

Thèse présentée 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

Présentée par

Fabien PERTUY

**Étude des mécanismes de formation
des plaquettes sanguines :
rôle de l'environnement médullaire**

Soutenue publiquement le **25 mars 2014**

Directeur de thèse :

Madame Catherine LÉON

CR1, INSERM, Université de Strasbourg

Rapporteurs externes :

Madame Alessandra BALDUINI

Professeur, Université de Pavie, Italie

Madame Hana RASLOVA

DR2, INSERM, Université de Paris XI

Examineur :

Monsieur Jean-Luc GALZI

DR1, CNRS, Université de Strasbourg

Membres invités :

Monsieur Jean-Noël FREUND

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

Monsieur Christian GACHET

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S 949

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

Directeur : Christian GACHET

Etablissement Français du Sang (EFS)-Alsace

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-alsace.fr

Remerciements

En toute honnêteté, je n'ai pas vu ces années passer. Ce doit être le signe que l'épreuve ne fut pas si dure, ou plutôt que j'ai été suffisamment bien entouré pour ne pas m'en rendre compte. En fait, je suis convaincu qu'à l'instar du mégacaryocyte, l'environnement du doctorant influe définitivement sur la qualité de sa maturation.

A l'issue de cette thèse, je tiens à remercier ceux sans qui je n'aurais pas pu vivre cette expérience, à commencer par Christian GACHET, directeur de l'UMR_S949 et de l'EFS-Alsace, qui m'a permis d'intégrer ce laboratoire, et dont les questions/conseils/avis/remarques m'ont, je pense, permis de m'améliorer.

A l'ARMESA et la Société Française d'Hématologie, qui ont financé mon travail, je leur en suis reconnaissant.

Et puisqu'une thèse n'a pas de raison d'être si elle ne finit pas, je remercie Alessandra BALDUINI, Hana RASLOVA, Jean-Luc GALZI et Jean-Noël FREUND pour avoir accepté de siéger dans mon jury, et d'évaluer mon travail.

Je remercie François LANZA, mon directeur d'équipe, pour sa grande patience et ses suggestions, qui ont manifestement permis d'améliorer mon travail.

Je remercie Catherine LEON, ma directrice de thèse, pour m'avoir accompagné tout au long de cette aventure, il me semble que le bilan n'est plutôt pas mauvais. Merci pour m'avoir dirigé, écouté, soutenu, pour avoir discuté et m'avoir laissé suffisamment de liberté pour m'épanouir dans ce travail. Il me semble que nous nous sommes plutôt (très) bien entendus, et j'en suis heureux.

Merci à Josiane et Patricia, pour leur travail exceptionnel, leur bonne humeur, leur humour et leur amitié. Je ne conseillerais tout de même à personne de proposer un mouchoir à Pat', et il me semble que Jojo pourrait casser des dents si elle s'énerve, mais bien heureusement ces événements sont si rares que votre présence à toutes les deux est majoritairement délicieuse.

Merci à Alicia, qui a vite su s'adapter à son environnement et assurera un niveau constant (et tout à fait honorable) de râleries quand je partirai. Souviens-toi que c'est toi qui portes l'étoile (rose, bien sûr), shérif.

A Anita, Fabienne et Jean-Yves, qui m'ont « adopté » et appris tout ce que je sais en microscopie électronique (et une bonne partie de mon vocabulaire alsacien). Anita, j'ai apprécié nos discussions, ton expérience de la microscopie électronique est inestimable et tu m'as beaucoup appris, merci. Fabienne, ta patience et tes astuces pour la manipulation de l'ultramicrotome sont sans égal, merci. Continue à ne pas te laisser marcher sur les pieds (et par les meubles non plus, c'est meilleur pour la santé :p). Jean-Yves, on en a passé du temps à discuter de TEM, SEM, FIB/SEM, AMIRA et autre reconstructions 3D... j'espère qu'on en aura encore l'occasion, ça me ferait plaisir. Promis, quand j'aurai le 20, je te préviens ! Merci à tous les trois pour votre amitié.

A Eric, mon partenaire de thèse. Je vais me contenter du minimum sans quoi j'aurais encore des pages à remplir... merci.

A Sylvie, la maman du labo, toujours bon public (trop bon public ?) et la première à rire de mes blagues pas toujours très bonnes. Je crois que tu es responsable de la deuxième partie de mon vocabulaire alsacien, si raffinée que je pourrais devenir fleuriste... Merci Gummi Mucka.

A Nico, toujours le break qu'il faut, quand il faut. Pour ta bonne humeur, qui remplirait un labo vide (tu ne passes pas inaperçu, enfin, inentendu :p). Tu connais celle des 9 tomates ? Merci.

A Véro, Anne et Catherine (B), qui m'ont permis de relever considérablement le niveau de mes blagues, même si j'ai peur de les avoir un peu contaminées toutes les trois... Merci.

A tous les occupants, passés et présents, du bureau des étudiants, et à tous les étudiants que j'ai croisé à l'EFS, dont Salima, Léa et Emmanuelle, avec qui j'ai bien ri. Merci.

A Pascal et Claude et toute l'équipe de foot, c'était vraiment sympa.

A tous les autres (je ne pourrai pas tous vous citer), Steph, Domi, MJB, Valérie (dont les placards regorgent de trésors), Blandine, Pierre, Béatrice, Manuela, Catherine (S), Monique, Catherine (Z), Pascal (M), Alain, Benjamin, Senay, Catherine (R), Philippe, etc... De près ou de loin, vous m'avez toutes et tous apporté quelque chose, merci.

Je ne me sentirais pas tout à fait honnête si je ne m'excusais pas, mais je déguiserais cela sous forme de félicitations : vous m'avez supporté pendant trois ans et demi, à tous, Bravo !

Au-delà du cercle professionnel, je n'aurais pas pu (ou voulu) traverser ces années sans mes proches. Je choisis de leur dédier cette thèse.

A Etienne, Ludovic et Marion, Mathieu et Julie.

A ma famille, vous êtes toujours là quand il faut.

A Clémence, nous avons fait le chemin ensemble. Ta présence m'est infiniment précieuse.

Sommaire

Sommaire	i
Liste des figures	vi
Liste des tables	viii
Liste des annexes	ix
Liste des abréviations	x
Introduction	1
Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse	2
Historique	2
Le mégacaryocyte	4
Ontogénèse des mégacaryocytes	5
Mécanismes moléculaires de différenciation	6
Attributs du mégacaryocyte mature	8
Polyploïdie	10
Membranes de démarcation	13
Organelles spécifiques	14
Zone périphérique	15
La thrombopoïèse	16
La plaquette sanguine	19
Structure générale de la plaquette	19
Les organelles de sécrétion	20
Granules alpha	21
Granules denses	21

Lysosomes	21
Fonctions des plaquettes	23
L'environnement médullaire dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse	24
Les interactions cellules/environnement	25
La matrice extracellulaire	26
La MEC dans la moelle osseuse	28
Intégrines	31
Structure des intégrines	31
Fonctions des intégrines	32
Les intégrines mégacaryocytaires	33
Partie I - Défauts des mégacaryocytes <i>Myh9</i> ^{-/-} : répartition des organelles.	37
Les maladies liées à <i>MYH9</i>	38
Fonctions de la myosine non-musculaire IIA	39
Le modèle <i>Myh9</i> ^{-/-} : avancées sur le rôle de la myosine IIA dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse	40
La répartition des organelles dans les plaquettes <i>Myh9</i> ^{-/-}	41
Article publié - Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets.	43
Discussion	44
Partie II - Mégacaryocytes et environnement médullaire : rôle des intégrines.	47
Etude du rôle des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse	48
Matériel et méthodes	48
Matériel	48
Animaux	49
Numération plaquettaire	49
Formation de proplaquettes en explant de moelle osseuse	50

Microscopie électronique à transmission	50
Western Blot	51
Résultats	52
L'absence d'intégrines de type $\beta 3$, mais pas $\beta 1$, affecte négativement la thrombopoïèse.	52
L'absence d'intégrine αIIb ne perturbe pas la production des plaquettes.	54
La suppression des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ entraîne un défaut d'organisation du DMS dans les mégacaryocytes <i>in situ</i> .	55
Discussion	59
Partie III - Mégacaryocytes et environnement médullaire : Culture 3D.	61
Influence de l'environnement sur les fonctions cellulaires	62
Les systèmes de culture cellulaire en trois dimensions (3D)	62
Article en preparation - Improved megakaryocyte differentiation using 3D hydrogel progenitor culture	65
Introduction	65
Material and methods	67
Materials	67
Animals	67
Culture of mouse bone marrow progenitor cells	67
<i>In vitro</i> proplatelets formation	67
Physical measurements (stiffness)	68
Transmission electron microscopy (TEM)	68
Flow cytometry	68
Results	69
Megakaryocyte maturation requires bone marrow environment	69
Improved demarcation membranes organization in 3D MC gel culture	69

Increasing gel stiffness improves DMS structuration	70
MC culture reproduces <i>in situ</i> morphological defects of <i>Myh9</i> ^{-/-} megakaryocytes	70
Megakaryocytes differentiation is improved in MC cell culture	71
Increased proplatelets formation from 3D cultured megakaryocytes	71
Discussion	78
Partie IV - Caractérisation de la souris Pf4-cre.	81
Etudes de la lignée MK grâce aux souris KO : nécessité du ciblage	82
La lignée transgénique murine « Pf4-cre »	82
Recombinaison non-hématopoïétique avec le système Pf4-cre	82
Article en préparation - Evidence for non-hematopoietic Cre activity in Pf4-Cre mice.	84
Abstract	84
Introduction	85
Material and Methods	86
Materials	86
Animals	86
Flow cytometry	86
Confocal microscopy	87
Immunogold Transmission Electron Microscopy	87
Immunohistochemistry	88
Results	89
Early expression of Pf4-cre transgene in all megakaryocytes	89
Pf4-cre recombination is minor event among circulating leukocytes	89
Recombined infiltrated cells in mouse embryo and adult organs.	90
Pf4-cre expression in the distal intestine can lead to unexpected phenotype.	90
Pf4-cre expression is endogenous in the distal intestine.	91

Discussion	92
Figures	95
Discussion	110
Discussion générale	113
Annexe 1 – Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD.	117
Annexe 2 – Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes.	118
Bibliographie	119

Liste des figures

Figure 1 : Mégacaryocytes dessinés par Howell en 1890	3
Figure 2 : Hématopoïèse et engagement mégacaryocytaire	8
Figure 3 : Stades de maturation du mégacaryocyte	9
Figure 4 : Cycle cellulaire et Endomitose	11
Figure 5 : Organelles spécifiques du mégacaryocyte	15
Figure 6 : Mégacaryocyte formant des proplaquettes	17
Figure 7 : Structure de la plaquette sanguine	20
Figure 8 : Organisation de la moelle osseuse hématopoïétique	24
Figure 9 : Les protéines de la MEC forment un réseau tridimensionnel	27
Figure 10 : Les dimères d'intégrines	31
Figure 11 : Signalisation bilatérale des intégrines	32
Figure - II-1 : Les intégrines de type $\beta 3$, mais pas de type $\beta 1$, jouent un rôle clé dans la thrombopoïèse	53
Figure - II-2 : L'intégrine $\alpha I I b$ n'est pas nécessaire à la formation des plaquettes	54
Figure - II-3 : Ultrastructure <i>in situ</i> des mégacaryocytes <i>Itgb1</i> ^{-/-} , <i>Itgb3</i> ^{-/-} et <i>Itgb1</i> ^{-/-} / <i>Itgb3</i> ^{-/-}	56
Figure - II-4 : Planche d'images représentatives des mégacaryocytes <i>Pf4-cre</i> en MET.	57
Figure - II-5 : Planche d'images représentatives de mégacaryocytes <i>Itgb1</i> ^{-/-} / <i>Itgb3</i> ^{-/-} en MET.	58
Figure - III-1 : Différences d'organisation <i>in situ</i> et <i>in vitro</i> en 2D et 3D	63
Figure - III-2 : The bone marrow environment strongly influences WT and <i>Myh9</i> ^{-/-} megakaryocytes maturation	72
Figure - III-3 : MC-cultured WT megakaryocytes display an improved cytoplasm organization	73

Figure - III-4 : Methylcellulose viscoelastic properties evolution at 37°C	74
Figure - III-5 : MC-cultured <i>Myh9</i> ^{-/-} megakaryocytes display an abnormal morphology	75
Figure - III-6 : MC culture improves megakaryocytes ploidy	76
Figure - III-7 : More megakaryocytes form proplatelets when cultured in MC gel	77
Figure - IV-1 : Pf4-cre mediated recombination occurs early in megakaryopoiesis	95
Figure - IV-2 : Minor Pf4-cre recombination among circulating CD45 ⁺ cells	96
Figure - IV-3 : Recombined cells in <i>mT/mG;Pf4-cre</i> embryo	97
Figure - IV-4 : Recombined cells in <i>mT/mG;Pf4-cre</i> adult organs	98
Figure - IV-5 : Pf4-cre activity in the distal intestine	99
Figure - IV-6 : <i>Apc</i> ^{flox/flox} ; <i>Pf4-cre</i> mice develop adenocarcinoma in the distal intestine	100
Figure - IV-7 : Pf4-cre activity is intrinsic to the distal intestine	101
Figure - IV-8 : Mosaic reconstitution of a <i>mT/mF;Pf4-cre</i> 14.5dpc embryo	102

Liste des tables

Table 1 : Contenu des granules plaquettaires.	22
Table 2 : Composition de la matrice extracellulaire de la moelle osseuse de mammifères	29
Table 3 : Principaux ligands connus des intégrines exprimées par les mégacaryocytes	33
Table - IV-1 : Non-exhaustive list of the studies using <i>Pf4-cre</i> mice in gene depletion or transgene expression strategies	104

Liste des annexes

Annexe 1 – Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD.

Annexe 2 – Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes.

Liste des abréviations

2D	deux dimensions
3D	trois dimensions
7AAD	7-AminoActinomycine D
ADP	Adénosine DiPhosphate
AF647	AlexaFluor 647
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BSA	Bovine Serum Albumin
C/EBP α	CCAAT/Enhancer-Binding Protein alpha
cdk	cyclin dependant kinase
CDXX	Cluster of Differentiation XX
CFU-MK	Colony Forming Unit - Megakaryocyte
CMP	Common Myeloid Progenitor
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CTAD	Citrate Théophylline Adénosine Dipyridamole
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMS	Demarcation Membrane System
dpc	day post coitus
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Acide Ethylène Glycol Tétra-acétique
EPO	ErythroPOïétine
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF-4	Fibroblast Growth Factor 4

FLI1	Friend of Leukemia Integration 1
FOG1	Friend Of GATA1
GAG	GlycosAminoGlycanes
GEF	Guanine Exchange Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GPXX	GlycoProtéine XX
GT	Glanzmann Thrombasthenia
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IL-X	InterLeukine X
IMS	Invaginated Membrane System
JAK	JANus Kinase
LRO	Lysosome Related Organelles
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MC	Méthylcellulose
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEP	Megakaryocyte Erythrocyte Progenitor
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MKL1	Megakaryoblastic Leukemia 1
MPP	MultiPotent Progenitor
mTOR	mouse Target Of Rapamycin
MVB	MultiVesicular Body
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE/Cy7	PhycoÉrythrine / Cyanin 7
PerCP/Cy5.5	Peridinin ChloroPhyll / Cyanin 5.5
PF4	Platelet Factor 4
PI3K	PhosphoInositol-3-Phosphate
PVDF	PolyVynilyDene Fluoride
PZ	Peripheral Zone
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor 1
SDS-PAGE	Sodium DodecylSulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SRF	Serum Response Factor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

TAL1	T-cell Acute Leukemia 1
tdTomato	tandem dimer Tomato
TPO	ThromboPOïétine
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
vWF	Facteur Willebrand
WT	Wild Type

Introduction

Mégacaryopoïèse, thrombopoïèse et environnement médullaire.

Les plaquettes sanguines constituent un élément vital du sang, en ce sens qu'elles assurent l'intégrité vasculaire et la prévention des hémorragies. Un nombre insuffisant de plaquettes, ou la présence de plaquettes non fonctionnelles, peut-être responsable de saignements et représente un risque pour le patient en cas de traumatisme ou d'intervention chirurgicale. Dans ce contexte, la connaissance des mécanismes de différenciation des mégacaryocytes (mégacaryopoïèse), précurseurs des plaquettes, et des mécanismes de formation des plaquettes (thrombopoïèse) revêt un intérêt médical certain. La compréhension de ces mécanismes nous aide à mieux appréhender l'origine de certaines maladies plaquettaires telles que les macrothrombopénies, et permet d'envisager la production de plaquettes « artificielles » *in vitro* en vue d'une transfusion.

L'introduction de ce manuscrit décrit d'abord les aspects connus de la structure et de la différenciation du mégacaryocyte, les principales hypothèses sur la formation des plaquettes sanguines à partir du mégacaryocyte, et plus brièvement le rôle des plaquettes.

L'environnement médullaire et ses interactions avec le mégacaryocyte sont traités dans la seconde section de cette introduction, qui décrit notamment les principales interactions entre la cellule et les composants de la matrice extracellulaire.

Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse

Les mégacaryocytes sont des cellules hématopoïétiques géantes (20 à 50 µm de diamètre) dont la principale fonction consiste à produire des plaquettes sanguines. Ces cellules acquièrent des caractéristiques spécifiques au cours de leur différenciation et de leur maturation, désignées sous le terme « mégacaryopoïèse ». Une fois mature, le mégacaryocyte peut former des plaquettes sanguines, ces petits éléments cellulaires qui permettent l'arrêt des saignements au cours de l'hémostase, et donc le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins. La formation des plaquettes par le mégacaryocyte est désignée sous le terme « thrombopoïèse ».

Historique

Si la première description de cellules géantes « polynuclées » dans la moelle osseuse est attribuée à Robin dès 1849, le terme « mégacaryocyte » apparaît en 1890 quand Howell différencie deux populations de cellules géantes de la moelle osseuse du chat, les « mégacaryocytes » qui possèdent un noyau géant, et les « polycaryocytes », ou ostéoclastes, possédant plusieurs noyaux. Le mégacaryocyte est alors décrit par Howell comme une cellule géante, possédant un gros noyau multilobé (Figure 1). Le lien entre le mégacaryocyte et la production des cellules sanguines semble déjà évident à l'époque, notamment grâce à l'observation de ces cellules dans les différents organes hématopoïétiques, moelle osseuse, foie embryonnaire et rate. Les contemporains de Howell émettront diverses hypothèses sur cette cellule atypique, soit sur son rôle dans la formation de leucocytes ou d'érythroblastes par fragmentation, soit sur son origine dégénérative. C'est Wright qui proposera le rôle du mégacaryocyte dans la formation des plaquettes en 1906, à partir de l'observation de longs prolongements dont l'extrémité ressemble aux plaquettes et présente des caractéristiques similaires après coloration. Son hypothèse est discutée, puis progressivement soutenue, notamment par Bunting qui montre en 1909 un lien entre l'augmentation du nombre de mégacaryocytes dans la moelle et l'augmentation du chiffre plaquettaire chez le lapin. Ce rôle est globalement accepté par la communauté scientifique dans le courant des années 1910 et soulève la question du mécanisme et du lieu de production des plaquettes. Ce sujet est notamment abordé par Howell et Donahue, qui proposent en 1937 l'existence de deux populations de mégacaryocytes, une dans la moelle osseuse et l'autre dans les poumons. C'est cette deuxième population qui est supposée produire des plaquettes par fragmentation dans la circulation pulmonaire. Cette hypothèse fait écho à un nombre important d'observations de mégacaryocytes au niveau des poumons, et semble-t-il surtout du poumon

droit. Le développement du mégacaryocyte est décrit et discuté depuis les années 1890 chez différentes espèces (Homme, cochon, chat, lapin, rat,...), mais c'est Potter qui étudiera le premier la souris en 1940. Il signe avec Ward un article descriptif très complet sur le développement du mégacaryocyte dans la moelle osseuse en signalant déjà la présence d'un « dernier progéniteur commun » avec les lignées myéloïde et lymphoïde, la polyploïdie due à des mitoses incomplètes, la présence de granules et de nombreuses mitochondries, l'incapacité du mégacaryocyte à se diviser et sa tendance à englober des cellules par le phénomène d'empéripolèse, encore très mal compris aujourd'hui.

