hypotonic Shocks Activate Rat TRPV4 in Yeast in the Absence of Polyunsaturated Fatty Acids.” *FEBS Letters* 583(4): 754–58.
<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19174160/> (June 23, 2021).
- Lowe, G. D. O. et al. 1997. “Epidemiology of Coagulation Factors, Inhibitors and Activation Markers: The Third Glasgow MONICA Survey. I. Illustrative Reference Ranges by Age, Sex and Hormone Use.” *British journal of haematology* 97(4): 775–84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9217176/> (August 2, 2021).
- Lyons, James S. et al. 2017. “Microtubules Tune Mechanotransduction through NOX2 and TRPV4 to Decrease Sclerostin Abundance in Osteocytes.” *Science Signaling* 10(506). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/29162742/> (March 15, 2021).
- Machlus, Kellie R. et al. 2016. “CCL5 Derived from Platelets Increases Megakaryocyte Proplatelet Formation.” *Blood* 127(7): 921–26. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26647394/> (April 28, 2021).
- Maciver, Sutherland K. 1996. “Myosin II Function in Non-Muscle Cells.” *BioEssays* 18(3): 179–82.
<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/8867731/> (June 21, 2021).
- Mahaut-Smith, Martyn P. et al. 2003. “Properties of the Demarcation Membrane System in Living Rat Megakaryocytes.” *Biophysical Journal* 84(4): 2646–54. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12668473/> (April 27, 2021).
- Mahaut-Smith, MP. 2012. “The Unique Contribution of Ion Channels to Platelet and Megakaryocyte

- Function." *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 10(9): 1722–32. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22741535/> (July 27, 2021).
- Maki, Koichiro et al. 2016. "Mechano-Adaptive Sensory Mechanism of α -Catenin under Tension." *Scientific reports* 6: 24878.
- Maksimovic, Srdjan et al. 2014. "Epidermal Merkel Cells Are Mechanosensory Cells That Tune Mammalian Touch Receptors." *Nature* 509(7502): 617–21. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24717432/> (June 22, 2021).
- Malara, Alessandro, Cristian Gruppi, Isabella Pallotta, et al. 2011. "Extracellular Matrix Structure and Nano-Mechanics Determine Megakaryocyte Function." *Blood* 118(16): 4449–53. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21828129/> (April 2, 2021).
- Malara, Alessandro, Cristian Gruppi, Paola Rebuzzini, et al. 2011. "Megakaryocyte-Matrix Interaction within Bone Marrow: New Roles for Fibronectin and Factor XIII-A." *Blood* 117(8): 2476–83. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/117/8/2476/1496879/zh800811002476.pdf> (March 23, 2021).
- Malara, Alessandro et al. 2014. "Megakaryocytes Contribute to the Bone Marrow-Matrix Environment by Expressing Fibronectin, Type IV Collagen, and Laminin." *Stem Cells* 32(4): 926–37. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24357118/> (March 25, 2021).
- . 2019. "EDA Fibronectin–TLR4 Axis Sustains Megakaryocyte Expansion and Inflammation in Bone Marrow Fibrosis." *The Journal of Experimental Medicine* 216(3): 587–604. <https://doi.org/10.1084/jem.20181074> (April 4, 2019).
- Mammoto, Tadanori, and Donald E. Ingber. 2010. "Mechanical Control of Tissue and Organ Development." *Development* 137(9): 1407–20. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20388652/> (June 22, 2021).
- Mammoto, Tadanori, Akiko Mammoto, and Donald E. Ingber. 2013. "Mechanobiology and Developmental Control." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29: 27–61. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24099083/> (June 22, 2021).
- Mancini, Elena et al. 2012. "FOG-1 and GATA-1 Act Sequentially to Specify Definitive Megakaryocytic and Erythroid Progenitors." *EMBO Journal* 31(2): 351–65. www.embojournal.org (April 28, 2021).
- Martinac, Boris, and Kate Poole. 2018. "Mechanically Activated Ion Channels." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 97(November 2017): 104–7. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.02.011>.
- Matsumura, G, and K Sasaki. 1989. "Megakaryocytes in the Yolk Sac, Liver and Bone Marrow of the Mouse: A Cytometrical Analysis by Semithin Light Microscopy." *Journal of Anatomy* 167: 181.
- Matsuura, Shinobu et al. 2020. "Adhesion to Fibronectin via A5b1 Integrin Supports Expansion of the Megakaryocyte Lineage in Primary Myelofibrosis." *Blood* 135(25): 2286–91.
- Matthews, Benjamin D. et al. 2010. "Ultra-Rapid Activation of TRPV4 Ion Channels by Mechanical Forces Applied to Cell Surface B1 Integrins." *Integrative Biology* 2(9): 435. <https://academic.oup.com/ib/article/2/9/435-442/5210981> (March 17, 2021).
- Mattia, Gianfranco et al. 2002. "Different Ploidy Levels of Megakaryocytes Generated from Peripheral or Cord Blood CD34+ Cells Are Correlated with Different Levels of Platelet Release." *Blood* 99(3): 888–97. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/11806991/> (June 1, 2021).

- Maurer, Melanie, and Jan Lammerding. 2019. "The Driving Force: Nuclear Mechanotransduction in Cellular Function, Fate, and Disease." *Annual Review of Biomedical Engineering* 21: 443–68. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/30916994/> (June 14, 2021).
- Mazo, I B, and U H von Andrian. 1999. "Adhesion and Homing of Blood-Borne Cells in Bone Marrow Microvessels." *Journal of leukocyte biology* 66(1): 25–32.
- Mazzi, Stefania et al. 2018. "Megakaryocyte and Polyploidization." *Experimental Hematology* 57: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.10.001> (April 27, 2021).
- Mazzon, Cristina et al. 2011. "The Critical Role of Agrin in the Hematopoietic Stem Cell Niche." *Blood* 118(10): 2733–42. [/pmc/articles/PMC3172792/?report=abstract](https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17090474/) (January 19, 2021).
- McGloin, David. 2006. "Optical Tweezers: 20 Years On." *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 364(1849): 3521–37. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17090474/> (April 1, 2021).
- McMillin, Margaret J. et al. 2014. "Mutations in PIEZO2 Cause Gordon Syndrome, Marden-Walker Syndrome, and Distal Arthrogryposis Type 5." *American Journal of Human Genetics* 94(5): 734–44. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24726473/> (June 22, 2021).
- Medvinsky, Alexander L., Nina L. Samoylina, Albrecht M. Müller, and Elaine A. Dzierzak. 1993. "An Early Pre-Liver Intraembryonic Source of CFU-S in the Developing Mouse." *Nature* 364(6432): 64–67.
- Méndez-Ferrer, Simón et al. 2010. "Mesenchymal and Haematopoietic Stem Cells Form a Unique Bone Marrow Niche." *Nature* 466(7308): 829–34. <https://www.nature.com/articles/nature09262> (January 20, 2021).
- Mendoza, Suelhem A. et al. 2010. "TRPV4-Mediated Endothelial Ca²⁺ Influx and Vasodilation in Response to Shear Stress." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 298(2).
- Metcalf, D, G R Johnson, and T E Mandel. 1979. "Colony Formation in Agar by Multipotential Hemopoietic Cells." *Journal of cellular physiology* 98(2): 401–20.
- Mikkola, Hanna K.A., and Stuart H. Orkin. 2006. "The Journey of Developing Hematopoietic Stem Cells." *Development* 133(19): 3733–44.
- Milton, Claire C. et al. 2014. "The Hippo Pathway Regulates Hematopoiesis in Drosophila Melanogaster." *Current Biology* 24(22): 2673–80. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25454587/> (June 15, 2021).
- Miralles, Francesc, Guido Posern, Alexia Ileana Zaromytidou, and Richard Treisman. 2003. "Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL." *Cell* 113(3): 329–42. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12732141/> (June 16, 2021).
- Mizuguchi, Mineyuki et al. 2014. "Transient α -Helices in the Disordered RPEL Motifs of the Serum Response Factor Coactivator MKL1." *Scientific Reports* 4. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24909411/> (June 16, 2021).
- Moon, Sungho et al. 2017. "Phosphorylation by NLK Inhibits YAP -14-3-3-interactions and Induces Its Nuclear Localization." *EMBO reports* 18(1): 61–71. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27979972/> (June 15, 2021).
- Moore, Emily R, Han Seul Ryu, Ya Xing Zhu, and Christopher R Jacobs. 2018. 7 *Journal of molecular biochemistry Adenylyl Cyclases and TRPV4 Mediate Ca²⁺ /CAMP Dynamics to Enhance Fluid Flow-Induced Osteogenesis in Osteocytes*. NIH Public Access.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31123666> (July 5, 2019).