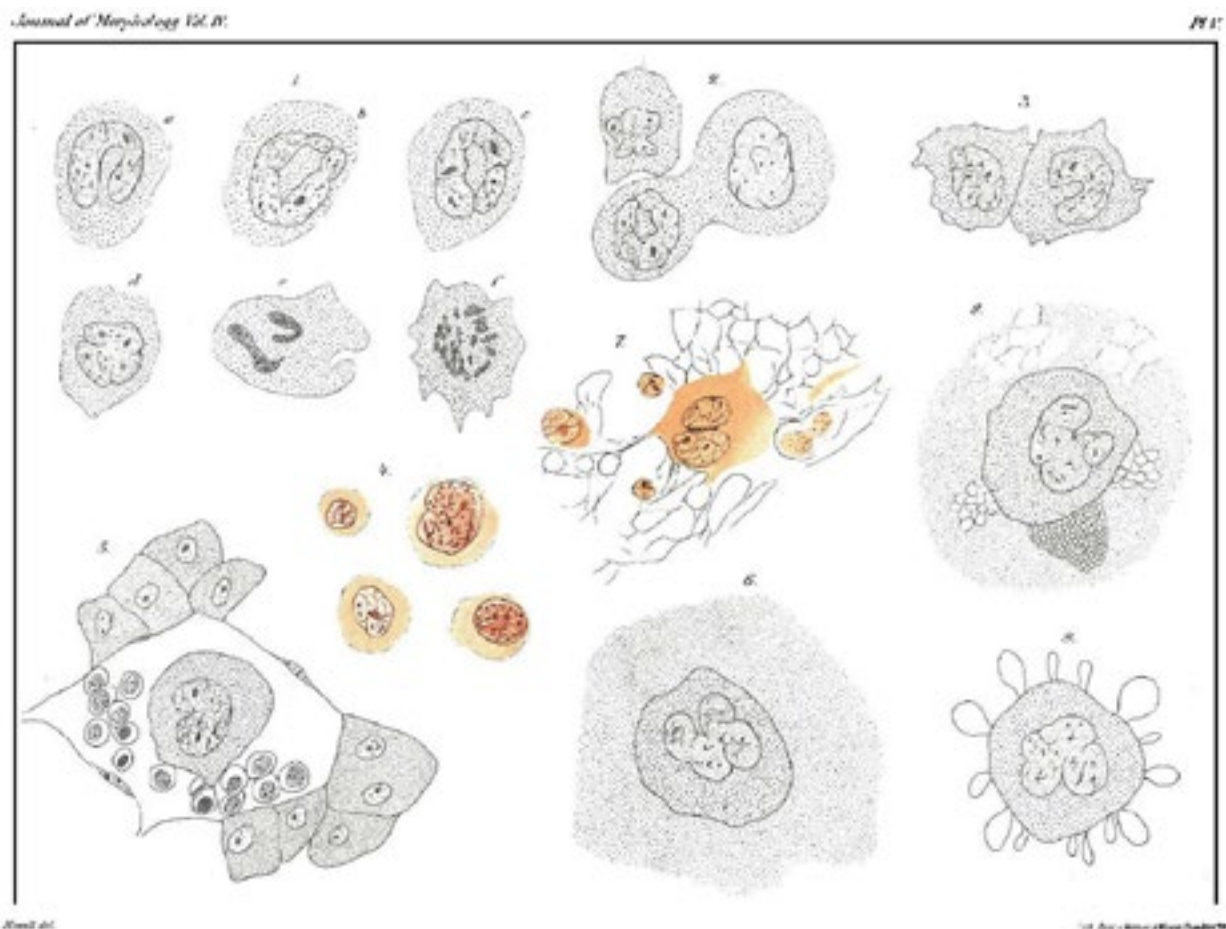


Figure 1 : Mégacaryocytes dessinés par Howell en 1890

Illustrations de Howell, W. (1890). *J. Morphol.* 4, 117–130. (Copyright © 1890 Wiley-Liss, Inc.).
(Reproduit avec l'autorisation de l'éditeur WILEY)

L'origine commune entre le mégacaryocyte et la plaquette est définitivement assise en 1955 par la démonstration de Humphrey, qui met en évidence par immunomarquage la réactivité d'un sérum anti-plaquettes vis-à-vis des mégacaryocytes. S'ensuit l'observation directe de la formation des plaquettes par les mégacaryocytes par Thiery et Bessis en 1956 grâce à la technique des explants et à la « microcinématographie ». Les années 1950 voient apparaître la description de l'ultrastructure du mégacaryocyte en microscopie électronique avec notamment une étude

approfondie de Yamada en 1957, qui décrit trois stades de différenciation ainsi que le système de membranes de démarcation (DMS).

La théorie de Howell et Donahue sur la population de mégacaryocytes résidant dans les poumons est invalidée par Kaufman en 1965, qui souligne pourtant le rôle de la microcirculation pulmonaire dans la libération des plaquettes suite à la migration des mégacaryocytes de la moelle dans la circulation. Kaufman suggère, par une succession de calculs et d'estimations, que 7 à 33% des plaquettes sont produites à partir de mégacaryocytes circulants, filtrés au niveau de la microcirculation pulmonaire. Même si elle est moins soutenue par la communauté scientifique depuis une quinzaine d'années, la production au niveau des poumons n'est toujours pas démentie et fait à ce jour partie des sites potentiels de formation de plaquettes par les mégacaryocytes. Ces mécanismes sont étudiés de manière plus intensive à partir des années 1970-80 avec l'émergence de la culture de mégacaryocytes *in vitro*, dont Metcalf fut l'un des précurseurs en 1975.

C'est la production de thrombopoïétine (TPO), l'hormone de la thrombopoïèse, qui constitue la base de la culture de mégacaryocytes telle qu'elle se pratique actuellement. L'existence d'un facteur stimulant la thrombopoïèse est évoquée depuis les années 50, notamment par Stefanini en 1952, et il est alors déjà connu que le plasma de patients thrombocytémiques contient ce facteur en quantité importante. Le terme « thrombopoïétine » semble être amené par Cserhati et Kelemen en 1958, mais il faudra attendre les années 90 pour que le gène de la TPO soit finalement identifié puis cloné simultanément par Lok *et al.*, de Sauvage *et al.*, Bartley *et al.* et Sohma *et al.* en 1994. Le gène c-MPL, du récepteur de la TPO, est cloné la même année par Mignotte et collaborateurs, soulignant l'intérêt soulevé par cette hormone. C'est cette étape de clonage, nécessaire à la production de TPO recombinante, qui pose le socle de la culture de progéniteurs mégacaryocytaires et permet enfin de différencier des mégacaryocytes *in vitro* de manière reproductible.

Le mégacaryocyte

Le mégacaryocyte est une cellule géante de la lignée hématopoïétique, à l'origine de la formation des plaquettes sanguines. Il est retrouvé dans les organes hématopoïétiques, qui évoluent en fonction de l'âge et de l'espèce. Chez l'Homme adulte, la moelle osseuse constitue le seul tissu hématopoïétique dans lequel sont présents les mégacaryocytes. Elle est principalement active dans les os plats (os pelviens, sternum, scapula,...), alors qu'elle est également active dans les os long chez l'enfant. Chez d'autres mammifères (souris, rat, cochon d'inde, chat, chien...) la « pulpe

rouge » de la rate contient également des mégacaryocytes (Brown, 1913; Song, 1978). Les mégacaryocytes ont une maturation complexe qui leur permet d'acquérir les caractéristiques nécessaires à la production des plaquettes sanguines.

Ontogénèse des mégacaryocytes

Chez l'Homme comme chez la souris, la mégacaryopoïèse débute au niveau du sac vitellin, où l'on retrouve déjà des mégacaryocytes (Jordan, 1916; Matsumura and Sasaki, 1989), puis transite par le foie fœtal avant de s'établir au niveau de la moelle osseuse (Charbord et al., 1996; Danchakoff, 1916; Matsumura and Sasaki, 1988, 1989). Des études fines chez la souris ont permis de montrer que des précurseurs possédant un potentiel mégacaryocytaire sont présents dans le sac vitellin à partir de 7,5 dpc (Days Post Coitus, jours après fécondation) (Tober et al., 2007; Xu, 2001). Les premiers mégacaryocytes mesurent environ 8 µm de diamètre et apparaissent dans le sac vitellin autour de 8,5-9-9,5 dpc. Ces cellules expriment les marqueurs spécifiques CD42c (Glycoprotéine Ib β) et l'acétylcholine estérase et présentent, malgré leur petite taille, des caractéristiques ultrastructurales typiques des mégacaryocytes (Matsumura and Sasaki, 1989; Tober et al., 2007; Xu, 2001). Les premières plaquettes circulantes sont décrites en quantité très faible à 10,5 dpc, puis de manière plus importante à 11,5 dpc, suggérant une mise en place rapide de la thrombopoïèse après l'apparition des mégacaryocytes. Les plaquettes embryonnaires sont plus grandes que les plaquettes adultes, et comportent du réticulum endoplasmique granulaire de manière importante (Tober et al., 2007). Les mégacaryocytes disparaissent du sac vitellin à 12 dpc, alors qu'ils apparaissent au niveau du foie fœtal à partir de 11 dpc (Matsumura and Sasaki, 1989). On ne sait actuellement pas si cette transition résulte d'une colonisation du foie fœtal par les cellules du sac vitellin ou si une seconde vague de précurseurs mégacaryocytaires se développe spontanément dans le foie fœtal. La morphologie des mégacaryocytes du foie fœtal évolue avec une augmentation progressive de la taille pour passer de 8-10 µm de diamètre à 11 dpc à 20 µm (entre 10 et 29 µm) de diamètre à 15 dpc, taille qu'ils conserveront. En plus de la taille, ces mégacaryocytes développent les autres attributs spécifiques retrouvés dans le mégacaryocyte adulte (granules, noyau polylobé, membranes de démarcation, voir « Attributs du mégacaryocyte mature » page 8) (Matsumura and Sasaki, 1989). Chez la souris, on observe encore des mégacaryocytes dans le foie 7 jours après la naissance, mais ces cellules ne sont plus présentes dans le foie adulte, disparaissant probablement après la prise de relais de la moelle et de la rate dans la mégacaryopoïèse (Matsumura and Sasaki, 1989; Slayton et al., 2005).

De manière intéressante, certaines études suggèrent que la maturation des mégacaryocytes embryonnaires et adultes est régulée différemment. Comparés aux mégacaryocytes adultes, les mégacaryocytes embryonnaires ou de nouveau-nés sont plus petits et ont une ploïdie moins importante, mais ils possèdent les caractéristiques ultrastructurales de mégacaryocytes matures. Ces différences sont retrouvées dans les mégacaryocytes dérivés de la culture de progéniteurs embryonnaires comparés à la descendance de progéniteurs adultes, et semblent dues à la fois à une programmation épigénétique des progéniteurs embryonnaires et à l'influence de l'environnement dans lequel les mégacaryocytes se différencient (Bluteau et al., 2013; Liu and Sola-Visner, 2011; Slayton et al., 2005).

Mécanismes moléculaires de différenciation

Au cours de la mégacaryopoïèse, une machinerie complexe de différenciation cellulaire oriente la cellule souche hématopoïétique (CSH) vers le mégacaryocyte en passant par plusieurs stades de multipotence. Ces stades successifs définissent des embranchements entre les différentes lignées hématopoïétiques et sont appelés progéniteur multipotent (MPP, « MultiPotent Progenitor ») progéniteur myéloïde commun (CMP, « Common Myeloid Progenitor ») ou progéniteur mégacaryo-érythrocytaire (MEP, « Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor ») (voir Figure 2).

Les études réalisées jusqu'à maintenant sur les mécanismes de différenciation mettent en avant à la fois une régulation par des cytokines et par des facteurs de transcription qui interagissent de manière interdépendante (certaines cytokines régulent l'expression de facteurs de transcription, et les facteurs de transcription régulent l'expression de certains récepteurs de cytokines). La complexité de leur relation ne permet pas de mettre en avant un schéma intégratif précis. Pour cette raison, la régulation de la différenciation mégacaryocytaire par les cytokines et par les facteurs de transcriptions sont abordées ci-après de manière séparée.

La cytokine majeure de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse est la thrombopoïétine (TPO), qui interagit avec son récepteur c-Mpl (cellular - Myeloproliferative leukemia). L'absence de TPO ou de son récepteur divise par cinq le nombre de plaquettes et de mégacaryocytes sans affecter les autres populations hématopoïétiques matures (Gurney et al., 1994; de Sauvage et al., 1996). L'absence de c-Mpl entraîne également une diminution de la quantité de progéniteurs hématopoïétiques, suggérant un rôle de la TPO dans la prolifération ou le maintien des CSH (Alexander et al., 1996; de Graaf and Metcalf, 2011). La persistance, bien qu'en quantité réduite, de plaquettes et de mégacaryocytes de morphologie et fonction normales en absence de TPO ou de c-Mpl suggère toutefois que d'autres cytokines peuvent contribuer à la différenciation

Introduction - Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse

mégacaryocytaire (Bunting et al., 1997). Il est connu que d'autres cytokines peuvent stimuler la mégacaryopoïèse, notamment en combinaison avec la TPO, comme par exemple les interleukines 3 (IL-3), 6 (IL-6) et 11 (IL-11), le Stem Cell Factor (SCF), l'érythropoïétine (EPO), le Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) ou encore certaines petites molécules comme la staurosporine, un inhibiteur de la Protéine kinase C qui induit l'apoptose (Broudy et al., 1995; Burstein et al., 1992; Imai and Nakahata, 1994; Metcalf, 2008; Nakashima and Taga, 1998; Peng and Liao, 2011). L'ensemble de ces cytokines, TPO comprise, entraînent une activation de la voie JAK/STAT, qui semble jouer un rôle prédominant dans la mégacaryopoïèse, et stimulent également la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et celle des PI3K (Phosphatidylinositol-3-Phosphate Kinase) (de Graaf and Metcalf, 2011; Nakashima and Taga, 1998; Rönnstrand, 2004). Plus récemment, un rôle pro-mégacaryopoïétique a également été proposé pour l'angiopoïétine, dont la signalisation passe encore une fois par la voie JAK/STAT et la voie des MAPK (Li and Slayton, 2013; Saulle et al., 2012). Globalement ces voies de signalisation aboutissent à la régulation de la transcription, par exemple de gènes impliqués dans la prolifération et dans la survie cellulaire, ou de gènes de cytokines et de récepteurs de cytokines (de Graaf and Metcalf, 2011; Harrison, 2012; Kaushansky, 2006).

Parallèlement, la mégacaryopoïèse est dirigée par de nombreux facteurs de transcription. Les relations entre ces facteurs sont complexes, mais il est possible d'extraire un schéma global impliqué dans l'orientation vers la lignée mégacaryocytaire. Les facteurs GATA2 et C/EBP α (CCAAT/Enhancer-Binding Protein alpha), actifs dans la CSH et le MPP, induisent respectivement l'expression de GATA1 et PU.1 dans le progéniteur CMP. GATA1 et PU.1 sont des corépresseurs, ce qui met en place une balance au sein du CMP : GATA1 entraîne l'engagement vers le MEP tandis que PU.1 oriente la cellule vers les autres lignées myéloïdes (Krumtsiek et al., 2011; Laiosa et al., 2006; Nakajima, 2011). GATA1 entraîne l'expression de FOG1 (Friend Of GATA1) dans le MEP, et l'action combinée de ces facteurs entraîne la répression de GATA2. L'expression de plusieurs facteurs clés engage le MEP dans la lignée mégacaryocytaire et dirige la mégacaryopoïèse, parmi lesquels FLI1 (Friend Leukemia Integration 1), TAL1 (T-cell Acute lymphocytic Leukemia 1, aussi connu sous le nom de « SCL »), RUNX1 (Runt-related transcription factor 1), MKL1 (Megakaryoblastic Leukemia 1), SRF (Serum Response Factor) et NF-E2 (Lecine et al., 1998; Shivdasani et al., 1997; Smith et al., 2012; Szalai et al., 2006; Tijssen and Ghevaert, 2013; Tijssen et al., 2011; Vyas et al., 1999) (voir Figure 2).

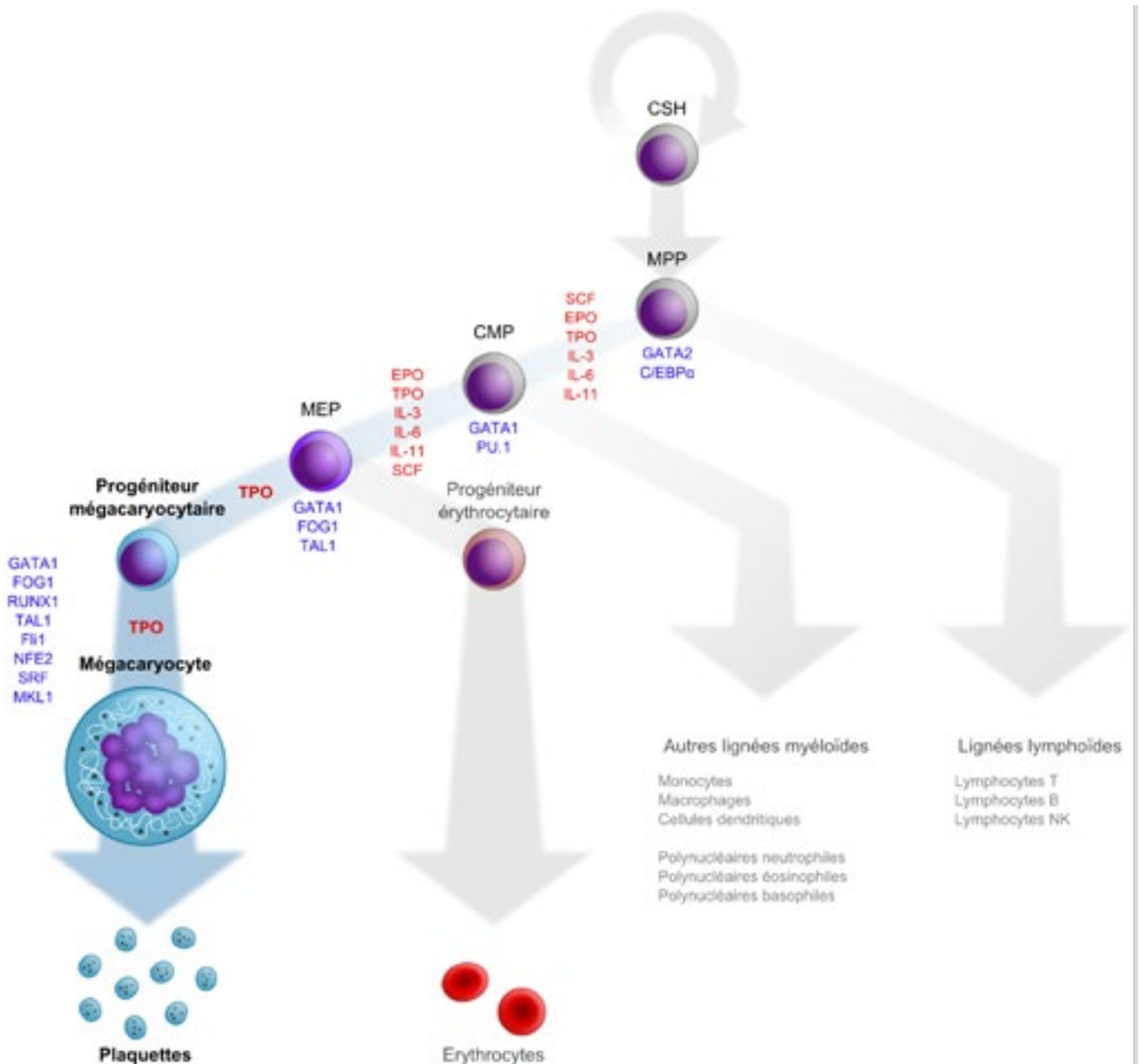


Figure 2 : Hématopoïèse et engagement mégacaryocytaire

La cellule souche hématopoïétique (CSH) se différencie en mégacaryocyte en passant par plusieurs stades de multipotence qui constituent les embranchements entre les différentes lignées myéloïdes. Quelques cytokines qui orientent cette différenciation sont indiquées en rouge, et les principaux facteurs de transcription impliqués sont indiqués en bleu. MPP, MultiPotent Progenitor ; CMP, Common Myeloid Progenitor ; MEP, Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor.

Attributs du mégacaryocyte mature

Il est possible de distinguer différents stades de maturation du mégacaryocyte en observant sa morphologie ou son ultrastructure. Ces stades sont nommés de I à III et ont été définis de manière précise à partir de l'observation de moelle osseuse en microscopie électronique à

transmission (MET) (Yamada, 1957) (voir Figure 3), puis corrélés avec les observations faites en microscopie optique (Ebbe and Stohman, 1965; Feinendegen et al., 1962). Le mégacaryocyte de stade I, ou « mégacaryoblaste », est la première cellule identifiée au-delà de l'engagement du MEP et a un diamètre compris entre 10 et 15 μm , un noyau souvent bilobé qui occupe une grande partie du cytoplasme (rapport nucléo-cytoplasmique élevé), et peut contenir une faible quantité de granules en formation et éventuellement le précurseur des membranes de démarcation en cours de développement (Eckly et al., 2014; Levine, 1980; Levine et al., 1982; Yamada, 1957). Le mégacaryocyte de stade II, ou « promégacaryocyte », a un diamètre compris entre 15 et 30 μm , possède un noyau multilobé de grande taille ainsi qu'un cytoplasme important et rempli de granules alpha (α) et de granules denses (δ) dont certains sont en cours de maturation (Levine, 1980; Levine et al., 1982; Yamada, 1957). Les mégacaryocytes de stade II, et parfois de stade I, sont très riches en mitochondries et comportent un réticulum endoplasmique granuleux (REG) et un appareil de Golgi très développés, nécessaires à la synthèse protéique importante qui se met en place pendant la maturation (Bentfeld-Barker and Bainton, 1982; Zucker-Franklin, 2003) (Anita Eckly, Fabien Pertuy, observations personnelles).