- Moore, Malcolm A.S., and Donald Metcalf. 1970. "Ontogeny of the Haemopoietic System: Yolk Sac Origin of In Vivo and In Vitro Colony Forming Cells in the Developing Mouse Embryo." *British Journal of Haematology* 18(3): 279–96.
- Moran, Magdalene M., Michael Allen McAlexander, Tamás Bíró, and Arpad Szallasi. 2011. "Transient Receptor Potential Channels as Therapeutic Targets." *Nature Reviews Drug Discovery* 10(8): 601–20. <https://www-nature-com.scd-rproxy.u-strasbg.fr/articles/nrd3456> (August 4, 2021).
- Morgan, Joshua T., Christopher J. Murphy, and Paul Russell. 2013. "What Do Mechanotransduction, Hippo, Wnt, and TGF β Have in Common? YAP and TAZ as Key Orchestrating Molecules in Ocular Health and Disease." *Experimental Eye Research* 115: 1–12. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23792172/> (June 15, 2021).
- Morone, Nobuhiro et al. 2006. "Three-Dimensional Reconstruction of the Membrane Skeleton at the Plasma Membrane Interface by Electron Tomography." *Journal of Cell Biology* 174(6): 851–62. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16954349/> (June 21, 2021).
- Müller, Albrecht M. et al. 1994. "Development of Hematopoietic Stem Cell Activity in the Mouse Embryo." *Immunity* 1(4): 291–301.
- Müller, Daniel J., Jonne Helenius, David Alsteens, and Yves F. Dufrene. 2009. "Force Probing Surfaces of Living Cells to Molecular Resolution." *Nature Chemical Biology* 5(6): 383–90. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19448607/> (March 31, 2021).
- Nagafuchi, A., and M. Takeichi. 1988. "Cell Binding Function of E-Cadherin Is Regulated by the Cytoplasmic Domain." *The EMBO journal* 7(12): 3679–84. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/3061804/> (June 22, 2021).
- Nakagawa, Yosuke et al. 2013. "Two Differential Flows in a Bioreactor Promoted Platelet Generation from Human Pluripotent Stem Cell-Derived Megakaryocytes." *Experimental Hematology* 41(8): 742–48. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23618622/> (May 18, 2021).
- Nakeff, A., and B. Maat. 1974. "Separation of Megakaryocytes from Mouse Bone Marrow by Velocity Sedimentation." *Blood* 43(4): 591–95.
- Narayan, K., S. Juneja, and C. Garcia. 1994. "Effects of 5-Fluorouracil or Total-Body Irradiation on Murine Bone Marrow Microvasculature." *Experimental Hematology* 22(2): 142–48. <https://europepmc.org/article/med/8299736> (March 30, 2021).
- Naumanen, P., P. Lappalainen, and P. Hotulainen. 2008. "Mechanisms of Actin Stress Fibre Assembly." In *Journal of Microscopy*, J Microsc, 446–54. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/18755000/> (June 21, 2021).
- Nesbitt, Warwick S., Pierre Mangin, Hatem H. Salem, and Shaun P. Jackson. 2006. "The Impact of Blood Rheology on the Molecular and Cellular Events Underlying Arterial Thrombosis." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 84(12): 989–95. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17013658/> (April 2, 2021).
- Neunert, C. et al. 2015. "Severe Bleeding Events in Adults and Children with Primary Immune Thrombocytopenia: A Systematic Review." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13(3): 457–64. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25495497/> (June 4, 2021).
- Nikolaev, YA et al. 2019. "Mammalian TRP Ion Channels Are Insensitive to Membrane Stretch." *Journal of cell science* 132(23). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u->

strasbg.fr/31722978/ (July 28, 2021).

Nilsson, Susan K. et al. 1998. "Immunofluorescence Characterization of Key Extracellular Matrix Proteins in Murine Bone Marrow in Situ." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 46(3): 371–77. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9487119/> (March 17, 2021).

———. 2005. "Osteopontin, a Key Component of the Hematopoietic Stem Cell Niche and Regulator of Primitive Hematopoietic Progenitor Cells." *Blood* 106(4): 1232–39. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/106/4/1232/1712674/zh801605001232.pdf> (January 19, 2021).

Nishikii, Hidekazu, Naoki Kurita, and Shigeru Chiba. 2017. "The Road Map for Megakaryopoietic Lineage from Hematopoietic Stem/Progenitor Cells." *Stem Cells Translational Medicine* 6(8): 1661–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28682009> (March 20, 2020).

Nishimoto, Tetsuya, Yuka Okazaki, Miku Numajiri, and Masataka Kuwana. 2017. "Mouse Immune Thrombocytopenia Is Associated with Th1 Bias and Expression of Activating Fcγ Receptors." *International Journal of Hematology* 105(5): 598–605. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28028748/> (June 4, 2021).

Nishimura, Satoshi et al. 2015. "IL-1α Induces Thrombopoiesis through Megakaryocyte Rupture in Response to Acute Platelet Needs." *Journal of Cell Biology* 209(3): 453–66. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25963822/> (October 14, 2020).

Nonomura, Keiko et al. 2017. "Piezo2 Senses Airway Stretch and Mediates Lung Inflation-Induced Apnoea." *Nature* 541(7636): 176–81. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28002412/> (June 22, 2021).

Notta, Faiyaz, Sasan Zandi, Naoya Takayama, Stephanie Dobson, Olga I Gan, Gavin Wilson, Kerstin B Kaufmann, Jessica McLeod, et al. 2016. "Distinct Routes of Lineage Development Reshape the Human Blood Hierarchy across Ontogeny." *Science (New York, N.Y.)* 351(6269): aab2116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26541609> (May 22, 2017).

Notta, Faiyaz, Sasan Zandi, Naoya Takayama, Stephanie Dobson, Olga I. Gan, Gavin Wilson, Kerstin B. Kaufmann, Jessica McLeod, et al. 2016. "Distinct Routes of Lineage Development Reshape the Human Blood Hierarchy across Ontogeny." *Science* 351(6269). <http://science.sciencemag.org/> (April 26, 2021).

Nurden, Alan T. 2005. "Qualitative Disorders of Platelets and Megakaryocytes." In *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, J Thromb Haemost, 1773–82. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16102044/> (June 7, 2021).

———. 2006. "Glanzmann Thrombasthenia." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1(1). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16722529/> (June 7, 2021).

———. 2014. "Platelet Membrane Glycoproteins: A Historical Review." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 40(5): 577–84. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24967889/> (April 27, 2021).

Nurden, Alan T., and Paquita Nurden. 2014. "Congenital Platelet Disorders and Understanding of Platelet Function." *British Journal of Haematology* 165(2): 165–78. <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.12662> (April 27, 2021).

Nurden, AT, and P Nurden. 2020. "Inherited Thrombocytopenias: History, Advances and Perspectives." *Haematologica* 105(8): 2004–19. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/32527953/> (July 29, 2021).

- O'Neil, Roger G., and Stefan Heller. 2005. "The Mechanosensitive Nature of TRPV Channels." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 451(1): 193–203.
- Ogawa, M. 1993. "Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells." *Blood* 81(11): 2844–53. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/81/11/2844/609764/2844.pdf> (April 26, 2021).
- Olson, Eric N., and Alfred Nordheim. 2010. "Linking Actin Dynamics and Gene Transcription to Drive Cellular Motile Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(5): 353–65. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20414257/> (June 21, 2021).
- Orr, A Wayne, Brian P Helmke, Brett R Blackman, and Martin A Schwartz. 2006. "Review Mechanisms of Mechanotransduction." *Developmental Cell* 10: 11–20. http://ac.els-cdn.com/S153458070500482X/1-s2.0-S153458070500482X-main.pdf?_tid=c4c0d810-447d-11e7-8ae1-00000aacb360&acdnat=1496069442_d12d7cef111196b7219aeaf41b92830b (May 29, 2017).
- Osmanagic-Myers, Selma, Thomas Dechat, and Roland Foisner. 2015. "Lamins at the Crossroads of Mechanosignaling." *Genes and Development* 29(3): 225–37.
- Padmakumar, V. C. et al. 2005. "The Inner Nuclear Membrane Protein Sun1 Mediates the Anchorage of Nesprin-2 to the Nuclear Envelope." *Journal of Cell Science* 118(15): 3419–30. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16079285/> (June 21, 2021).
- Palis, James et al. 1999. "Development of Erythroid and Myeloid Progenitors in the Yolk Sac and Embryo Proper of the Mouse." *Development* 126(22): 5073–84.
- Pallotta, Isabella et al. 2009. "Bone Marrow Osteoblastic Niche: A New Model to Study Physiological Regulation of Megakaryopoiesis." *PLoS ONE* 4(12). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20027303/> (March 24, 2021).
- Panciera, Tito, Luca Azzolin, Michelangelo Cordenonsi, and Stefano Piccolo. 2017. "Mechanobiology of YAP and TAZ in Physiology and Disease." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(12): 758–70. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm.2017.87> (January 11, 2018).
- Pankov, Roumen, and Kenneth M. Yamada. 2002. "Fibronectin at a Glance." *Journal of Cell Science* 115(20): 3861–63. <https://jcs-biologists-org.scd-rproxy.u-strasbg.fr/content/115/20/3861> (March 24, 2021).
- Parnes, Aric, and Arvind Ravi. 2016. "Polycythemia and Thrombocytosis." *Primary care* 43(4): 589–605.
- Patel-Hett, Sunita et al. 2011. "The Spectrin-Based Membrane Skeleton Stabilizes Mouse Megakaryocyte Membrane Systems and Is Essential for Proplatelet and Platelet Formation." *Blood* 118(6): 1641–52.
- Pecci, Alessandro et al. 2010. "Eltrombopag for the Treatment of the Inherited Thrombocytopenia Deriving from MYH9 Mutations." *Blood* 116(26): 5832–37.
- Pecci, Alessandro, and Carlo L. Balduini. 2014. "Lessons in Platelet Production from Inherited Thrombocytopenias." *British Journal of Haematology* 165(2): 179–92. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24480030/> (June 4, 2021).
- Pelham, Robert J., and Yu Li Wang. 1997. "Cell Locomotion and Focal Adhesions Are Regulated by Substrate Flexibility." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25): 13661–65. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9391082/> (June 10, 2021).

- Pellegrin, Stéphanie, and Harry Mellor. 2007. "Actin Stress Fibers." *Journal of Cell Science* 120(20): 3491–99. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17928305/> (June 21, 2021).
- Pethő, Zoltán, Karolina Najder, Etmar Bulk, and Albrecht Schwab. 2019. "Mechanosensitive Ion Channels Push Cancer Progression." *Cell Calcium* 80: 79–90.
- Petrey, Aaron C. et al. 2016. "Hyaluronan Depolymerization by Megakaryocyte Hyaluronidase-2 Is Required for Thrombopoiesis." *American Journal of Pathology* 186(9): 2390–2403. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27398974/> (April 2, 2021).
- Piccolo, Stefano, Sirio Dupont, and Michelangelo Cordenonsi. 2014. "The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond." *Beyond. Physiol Rev* 94: 1287–1312. <http://physrev.physiology.org/content/physrev/94/4/1287.full.pdf> (May 26, 2017).
- Pietrzyk-Nivau, Audrey et al. 2015. "Three-Dimensional Environment Sustains Hematopoietic Stem Cell Differentiation into Platelet-Producing Megakaryocytes." *PLoS ONE* 10(8): 1–19. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0136652>.
- Pinho, Sandra et al. 2018. "Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches." *Developmental cell* 44(5): 634–641.e4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29456137> (March 20, 2020).
- Pipes, G. C.Teg, Esther E. Creemers, and Eric N. Olson. 2006. "The Myocardin Family of Transcriptional Coactivators: Versatile Regulators of Cell Growth, Migration, and Myogenesis." *Genes and Development* 20(12): 1545–56. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16778073/> (June 16, 2021).
- Pittenger, Mark F. et al. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284(5411): 143–47. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/10102814/> (May 27, 2021).
- Pleines, Irina, and Bernhard Nieswandt. 2016. "RhoA/ROCK Guides NMII on the Way to MK Polyploidy." *Blood* 128(26): 3025–26. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/128/26/3025/1397722/blood746685.pdf> (August 4, 2021).
- Pollard, Thomas D., and John A. Cooper. 2009. "Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement." *Science* 326(5957): 1208–12. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19965462/> (June 21, 2021).
- Pollard, Thomas D., Robert R. Weihing, and M. R. Adelman. 1974. "Actin and Myosin and Cell Movement." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2(1): 1–65.
- Potts, Kathryn S. et al. 2014. "A Lineage of Diploid Platelet-Forming Cells Precedes Polyploid Megakaryocyte Formation in the Mouse Embryo." *Blood* 124(17): 2725–29. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25079356/> (March 24, 2021).
- . 2020. "Membrane Budding Is a Major Mechanism of in Vivo Platelet Biogenesis." *The Journal of experimental medicine* 217(9). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/32706855/> (September 4, 2020).
- Psaila, B. 2016. "Tense Your Megas! Structural Rigidity Is Key." *Blood* 128(16): 1997–99. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28157674/> (August 4, 2021).
- Raab, Matthew et al. 2012. "Crawling from Soft to Stiff Matrix Polarizes the Cytoskeleton and Phosphoregulates Myosin-II Heavy Chain." *The Journal of cell biology* 199(4): 669–83.
- Radley, J. M., and G. Scurfield. 1979. "Effects of 5-Fluorouracil on Mouse Bone Marrow." *British Journal of Haematology* 43(3): 341–51. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u->