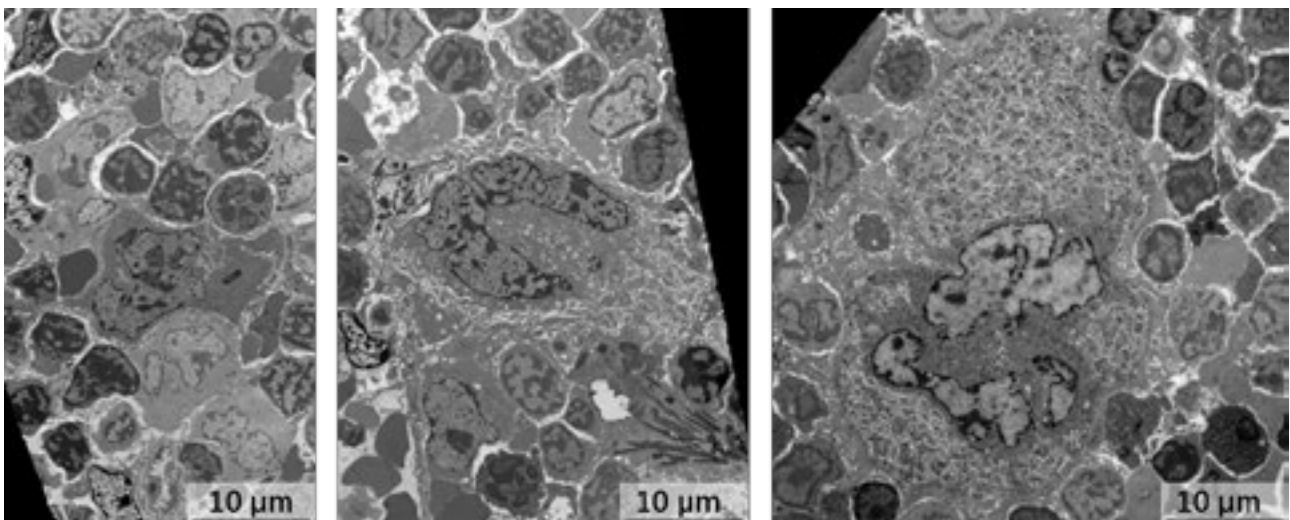


Figure 3 : Stades de maturation du mégacaryocyte

Stades de maturation des mégacaryocytes de moelle osseuse de souris. Le stade I correspond à un mégacaryocyte immature de 10 à 15 μm de diamètre (aussi appelé mégacaryoblaste), qui contient un noyau mono ou bi-lobé, occupant une large proportion du cytoplasme, et quelques granules en formation. Le mégacaryocyte de stade II (promégacaryocyte) mesure 15 à 30 μm de diamètre et contient un cytoplasme très développé, un noyau multilobé, de nombreux granules en formation mais peu de DMS. Le mégacaryocyte de stade III, mature, mesure de 20 à 50 μm de diamètre, comprend un noyau multilobé, un cytoplasme très étendu fragmenté en territoires plaquettaires par un système de démarcation très développé et délimité par une zone périphérique dénuée de membranes, et de nombreuses organelles.

(Images : Anita Eckly, UMR_S949, EFS-Alsace, photographies de mégacaryocytes en MET)

Le stade III correspond au mégacaryocyte mature, qui mesure entre 20 et 50 μm de diamètre et présente des caractéristiques morphologiques et ultrastructurales uniques (Levine, 1980; Levine et al., 1982; Tomer, 2004; Yamada, 1957). Ces caractéristiques sont i) un noyau multilobé de grande taille, renfermant un génome polyploïde issu d'endomitoses, ii) un système de membranes internes extrêmement étendu, appelé « membranes de démarcations » (ou DMS pour « Demarcation Membrane System ») iii) des granules spécifiques à la lignée plaquettaire (granules α et δ) ainsi que des lysosomes, avec une morphologie similaire à celle retrouvée dans les plaquettes, et iv) une région cytoplasmique appelée zone périphérique (ou PZ pour « Peripheral Zone »), située à la périphérie de la cellule, dénuée d'organelles et comportant principalement des protéines du cytosquelette (très riche en actine et en myosine IIA).

Certains auteurs utilisent la dénomination « stade IV » pour désigner les mégacaryocytes formant des plaquettes *in vitro* ou *in situ* (Levine et al., 1982; Straneva et al., 1986). Le stade ultérieur à la formation des plaquettes est décrit comme un noyau de mégacaryocyte entouré de membrane plasmique et parfois d'une fine couche de cytoplasme, cette forme est appelée « noyau nu » (Behnke and Forer, 1998; Jordan, 1940). Les noyaux nus sont observés dans la moelle ou au niveau de la microcirculation pulmonaire et semblent présenter des signes d'apoptose, l'inhibition de l'apoptose dans les mégacaryocytes entraîne d'ailleurs une augmentation de la quantité de noyaux nus à ce niveau (Josefsson et al., 2011; Zucker-Franklin, 2003). Bien que le processus n'ait jamais été vraiment démontré, plusieurs observations suggèrent que ces noyaux sont éliminés par les macrophages (Pedersen, 1978; Radley and Haller, 1983; Thiele et al., 1992).

Polyploïdie

La « polyploïdie » constitue l'une des particularités du mégacaryocyte et correspond à l'augmentation du nombre de copies des chromosomes. Bien que la polyploïdie soit parfois synonyme de pathologie, comme cela peut être le cas pour l'aneuploïdie dans le processus de cancérisation (Ricke and van Deursen, 2013), certaines cellules se maintiennent à un état polyploïde de manière physiologique, par exemple les myocytes ou les ostéoclastes par des phénomènes de fusion cellulaire (Abmayr and Pavlath, 2012; Helming and Gordon, 2009), ou encore les hépatocytes par le biais d'une mitose acytokinétique (Zimmet and Ravid, 2000). Le mégacaryocyte fait partie de ces cellules physiologiquement polyploïdes, et le nombre de copies de son génome augmente par un processus appelé « endomitose » qui entraîne un doublement de l'information génétique à chaque cycle cellulaire ($2^{(1+X)}N$, où X représente le nombre de cycles d'endomitose, voir Figure 4), et peut atteindre $128N$ de manière classique (soit six cycles

d'endomitose, 2^7N) et jusqu'à $512N$ (soit 8 cycles d'endomitose, 2^9N) dans certains cas exceptionnels (Mazur et al., 1988).

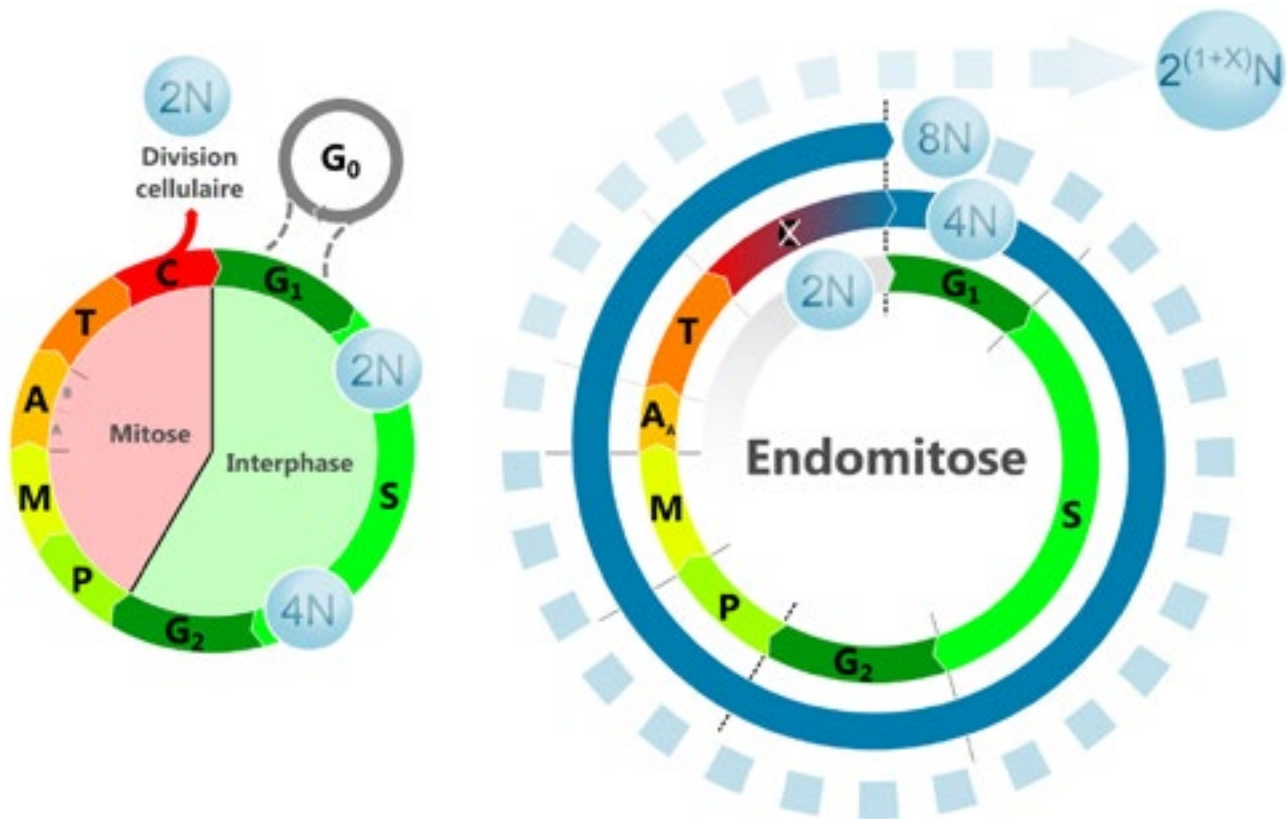


Figure 4 : Cycle cellulaire et Endomitose

Durant le cycle cellulaire classique (à gauche) la cellule se situe soit dans un état de quiescence (G_0) soit dans un cycle actif où elle alterne entre l'interphase et la mitose. Durant l'interphase la cellule duplique son génome (phase S), passant d'un état diploïde ($2N$) à tétraploïde ($4N$). La mitose regroupe les étapes menant à la division cellulaire : Prophase (condensation de la chromatine et dissolution de l'enveloppe nucléaire), Métaphase (mise en place des fuseaux mitotiques), Anaphase (séparée en anaphase A, séparation des chromatides, et anaphase B, répartition des chromatides aux pôles de la cellule), Télophase (décondensation des chromosomes, reconstitution des membranes nucléaires, formation du sillon de clivage) et Cytokinèse (division en deux cellules filles).

L'endomitose (à droite) correspond à un cycle cellulaire sans anaphase B et comprenant une cytokinèse « avortée ». La succession des cycles d'endomitose mène à l'augmentation de la ploïdie par doublement, conduisant à une ploïdie finale de $2^{(1+X)}N$.

L'endomitose a tout d'abord été décrite comme un cycle cellulaire classique dénué d'anaphase B, de télophase et de cytokinèse. La cellule endomitotique enchaîne ainsi les cycles cellulaires sans se diviser, et reforme sa membrane nucléaire dans une phase « G-like » courte qui débute le cycle suivant (Nagata et al., 1997; Ravid et al., 2002; Vitrat et al., 1998). Des travaux récents, basés sur la vidéomicroscopie, montrent que si l'anaphase B est en effet incomplète, la télophase semble cependant bien avoir lieu (Lordier et al., 2008, 2012a). La formation d'un unique noyau polylobé

serait due à un défaut de karyokinèse, où la persistance de lien entre les chromatides sœurs (un pont nucléoplasmique) permettrait de reconstituer une membrane nucléaire unique (Lordier et al., 2012a). De la même manière la cytokinèse est « avortée », elle s'initie avec une accumulation d'actomyosine qui forme un anneau contractile capable d'effectuer une constriction de la cellule. Ce phénomène n'aboutit cependant pas au clivage habituellement observé en mitose et permet ainsi la reformation d'une cellule polyploïde unique (Lordier et al., 2008). Il est intéressant de souligner que l'engagement de la cellule dans un cycle endomitotique ne semble pas définitif, certains mégacaryocytes polyploïdes seraient en effet capables de se diviser pour former des cellules filles (Leysi-Derilou et al., 2010). Ce mécanisme pourrait permettre l'expansion de la population des mégacaryocytes polyploïdes et peut produire des divisions asymétriques, produisant ainsi des cellules filles de ploïdies différentes. Cependant, ce phénomène semble ne concerner qu'une faible proportion des mégacaryocytes de la moelle osseuse (Leysi-Derilou et al., 2010).

En termes de mécanismes, la transition entre la mitose et l'endomitose résulte de la régulation négative de la contractilité dans les progéniteurs mégacaryocytaires. Cette régulation passe à la fois par une répression de l'expression de la myosine IIB par le facteur de transcription RUNX1 (Lordier et al., 2012b) et par une diminution de la signalisation de la voie Rho/Rock (Lordier et al., 2008). L'implication de la GTPase RhoA a été montrée sur l'observation que la régulation négative de protéines de type GEF (Guanine Exchange Factor), impliquées dans l'activation de RhoA (GEF-H1 et ECT2), joue un rôle dans la transition mitose/endomitose et dans la poursuite des cycles endomitotiques (Gao et al., 2012). Cette inhibition de l'activité de RhoA entraîne une diminution de l'accumulation d'actine au niveau de l'anneau contractile qui, couplée à une diminution d'expression de la myosine IIB, serait responsable de la cytokinèse incomplète. Une régulation fine des points de contrôles G₁/S et G₂/M est également nécessaire au mégacaryocyte afin de poursuivre les endomitoses. Globalement, l'activité des cyclines D3, E et A serait augmentée, ainsi que celle des kinases associées cdk2 et cdk4 (Cyclin Dependant Kinase), favorisant ainsi l'enchaînement des phases G₁, S et G₂ (Eliades et al., 2010; Raslova et al., 2006; Ravid et al., 2002). En revanche une diminution de la cycline B1, de la kinase AuroraB et de la survivine, qui restent toutefois présentes et actives dans les mégacaryocytes, jouerait un rôle dans le passage des étapes de la mitose sans division cellulaire (Geddis and Kaushansky, 2004; Ravid et al., 2002; Wang, 1996; Wen et al., 2009). La modulation de ces protéines durant l'endomitose dépend notamment de la régulation de p21 par le facteur de transcription SCL (Stem Cell Leukemia) et la voie de signalisation mTOR (mouse Target Of Rapamycin), mais probablement aussi de la

régulation de p53 (Apostolidis et al., 2011; Chagraoui et al., 2011; Raslova et al., 2006; Ravid et al., 2002).

Résultat du processus d'endomitose, la polyploidie semble permettre au mégacaryocyte d'augmenter très fortement sa capacité de transcription et de traduction, ce qui est vraisemblablement nécessaire, en regard du développement de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique, à sa forte augmentation de taille et à la production massive des protéines plaquettaires (Hancock et al., 1993; Levine et al., 1982).

Membranes de démarcation

Le DMS est une réserve membranaire à l'intérieur du mégacaryocyte, et correspond à la membrane des futures plaquettes (Radley and Haller, 1982; Schulze et al., 2006). Le DMS est connecté à la membrane plasmique (Eckly et al., 2014; Fedorko and Levine, 1976; Mahaut-Smith et al., 2003; Topp et al., 1990) et présente par conséquent la même composition que celle-ci, on y retrouve notamment les marqueurs de la surface plaquettaire (dont CD41 et CD42) (Humphrey, 1955; Mahaut-Smith et al., 2003; Schulze et al., 2006). Cet ensemble de membranes s'organise sous forme d'invaginations interconnectées qui s'entremêlent dans le cytoplasme et dessinent, sur un plan de coupe, des îlots cytoplasmiques appelés « territoires plaquettaires » (Paulus, 1967; Zucker-Franklin, 1996). Ce réseau membranaire semble structuré par de l'actomyosine, des microtubules et de la spectrine puisque la déstabilisation de l'un ou l'autre de ces éléments, à l'aide de composés chimiques ou dans le cas de souris génétiquement modifiées, entraîne une perturbation importante du DMS (Eckly et al., 2009; Patel-Hett et al., 2011; Schulze et al., 2006; Stenberg et al., 1995).

Dans certains cas où le DMS est moins développé, on peut observer une diminution du chiffre plaquettaire ou encore de la quantité de proplaquettes formées par mégacaryocyte, en accord avec l'idée que le DMS constituerait une réserve de membrane pour la formation des plaquettes (Radley and Haller, 1982). C'est notamment le cas pour le syndrome de Bernard-Soulier et les maladies liées à *MYH9* (Eckly et al., 2009, 2010; Poujol et al., 2002; Strassel et al., 2009). Cette corrélation apparente entre la capacité à former des proplaquettes ou des plaquettes et la quantité de DMS pourrait suggérer que cette réserve constitue le facteur limitant dans la formation des plaquettes dans ces pathologies, bien qu'il reste délicat d'établir un lien direct dans le cas précis de ces thrombopathies (Eckly et al., 2009; Strassel et al., 2009).

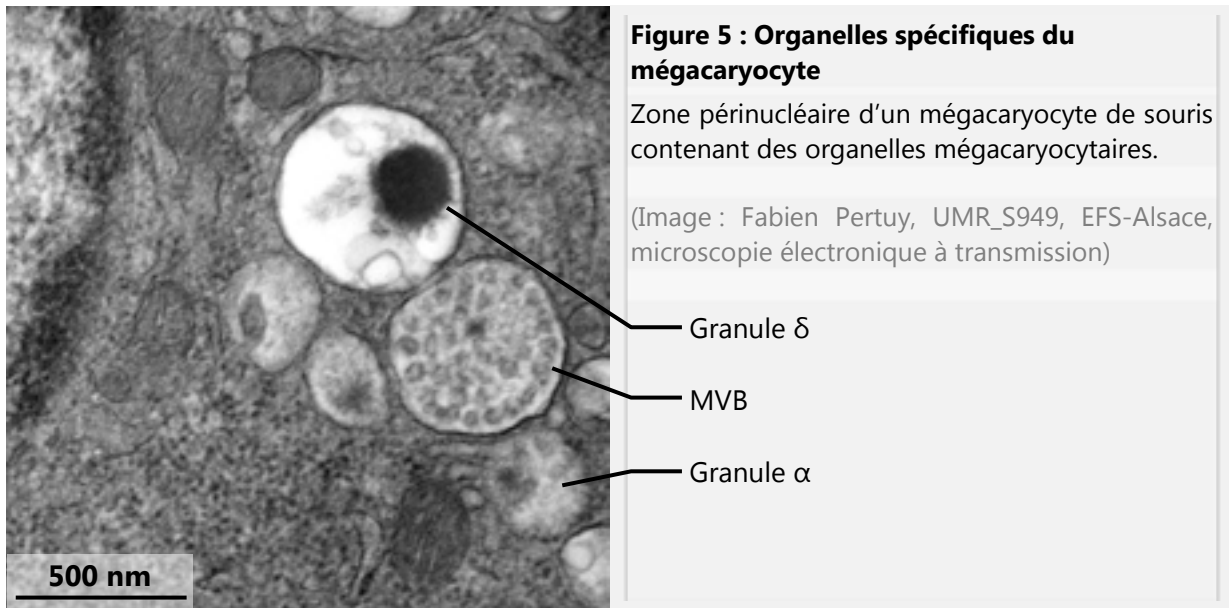
Il a récemment été proposé que la formation du sillon de clivage durant le premier cycle d'endomitose (Lordier et al., 2008) serait à l'origine d'un réseau membranaire, baptisé « pré-

DMS », localisé entre les lobes du noyau et à partir duquel se développerait le DMS (Eckly et al., 2014). L'origine des membranes responsables de la croissance de ce réseau est discutée depuis plusieurs dizaines d'années, et il semble que le DMS soit alimenté à la fois par la membrane plasmique, la fusion avec des vésicules issues de l'appareil de golgi et par un phénomène d'accolement au réticulum endoplasmique (Eckly et al., 2014; MacPherson, 1972a; Tavassoli, 1980).

L'absence de lien entre les territoires plaquettaires et les plaquettes définitives a poussé certains auteurs à rebaptiser le DMS en « IMS » (pour « Invaginated Membrane System », ou « Internal Membrane System ») pour qualifier ce réseau membranaire (Italiano et al., 2003; Radley and Haller, 1982; Schulze et al., 2006). Les termes « Demarcation membrane system », « Invaginated Membrane System » et « Internal Membrane System » sont actuellement utilisés tous les trois pour désigner la même structure.