- strasbg.fr/497116/ (March 30, 2021).
- . 1980. "The Mechanism of Platelet Release." *Blood* 56(6): 996–99.
- Radley, JM, and CJ Haller. 1982. "The Demarcation Membrane System of the Megakaryocyte: A Misnomer?" *Blood* 60(1): 213–19.
- Rafii, S et al. 1994. "Isolation and Characterization of Human Bone Marrow Microvascular Endothelial Cells: Hematopoietic Progenitor Cell Adhesion." *Blood* 84(1): 10–19.
- Rafii, Shahin et al. 1995. "Human Bone Marrow Microvascular Endothelial Cells Support Long-Term Proliferation and Differentiation of Myeloid and Megakaryocytic Progenitors." *Blood* 86(9): 3353–63. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/7579438/> (May 25, 2021).
- Rafii, Shahin, Jason M. Butler, and Bi Sen Ding. 2016. "Angiocrine Functions of Organ-Specific Endothelial Cells." *Nature* 529(7586): 316–25. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26791722/> (May 19, 2021).
- Raghuwanshi, Sanjeev et al. 2019. "MicroRNA Function in Megakaryocytes." *Platelets* 30(7): 809–16. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09537104.2018.1528343> (April 28, 2021).
- Ragu, C. et al. 2010. "The Serum Response Factor (SRF)/Megakaryocytic Acute Leukemia (MAL) Network Participates in Megakaryocyte Development." *Leukemia* 24(6): 1227–30. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20428204/> (June 16, 2021).
- Ranade, Sanjeev S., Zhaozhu Qiu, et al. 2014. "Piezo1, a Mechanically Activated Ion Channel, Is Required for Vascular Development in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(28): 10347–52. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1409233111 (June 22, 2021).
- Ranade, Sanjeev S., Seung Hyun Woo, et al. 2014. "Piezo2 Is the Major Transducer of Mechanical Forces for Touch Sensation in Mice." *Nature* 516(729): 121–25. <https://www.nature.com/articles/nature13980> (June 22, 2021).
- Ravid, Katya, Jun Lu, Jeffrey M. Zimmet, and Matthew R. Jones. 2002. "Roads to Polyploidy: The Megakaryocyte Example." *Journal of Cellular Physiology* 190(1): 7–20. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/11807806/> (April 27, 2021).
- Rayees, Sheikh et al. 2019. "PAR2-Mediated CAMP Generation Suppresses TRPV4-Dependent Ca²⁺ Signaling in Alveolar Macrophages to Resolve TLR4-Induced Inflammation." *Cell Reports* 27: 793–805. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.053> (July 5, 2019).
- Reagan, Michaela R., and Clifford J. Rosen. 2016. "Navigating the Bone Marrow Niche: Translational Insights and Cancer-Driven Dysfunction." *Nature Reviews Rheumatology* 12(3): 154–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607387> (May 5, 2020).
- Reilly, Gwendolen C., and Adam J. Engler. 2010. "Intrinsic Extracellular Matrix Properties Regulate Stem Cell Differentiation." *Journal of Biomechanics* 43(1): 55–62. www.elsevier.com/locate/jbiomech (March 24, 2021).
- Reynolds, A B et al. 1994. "Identification of a New Catenin: The Tyrosine Kinase Substrate P120cas Associates with E-Cadherin Complexes." *Molecular and cellular biology* 14(12): 8333–42.
- Ribatti, Domenico, and Enrico Crivellato. 2007. "Giulio Bizzozzero and the Discovery of Platelets." *Leukemia Research* 31(10): 1339–41. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17383722/> (June 8, 2021).
- Ricard-Blum, Sylvie. 2011. "The Collagen Family." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(1): 1–

19. /pmc/articles/PMC3003457/ (July 31, 2021).
- Richardson, Jennifer L et al. 2005. "Mechanisms of Organelle Transport and Capture along Proplatelets during Platelet Production." *Blood* 106(13): 4066–75.
- Del Rio, Armando et al. 2009. "Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding." *Science* 323(5914): 638–41. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19179532/> (June 23, 2021).
- Rodeghiero, F, A Pecci, and C L Balduini. 2018. "Thrombopoietin Receptor Agonists in Hereditary Thrombocytopenias." *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 16(9): 1700–1710.
- Rokkam, Venkata R, and Rajesh Kotagiri. 2021. "Secondary Thrombocytosis." In *Treasure Island* (FL).
- Roux, Kyle J. et al. 2009. "Nesprin 4 Is an Outer Nuclear Membrane Protein That Can Induce Kinesin-Mediated Cell Polarization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(7): 2194–99. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19164528/> (June 21, 2021).
- Roy, Anita, Larissa Lordier, Stefania Mazzi, et al. 2016. "Activity of Nonmuscle Myosin II Isoforms Determines Localization at the Cleavage Furrow of Megakaryocytes." *Blood* 128(26): 3137–45. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27737892/> (April 27, 2021).
- Roy, Anita, Larissa Lordier, Catherine Pioche-Durieu, et al. 2016. "Uncoupling of the Hippo and Rho Pathways Allows Megakaryocytes to Escape the Tetraploid Checkpoint." *Haematologica* 101(12): 1469–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27515249> (December 12, 2017).
- Ru, Yong Xin et al. 2015. "On the Maturation of Megakaryocytes: A Review with Original Observations on Human in Vivo Cells Emphasizing Morphology and Ultrastructure." *Ultrastructural Pathology* 39(2): 79–87. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/25569023/> (June 2, 2021).
- Sabri, Siham et al. 2004. "Differential Regulation of Actin Stress Fiber Assembly and Proplatelet Formation by $\alpha 2 \beta 1$ Integrin and GPVI in Human Megakaryocytes." *Blood* 104(10): 3117–25. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15265786/> (March 24, 2021).
- Do Sacramento, V et al. 2020. "Functional Properties of Human Platelets Derived in Vitro from CD34 + Cells." *Scientific reports* 10(1). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/31969609/> (July 30, 2021).
- Salbreux, Guillaume, Guillaume Charras, and Ewa Paluch. 2012. "Actin Cortex Mechanics and Cellular Morphogenesis." *Trends in Cell Biology* 22(10): 536–45. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22871642/> (June 21, 2021).
- Salles, Isabelle I. et al. 2008. "Inherited Traits Affecting Platelet Function." *Blood Reviews* 22(3): 155–72. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/18180086/> (June 7, 2021).
- Sanjuan-Pla, Alejandra et al. 2013. "Platelet-Biased Stem Cells Reside at the Apex of the Haematopoietic Stem-Cell Hierarchy." *Nature* 502(7470): 232–36.
- Sansores-Garcia, Leticia et al. 2011. "Modulating F-Actin Organization Induces Organ Growth by Affecting the Hippo Pathway." *EMBO Journal* 30(12): 2325–35. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21556047/> (June 15, 2021).
- Saotome, Kei et al. 2018. "Structure of the Mechanically Activated Ion Channel Piezo1." *Nature* 554(7693): 481–86. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/29261642/> (June 22, 2021).