Organelles spécifiques

Le mégacaryocyte produit des organelles spécifiques, apparentées aux lysosomes (ou LRO, Lysosomes Related Organelles), qui formeront une fois matures les « organelles de sécrétion » plaquettaires (granules α , granules δ et lysosomes, voir « Les organelles de sécrétion » page 20). La biogénèse de ces organelles se met en place entre les stades I et II, associée à une forte augmentation de l'activité de production à la fois de membranes et de protéines (Bentfeld-Barker and Bainton, 1982; King and Reed, 2002; MacPherson, 1972b). Les granules et les lysosomes semblent provenir des « corps multivésiculaires » (MVB ou « Multi Vesicular Bodies », voir Figure 5), un compartiment qui rassemble des éléments du trans-golgi et de la voie endocytique (Ambrosio et al., 2012; Youssefian and Cramer, 2000). Les MVB, granules et lysosomes présentent à la fois des protéines spécifiques au mégacaryocyte (CD41, CD42, Pf4 (Platelet factor 4), β -thromboglobuline, ...) et des protéines retrouvées dans d'autres types cellulaires (P-sélectine, phosphatidylsérine, ...) (Heijnen et al., 1999; King and Reed, 2002). Le contenu de ces organelles est à la fois d'origine endogène et exogène, certains éléments tels que le fibrinogène, l'albumine et les immunoglobulines sont incorporés par endocytose ou pinocytose à partir du liquide interstitiel (Fedorko, 1977a, 1977b; Handagama et al., 1989; Tranzer et al., 1972).



Zone périphérique

La zone périphérique (PZ) correspond à une bande de cytoplasme située directement sous la membrane plasmique, majoritairement dénuée d'organelles, et qui parcourt la périphérie de la cellule (Zucker-Franklin et al., 1987). Cette structure est constituée essentiellement de cytosquelette d'actine et de myosine IIA organisées en trois couches : un réseau cortical riche en actomyosine sous la membrane, une large zone principalement constituée d'actine filamenteuse et un second réseau d'actomyosine à l'interface entre la PZ et le reste du cytoplasme, riche en organelles et en DMS (Eckly et al., 2009; Strassel et al., 2009; Observations personnelles Anita Eckly, Catherine Léon, Fabien Pertuy). Le rôle de la PZ est peu étudié et n'est pas clairement établi. Ce réseau d'actomyosine pourrait avoir une fonction structurante pour le mégacaryocyte, puisque l'on peut observer que les mégacaryocytes démunis de myosine IIA présentent une absence de PZ, associée à une morphologie relâchée *in situ*, au sein de la moelle osseuse (Eckly et al., 2009) (voir « Le modèle *Myh9*^{-/-} : avancées sur le rôle de la myosine IIA dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse » page 40).

On pourrait imaginer que la PZ constitue une barrière prévenant la fragmentation du mégacaryocyte ou la formation de proplaquettes. En effet, l'ajout d'inhibiteurs de la polymérisation d'actine (cytochalasine D) ou de l'activité contractile de la myosine IIA (blebbistatine) entraîne une augmentation de la formation de proplaquettes par les mégacaryocytes (Balduini et al., 2008; Eckly et al., 2010; Tablin et al., 1990), suggérant que la déstabilisation de la PZ pourrait faciliter la formation de ces extensions.

La thrombopoïèse

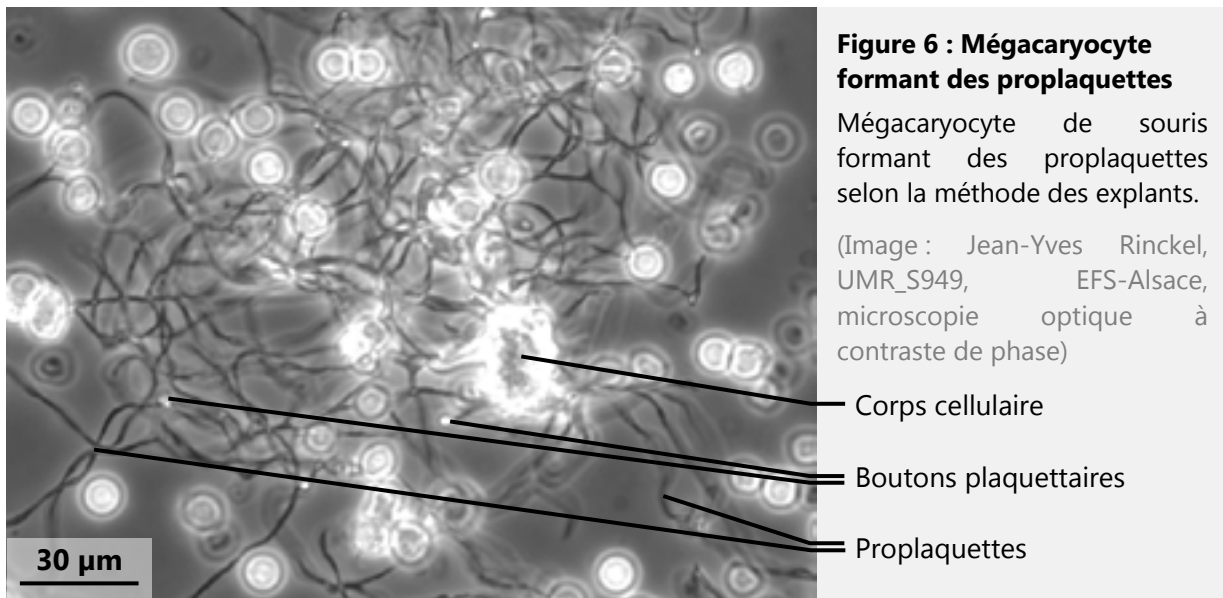
Bien qu'il soit étudié depuis plusieurs dizaines d'années, le mécanisme de formation des plaquettes reste discuté encore aujourd'hui.

Parmi les théories proposées depuis les années 50, on peut opposer deux modèles : i) un **modèle « passif »** de relargage des plaquettes par éclatement ou morcèlement du mégacaryocyte, et ii) un **modèle « actif »** où le mégacaryocyte forme des extensions qui seront à l'origine des plaquettes.

Le modèle de relargage passif fait référence à deux théories. La première est suggérée par Pisciotta, qui observe en 1953 des mégacaryocytes entourés de structures sphéroïdes et propose que la formation des plaquettes intervienne suite à l'éclatement des mégacaryocytes arrivés à maturation. L'observation de ce phénomène n'est pas corroborée, et est même considérée comme artéfactuelle puisque qu'elle se base sur des frottis de moelle osseuse. La préparation de tels échantillons est en effet connue pour être traumatique pour le mégacaryocyte et souvent entraîner l'explosion de ce dernier. Le deuxième mécanisme est proposé par Trowbridge, Martin et Slater, qui expliquent en 1982 que l'hétérogénéité et la distribution lognormale de la taille des plaquettes est due à la fragmentation du mégacaryocyte sous la force du flux sanguin. Quel que soit le mécanisme considéré, le modèle de relargage passif suppose que les plaquettes sont préformées dans le cytoplasme du mégacaryocyte. Cette théorie est suggérée par Yamada en 1957, quand il remarque que les membranes du DMS dessinent des zones de taille et de contenu similaires à une plaquette, d'où leur dénomination « territoires plaquettaires ». Cette idée est reprise notamment par MacPherson en 1972 et par Tavassoli en 1979, qui proposent des modèles de fusion entre des « tubes » de DMS qui constitueraient alors un feuillet préformant la membrane plaquettaire. De nos jours le modèle de relargage passif a été abandonné au profit du mécanisme « actif » de formation des plaquettes. Cependant, certains auteurs considèrent toujours cette théorie valable, en particulier Goro Kosaki, qui nomme les territoires plaquettaires « protoplaquettes » et propose leur libération suite à l'éclatement du mégacaryocyte (Kosaki and Kambayashi, 2011).

Le modèle « actif » de formation des plaquettes repose sur différentes observations. On peut le relier à la description de Wright en 1906, qui voyait des mégacaryocytes formant des « pseudopodes similaires à des bourgeons, qui proviennent soit des mégacaryocytes soit d'autres pseudopodes, présentant des parties rondes, centrales et granulaires ». Ce modèle prend toutefois une dimension plus concrète avec la vidéomicroscopie, sur moelle osseuse vivante, de

Thiéry et Bessis en 1956, qui montrent la formation de plaquettes à partir du mégacaryocyte. Ces auteurs décrivent des « expansions (qui) s'allongent de plus en plus, donnant à la cellule un aspect de pieuvre tout à fait caractéristique » (voir Figure 6), et ils notent que « Si, lorsque les filaments mégacaryocytaires sont complètement développés, on imprime quelques mouvements brusques [...] les courants ainsi provoqués dans la préparation détachent les plaquettes de leur filament d'union. ».



Ils distinguent alors ce mécanisme d'observations similaires à celles de Pisciotta, en montrant un mégacaryocyte « s'altérant d'une manière particulière que l'on ne doit pas confondre avec la plaquetto-génèse ». Ils poursuivent en décrivant cette cellule dont « la membrane cellulaire s'est rompue ; par cet orifice, sortent de nombreuses petites gouttelettes de cytoplasme qui ne sont pas des plaquettes et qui dégénèrent rapidement en se vacuolisant dans le milieu. ». Behnke va plus loin en observant en 1969, en microscopie électronique à transmission, que les processus cytoplasmiques contiennent des microtubules orientés dans le sens de l'extension, suggérant un rôle de ces derniers dans la formation des plaquettes. Becker et De Bruyn observent ces longs prolongements *in situ* en microscopie électronique à balayage, et proposent le terme « proplaquette » en 1976. Cette idée est reprise par Radley et Haller en 1982, qui montrent que l'extension de ces processus est inhibée par la vincristine, un agent qui empêche la polymérisation des microtubules. Leven et Yee, en 1987, furent les premiers à proposer la « culture » de mégacaryocytes comme un modèle d'étude de la plaquetto-génèse. Les auteurs montrent que le mégacaryocyte isolé de la moelle osseuse émet de longs processus cytoplasmiques contenant des microtubules, et étudient l'impact de drogues ou de plasma sur ce phénomène. Ce modèle est assis quelques années plus tard par le travail d'Italiano et collaborateurs, qui réutilisent le

terme « proplaquette » (Italiano et al., 1999). Cette étude décrit la formation, la structure et l'ultrastructure de la proplaquette en culture, et reprend l'idée que les plaquettes sont formées par le détachement des « boutons plaquettaires » situés à l'extrémité de ces prolongements. Ainsi, les proplaquettes peuvent se former *in vitro* au cours de la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques en mégacaryocytes (Choi et al., 1995), ou *ex vivo* dans la technique « des explants » (voir Figure 6) lors de l'incubation d'un fragment de moelle osseuse entre lame et lamelle (Eckly et al., 2012; Thiery and Bessis, 1956). Les microtubules parcourent la proplaquette, forment un enroulement au niveau du bouton plaquettaire, de manière similaire à la bande marginale des plaquettes (voir « Structure générale de la plaquette » page 19) et sont impliqués dans le trafic des organelles vers le bouton plaquettaire via la kinésine (Richardson et al., 2005).

Le modèle de formation « active » des plaquettes est actuellement reconnu et accepté par la majorité de la communauté scientifique. Toutefois, la conception de ce modèle s'est appuyée sur des observations réalisées *in situ* sur des tissus fixés, sans permettre d'aborder l'aspect dynamique du phénomène, ou *in vitro*, et donc en dehors du contexte physiologique. Néanmoins, les avancées dans le domaine de la microscopie intravitale permettent désormais d'observer de manière dynamique la formation de plaquettes *in vivo* (Junt et al., 2007). Ces observations soulèvent de nouvelles questions puisque les mégacaryocytes détectés au niveau de la moelle osseuse semblent libérer dans la circulation sanguine à la fois des fragments de grande taille et des extensions semblables aux proplaquettes. Recoupés avec d'anciennes observations de microscopie électronique (Penington et al., 1976), ces résultats constituent une variante au modèle des proplaquettes. Depuis l'observation récente que des plaquettes isolées à partir d'un prélèvement de sang sont capables de se diviser (Schwartz et al., 2010), un intermédiaire entre le mégacaryocyte et la plaquette est également proposé (Thon et al., 2010). La « préplaquette » serait ainsi un fragment mégacaryocytaire de grande taille formé à partir d'une proplaquette, possédant une bande marginale de microtubules et étant capable de se réorganiser, via le cytosquelette de microtubules, pour se diviser en plusieurs plaquettes (Thon et al., 2010). Nos observations vont dans le sens de l'existence de formes intermédiaires entre le mégacaryocyte et la plaquette, et nous proposons dans un article décrit ci-après que le mégacaryocyte peut former dans la circulation soit des fragments de grande taille, qui deviendront des préplaquettes puis des proplaquettes, soit directement des proplaquettes. Ces dernières constitueraient le passage impératif avant la formation des plaquettes.

Tout comme le mécanisme de la thrombopoïèse, le site où sont formées les plaquettes n'est pas clairement défini. En effet, si l'observation de fragments de mégacaryocytes dans les sinusoides

de la moelle est largement rapportée dans la littérature (Becker and De Bruyn, 1976; Behnke and Forer, 1998; Junt et al., 2007; Penington et al., 1976), certains mégacaryocytes passent dans la circulation sanguine à travers les sinusoides de la moelle en conservant leur intégrité (Tavassoli and Aoki, 1981). En parallèle, des mégacaryocytes sont également observés au niveau de la microcirculation pulmonaire (Levine et al., 1993; Pedersen, 1978; Zucker-Franklin and Philipp, 2000) de manière compatible avec la formation de plaquettes à ce niveau. De plus, il est démontré que l'injection de mégacaryocytes matures directement dans la circulation sanguine permet de former des plaquettes (Fuentes et al., 2010). Ainsi, il semble raisonnable de penser que les plaquettes sont produites à la fois au niveau de la moelle, et par des mégacaryocytes circulants ou bloqués dans la microcirculation pulmonaire.

La plaquette sanguine

L'observation des plaquettes sanguines n'a été rendue possible qu'à partir des années 1830 avec la production d'objectifs achromatiques, permettant de distinguer des particules jusqu'à 2 µm de diamètre. Les premières traces écrites décrivant des éléments ressemblant aux plaquettes sont datées de 1842, avec les observations de Donné, d'Addison et de Gerber et Gulliver. Si d'autres ont pu décrire des éléments similaires après cette période, c'est Max Schultze qui désigne les plaquettes comme étant le « troisième élément » du sang en 1865, en indiquant qu'elles constituent des « masses granulaires » entremêlées d'un réseau fibreux. Ce « troisième élément » est étudié plus avant par Giulio Bizzozero en 1882, qui le nommera « petite plaque » et notera qu'elle est capable de s'accrocher à la paroi d'un vaisseau lésé. Le terme « plaquette » n'est introduit qu'en 1895 par M.L. Holbrook, qui suggère alors que ces éléments sont issus de la fragmentation des globules rouges, et le lien entre plaquette et mégacaryocyte est suggéré en 1906 par Wright.

Structure générale de la plaquette

La plaquette sanguine est un fragment anucléé circulant qui mesure en moyenne 3 µm chez l'Homme (Frojmovic and Milton, 1982) et provient du mégacaryocyte. Si le terme « fragment » permet de la différencier d'une cellule, la plaquette n'en reste pas moins organisée. Elle comporte un enroulement de microtubules (8 à 12 spires) qui forme un anneau à sa périphérie, appelé « bande marginale », lui conférant ainsi une forme discoïde en exerçant une force de tension sous la membrane plasmique (Behnke and Zelander, 1966; Patel-Hett et al., 2011; White, 1968; White and Krivit, 1967). La plaquette renferme un système de membrane connecté au milieu

extracellulaire, le « système canaliculaire ouvert », possible réminiscence du DMS qui joue un rôle dans l'absorption de molécules par la plaquette et dans la sécrétion du contenu granulaire dans le milieu extracellulaire (Escolar and White, 1991). Le système canaliculaire ouvert constitue également une membrane de réserve pour l'émission de filopodes ou l'étalement de la plaquette (Escolar et al., 1989; van Nispen tot Pannerden et al., 2010). Le cytoplasme plaquettaire est riche en protéines du cytosquelette, notamment des tubulines, de l'actine et de la myosine IIA. On peut y retrouver des mitochondries, des organelles de sécrétion, du réticulum endoplasmique lisse (aussi appelé « système tubulaire dense »), occasionnellement du réticulum endoplasmique granulaire, que l'on retrouve notamment dans les plaquettes « jeunes », et plus rarement de l'appareil de Golgi (voir Figure 7).

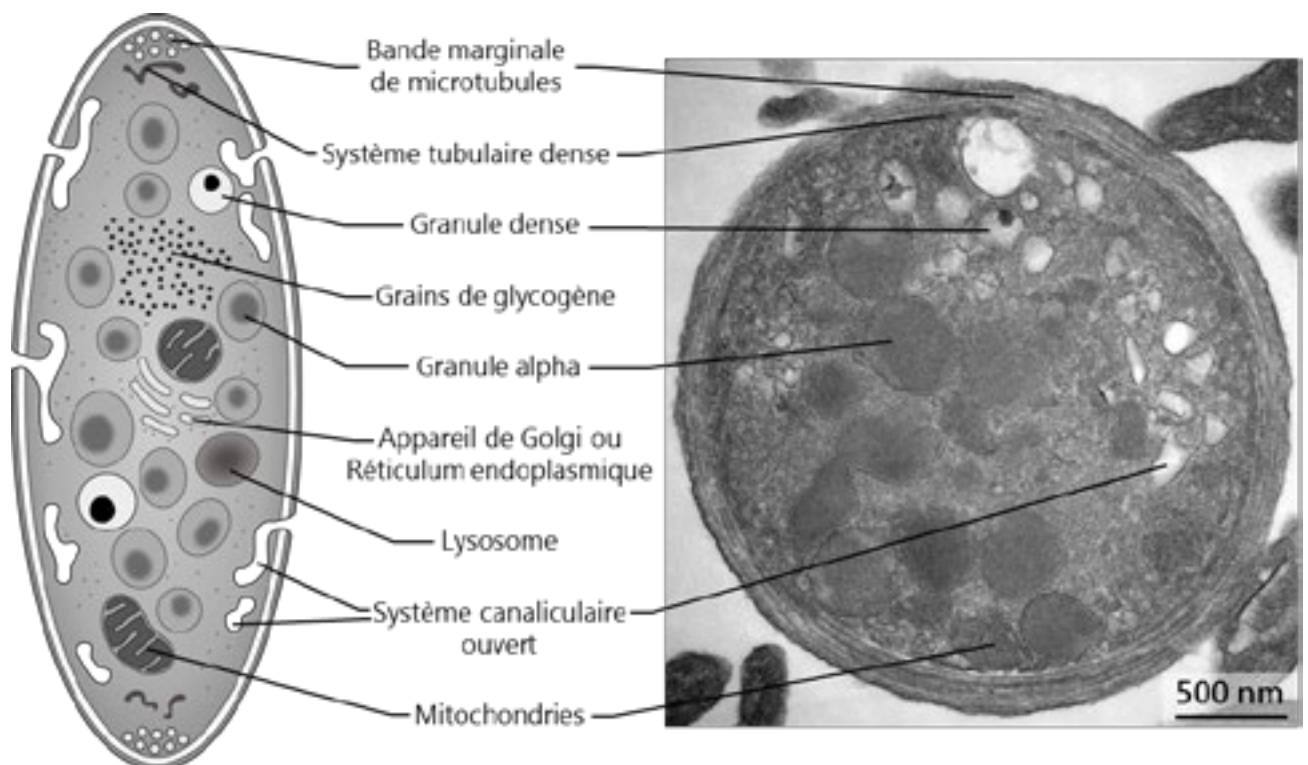


Figure 7 : Structure de la plaquette sanguine

A gauche, schéma d'une plaquette en coupe transverse (adapté de B. Boneu et J-P. Cazenave, « Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose » deuxième édition (1997), figure I-4). A droite, photographie d'une coupe frontale de plaquette sanguine de souris en MET. (Image : Fabien Pertuy, UMR_S949, EFS-Alsace)

Les organelles de sécrétion

Les granules alpha (α), les granules denses (δ) et les lysosomes sont les trois types d'organelles dits « de sécrétion », et sont plus généralement regroupés sous le terme « granules

plaquettaires ». Ceux que l'on retrouve dans les plaquettes peuvent avoir un contenu différent des granules initialement produits par le mégacaryocyte, leur maturation continue en effet dans la circulation où les plaquettes absorbent une proportion parfois importante de molécules plasmatiques, comme c'est par exemple le cas pour les immunoglobulines, la sérotonine ou encore le fibrinogène (Handagama et al., 1990; Tranzer et al., 1972).

Granules alpha

Les granules alpha (α) sont les organelles plaquettaires majoritaires, avec environ 40 granules α par plaquette humaine et une dizaine par plaquette de souris (données personnelles, Anita Eckly), et contiennent une grande diversité de protéines. Ils peuvent être de forme ovale ou allongée, mais sont le plus souvent de forme sphérique et présentent un diamètre compris entre 200 et 500 nm. Ils présentent en général plusieurs zones de contraste en MET, résultant de la compartimentation des protéines stockées (Harrison and Cramer, 1993; van Nispen tot Pannerden et al., 2010) et sont difficiles à différencier des lysosomes. Les granules α contiennent des protéines de matrice extracellulaire, des facteurs de croissance, des facteurs de coagulation, des inhibiteurs de protéases ou encore des protéoglycans (voir Table 1) (Harrison and Cramer, 1993).

Granules denses

Les granules denses (δ) sont estimés au nombre de 6 à 8 par plaquette humaine et 8 à 10 par plaquette de souris (données personnelles, Anita Eckly), et se présentent sous l'aspect de vésicules sphériques, ou parfois allongées, de 150 à 300 nm de diamètre. Ces organelles possèdent un « corps » très dense aux électrons qui contraste fortement avec le reste de leur contenu, les faisant ressembler à un « œil de bœuf » (White, 2008). Les granules δ contiennent des composés non protéiques dont du calcium, de l'adénosine diphosphate (ADP), de l'adénosine triphosphate (ATP), des pyrophosphates, de la sérotonine et de l'histamine (voir Table 1) (Fukami, 1997; McNicol and Israels, 1999). La concentration importante en calcium et la présence de phosphates et de sérotonine, qui réagit avec les produits de contraste, sont responsables de l'aspect caractéristique de ces organelles en MET (Gerrard et al., 1977).

Lysosomes

Les plaquettes contiennent des lysosomes primaires et secondaires qui renferment essentiellement des enzymes (voir Table 1) et présentent une importante hétérogénéité (McNicol and Israels, 1999). Ces organelles sont des vésicules sphériques de 175 à 250nm (Bentfeld-Barker and Bainton, 1982), qui présentent souvent un aspect similaire aux granules α . Le nombre de

lysosomes présents dans les plaquettes est faible, mais aucune donnée quantitative précise n'est disponible dans la littérature. Les lysosomes intègrent des molécules par la voie endocytaire en interagissant avec des vésicules recouvertes de clathrine. Ils présentent à leur membrane des protéines lysosomales ubiquitaires de la famille LAMP (King and Reed, 2002).

Contenu des granules plaquettaires		
Granules α	Granules δ	Lysosomes
Albumine	Sérotonine	Cathepsine D
Fibrinogène	ATP	Cathepsine E
Fibronectine	ADP	Carboxypeptidase A
Vitronectine	Calcium	Carboxypeptidase B
Ostéonectine	Pyrophosphate	Proline carboxypeptidase
Facteur de Willebrand		β -N-acétyl-D-hexosaminidase
vWAgII (von Willebrand Antigen II)		β -D-glucuronidase
Thrombospondine		β -D-galactosidase
Facteur plaquettaire 4		α -D-mannosidase
IgG, IgA, IgM		α -L-arabinofuranosidase
Inhibiteur de la C1 estérase		α -D-galactosidase
Plasminogène		α -L-fucosidase
PAI1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)		β -D-fucosidase
Inhibiteur de collagénase dérivé des plaquettes		β -D-glucosidase
Kinogène de haut poids moléculaire		α -D-glucosidase
Protéine S		Phosphatase acide
α 2-antitrypsine		Arylsulphatase
α 2-macroglobuline		
α 2-antiplasmine		
Multimérine		
PBP (Platelet basic protein)		
β -thromboglobulin		
HRG (Histidine-rich glycoprotein)		
CTAP3 (Connective tissue-activating protein III)		
NAP2 (Neutrophil-activating protein II)		
PDGF (Platelet-derived growth factor)		
TGF β (Transforming growth factor β)		
VEGF (Vascular Endothelial cell Growth Factor)		
Facteur V de la coagulation		
Facteur VIII de la coagulation		

Table 1 : Contenu des granules plaquettaires.

Reproduit de Thrombosis Research volume 95, McNicol, A., and Israels, S.J., « Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. » Pages 1–18, Copyright (1999), avec la permission de l'éditeur Elsevier.

Fonctions des plaquettes

Les plaquettes jouent un rôle vital par leur implication dans l'hémostase primaire. Elles permettent en effet de maintenir l'intégrité vasculaire en comblant les brèches qui peuvent apparaître suite à une lésion des vaisseaux sanguins. La description de leurs fonctions sera ici volontairement abrégée puisqu'il ne s'agit pas de l'objet de ce manuscrit. Brièvement, l'endothélium endommagé expose au flux sanguin le sous-endothélium, riche en protéines de matrice extracellulaire (MEC). Les plaquettes adhèrent à ce sous-endothélium, principalement par l'interaction entre le facteur Willebrand (vWF, « von Willebrand Factor ») et le complexe GPIb-V-IX, mais également par l'engagement d'autres récepteurs plaquettaires vis-à-vis de protéines de la MEC (en particulier le couple intégrine $\alpha 2\beta 1$ /collagène). Cette adhésion entraîne une signalisation qui déclenche l'activation plaquettaire. La plaquette activée va changer de forme en se contractant et émettre des filopodes puis des lamellipodes, conduisant à son étalement. Les plaquettes activées sécrètent également le contenu de leurs granules, relarguant ainsi de nombreux agonistes pro-activateurs qui enclenchent une boucle d'amplification. Ce phénomène d'amplification, accompagné de la sécrétion, entraîne le recrutement et l'activation de plaquettes circulantes, notamment par la liaison du fibrinogène plasmatique. Ce recrutement mène à la formation d'un agrégat plaquettaire, ou thrombus, qui obstrue la brèche vasculaire et permet l'arrêt du saignement. Cet agrégat est finalement stabilisé par un réseau insoluble de fibrine, résultant de la transformation du fibrinogène en fibrine par la thrombine.

Bien que l'hémostase constitue le rôle principal des plaquettes, ces dernières participent également à d'autres processus physiologiques comme l'inflammation (Rondina et al., 2013) et la néoangiogenèse (Kisucka et al., 2006), notamment en sécrétant leur contenu granulaire, ou la formation des vaisseaux lymphatiques (Bertozzi et al., 2010), et la progression tumorale (Pinedo et al., 1998) et la dissémination métastatique (Labelle et al., 2011), notamment par l'interaction directe des glycoprotéines membranaires.

L'environnement médullaire dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

La moelle osseuse hématopoïétique est un tissu riche qui regroupe aussi bien des cellules hématopoïétiques, endothéliales, stromales, osseuses ou nerveuses qu'une grande variété d'éléments de matrice extracellulaire (MEC) (Bi et al., 2005; Klein, 1995; Nilsson et al., 1998; Noordegraaf and Ploemacher, 1979; Shen and Nilsson, 2012). La moelle constitue également un tissu très dynamique qui se renouvelle sans cesse en produisant une quantité importante de cellules sanguines. Ces cellules évoluent dans un environnement organisé en trois dimensions (3D) contenant des structures « fonctionnelles » : les vaisseaux sanguins et la matrice osseuse (voir Figure 8).

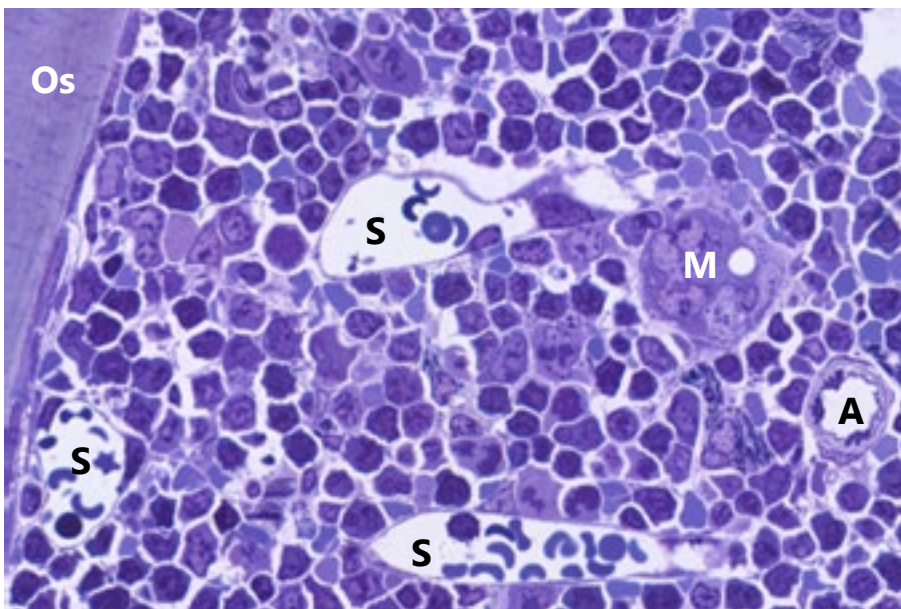


Figure 8 : Organisation de la moelle osseuse hématopoïétique

La moelle hématopoïétique est au contact de l'os (Os) et contient des capillaires sinusoides (S), et artérioles (A). Ces deux éléments sont soutenus par des cellules stromales et des cellules hématopoïétiques, dont les mégacaryocytes (M).

(Image : Fabien Pertuy, UMR_S949, EFS-Alsace, Moelle de fémur de souris colorée au bleu de toluidine)

Les vaisseaux et l'os sont considérés comme des zones spécialisées, la « niche vasculaire » et la « niche endostéale » respectivement, ainsi nommées à cause de la présence de cellules souches hématopoïétiques au niveau de ces structures (Lo Celso and Scadden, 2011; Mercier et al., 2012). Ces deux « niches » seraient supposées maintenir et réguler les cellules souches hématopoïétiques, comme c'est le cas dans d'autres tissus, mais cette idée n'est pas clairement établie dans le cas de la moelle. La mégacaryopoïèse a lieu entre ces deux « microenvironnements », et le modèle de différenciation actuel propose que les progéniteurs mégacaryocytaires migrent depuis la niche endostéale vers la niche vasculaire, notamment sous l'effet d'un gradient de cytokines comme le SDF-1, et effectuent leur maturation au contact des vaisseaux sanguins (Avecilla et al., 2004). Effectivement, la grande majorité des mégacaryocytes matures est retrouvée à proximité des vaisseaux sanguins, et notamment des capillaires

sinusoïdes (Lichtman et al., 1978; Malara et al., 2013; Mazharian et al., 2011). Chez l'Homme l'hématopoïèse a lieu au niveau des os plats ou de l'épiphyse des os longs, qui sont des régions riches en trabécules osseux au niveau desquels les vaisseaux sanguins et l'endoste sont en étroite relation (Lo Celso et al., 2009). Ainsi l'orientation vers la différenciation mégacaryocytaire résulte de l'interaction des progéniteurs avec un microenvironnement complexe qui rassemble plusieurs types cellulaires, des cytokines et la MEC.

Afin d'introduire les bases de notre étude sur le rôle de l'environnement médullaire dans la mégacaryopoïèse et le thrombopoïèse, cette partie aborde de manière générale la diversité des interactions présentes entre le mégacaryocyte et son environnement, puis se focalise sur les protéines de matrice extracellulaire et les intégrines.

Les interactions cellules/environnement

La capacité de sonder et de percevoir son environnement est cruciale pour la cellule. Elle lui permet de réagir à un stimulus positif (nutriments, facteurs chimioattractants) ou négatif (substance toxique, facteur répulsif, signal inhibiteur). Le signal perçu entraîne à la fois une adaptation de nature biochimique (signalisation intracellulaire, modification de l'expression génique, modification du métabolisme) et une réponse dynamique de la cellule (polarisation, migration, mise en place d'adhésions ou de jonctions, sécrétion). Cette adaptation est nécessaire à la survie de la cellule, mais aussi à sa différenciation et à l'organisation de structures multicellulaires polarisées comme un épithélium ou un endothélium (Broxmeyer, 2001; Theveneau and Mayor, 2012; Vihervaara et al., 2013).

La nature des stimuli auxquels la cellule est exposée détermine le type d'interaction qui s'installe entre la cellule et son environnement, notamment les interactions chimiques ou mécaniques.

Les interactions chimiques correspondent à la reconnaissance d'une molécule par son récepteur, induisant une signalisation intracellulaire. Les signaux par lesquels sont médiées ces interactions sont à la fois dues à des facteurs diffusibles (cytokines, morphogènes, neurotransmetteurs) ou non-diffusibles, immobilisés au niveau d'une structure précise (composants de la matrice extracellulaire, éléments extracellulaires de la membrane plasmique). Au niveau des mégacaryocytes ces interactions concernent principalement les cytokines (voir « Mécanismes moléculaires de différenciation » page 6). Certains récepteurs reconnaissant de petites molécules sont également exprimés par le mégacaryocyte (récepteurs de nucléotides, du thromboxane, de la sérotonine,...), mais le rôle de ces molécules dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse est peu étudié. Néanmoins, deux études récentes proposent l'implication de l'ADP, via les récepteurs

P2Y1, P2Y12 et P1Y13 et la signalisation calcique, dans la formation de proplaquettes et la modulation de l'adhésion aux protéines de MEC *in vitro* (Balduini et al., 2012; Di Buduo et al., 2014). De la même manière, si le mégacaryocyte exprime plusieurs types de récepteurs de la MEC, la plupart ne sont pas connus pour tenir un rôle clé dans la mégacaryopoïèse ou la thrombopoïèse. Cependant, les défauts touchant le complexe GPIb-V-IX entraînent le syndrome de Bernard-Soulier, alliant défaut de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse, et certaines formes de la thrombasthénie de Glanzmann, un défaut de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, peuvent également entraîner un défaut de la thrombopoïèse (voir « Les intégrines mégacaryocytaires » page 33).

A la différence des interactions chimiques, les interactions mécaniques correspondent à la transduction de contraintes mécaniques en signaux cellulaires (électriques ou biochimiques), un processus désigné par le terme « mécanotransduction ». La mécanotransduction peut être déclenchée par l'exposition de la cellule à un stress (pression, forces de cisaillement, de traction, de compression), ou en réaction aux paramètres physiques de son environnement (rigidité, élasticité) (Chen, 2008; Gurkan and Akkus, 2008). Parmi les mécanorécepteurs, on retrouve notamment des canaux ioniques sensibles à la pression (Delmas and Coste, 2013), certains récepteurs couplés aux protéines G (Chachisvilis et al., 2006) et des protéines d'adhésion comme les intégrines (Geiger et al., 2009; Wei et al., 2008), ou les cadhérines (le Duc et al., 2010). Cet aspect est peu documenté dans les mégacaryocytes, et si un rôle de la mécanotransduction est en effet proposé (Malara et al., 2011; Shin et al., 2011), aucun mécanisme précis n'a clairement été identifié. Ces travaux indiquent cependant que le mégacaryocyte réagit à la rigidité ou à l'élasticité de son environnement, paramètres qui sont notamment régulés par la matrice extracellulaire (Reilly and Engler, 2010; Wei et al., 2008).

La matrice extracellulaire

In vivo, la matrice extracellulaire constitue le principal support pour l'ancrage des cellules et entraîne des interactions à la fois chimiques et mécaniques (Kim et al., 2011). Elle regroupe des sucres complexes et des protéines pour former un réseau tridimensionnel qui tient un rôle structural important, et sa composition et son organisation sont toutes deux essentielles dans la mise en place et le maintien des épithéliums (lames basales de l'épithélium intestinal, des endothéliums vasculaires,...) et des tissus conjonctifs. On retrouve dans la MEC des protéines capables de former des structures fibrillaires, par exemple les collagènes I, II, III, V et XI peuvent former des fibrilles larges, le collagène VI forme des microfibrilles et les collagènes IV, VIII et X forment des réseaux (van der Rest and Garrone, 1991). En dehors des collagènes il existe un très

grand nombre de protéines de MEC, notamment différentes formes de laminines, la fibronectine, la vitronectine ou encore l'élastine, et leur association forme un réseau complexe (Charonis et al., 1985; Gebb et al., 1986; Hynes, 2009) (voir Figure 9).

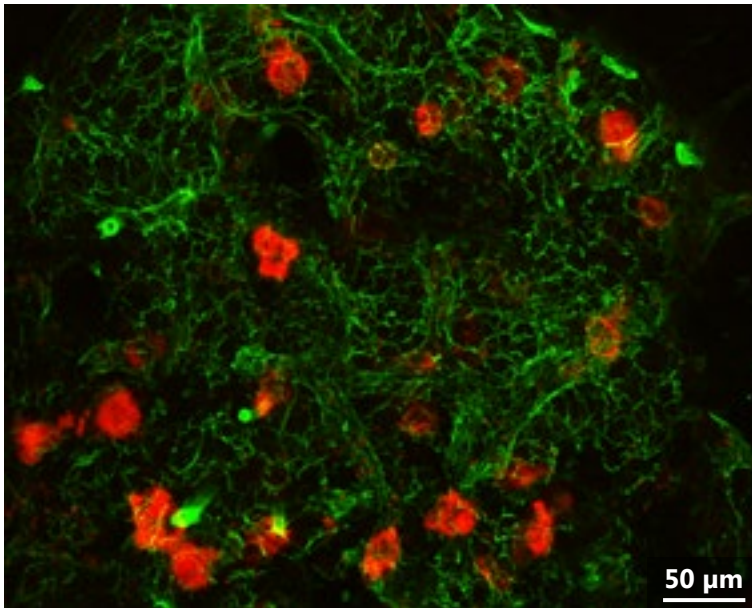


Figure 9 : Les protéines de la MEC forment un réseau tridimensionnel

Le collagène IV (vert) s'organise en fibrilles dans la moelle osseuse, formant un réseau tridimensionnel qui entoure les cellules, dont les mégacaryocytes (rouge).

(Image : Fabien Pertuy, UMR_S949, EFS-Alsace, Projection maximale d'images acquises en microscopie confocale sur une épaisseur de 100 µm, immunomarquage de la GPIIb β (rouge) et du collagène IV (vert) sur de la moelle de souris)

Hormis des protéines, la MEC rassemble également des glycosaminoglycans (GAGs), sucres complexes différenciés par les chaînes qui les composent. On retrouve ainsi l'acide hyaluronique (ou hyaluronane), qui constitue le seul GAG non sulfaté, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate (héparine) et le kératane sulfate. Les GAGs sulfatés sont liés de manière covalente à des protéines pour former des protéoglycans (Gandhi and Mancera, 2008). De manière générale, les GAGs forment un gel hydraté capable d'absorber les stress de pression et de retenir des molécules diffusibles comme des cytokines (Hynes, 2009; Kim et al., 2011).

Toutes les cellules peuvent produire de la MEC, mais certains types cellulaires produisent des éléments spécifiques de la matrice, par exemple les ostéoblastes produisent du collagène I alors que les cellules endothéliales sécrètent entre autre des laminines et du collagène IV (Davis and Senger, 2005; Neve et al., 2011). Cette spécificité permet de faire varier le type de MEC d'un tissu à un autre, ou au sein d'un même tissu, modulant du même coup la rigidité de ce tissu et sa composition. Les défauts touchant la MEC peuvent entraîner des pathologies, comme c'est le cas pour certaines épidermolyses bulleuses (défaut des laminines) ou l'ostéogénèse imparfaite (défaut du collagène I) (Bateman et al., 2009). La MEC joue également un rôle clé dans la détermination du devenir cellulaire, en influant sur l'engagement et la différenciation des cellules souches par la modulation de sa composition et de sa rigidité (Engler et al., 2006; Reilly and Engler, 2010). Certaines pathologies peuvent altérer la MEC en la dégradant, comme c'est le cas

dans la progression métastatique des cancers, ou en entraînant une accumulation anormale de protéines, comme c'est le cas pour la myélofibrose (Le Bousse-Kerdilès, 2012; Lu et al., 2012).

La composition de la MEC dans la moelle osseuse est décrite dans la partie « La MEC dans la moelle osseuse » (page 28), et les interactions entre les protéines de MEC et les mégacaryocytes sont abordées dans la partie « Les intégrines mégacaryocytaires » (page 33). Contrairement aux protéines, peu d'études s'intéressent spécifiquement à l'interaction entre les mégacaryocytes et les protéoglycans. Il est néanmoins montré que les GAGs sulfatés, et notamment l'héparine, permettent d'augmenter la formation de proplaquettes à partir de mégacaryocytes *in vitro* en présence de sérum (Strassel et al., 2012; Tajika et al., 1996), probablement en partie en bloquant l'action inhibitrice de la thrombine sur ce phénomène (Hunt et al., 1993). De cette manière, les protéoglycans pourraient jouer un rôle dans la thrombopoïèse *in vivo*.

La MEC dans la moelle osseuse

La MEC de la moelle osseuse rassemble une diversité importante de protéines et de GAGs dont la nature et la localisation sont étudiées depuis les années 1980. Peu de ces études s'intéressent à l'aspect quantitatif de la composition de la moelle. Par exemple, on sait que les cultures de cellules de moelle produisent une grande variété de protéines de MEC dont les collagènes I, III, IV, V et VI, la laminine et la fibronectine (Chichester et al., 1993), mais une seule étude mesure la proportion des sous-types de collagènes retrouvés dans ces cultures (ratio de 5:1, collagène I par rapport au collagène III) (Bentley, 1982). Les GAGs extraits de la moelle osseuse sont, quant à eux, essentiellement du chondroïtine sulfate (80%) et de l'acide hyaluronique (15%), les 5% restant n'ont pas été identifiés plus précisément (Noordegraaf and Ploemacher, 1979; Oguri et al., 1987). L'une de ces études mentionne que parmi ces 80%, 15% correspondent au chondroïtine sulfate B, désormais appelé dermatane sulfate (Noordegraaf and Ploemacher, 1979). La plupart des informations disponibles sur la composition de la MEC de la moelle sont qualitatives, avec notamment la localisation de certains éléments vis-à-vis de l'os, des vaisseaux ou l'espace intercellulaire (voir Table 2).