- De Sauvage, Frederic J. et al. 1996. "Physiological Regulation of Early and Late Stages of Megakaryocytopoiesis by Thrombopoietin." *Journal of Experimental Medicine* 183(2): 651–56.
- Schachtner, Hannah et al. 2013. "Megakaryocytes Assemble Podosomes That Degrade Matrix and Protrude through Basement Membrane." *Blood* 121(13): 2542–52. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/121/13/2542/1365417/2542.pdf> (May 18, 2021).
- Scharenberg, Matthias A. et al. 2014. "TGF- β -Induced Differentiation into Myofibroblasts Involves Specific Regulation of Two MKL1 Isoforms." *Journal of Cell Science* 127(5): 1079–91. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/24424023/> (June 16, 2021).
- Schick, P. K. et al. 1998. *92 Blood Integrins Involved in the Adhesion of Megakaryocytes to Fibronectin and Fibrinogen*. W.B. Saunders.
- Schmaier, Alec A. et al. 2011. "Occlusive Thrombi Arise in Mammals but Not Birds in Response to Arterial Injury: Evolutionary Insight into Human Cardiovascular Disease." *Blood* 118(13): 3661–69. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21816834/> (June 8, 2021).
- Schmitt, Alain et al. 2001. "Of Mice and Men: Comparison of the Ultrastructure of Megakaryocytes and Platelets." *Experimental Hematology* 29(11): 1295–1302. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/11698125/> (April 28, 2021).
- Schneider, Maria et al. 2011. "Molecular Mechanisms of Centrosome and Cytoskeleton Anchorage at the Nuclear Envelope." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(9): 1593–1610. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20922455/> (June 21, 2021).
- Schofield, R. 1978. "The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell." *Blood cells* 4(1–2): 7–25. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/747780/> (July 29, 2021).
- Scholz, Nicole. 2018. "Cancer Cell Mechanics: Adhesion G Protein-Coupled Receptors in Action?" *Frontiers in oncology* 8: 59.
- Schulze, Harald et al. 2006. "Characterization of the Megakaryocyte Demarcation Membrane System and Its Role in Thrombopoiesis." *Blood* 107(10): 3868–75.
- Semeniak, Daniela et al. 2016. "Proplatelet Formation Is Selectively Inhibited by Collagen Type I through Syk-Independent GPVI Signaling." *Journal of Cell Science* 129(18): 3473–84. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27505889/> (March 24, 2021).
- Seth, A et al. 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* 8(7): 1783–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8510925> (March 18, 2020).
- Sethi, Kriti, Erin J. Cram, and Ronen Zaidel-Bar. 2017. "Stretch-Induced Actomyosin Contraction in Epithelial Tubes: Mechanotransduction Pathways for Tubular Homeostasis." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 71: 146–52. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/28610943/> (June 14, 2021).
- Shaklai, Matityahu, and Mehdi Tavassoli. 1978. "Demarcation Membrane System in Rat Megakaryocyte and the Mechanism of Platelet Formation: A Membrane Reorganization Process." *Journal of Ultrastructure Research* 62(3): 270–85. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/650736/> (May 17, 2021).
- Shen, Yi, and Susan K. Nilsson. 2012. "Bone, Microenvironment and Hematopoiesis." *Current Opinion in Hematology* 19(4): 250–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504524> (May 5, 2020).

- Shimi, Takeshi et al. 2008. "The A- and B-Type Nuclear Lamin Networks: Microdomains Involved in Chromatin Organization and Transcription." *Genes and Development* 22(24): 3409–21. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19141474/> (June 21, 2021).
- Shin, Jae-Won et al. 2014. "Contractile Forces Sustain and Polarize Hematopoiesis from Stem and Progenitor Cells." *Cell stem cell* 14(1): 81–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24268694> (May 26, 2017).
- Shin, Jae-Won, Joe Swift, Kyle R Spinler, and Dennis E Discher. 2011. "Myosin-II Inhibition and Soft 2D Matrix Maximize Multinucleation and Cellular Projections Typical of Platelet-Producing Megakaryocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(28): 11458–63. <http://www.pnas.org/content/108/28/11458>.
- Shin, Joseph Y., Wenhua Hu, Mayumi Naramura, and Christopher Y. Park. 2014. "High C-Kit Expression Identifies Hematopoietic Stem Cells with Impaired Self-Renewal and Megakaryocytic Bias." *Journal of Experimental Medicine* 211(2): 217–31.
- Shirota, T, and M Tavassoli. 1992. "Alterations of Bone Marrow Sinus Endothelium Induced by Ionizing Irradiation: Implications in the Homing of Intravenously Transplanted Marrow Cells." *Blood cells* 18(2): 197–214.
- Shivdasani, R A et al. 1995. "Transcription Factor NF-E2 Is Required for Platelet Formation Independent of the Actions of Thrombopoietin/MGDF in Megakaryocyte Development." *Cell* 81(5): 695–704. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774011> (February 25, 2020).
- Shivdasani, R A, Y Fujiwara, M A McDevitt, and S H Orkin. 1997. "A Lineage-Selective Knockout Establishes the Critical Role of Transcription Factor GATA-1 in Megakaryocyte Growth and Platelet Development." *The EMBO journal* 16(13): 3965–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233806> (February 25, 2020).
- Shivdasani, Ramesh A. 2001. "Molecular and Transcriptional Regulation of Megakaryocyte Differentiation." *Stem Cells* 19(5): 397–407. <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.19-5-397> (February 10, 2020).
- Siveen, Kodappully S. et al. 2020. "TRPV2: A Cancer Biomarker and Potential Therapeutic Target." *Disease Markers* 2020. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/33376561/> (March 15, 2021).
- Small, J. V. 1988. "Myosin Filaments on the Move." *Nature* 331(6157): 568–69. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/3340208/> (June 21, 2021).
- Small, J. Victor, K. Rottner, I. Kaverina, and K. I. Anderson. 1998. "Assembling an Actin Cytoskeleton for Cell Attachment and Movement." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1404(3): 271–81. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9739149/> (June 21, 2021).
- Smith, Elenoe C. et al. 2013. "Induction of Megakaryocyte Differentiation Drives Nuclear Accumulation and Transcriptional Function of MKL1 via Actin Polymerization and RhoA Activation." *Blood* 121(7): 1094–1101. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23243284/> (June 16, 2021).
- Solh, Tia, Ashley Botsford, and Melhem Solh. 2015. "Glanzmann's Thrombasthenia: Pathogenesis, Diagnosis, and Current and Emerging Treatment Options." *Journal of Blood Medicine* 6: 219–27. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26185478/> (June 7, 2021).
- Spangrude, Gerald J., Shelly Heimfeld, and Irving L. Weissman. 1988. "Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells." *Science* 241(4861): 58–62.

- <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/2898810/> (April 26, 2021).
- Speight, Pam, Michael Kofler, Katalin Szász, and András Kapus. 2016. "Context-Dependent Switch in Chemo/Mechanotransduction via Multilevel Crosstalk among Cytoskeleton-Regulated MRTF and TAZ and TGF β -Regulated Smad3." *Nature Communications* 7. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27189435/> (June 15, 2021).
- Stasi, Roberto et al. 2010. "Thrombopoietic Agents." *Blood Reviews* 24(4–5): 179–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2010.04.002>.
- Stegner, David et al. 2017. "Thrombopoiesis Is Spatially Regulated by the Bone Marrow Vasculature." *Nature Communications* 8(1).
- Stenberg, P. E., and J. Levin. 1989. "Mechanisms of Platelet Production." *Blood Cells* 15(1): 23–47. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/2649182/> (May 17, 2021).
- Straneva, J. E. et al. 1986. "Terminal Cytoplasmic Maturation of Human Megakaryocytes in Vitro." *Experimental Hematology* 14(10): 919–29. <https://europepmc.org/article/med/3770100> (April 28, 2021).
- Strassel, Catherine et al. 2009. "Intrinsic Impaired Proplatelet Formation and Microtubule Coil Assembly of Megakaryocytes in a Mouse Model of Bernard-Soulier Syndrome." *Haematologica* 94(6): 800–810. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19377075/> (June 2, 2021).
- . 2012. "Hirudin and Heparin Enable Efficient Megakaryocyte Differentiation of Mouse Bone Marrow Progenitors." *Experimental Cell Research* 318(1): 25–32. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22008103/> (July 4, 2021).
- . 2016. "Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Enrichment of a Megakaryocytic Precursor with a High Potential to Produce Proplatelets." *Blood* 127(18): 2231–40. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26966088/> (July 4, 2021).
- . 2019. "An Essential Role for A4A-Tubulin in Platelet Biogenesis." *Life Science Alliance* 2(1). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/30760556/> (May 17, 2021).
- Stricker, Jonathan, Tobias Falzone, and Margaret Gardel. 2010. "Mechanics of the F-Actin Cytoskeleton." *Journal of Biomechanics* 43(1): 9–14. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19913792/> (June 21, 2021).
- Strotmann, Rainer et al. 2000. "OTRPC4, a Nonselective Cation Channel That Confers Sensivity to Extracellular Osmolarity." *Nature Cell Biology* 2(10): 695–702. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/11025659/> (October 14, 2020).
- Sun, Zhiqi, Shengzhen S. Guo, and Reinhard Fässler. 2016. "Integrin-Mediated Mechanotransduction." *Journal of Cell Biology* 215(4): 445–56. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27872252/> (July 5, 2021).
- Swift, Joe et al. 2013. "Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation." *Science* 341(6149). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23990565/> (June 21, 2021).
- Syeda, Ruhma et al. 2015. "Chemical Activation of the Mechanotransduction Channel Piezo1." *eLife* 4(MAY). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/26001275/> (June 22, 2021).
- Szalai, G., A. C. LaRue, and D. K. Watson. 2006. 63 Cellular and Molecular Life Sciences *Molecular Mechanisms of Megakaryopoiesis*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909203> (February 10, 2020).

- Tablin, Fern, Marlene Castro, and Robert M Leven. 1990. 97 *Journal of Cell Science Blood Platelet Formation in Vitro. The Role of the Cytoskeleton in Megakaryocyte Fragmentation*. The Company of Biologists.
- Taichman, R S, M J Reilly, and S G Emerson. 1999. "Osteoblasts and The Hematopoietic Microenvironment." *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 4(5): 421–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27426847> (January 19, 2021).
- Tajika, Kenji, Kenji Ikebuchi, Kazuo Dan, and Shigetaka Asano. 1996. "A Role of GAGs in ECM on Morphogenesis of Megakaryocytes." *British Journal of Haematology* 94(1): 34–39. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/8757505/> (July 4, 2021).
- Tamkun, John W. et al. 1986. "Structure of Integrin, a Glycoprotein Involved in the Transmembrane Linkage between Fibronectin and Actin." *Cell* 46(2): 271–82. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/3487386/> (June 23, 2021).
- Tan, Samuel C.W. et al. 2008. "Viscoelastic Behaviour of Human Mesenchymal Stem Cells." *BMC Cell Biology* 9. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/18644160/> (April 1, 2021).
- Tavassoli, Mehdi, and Makoto Aoki. 1981. "Migration of Entire Megakaryocytes through the Marrow-Blood Barrier." *British Journal of Haematology* 48(1): 25–29. <https://onlinelibrary-wiley-com.scd-rproxy.u-strasbg.fr/doi/full/10.1111/j.1365-2141.1981.00025.x> (May 18, 2021).
- Tavassoli, Mehdi, and Matityahu Shaklai. 1979. "Absence of Tight Junctions in Endothelium of Marrow Sinuses: Possible Significance for Marrow Cell Egress." *British Journal of Haematology* 41(3): 303–7.
- Tavian, Manuela, and Bruno Péault. 2005. "The Changing Cellular Environments of Hematopoiesis in Human Development in Utero." *Experimental Hematology* 33(9 SPEC. ISS.): 1062–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140155> (April 28, 2020).
- Thiele, Jürgen, and Hans M. Kvasnicka. 2007. "Myelofibrosis - What's in a Name? Consensus on Definition and EUMNET Grading." *Pathobiology* 74(2): 89–96. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17587880/> (April 5, 2021).
- Thiery, J P, and M Bessis. 1956. "[Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells]." *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* 242(2): 290–92.
- Thom, Christopher S., Erik Brandsma, and Michele P. Lambert. 2020. "Thrombocytosis in an Infant with a TRPV4 Mutation: A Case Report." *Platelets*: 1–3. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09537104.2020.1755644> (October 20, 2020).
- Thon, Jonathan N. et al. 2010. "Cytoskeletal Mechanics of Proplatelet Maturation and Platelet Release." *Journal of Cell Biology* 191(4): 861–74.
- Thon, Jonathan N., and Joseph E. Italiano. 2012. "Does Size Matter in Platelet Production?" *Blood* 120(8): 1552–61. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22665937/> (June 8, 2021).
- Thon, Jonathan N et al. 2014. "Platelet Bioreactor-on-a-Chip." *Blood* 124(12): 1857–67.
- Thon, Jonathan N, and Joseph E Italiano. 2010. "Platelet Formation." *Seminars in hematology* 47(3): 220–26. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/20620432/> (July 27, 2021).
- Tijssen, M. R., and C. Ghevaert. 2013. "Transcription Factors in Late Megakaryopoiesis and Related Platelet Disorders." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11(4): 593–604. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/23311859/> (April 28, 2021).