Le compartiment osseux contient du collagène I en grande quantité, de la vitronectine et de la fibronectine (Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998; Seiffert, 1996), alors que la présence de collagènes III et IV en faible quantité au niveau de l'os semble mal établie (Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998). L'endoste rassemble les collagènes I, IV, VI, de la fibronectine et de la ténascine-C (Mackie et al., 1987; Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998).

	Espace					Autres cellules
	Os	Endoste	intercellulaire	Vaisseaux	Mégacaryocytes	
Protéines						
Collagène I	+++ 10, 11, 17	+	++ 1, 5, 10, 17	+	1, 10, 17	
Collagène III	+/- 10/11, 17		+/- 4, 10/5, 11, 17	+/-	5, 10/11, 17	+/- 5/10, 11, 17
Collagène IV	+/- 11/10, 17	+/- 11/17	++ 5, 10, 11, 16, 17	+++	5, 10, 11, 17	
Collagène V			+		5	
Collagène VI		+	++	++	5, 10	
Facteur de Willebrand			+	++	+++	
			17	7, 17	7, 17	
Fibrinogène			+	+++	+++	+
			2, 8	2, 8	2, 7	2
Fibronectine	+	+	+++	++	++	
	10, 11	11, 17	1, 4, 10, 11, 16, 17	1, 4, 10, 16, 17	10, 11, 16, 17	
Laminine			+	+++		
			1, 11, 14, 16, 17	1, 10, 11, 14, 16,		
Ténascine C		+	++	+		
		9	4, 9	4		
Thrombospondine 1			+		++	
			6		3, 6	
Thrombospondine 2			+		++	
			6		6	
Vitronectine	++		+/-			
	13		13			
Glycosamoniqglycans						
Acide hyaluronique			+	+		+
			15	15		15
Chondroïtine sulfate			++		+	
			12		12	
Héparane sulfate			+	++		++
			1	1		1

Table 2 : Composition de la matrice extracellulaire de la moelle osseuse de mammifères

Les scores « +++ », « ++ », « + » représentent une quantité relative pour un élément donné entre les différentes localisations ; le score « +/- » signifie la présence d'informations contradictoires ou imprécises dans la littérature. Les références sont indiquées comme suit : 1, (Hamilton and Campbell, 1991) ; 2, (Handagama et al., 1989) ; 3, (Iruela-Arispe et al., 1993) ; 4, (Klein et al., 1993) ; 5, (Klein et al., 1995) ; 6, (Kyriakides et al., 2003) ; 7, (de Larouzière et al., 1998) ; 8, (Larson and Watson, 2006) ; 9, (Mackie et al., 1987) ; 10, (Malara et al., 2013) ; 11, (Nilsson et al., 1998) ; 12, (Oguri et al., 1987) ; 13, (Seiffert, 1996) ; 14, (Siler et al., 2000) ; 15, (Sundström et al., 2002) ; 16, (Topp and Tablin, 1991) ; 17, Observations personnelles à partir d'immunomarquages de moelle osseuse de souris, Fabien Pertuy.

L'espace intercellulaire de la moelle osseuse rassemble une grande diversité d'éléments de la MEC, avec notamment un réseau protéique composé de collagènes I, IV, V et VI, de facteur de Willebrand (observations personnelles, Fabien Pertuy), de fibrinogène, de fibronectine, de laminine (particulièrement la laminine 411), de ténascine-C et de thrombospondines 1 et 2 (Hamilton and Campbell, 1991; Handagama et al., 1989; Iruela-Arispe et al., 1993; Klein et al., 1993, 1995; Kyriakides et al., 2003; Larson and Watson, 2006; Mackie et al., 1987; Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998; Siler et al., 2000; Topp and Tablin, 1991). La présence de collagène III dans ce compartiment n'est pas claire (Klein et al., 1993, 1995; Malara et al., 2013; Nilsson et al.,

1998), et il semble y avoir très peu de vitronectine dans l'espace intercellulaire de la moelle osseuse saine, alors que ces deux protéines apparaissent clairement présentes dans le cas d'une myélofibrose (Apaja-Sarkkinen et al., 1986; Reilly and Nash, 1988; Seiffert, 1996). Ce réseau de MEC regroupe également de l'acide hyaluronique, du chondroïtine sulfate et de l'héparane sulfate (Hamilton and Campbell, 1991; Oguri et al., 1987; Sundström et al., 2002).

La nature de la MEC qui soutient les vaisseaux dans la moelle osseuse soulève un intérêt particulier de par sa potentielle implication dans la thrombopoïèse. On retrouve à cette localisation des collagènes I, IV et VI, du facteur de Willebrand, du fibrinogène, de la fibronectine, de la laminine, de la ténascine C, de l'acide hyaluronique et de l'héparane sulfate (Hamilton and Campbell, 1991; Handagama et al., 1989; Klein et al., 1993, 1995; de Larouzière et al., 1998; Larson and Watson, 2006; Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998; Siler et al., 2000; Sundström et al., 2002; Topp and Tablin, 1991). La présence de collagène III à ce niveau n'est encore une fois pas clairement établie (Klein et al., 1995; Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998). Certaines protéines, ou isoformes de protéines, semblent préférentiellement localisées au niveau des artérioles, comme les laminines 211, 221, 511 et 521, et les collagènes I, III et VI, alors que la laminine 411, la fibronectine, et le collagène IV semblent plutôt localisés au niveau des sinusoides (Malara et al., 2013; Siler et al., 2000).

Certains de ces éléments de la MEC sont observés dans le cytoplasme de petites cellules, comme le fibrinogène, l'acide hyaluronique et l'héparane sulfate et parfois le collagène III (Hamilton and Campbell, 1991; Handagama et al., 1989; Klein et al., 1995; Sundström et al., 2002), alors que d'autres sont présents dans les mégacaryocytes, comme le facteur de Willebrand, le fibrinogène, la fibronectine, les thrombospondines 1 et 2 et le chondroïtine sulfate (Handagama et al., 1989; Iruela-Arispe et al., 1993; Kyriakides et al., 2003; de Larouzière et al., 1998; Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998; Oguri et al., 1987; Topp and Tablin, 1991). Il est connu que le mégacaryocyte synthétise le facteur de Willebrand, la fibronectine et la thrombospondine 1 (Kyriakides et al., 2003; de Larouzière et al., 1998; Malara et al., 2010, 2013), en revanche il n'exprime pas le fibrinogène qui est endocyté au cours de la mégacaryopoïèse (Handagama et al., 1993, 1989; de Larouzière et al., 1998; Louache et al., 1991) et n'exprime pas ou peu la thrombospondine 2, qui peut également être endocytée par le mégacaryocyte (Kyriakides et al., 2003). Une étude récente a montré que le collagène IV et la laminine sont synthétisés par les mégacaryocytes, plus particulièrement lors de la reconstitution de la moelle après une myélosuppression. Néanmoins, les mégacaryocytes matures ne présentent pas de marquage cytoplasmique pour ces protéines (Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998), ce qui suggère qu'elles pourraient être synthétisées par

les mégacaryocytes immatures et secrétées au cours de la mégacaryopoïèse pour être incorporées à la matrice de la moelle.

Intégrines

Même si elles ne constituent pas les seules protéines d'adhésion impliquées dans les interactions avec la MEC, les intégrines en sont les principaux récepteurs. Elles permettent à la cellule de former des points d'ancrage 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'actine et entraîne l'activation de kinases.

Structure des intégrines

Les intégrines (Hynes, 2004; Tamkun et al., 1986) sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Au total il existe dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β , qui peuvent s'assembler pour former au moins vingt-quatre dimères d'intégrines (voir Figure 10).



Figure 10 : Les dimères d'intégrines

Les intégrines rassemblent dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β qui peuvent s'assembler pour former vingt-quatre dimères connus (traits pleins ou pointillés). Les dimères exprimés par les mégacaryocytes sont indiqués en traits pleins bleus.

Schéma adapté de Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.

Chaque sous-unité peut-être grossièrement décomposée en une « tête » et une « queue » extracellulaires, et un domaine intracellulaire (Xiong et al., 2001). L'association des deux têtes permet d'assembler le site de liaison aux ligands, dont la spécificité dépend des sous-unités impliquées. L'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ est ainsi le principal récepteur du fibrinogène, alors que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ lie essentiellement la vitronectine (voir Table 3 page 33). Ces sites reconnaissent une grande variété de ligands, notamment par l'intermédiaire de certains domaines peptidiques spécifiques comme les domaines RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique), et sont dépendants de la liaison de cations divalents (Humphries et al., 2006; Xiong et al., 2002). Les « queues » permettent

d'articuler l'intégrine en lui donnant une conformation repliée, inactive, ou dépliée, active. La transition entre ces deux conformations est dirigée par la signalisation « inside-out », qui dépend des domaines cytoplasmiques et permet de moduler l'affinité de l'intégrine pour son ligand (Takagi et al., 2002; Vinogradova et al., 2002). La liaison de la taline et de la kindline au domaine intracellulaire de la sous-unité β constitue une étape essentielle de cette activation (Harburger et al., 2009). Une fois activée, l'intégrine peut reconnaître son ligand et ainsi déclencher une signalisation « outside-in » qui entraîne notamment l'ancrage de l'intégrine au cytosquelette d'actine (voir Figure 11). Cet ancrage constitue le point de départ de la formation d'une adhésion, et mène à une régulation très complexe du cytosquelette d'actine qui implique plus d'une centaine de protéines parmi lesquelles les kinases FAK (Focal Adhesion Kinase) et Src, la vinculine et la paxilline (Harburger and Calderwood, 2009; Hynes, 2002; Zaidel-Bar et al., 2007).

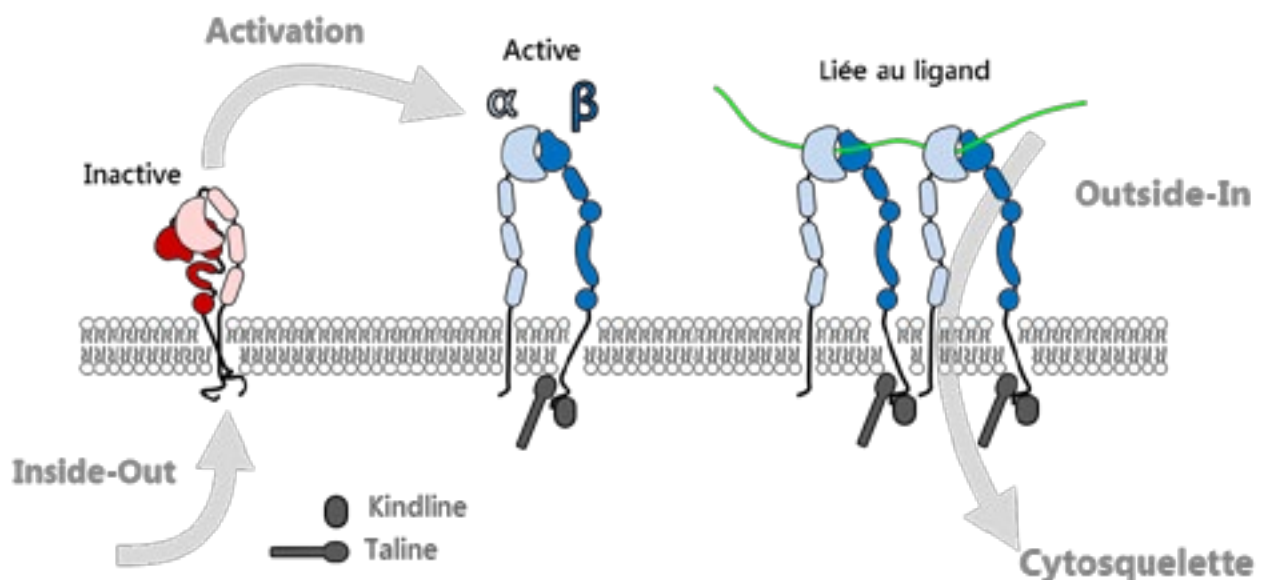


Figure 11 : Signalisation bilatérale des intégrines

La signalisation « inside-out » déclenche la liaison de la kindline et de la taline à la partie intracytoplasmique de la sous-unité β de l'intégrine, et entraîne un changement de conformation avec le dépliement de sa partie extracellulaire. L'intégrine ainsi activée peut reconnaître son ligand et déclencher une signalisation « outside-in » qui stimule notamment le cytosquelette d'actine.

Fonctions des intégrines

Les intégrines jouent un rôle primordial dans la mise en place et la stabilisation d'adhésions entre la cellule et son environnement. Leur lien au cytosquelette d'actomyosine les implique dans de nombreux processus de contractilité. Elles peuvent ainsi servir d'attache à la MEC pour permettre la migration de la cellule, ou réciproquement servir à réorganiser la MEC grâce à la contractilité cellulaire, comme par exemple dans le cas de la fibrillogénèse. Les intégrines sont également impliquées dans l'analyse de l'environnement par la cellule grâce à la mécanotransduction. La

contraction du cytosquelette couplée à une intégrine peut ainsi permettre à la cellule de ressentir la rigidité du milieu environnant (Geiger et al., 2009).

Les intégrines mégacaryocytaires

Les mégacaryocytes disposent de six dimères d'intégrines, et n'exprimeraient que les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$. On peut ainsi retrouver à leur surface les intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$ et $\alpha V\beta 3$ (Berthier et al., 1998; Fox and Kaushansky, 2005; Hagiwara et al., 1996; Leven and Tablin, 1992). L'expression des intégrines a été mesurée de manière quantitative sur les plaquettes humaines (Burkhart et al., 2012), mais pas au niveau des mégacaryocytes. On peut cependant raisonnablement considérer que les données obtenues sur les plaquettes reflètent le niveau d'expression des intégrines par le mégacaryocyte mature. Contrairement aux autres, $\alpha 4\beta 1$ est absente des plaquettes, et semble donc être régulée négativement durant la mégacaryopoïèse. Au final, ces intégrines procurent aux mégacaryocytes la possibilité d'interagir avec une grande variété de ligands (voir Table 3).

Principaux ligands connus des intégrines exprimées par les mégacaryocytes

Intégrine	Ligands
$\alpha 2\beta 1$	Collagènes , thrombospondines, laminines
$\alpha 4\beta 1$	Fibronectine, thrombospondines, ostéopontine, VCAM-1, MAdCAM-1
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectine , ostéopontine
$\alpha 6\beta 1$	Laminines
$\alpha IIb\beta 3$	Fibrinogène , facteur de Willebrand, fibronectine, vitronectine, thrombospondines, ostéopontine, fibrilline, LAP-TGF β
$\alpha V\beta 3$	Vitronectine , fibronectine, fibrinogène, ténascine, thrombospondines, facteur de Willebrand, fibrilline, ostéopontine, PECAM-1, BSP, LAP-TGF β

Table 3 : Principaux ligands connus des intégrines exprimées par les mégacaryocytes

D'après (Humphries et al., 2006). Les ligands majoritaires des différents dimères sont indiqués en gras.

Parmi ces intégrines, $\alpha IIb\beta 3$ a été la plus étudiée, d'une part parce qu'il s'agit de la plus exprimée au niveau des plaquettes (60000 à 80000 copies par plaquette contre quelques milliers de copies pour les autres intégrines (Burkhart et al., 2012), d'autre part parce que les mégacaryocytes et les plaquettes sont les seules cellules différenciées à exprimer la sous-unité αIIb , mais également parce qu'elle est impliquée dans la thrombasthénie de Glanzmann (GT, « Glanzmann Thrombasthenia »). Cette maladie est une thrombopathie autosomique récessive, due à des mutations au niveau des gènes *ITGA2b* ou *ITGB3*. Ces mutations mènent à un défaut de l'expression ou de la fonction de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, et diminuent fortement ou suppriment

l'activation plaquettaire et l'agrégation. Les patients atteints de GT ont notamment des tendances hémorragiques moyennes à sévères (Nurden, 2006).

Certaines mutations dominantes touchant les gènes *ITGA2B* et *ITGB3* entraînent une activation constitutive de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$, et sont associées à une macrothrombopénie (Gresele et al., 2009; Kashiwagi et al., 2013; Kunishima et al., 2011). En dehors de ces cas, les patients atteints de GT ne semblent pas présenter de défauts au niveau de la numération ou de la morphologie plaquettaire. Les conséquences de la thrombasthénie de Glanzmann sur les mégacaryocytes sont mal connues, et une seule étude leur décrit des défauts au niveau de la maturité de leurs organelles (Falcão, 1974). L'activation constitutive de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ impacte négativement la formation de proplaquettes par les mégacaryocytes de patients atteints de GT présentant une macrothrombopénie, confortant l'idée que cette protéine est impliquée dans la régulation de la thrombopoïèse (Bury et al., 2012).

En dehors de la thrombasthénie de Glanzmann et de quelques très rares cas de diminution de l'expression d' $\alpha_2\beta_1$ (Noris et al., 2006), aucune pathologie plaquettaire n'est liée à un défaut d'intégrines. L'étude du rôle des intégrines dans la mégacaryopoïèse doit donc s'appuyer sur des modèles *in vivo* ou *in vitro*. Peu d'études *in vivo* sont disponibles, et celles utilisant des souris déficientes pour les intégrines β_1 ou β_3 dans la lignée plaquettaire n'ont pas révélé de défaut au niveau des mégacaryocytes ou de la production des plaquettes (Morgan et al., 2010; Tiedt et al., 2007). Par contre, l'inactivation de l'intégrine α_2 entraînerait une diminution du volume plaquettaire moyen (Habart et al., 2013). Il est également démontré *in vivo* que l'interaction d' $\alpha_4\beta_1$ avec VCAM-1 favorise l'interaction des mégacaryocytes immatures avec les cellules endothéliales en présence de FGF-4 et la migration transendothéliale en présence de SDF-1 (Avecilla et al., 2004). Ces étapes de contact avec l'endothélium et de passage transendothélial sont considérées comme essentielles pour la formation de plaquettes dans le flux sanguin.

Le rôle de certaines intégrines mégacaryocytaires a été suggéré de manière indirecte dans plusieurs études *in vivo*. L'absence de thrombospondine 2, un ligand de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, entraîne une altération de la PZ des mégacaryocytes *in situ*, alors que l'absorption de thrombospondine 2 par les mégacaryocytes *in vitro* réduit la formation des proplaquettes (Kyriakides et al., 2003). Les souris déficientes pour la vinculine, protéine intracellulaire qui régule les propriétés adhésives des intégrines, ont un défaut de stabilité de la membrane plasmique des mégacaryocytes, mais pas de défaut au niveau du nombre de plaquettes circulantes (Mitsios et al., 2010). De plus, les souris déficientes pour FAK, une kinase impliquée dans la signalisation outside-in des intégrines, présentent une augmentation du nombre de progéniteurs mégacaryocytaires, du nombre de

mégacaryocytes matures et de la ploïdie de ces mégacaryocytes, ainsi qu'une légère augmentation du nombre de plaquettes circulantes (Hitchcock et al., 2008).

Les études du rôle des intégrines dans la mégacaryopoïèse ont été réalisées majoritairement *in vitro* avec l'utilisation d'anticorps bloquants, d'antagonistes, comme les disintégrines, ou de ligands, comme des protéines de MEC. De cette manière, il a été montré que le blocage de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ inhibe la différenciation des mégacaryocytes murins, alors que son engagement, vis-à-vis d'un domaine de la fibronectine, semble favoriser la mégacaryopoïèse *in vitro* (Fox and Kaushansky, 2005). Parallèlement, l'engagement d' $\alpha 4\beta 1$ avec VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) favorise la formation de proplaquettes *in vitro* dans le cas d'une co-culture avec des cellules souches mésenchymateuses humaines (Pallotta et al., 2009). Il a également été montré chez le cobaye que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ favorise la formation des proplaquettes quand elle interagit avec la vitronectine en suspension, et qu'à l'inverse le blocage de cette intégrine par des anticorps inhibe la formation des proplaquettes (Leven, 1995; Leven and Tablin, 1992). En revanche, l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ suite à une stimulation à la thrombine, ou sous l'effet d'activateurs de la protéine kinase C, entraîne l'étalement du mégacaryocyte sur une surface de plastique et inhibe la formation de proplaquettes (Leven, 1995). Ces données suggèrent un effet répresseur de l'étalement du mégacaryocyte sur l'extension de proplaquettes, en accord avec les données obtenues chez un patient atteint de GT (Bury et al., 2012).