- Till, J E, and E A McCulloch. 1961. 14 Research A *Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells*.
- Tober, Joanna et al. 2007. "The Megakaryocyte Lineage Originates from Hemangioblast Precursors and Is an Integral Component Both of Primitive and of Definitive Hematopoiesis." *Blood* 109(4): 1433–41. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/17062726/> (March 24, 2021).
- Tojkander, Sari, Gergana Gateva, and Pekka Lappalainen. 2012. "Actin Stress Fibers - Assembly, Dynamics and Biological Roles." *Journal of Cell Science* 125(8): 1855–64. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/22544950/> (June 21, 2021).
- Tomer, Aaron. 2004. "Human Marrow Megakaryocyte Differentiation: Multiparameter Correlative Analysis Identifies von Willebrand Factor as a Sensitive and Distinctive Marker for Early (2N and 4N) Megakaryocytes." *Blood* 104(9): 2722–27. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/15198950/> (April 28, 2021).
- Topp, KS, F Tablin, and J Levin. 1990. "Culture of Isolated Bovine Megakaryocytes on Reconstituted Basement Membrane Matrix Leads to Proplatelet Process Formation." *Blood* 76(5): 912–24.
- Travlos, Gregory S. 2006. "Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow." *Toxicologic pathology* 34(5): 548–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067943>.
- Troussard, Xavier et al. 2014. "Full Blood Count Normal Reference Values for Adults in France." *Journal of Clinical Pathology* 67(4): 341–44. <http://dx.doi.org/10.1136/> (June 8, 2021).
- Trowbridge, E. A., J. F. Martin, and D. N. Slater. 1982. "Evidence for a Theory of Physical Fragmentation of Megakaryocytes, Implying That All Platelets Are Produced in the Pulmonary Circulation." *Thrombosis Research* 28(4): 461–75. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/7164032/> (May 18, 2021).
- Tsang, Alice P. et al. 1997. "FOG, a Multitype Zinc Finger Protein, Acts as a Cofactor for Transcription Factor GATA-1 in Erythroid and Megakaryocytic Differentiation." *Cell* 90(1): 109–19.
- Vainchenker, William, and Hana Raslova. 2020. "Megakaryocyte Polyploidization: Role in Platelet Production." *Platelets* 31(6): 707–16. <https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1667497>.
- Varga-Szabo, D, A Braun, and Bernhard Nieswandt. 2009. "Calcium Signaling in Platelets." *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7(7): 1057–66. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19422456/> (July 27, 2021).
- Van Der Velde-Zimmermann, D. et al. 1997. "Fibronectin Distribution in Human Bone Marrow Stroma: Matrix Assembly and Tumor Cell Adhesion via A5 β 1 Integrin." *Experimental Cell Research* 230(1): 111–20. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/9013713/> (April 20, 2021).
- Velling, Teet et al. 2002. "Polymerization of Type I and III Collagens Is Dependent on Fibronectin and Enhanced by Integrins A11 β 1 and A2 β 1." *Journal of Biological Chemistry* 277(40): 37377–81. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12145303/> (April 2, 2021).
- Vellino, Sanela et al. 2021. "Cross-Talk between the Calcium Channel TRPV4 and Reactive Oxygen Species Interlocks Adhesive and Degradative Functions of Invadosomes." *The Journal of cell biology* 220(2). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/33399853/> (March 15, 2021).
- Vicente-Manzanares, Miguel et al. 2011. "Myosin IIA/IIB Restrict Adhesive and Protrusive Signaling to Generate Front-Back Polarity in Migrating Cells." *Journal of Cell Biology* 193(2): 381–96.

- <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/21482721/> (June 21, 2021).
- Vitrat, Natacha et al. 1998. "Endomitosis of Human Megakaryocytes Are Due to Abortive Mitosis." *Blood* 91(10): 3711–23. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/91/10/3711/1416560/3711.pdf> (April 27, 2021).
- Vo, Quyen T, and Dennis F Thompson. 2019. "A Review and Assessment of Drug-Induced Thrombocytosis." *The Annals of pharmacotherapy* 53(5): 523–36.
- Voets, Thomas et al. 2002. "Molecular Determinants of Permeation through the Cation Channel TRPV4." *The Journal of biological chemistry* 277(37): 33704–10.
- Vogel, Viola, and Michael Sheetz. 2006. "Local Force and Geometry Sensing Regulate Cell Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(4): 265–75. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/16607289/> (June 10, 2021).
- Vögtle, T et al. 2019. "Heparan Sulfates Are Critical Regulators of the Inhibitory Megakaryocyte-Platelet Receptor G6b-B." *eLife* 8. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/31436532/> (July 29, 2021).
- De vos, Winnok H. et al. 2011. "Repetitive Disruptions of the Nuclear Envelope Invoke Temporary Loss of Cellular Compartmentalization in Laminopathies." *Human Molecular Genetics* 20(21): 4175–86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21831885/> (June 21, 2021).
- Vriens, J. et al. 2004. "Cell Swelling, Heat, and Chemical Agonists Use Distinct Pathways for the Activation of the Cation Channel TRPV4." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(1): 396–401. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/14691263/> (June 23, 2021).
- Wang, Da Zhi et al. 2002. "Potentiation of Serum Response Factor Activity by a Family of Myocardin-Related Transcription Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(23): 14855–60. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12397177/> (June 16, 2021).
- Wang, Leo D, and Amy J Wagers. 2011. "Dynamic Niches in the Origination and Differentiation of Haematopoietic Stem Cells." *Nature reviews. Molecular cell biology* 12(10): 643–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21886187> (May 22, 2017).
- Wang, Ning, and Dimitrije Stamenović. 2000. "Contribution of Intermediate Filaments to Cell Stiffness, Stiffening, and Growth." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 279(1 48-1). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/10898730/> (June 21, 2021).
- Wang, Ning, Jessica D. Tytell, and Donald E. Ingber. 2009. "Mechanotransduction at a Distance: Mechanically Coupling the Extracellular Matrix with the Nucleus." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(1): 75–82. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/19197334/> (June 14, 2021).
- Ward, Christina M., and Katya Ravid. 2020. "Matrix Mechanosensation in the Erythroid and Megakaryocytic Lineages." *Cells* 9(4): 894.
- Ward, Diane, Shelly Shiflett, and Jerry Kaplan. 2002. "Chediak-Higashi Syndrome: A Clinical and Molecular View of a Rare Lysosomal Storage Disorder." *Current molecular medicine* 2(5): 469–77. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12125812/> (July 6, 2021).
- Wehrle-Haller, Bernhard. 2012. "Structure and Function of Focal Adhesions." *Current opinion in cell biology* 24(1): 116–24.
- Wei, Wei Chun, Hsi Hui Lin, Meng Ru Shen, and Ming Jer Tang. 2008. "Mechanosensing Machinery

- for Cells under Low Substratum Rigidity." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 295(6). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/18923058/> (June 10, 2021).
- Woo, Seung Hyun et al. 2014. "Piezo2 Is Required for Merkel-Cell Mechanotransduction." *Nature* 509(7502): 622–26. <https://www.nature.com/articles/nature13251> (June 22, 2021).
- Woolthuis, Carolien M, and Christopher Y Park. 2016. "Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Commitment to the Megakaryocyte Lineage." *Blood* 127(10): 1242–48.
- Wright, James Homer. 1902. "A Rapid Method for the Differential Staining of Blood Films and Malarial Parasites." *The Journal of medical research* 7(1): 138–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19971449> (June 8, 2021).
- . 1906. "The Origin and Nature of the Blood Plates." *The Boston Medical and Surgical Journal* 154(23): 643–45. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm190606071542301> (June 8, 2021).
- Wright, JR, S Amisten, AH Goodall, and MP Mahaut-Smith. 2016. "Transcriptomic Analysis of the Ion Channelome of Human Platelets and Megakaryocytic Cell Lines." *Thrombosis and haemostasis* 116(2): 272–84. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/27277069/> (July 27, 2021).
- Wu, Jason, Amanda H Lewis, and Jörg Grandl. 2017. "Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels." *Trends in biochemical sciences* 42(1): 57–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27743844> (February 26, 2018).
- Xu, Chunliang et al. 2018. "Stem Cell Factor Is Selectively Secreted by Arterial Endothelial Cells in Bone Marrow." *Nature Communications* 9(1): 1–13. www.nature.com/naturecommunications (January 19, 2021).
- Xu, Hongshi et al. 2003. "Regulation of a Transient Receptor Potential (TRP) Channel by Tyrosine Phosphorylation: Src Family Kinase-Dependent Tyrosine Phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 Mediates Its Response to Hypotonic Stress." *Journal of Biological Chemistry* 278(13): 11520–27. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/12538589/> (June 23, 2021).
- Yamada, Eichi. 1957. "The Fine Structure of the Megakaryocyte in the Mouse Spleen." *Cells Tissues Organs* 29(3): 267–90. <https://www.karger.com/Article/FullText/141169> (April 28, 2021).
- Yamamoto, Ryo et al. 2013. "Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells." *Cell* 154(5): 1112–26.
- Yang, Ran et al. 2019. "Therapeutic Options for Adult Patients with Previously Treated Immune Thrombocytopenia - a Systematic Review and Network Meta-Analysis." *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 24(1): 290–99. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/30661482/> (July 29, 2021).
- Yatomi, Yutaka et al. 1997. "Sphingosine 1-Phosphate, a Bioactive Sphingolipid Abundantly Stored in Platelets, Is a Normal Constituent of Human Plasma and Serum." *Journal of Biochemistry* 121(5): 969–73. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9192741/> (June 8, 2021).
- Yu, Suyun et al. 2019. "Transient Receptor Potential Ion-Channel Subfamily V Member 4: A Potential Target for Cancer Treatment." *Cell Death and Disease* 10(7). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/31235786/> (June 23, 2021).
- Zarychanski, Ryan et al. 2012. "Mutations in the Mechanotransduction Protein PIEZO1 Are Associated with Hereditary Xerocytosis." *Blood* 120(9): 1908. [/pmc/articles/PMC3448561/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22448561/) (July 31, 2021).
- Zhang, Lin et al. 2012. "A Novel Role of Sphingosine 1-Phosphate Receptor S1pr1 in Mouse

- Thrombopoiesis." *Journal of Experimental Medicine* 209(12): 2165–81. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/23148237/> (May 17, 2021).
- . 2013. "Sphingosine Kinase 2 (Sphk2) Regulates Platelet Biogenesis by Providing Intracellular Sphingosine 1-Phosphate (S1P)." *Blood* 122(5): 791–802. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/23775711/> (June 8, 2021).
- Zhang, Shuyuan, Yu-Hsuan Lin, Branden Tarlow, and Hao Zhu. 2019. "The Origins and Functions of Hepatic Polyploidy." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 18(12): 1302–15.
- Zhao, Bin et al. 2007. "Inactivation of YAP Oncoprotein by the Hippo Pathway Is Involved in Cell Contact Inhibition and Tissue Growth Control." *Genes and Development* 21(21): 2747–61. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/17974916/> (June 15, 2021).
- Zhao, Ruogang, Krista L. Sider, and Craig A. Simmons. 2011. "Measurement of Layer-Specific Mechanical Properties in Multilayered Biomaterials by Micropipette Aspiration." *Acta Biomaterialia* 7(3): 1220–27. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/21056128/> (April 1, 2021).
- Zhao, Xiao Han et al. 2007. "Force Activates Smooth Muscle α -Actin Promoter Activity through the Rho Signaling Pathway." *Journal of Cell Science* 120(10): 1801–9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/17456553/> (June 16, 2021).
- Zheng, Junke et al. 2011. "Angiopoietin-like Protein 3 Supports the Activity of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niche." *Blood* 117(2): 470–79. [/pmc/articles/PMC3031476/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/17456553/) (January 19, 2021).
- Zou, Yunzeng et al. 2004. "Mechanical Stress Activates Angiotensin II Type 1 Receptor without the Involvement of Angiotensin II." *Nature Cell Biology* 6(6): 499–506. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/15146194/> (June 22, 2021).
- Zubcevic, Lejla et al. 2016. "Cryo-Electron Microscopy Structure of the TRPV2 Ion Channel." *Nature Structural and Molecular Biology* 23(2): 180–86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/26779611/> (June 23, 2021).
- Zucker-Franklin, Dorothea, and Claire S. Philipp. 2000. "Platelet Production in the Pulmonary Capillary Bed: New Ultrastructural Evidence for an Old Concept." *American Journal of Pathology* 157(1): 69–74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/10880377/> (May 17, 2021).
- Zuckerman, K. S., and M. S. Wicha. 1983. "Extracellular Matrix Production by the Adherent Cells of Long-Term Murine Bone Marrow Cultures." *Blood* 61(3): 540–47.

Etude des facteurs mécanobiologiques impliqués dans la formation des plaquettes sanguines

De nombreux aspects interviennent dans la régulation de la thrombopoïèse. La composante mécanique de l'environnement médullaire fait partie des facteurs à considérer lors de l'étude de la formation des plaquettes sanguines. Ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier les mécanismes par lesquels les mégacaryocytes s'adaptent aux changements de contraintes mécaniques de leur environnement. Le projet portait sur l'impact de la perte de confinement qui survient lors de l'extension des proplaquettes dans la circulation sanguine. Les travaux réalisés ont mis en avant une différence d'implication du cytosquelette dans l'extension des proplaquettes entre *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, mes travaux ont mis en évidence un rôle majeur du calcium extracellulaire dans la formation des proplaquettes. Les résultats obtenus permettent également de conclure d'une implication, au moins partiellement mécano-dépendante, du canal TRPV4 dans ce phénomène. De plus, un rôle de TRPV2 et des récepteurs Piezo 1 et 2 dans la thrombopoïèse a été démontré.

Mots clés : mégacaryocyte, mécanobiologie, canaux TRPV, proplaquettes

Study of the mechanobiological factors involved in blood platelet formation

Many aspects are involved in the regulation of thrombopoiesis. The mechanical properties of the medullar environment are to be considered when studying the production of blood platelets. The aim of this thesis was to identify the mechanisms by which megakaryocytes adapt to mechanical changes in their environment. The project focused on the impact of the loss of confinement that occurs during the proplatelet extension in the bloodstream. The work carried out highlighted a difference in the involvement of the cytoskeleton in proplatelet formation between *in vitro* and *in vivo* conditions. On the other hand, my work has highlighted a major role of extracellular calcium in proplatelet formation. The results obtained allow us to conclude that the TRPV4 channel is involved mechanically, at least in part, in the process. It also demonstrates a role for TRPV2 and Piezo 1 and 2 receptors in thrombopoiesis.

Keywords: megakaryocyte, mechanobiology, TRPV channels, proplatelets