Toutefois, les études *in vitro* donnent parfois des résultats contradictoires, et ne permettent pas d'établir précisément le rôle des interactions intégrines/protéines de MEC. Par exemple, Leven *et al.* décrivent que les mégacaryocytes au repos n'adhèrent pas spontanément au fibrinogène et ceux de Schick *et al.* suggèrent que l'activation d' $\alpha IIb\beta 3$ permet cette adhésion mais inhibe la formation des proplaquettes (Leven, 1995; Schick et al., 1998). À l'inverse, Larson *et al.* montrent que leurs mégacaryocytes adhèrent au fibrinogène sans activation préalable, ce qui entraîne l'émission de proplaquettes (Larson and Watson, 2006). Dans cette étude, le blocage de cette intégrine par un anticorps ou un antagoniste (lotrafiban) inhibe la formation de proplaquettes dans leurs conditions de culture, contrairement aux données de Leven et al. (Larson and Watson, 2006; Leven, 1995). Ces différences résultent probablement en partie des conditions de culture utilisées ainsi que de l'origine des cellules utilisées (cobaye ou souris), en particulier Larson *et al.* traitent leurs animaux à la TPO afin de stimuler la mégacaryopoïèse, et cette cytokine pourrait entraîner l'activation d' $\alpha IIb\beta 3$ (Zauli et al., 1997).

Des contradictions apparaissent également dans l'étude de l'influence du collagène I sur la thrombopoïèse *in vitro*. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est clairement impliquée dans la reconnaissance du

collagène I par les mégacaryocytes, mais l'exposition des cellules à cette matrice entraîne dans certains cas une formation de proplaquettes (Hunt et al., 1993; Tablin et al., 1990), et dans d'autres cas un étalement des mégacaryocytes et une inhibition de la formation de proplaquettes (Balduini et al., 2008; Larson and Watson, 2006; Malara et al., 2011; Sabri et al., 2004; Topp et al., 1990). On peut remarquer en détaillant les protocoles employés que les conditions défavorables à la formation de proplaquettes utilisent du collagène I immobilisé sur une surface rigide en verre ou en plastique, alors que les conditions favorables utilisent un gel épais de collagène, et donc une structure moins rigide. Par ailleurs, l'inhibition de la formation des proplaquettes sur collagène I est liée à l'activation du cytosquelette d'actomyosine (Malara et al., 2011) et est levée par l'utilisation de substances qui déstabilisent la myosine II (Balduini et al., 2008; Pallotta et al., 2009). De la même manière l'utilisation de matrigel, un gel composé de MEC, comme support pour les mégacaryocytes inhibe la formation de proplaquettes lorsqu'il est appliqué en couche fine (Tablin et al., 1990), mais pas en couche épaisse (Hunt et al., 1993; Topp et al., 1990). Et l'inhibition observée sur une surface recouverte d'une couche fine de matrigel est levée par la déstabilisation du cytosquelette d'actine par la cytochalasine D (Tablin et al., 1990). Ces données suggèrent que les intégrines mégacaryocytaires agissent comme des mécanorécepteurs au contact de la MEC, et régulent la thrombopoïèse. Le fait que le collagène I recouvrant des surfaces dures doit être fibrillaire pour inhiber la formation des proplaquettes, mais également pour permettre l'organisation de la fibronectine sous forme de fibres, conforte cette hypothèse (Malara et al., 2011).

Globalement, ces études sont en faveur d'une implication des intégrines dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse, mais l'importance et les rôles respectifs des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ sont encore mal compris. Ces données forment un socle à partir duquel nous avons abordé notre étude du rôle des intégrines dans la mégacaryopoïèse (voir « Etude du rôle des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse » page 48).

Partie I - Défauts des mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} : répartition des organelles.

Les maladies liées à *MYH9*

Les maladies liées à *MYH9* (Myosine Heavy chain 9), le gène codant pour la chaîne lourde IIA de la myosine non musculaire (qui forme la myosine IIA, voir « Fonctions de la myosine non-musculaire IIA » page 39), constituent une forme de thrombopénie héréditaire et regroupe les syndromes de May-Hegglin, Fetchner, Epstein et Sebastian. Ces maladies ont toutes en commun une macrothrombopénie à plaquettes géantes (1,5 à 2,5x plus grosses que la normale) (Noris et al., 2013). D'autres symptômes comme une perte d'audition et une atteinte rénale (glomérulonéphrite) peuvent se développer au cours de la vie (syndromes de Fetchner et d'Epstein), associés à une cataracte précoce dans le cas du syndrome de Fetchner (Althaus and Greinacher, 2009). Ces syndromes sont causés par des mutations ponctuelles autosomiques dominantes de *MYH9* qui affectent soit la tête, soit la queue de la myosine IIA. Les atteintes non plaquettaires et la sévérité des thrombopénies seraient plus souvent associées aux mutations affectant la tête de la myosine IIA, mais la gravité de l'évolution de la maladie semble plus précisément dépendre de la position de la mutation et semble également varier en fonction de la substitution impliquée (Pecci et al., 2008, 2014; De Rocco et al., 2013). La myosine IIA mutée peut entraîner l'apparition de corps d'inclusion au niveau de leucocytes, ce qui constitue, avec la macrothrombopénie, un critère discriminant pour le diagnostic (Althaus and Greinacher, 2009; Nurden, 2005). L'origine du caractère dominant des mutations liées à *MYH9* reste discutée, plusieurs études ont évalué un possible effet dominant négatif ou une haploinsuffisance, sans permettre de trancher en faveur d'une des deux hypothèses (Chen et al., 2013; Pecci et al., 2005; Zhang et al., 2011). Un modèle de souris déficientes pour la myosine IIA semble cependant aller à l'encontre de l'haploinsuffisance puisque la présence d'un seul allèle fonctionnel n'entraîne pas de phénotype plaquettaire ou rénal (Matsushita et al., 2004).

Les mégacaryocytes de ces patients présentent une morphologie anormale avec notamment un défaut d'organisation du DMS (Heynen et al., 1988; Zucker-Franklin, 2003). L'étude de mégacaryocytes différenciés *in vitro* à partir de progéniteurs provenant de ces patients a permis de mettre en avant le rôle de la myosine IIA dans la formation des proplaquettes et dans l'interaction du mégacaryocyte avec la matrice extracellulaire (Chen et al., 2013; Pecci et al., 2009). Plusieurs modèles murins reproduisent les symptômes observés dans les maladies liées à *MYH9*. Certains reproduisent des mutations retrouvées chez des patients (Carmichael and Alexander, 2011; Suzuki et al., 2013; Zhang et al., 2011), et d'autres correspondent à une

absence de la myosine IIA (Léon et al., 2007; Matsushita et al., 2004). Bien que ce dernier type de modèle ne permette d'étudier que les défauts d'origine plaquettaire et ne reproduise pas exactement la pathologie, il autorise en revanche une meilleure compréhension du rôle de la myosine IIA dans la thrombopoïèse et les fonctions plaquettaires.

Fonctions de la myosine non-musculaire IIA

Toutes les myosines sont des protéines motrices capables de générer un mouvement en utilisant l'hydrolyse de l'ATP. Les myosines de classe II sont des hexamères constitués d'une paire de chaînes lourdes et de deux paires de chaînes légères. Les chaînes légères « régulatrices » modulent l'activité des chaînes lourdes alors que les chaînes légères « essentielles » sont impliquées dans la stabilisation de la structure de la myosine. Les chaînes lourdes sont constituées d'une tête globulaire, d'un domaine cervical et d'une longue hélice alpha C-terminale. Deux chaînes lourdes s'associent par leurs domaines en hélice alpha, qui forment alors la « queue » de la myosine, puis lient les chaînes légères essentielles et régulatrices au niveau du domaine cervical, pour constituer un hexamère de myosine II. Chaque hexamère peut lier et hydrolyser l'ATP au niveau d'une tête, ce qui entraîne le basculement de celle-ci. Le basculement intervient grâce à la flexibilité du domaine cervical et constitue une étape essentielle des phénomènes de contractilité. Les hexamères peuvent s'assembler de manière antiparallèle pour former des filaments bipolaires, et lient des filaments d'actine par leurs têtes globulaires. La contraction intervient quand les têtes de myosines liées à l'actine basculent, générant une force de tension qui peut imprimer un mouvement (migration, contraction) ou stabiliser une structure (fibre de stress) (Vicente-Manzanares et al., 2009).

Il existe trois isoformes de myosine II non musculaire : les myosines IIA, IIB et IIC, dont les chaînes lourdes sont respectivement codées par les gènes *MYH9*, *MYH10* et *MYH14*. Les myosines non musculaires de classe II sont ubiquitaires, mais les isoformes exprimées varient en fonction des types cellulaires. De manière générale, ces myosines sont impliquées dans la contractilité cellulaire et les phénomènes d'adhésion, de polarisation et de migration. Le rôle de la myosine IIC est très mal connu *in vivo* contrairement à la myosine IIA, qui est impliquée dans la formation de structures dynamiques comme les adhésions, les protrusions ou le front de migration cellulaire, et la myosine IIB, qui participe notamment à des processus de stabilisation tels que le positionnement nucléaire (Cai et al., 2006; Rochlin et al., 1995; Vicente-Manzanares et al., 2008).

Défauts des mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} : répartition des organelles.

Au niveau du mégacaryocyte, la myosine IIC n'est pas exprimée et la myosine IIB est réprimée au cours de la différenciation, l'inhibition de son expression participant à l'initiation des cycles d'endomitose (comme décrit dans le paragraphe « Polyploïdie » page 10). Ainsi, la myosine IIA est la seule myosine de type II exprimée par les mégacaryocytes et les plaquettes. Elle joue un rôle au niveau de la régulation de la formation des proplaquettes *in vitro* (Balduini et al., 2008; Eckly et al., 2010; Pecci et al., 2009), mais également *in vivo* dans la structuration du DMS et de la PZ, ainsi que dans la formation des plaquettes sur les aspects qualitatif et quantitatif (Eckly et al., 2009, 2010).

Le modèle *Myh9*^{-/-} : avancées sur le rôle de la myosine IIA dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

L'inactivation ubiquitaire du gène *Myh9* chez la souris est létale à un stade précoce de l'embryogénèse et empêche de tirer des conclusions sur l'implication de la myosine IIA dans la mégacaryopoïèse, la thrombopoïèse ou la fonction plaquettaire (Conti et al., 2004). Pour étudier spécifiquement ces mécanismes, un modèle de souris *Myh9*^{-/-} spécifique des plaquettes a été développé dans notre équipe. Ce modèle reproduit le phénotype plaquettaire des maladies liées à *MYH9*, c'est-à-dire une macrothrombopénie accompagnée d'une absence de changement de forme au cours de l'activation plaquettaire. Les travaux menés sur cette souris ont également mis en évidence le rôle de la myosine IIA dans la rétraction du caillot, la formation et la stabilité du thrombus, la signalisation « outside-in » des intégrines plaquettaires et la formation des fibres de stress (Léon et al., 2007). Dans ce modèle, l'absence de myosine IIA n'entraîne pas de diminution de la ploïdie et augmente la densité des mégacaryocytes au niveau de la moelle osseuse. La myosine IIA est par ailleurs impliquée dans la régulation de la taille des boutons plaquettaires, dans la structuration de la PZ et du DMS. Son absence entraîne notamment une forte altération dans la morphologie des mégacaryocytes (Eckly et al., 2009). L'absence de myosine IIA entraîne également un fort défaut dans la formation des proplaquettes par les mégacaryocytes différenciés *in situ*, alors que l'inhibition de sa fonction contractile par la blebbistatine entraîne au contraire une augmentation de la formation des proplaquettes (Eckly et al., 2010). Ces effets a priori contradictoires semblent refléter d'une part l'importance de la structuration du mégacaryocyte (DMS, PZ) dans la formation de ces prolongements (*Myh9*^{-/-}), et d'autre part un rôle inhibiteur de la myosine IIA sur ce même phénomène dans le mégacaryocyte sauvage. Ainsi, l'activité contractile de cette myosine n'apparaît pas indispensable pour la

Défauts des mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} : répartition des organelles.

formation et l'élongation des proplaquettes. Les mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} présentent également une mortalité augmentée *in situ*, potentiellement liée aux altérations morphologiques de ces cellules en l'absence de myosine IIA et partiellement responsable de la thrombopénie observée chez les souris *Myh9*^{-/-} (Eckly et al., 2010). L'absence de myosine IIA entraîne une légère myélofibrose chez les souris *Myh9*^{-/-}, et ce phénomène est exacerbé par la stimulation de la mégacaryopoïèse avec un agoniste de c-Mpl (Léon et al., 2012). Cet effet pourrait être lié à la libération de cytokines dans le tissu médullaire environnant par les mégacaryocytes morts retrouvés chez les souris *Myh9*^{-/-} (Eckly et al., 2010).

Globalement, la myosine IIA est impliquée i) dans la maturation du mégacaryocyte, au niveau de l'organisation du DMS et de la PZ, ii) dans la formation des plaquettes, au niveau de la régulation de l'émission des proplaquettes et iii) dans la fonction des plaquettes, au niveau de la contractilité plaquettaire, de la formation et de la stabilité du thrombus, de la formation des fibres de stress et potentiellement de la signalisation outside-in des intégrines.

La répartition des organelles dans les plaquettes *Myh9*^{-/-}

Lors de l'étude des souris *Myh9*^{-/-}, la microscopie électronique à transmission (MET) a révélé que les plaquettes de ces souris ont, en plus de leur hétérogénéité en taille, un contenu hétérogène en organelles. Parmi ces plaquettes, certaines présentent une densité anormalement faible ou, à l'inverse, anormalement élevée d'organelles. De manière intéressante, nous avons pu mettre en évidence un défaut similaire chez un patient atteint d'un syndrome de May-Hegglin.

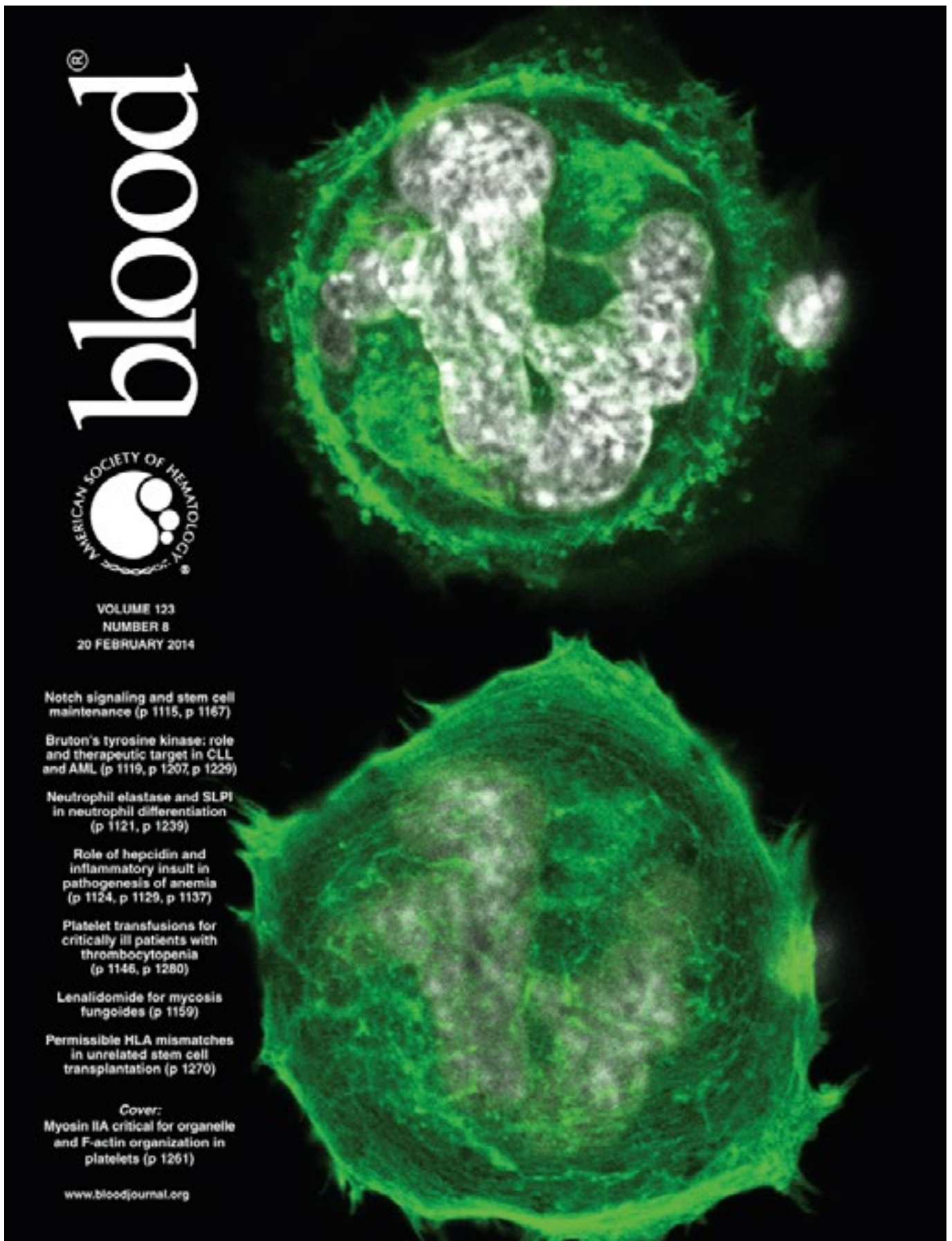
Nous avons retrouvé ce défaut dans des mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} matures, qui contiennent des amas d'organelles, souvent de même type. Ces amas sont normalement présents dans les mégacaryocytes immatures (stade I-II), suggérant que leur persistance dans les mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} de stade III résulte d'un défaut de distribution au cours de la maturation. Nous avons pu montrer que la transmission de ce défaut entre le mégacaryocyte et la plaquette provient de la libération dans la circulation sanguine de fragments au contenu hétérogène, subséquemment remodelés sous forme de plaquettes, et pas d'un défaut dans le trafic des organelles sur les microtubules durant la formation des proplaquettes. Nous montrons également que l'absence de myosine IIA entraîne une mobilité anormale des organelles, potentiellement due à un défaut d'organisation et de polymérisation de l'actine dans ces cellules. Nous proposons que ce défaut de la dynamique de l'actine soit à l'origine

Défauts des mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} : répartition des organelles.

de la répartition cytoplasmique hétérogène des organelles dans les mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} et donc du défaut initialement observé dans les plaquettes.

Défauts des mégacaryocytes Myh9^{-/-} : répartition des organelles.

Article publié - Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets.



blood

2014 123: 1261-1269
Prepublished online November 15, 2013;
doi:10.1182/blood-2013-06-508168

Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets

Fabien Pertuy, Anita Eckly, Josiane Weber, Fabienne Proamer, Jean-Yves Rinckel, François Lanza, Christian Gachet and Catherine Léon

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/123/8/1261.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Platelets and Thrombopoiesis](#) (433 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.

[Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.](#)



PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets

Fabien Pertuy, Anita Eckly, Josiane Weber, Fabienne Proamer, Jean-Yves Rinckel, François Lanza, Christian Gachet, and Catherine Léon

Unité Mixte de Recherche S949, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale–Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang–Alsace, Strasbourg, France

Key Points

- Myosin IIA deficiency affects F-actin structuration and organelle distribution in MKs which leads to abnormal platelet organelle content.

During proplatelet formation, a relatively homogeneous content of organelles is transported from the megakaryocyte (MK) to the nascent platelets along microtubule tracks. We found that platelets from *Myh9*^{-/-} mice and a MYH9-RD patient were heterogeneous in their organelle content (granules and mitochondria). In addition, *Myh9*^{-/-} MKs have an abnormal cytoplasmic clustering of organelles, suggesting that the platelet defect originates in the MKs. Myosin is not involved in the latest stage of organelle traffic along microtubular tracks in the proplatelet shafts as shown by confocal observations of proplatelet buds. By contrast, it is required for the earlier distribution of organelles within the large MK preplatelet fragments shed into the sinusoid circulation before terminal proplatelet remodeling. We show here that F-actin is abnormally clustered in the cytoplasm of *Myh9*^{-/-} MKs and actin polymerization is impaired in platelets. Myosin IIA is required for normal granule motility and positioning within MKs, mechanisms that may be dependent on organelle traveling and tethering onto F-actin cytoskeleton tracks. Altogether, our results indicate that the distribution of organelles within platelets critically depends on a homogeneous organelle distribution within MKs and preplatelet fragments, which requires myosin IIA. (*Blood*. 2014;123(8):1261-1269)

Introduction

Platelets play a pivotal role in hemostasis and in several other aspects of vascular biology such as atherosclerosis, angiogenesis, or wound healing, partly through secretion of their granule contents. α and dense granules, the 2 functionally most important secretory granules in platelets, store numerous platelet-activating factors as well as coagulation, angiogenic, and mitogenic factors. Platelets are produced by megakaryocytes (MKs) through a well-regulated process of differentiation and maturation. Granule biogenesis begins between stages I and II of MK differentiation¹ and involves both biosynthetic and endocytic pathways.² In the final steps of maturation, MKs shed cytoplasmic processes into the sinusoid vessels of the marrow.³ On the basis of in vitro observations, these processes called proplatelets have been described as thin and highly branched,⁴ with the tip of a proplatelet forming the proplatelet bud, whose size corresponds to the future platelet.

During proplatelet formation, constant and homogeneous amounts of components and organelles of the future platelet need to be distributed into the proplatelet bud, which is defined as the nascent platelet. A previous in vitro study showed that organelles are not transported as preformed “platelet units” but individually from the MK into the maturing platelet bud.⁵ Microtubules play an essential role in this transport by forming tracks along which kinesin-linked granules and mitochondria traffic. Organelles are eventually trapped once they enter the proplatelet tip, where they continue to circle along the microtubule coil.⁵ During final platelet maturation, the organelles

detach from the microtubule coil to adopt an apparently random subcellular location within the platelet. The mechanisms controlling the transport of granules/organelles from the MK cytoplasm into proplatelets and allowing the organelles to detach from the microtubule coil are still unknown, as is the way in which a relatively constant number of organelles is packaged within each platelet.

In the present report, we show that myosin IIA plays a critical role in the distribution of organelles within platelets and bone marrow MKs. We show here that myosin deficiency leads to defective actin cytoskeleton structuration which may impair granule distribution during MK maturation. Our data reveal that myosin is not involved in the latest stage of organelle transport along microtubular tracks in the proplatelet shafts. By contrast, it turns out that it is necessary for the earlier distribution of organelles within MKs and hence within the large MK fragments shed into the sinusoid circulation, before terminal proplatelet remodeling and platelet shedding.

Materials and methods

Materials

Materials are described in supplemental Methods (available on the *Blood* Web site).

Submitted June 12, 2013; accepted November 12, 2013. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, November 15, 2013; DOI 10.1182/blood-2013-06-508168.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2014 by The American Society of Hematology

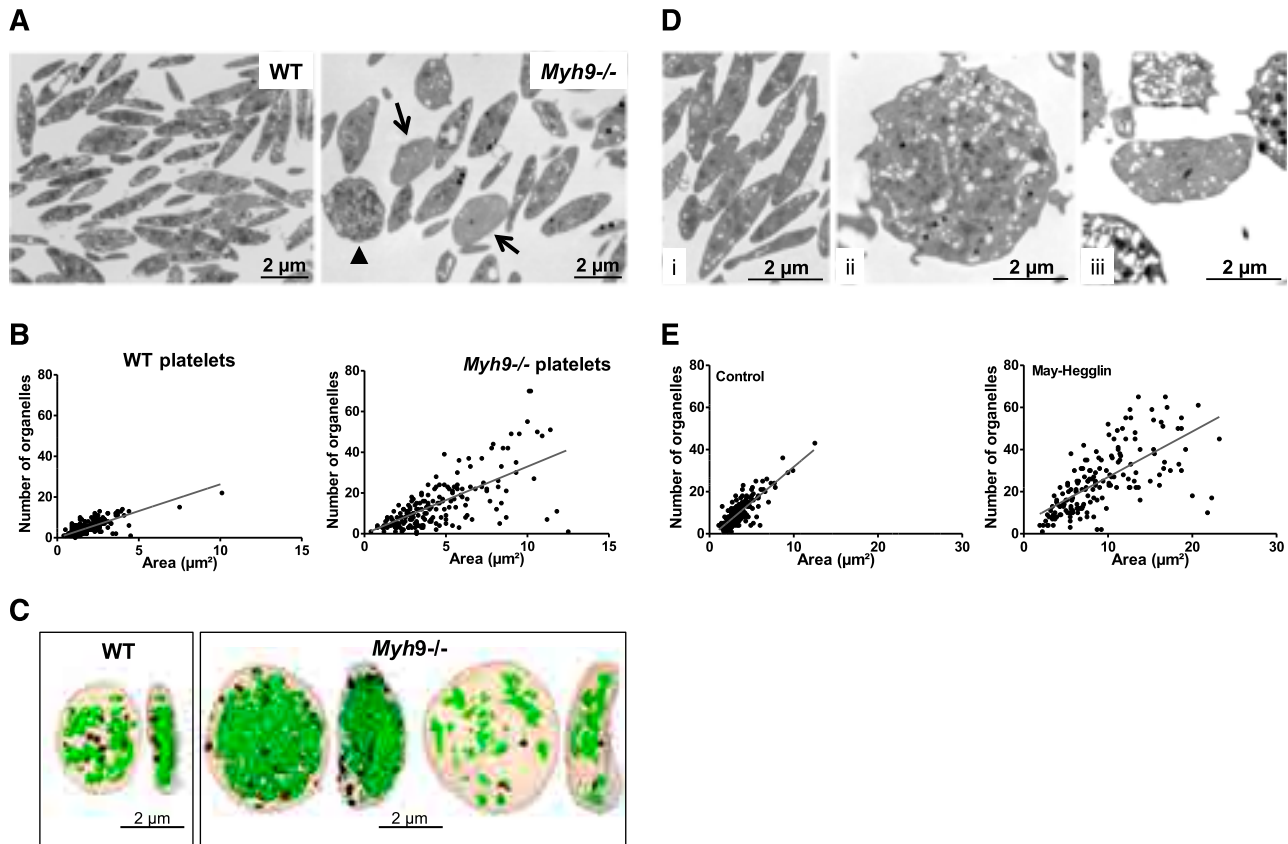


Figure 1. Abnormal distribution of organelles in mouse *Myh9*^{-/-} and human MYH9-RD platelets. (A) Wide-field electron micrographs of mouse platelets showing the heterogeneous content of *Myh9*^{-/-} platelets (right) as compared with WT cells (left). Arrows point to low-content platelets and the arrowhead to a high-content platelet. (B) Quantification of the total number of organelles (α and δ granules, lysosomes, and mitochondria) per platelet as observed by TEM. The number of organelles is plotted as a function of the platelet size, and 215 and 190 platelets were analyzed for WT and *Myh9*^{-/-} mice, respectively. $P < .0001$ for comparison of variances in the point distribution between WT and *Myh9*^{-/-} mice. (C) 3D reconstructions from an FIB/SEM analysis showing the face and profile views of 1 WT (left) and 2 *Myh9*^{-/-} platelets (right). Note the strong heterogeneity in the organelle contents of the *Myh9*^{-/-} platelets as compared with the WT one. (D) Ultrastructure of human platelets from a control individual (i) as compared with a MYH9-RD patient (ii-iii). (E) Quantification of the number of organelles (α and δ granules, lysosomes, and mitochondria) per platelet as a function of the platelet size, for the MYH9-RD patient (right) and a normal donor (left). Organelles were counted in 178 and 170 platelets for the control and patient, respectively. $P < .0001$ for comparison of variances in the point distribution.

Mouse

The floxed *Myh9* strain was crossed with PF4-Cre mice as described previously⁶ to obtain animals with deletion of exon 1 of the *Myh9* gene (*Myh9*^{-/-} mice) in the megakaryocytic lineage. All mice in this study had a C57BL/6J genetic background. Animals were used in accordance with the European laws and the Etablissement Français du Sang (EFS) Review Board regarding animal care.

Patient

Patient S.D., aged 55 years at the time of the study, presented an already reported MYH9 (p.Asp1424Asn) mutation⁷ (see supplemental Methods). The patient provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Washed platelet preparation and organelle isolation and immunolabeling

Human or mouse blood was centrifuged to obtain platelet-rich plasma, and platelets were washed in Tyrode-albumin buffer as previously described.⁸ For organelle isolation, human platelets ($1-2 \times 10^9$ in 13 mL) were disrupted by nitrogen cavitation and organelles isolated on Percoll gradient (see supplemental Methods).

Electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), pellets of washed platelets or flushed bone marrow cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde and embedded

in Epon as described.⁹ For immunolabeling, platelets or organelles were fixed in 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde, infiltrated with 2.3M sucrose, and frozen in liquid nitrogen.⁹ Focused ion beam (FIB)/scanning electron microscopy (SEM) was used to visualize the entire platelet at the resolution of electron microscopy. Three-dimensional (3D) reconstructions were obtained with Amira software (version 5.4; Visualization Sciences Group). See supplemental Methods for details on all the EM procedures.

In vitro MK differentiation and proplatelet formation

Mouse MKs were differentiated in vitro as previously described¹⁰ (see supplemental Methods for details).

F-actin visualization

For visualization of F-actin in bone marrow MKs, mouse femurs were directly flushed into 4% formaldehyde containing 4×10^{-5} M taxol and labeled (see supplemental Methods).

Videomicroscopy and organelle tracking

Megakaryocytes cultured for 5 days were incubated for 2 hours with AF-488-fibrinogen (150 μ g/mL) as described,⁵ washed, and allowed to adhere on poly-L-lysine for 2 hours (see supplemental Methods). Fluorescence was recorded for 5 minutes and organelle tracking performed using Imaris software (version 7.5). Data correspond to 9 to 10 videos for each genotype acquired from 3 independent experiments, resulting in 5260 tracks for wild-type (WT) organelles and 3479 tracks for *Myh9*^{-/-} organelles.

Statistical analyses

The dispersion of organelle contents in platelets and platelet buds was analyzed with R software (version 2.15.2). The residuals of the samples, calculated as the distance between each point and the regression line, were tested for normality using the Shapiro test ($n > 30$). For each comparison between *Myh9*^{-/-} or MYH9-RD cells and controls, the variance of the residuals was tested using the Levene test with an α risk of 5% and a 1-sided *P* value.

Statistical analyses of organelles mean speed and displacement were performed using the Mann-Whitney nonparametric test with an α risk of 5% and a 2-sided *P* value.

Results

Deletion or mutation of the myosin IIA gene leads to an abnormal platelet organelle distribution

Myh9^{-/-} platelets are heterogeneous in size, with an increased mean platelet volume (6.28 ± 0.08 fL compared with 4.84 ± 0.03 fL for WT platelets, $n = 12$ mice, $P < .0001$), and they contain larger amounts of rough endoplasmic reticulum (RER) as previously described.⁶ Myosin deficiency also led to an abnormal distribution of organelles (α and δ granules and mitochondria) within platelets. Using TEM, we found that some platelets had a gray appearance, containing few organelles and an open canalicular system (OCS), while others were crowded with organelles (Figure 1A). Platelets displaying a gray appearance, with <5 organelles per TEM section were quantified and qualified as “low-content” platelets. These represented $22.3\% \pm 2.2\%$ in *Myh9*^{-/-} mice vs $4\% \pm 1.3\%$ in WT mice (mean \pm standard error of the mean [SEM], $n = 297$ -301 platelets from 3 mice) (arrows, Figure 1A). These observations suggested an abnormal organelle distribution in *Myh9*^{-/-} platelets. A quantitative representation of the organelle content of WT and *Myh9*^{-/-} platelets according to the platelet size (Figure 1B) illustrates this heterogeneity ($P < .0001$, comparing the variance of the distributions in WT and *Myh9*^{-/-} platelets).

To visualize the spatial organelle distribution within platelets, we examined whole platelets using “dual beam” electron microscopy (FIB/SEM). This technique allows the observation of large-volume samples by acquisition of serial sections of 20 nm thickness. Although it was not possible to precisely quantify the number of platelets, we observed the presence of “low-content” and “high-content” platelets in *Myh9*^{-/-} image stacks (supplemental Videos 1-2, see arrows and arrowheads). Some of these platelets were entirely analyzed by manual segmentation delineating every organelle in each platelet section, which meant analyzing up to 220 sections, depending on the cell size and orientation. Subsequently, 3D images were reconstructed to visualize the entire platelet and its organelle content. Figure 1C and supplemental Videos 3-5 show the 3D reconstructions of a low-content and a high-content platelet, as compared with a WT platelet. The WT platelet contains 33 organelles (granules, lysosomes, and mitochondria) including 12 dense granules recognized by their typical dense aspect, for a volume of $4.6 \mu\text{m}^3$ (organelle:volume ratio of 7.2). The high-content *Myh9*^{-/-} platelet contains 341 organelles including 37 dense granules in a volume 4.3 times larger than the WT volume ($19.7 \mu\text{m}^3$) (organelle:volume ratio of 17.3), whereas the low-content platelet contains 48 organelles (2 dense granules) in a volume 3.3 times larger than the WT volume ($15.47 \mu\text{m}^3$) (organelle:volume ratio of 3.1) (Figure 1C).

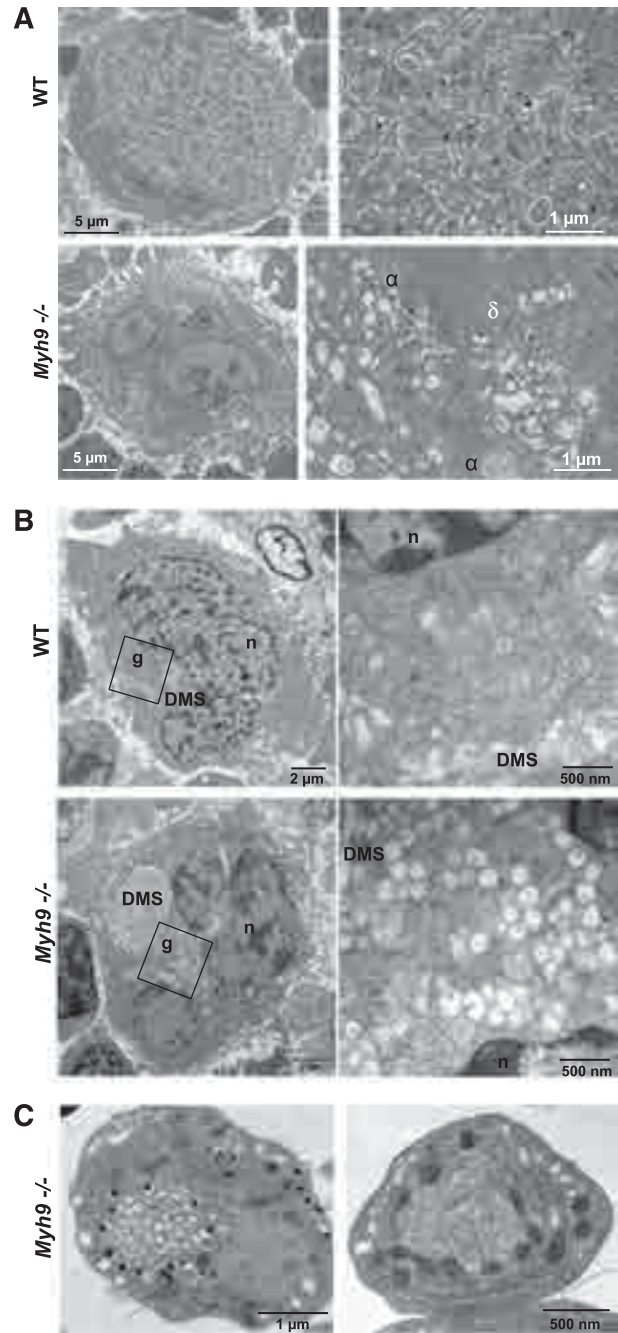


Figure 2. Abnormal MK distribution upon maturation of *Myh9*^{-/-} MKs. (A) TEM images showing the in situ ultrastructure of WT (top panels) and *Myh9*^{-/-} (bottom panels) MKs. Higher magnifications (right images) show the normal granule distribution in the WT cytoplasm and clusters of α (α) and dense (δ) granules in *Myh9*^{-/-} MKs. (B) TEM observations of in situ bone marrow showing the presence of granule clusters (g) located near the nucleus (n) and the developing pre-DMS in immature stage I WT (top panels) and *Myh9*^{-/-} (bottom panels) MKs. Right images are magnification of left images. (C) Detail showing the abnormal organelle positioning in platelets from *Myh9*^{-/-} mice. (Left) Dense granules aligned around membrane complex. (Right) Mitochondria aligned along the RER.

To determine whether the mutations in MYH9-RD patients lead to similar defects, we analyzed platelets from a patient with an *MYH9* p.Asp1424Asn mutation. This patient exhibited giant platelets having a heterogeneous distribution of the platelet granules and mitochondria, very similar to the phenotype observed in the mouse model (Figure 1D-E). Overall, these results demonstrate a role of myosin IIA in the distribution of organelles in platelets.

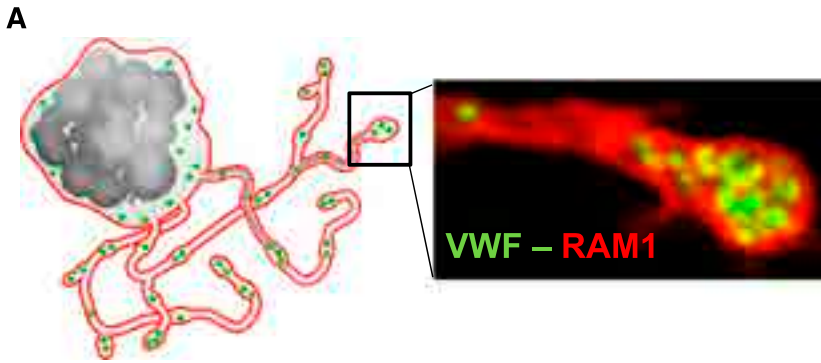
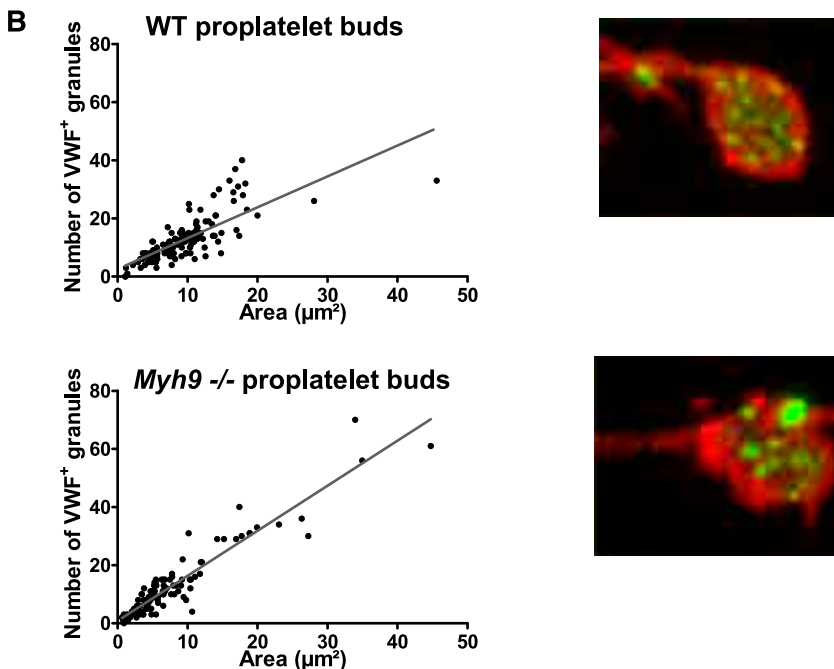


Figure 3. Granule distribution in proplatelet buds. (A) Cultured MKs bearing proplatelets were imaged after immunolabeling with anti-GPIIb β (red, RAM1) and anti-VWF antibodies (green). (B) Quantification of the number of VWF-positive granules (green labeling) per proplatelet bud as a function of the bud size. n = 123 proplatelet buds for WT cells, n = 115 proplatelet buds for *Myh9*^{-/-} cells, in 3 separate cultures. The variances in the point distribution were not statistically different.



***Myh9*^{-/-} MKs have an abnormal cytoplasmic organelle distribution**

To elucidate the origin of this heterogeneous platelet content, we looked at how the organelles were distributed within MKs. Bone marrow MKs were examined in situ by TEM. In more mature stage III WT MKs, the granules were evenly distributed within the so-called platelet territories, delineated by the demarcation membrane system (DMS) (Figure 2A). In contrast, *Myh9*^{-/-} bone marrow MKs displayed an abnormal organelle distribution pattern. α and dense granules and mitochondria were frequently observed in clusters, sometimes with organelles of the same type tightly packed (Figure 2A) or with surrounding membrane complexes. Strikingly, similar organelle clusters can be observed in less mature stage I to II WT and *Myh9*^{-/-} MKs, in close proximity to the developing pre-DMS which at this stage appears as a focal membrane complex located near the nucleus¹¹ (Figure 2B). Overall, these observations suggest that (1) the defect in *Myh9*^{-/-} platelets originates in the precursor cells, before the final maturation stage and prior to granule transport along the proplatelet shafts, and (2) it could result from a defective *Myh9*^{-/-} cytoplasmic maturation.

It is worthy of note that some circulating *Myh9*^{-/-} platelets also contained abnormally clustered organelles reminiscent of the abnormal clustering in MKs. Dense granules could be seen surrounding

membranous structures resembling the OCS (Figure 2C, left). In other unusual platelet morphologies, mitochondria or α granules were found positioned in a string-like fashion along the RER, often associated with microtubules (Figure 2C, right). Such organizations are occasionally observed in immature WT MKs (supplemental Figure 1), which again favors the hypothesis of an incomplete maturation process in *Myh9*^{-/-} MKs.

Myosin IIA is not involved in granule transport to proplatelet buds

During proplatelet formation, organelles have been shown to traffic from the MK to the proplatelet buds by moving along microtubular tracks in the proplatelet shafts.⁵ To determine whether myosin deficiency affects organelle transport to the proplatelet buds, WT and *Myh9*^{-/-} MKs bearing proplatelets were differentiated in vitro from Lin⁻ cells and analyzed by confocal microscopy after labeling with antibodies against von Willebrand factor (VWF), a specific marker of α granules (Figure 3A). As previously shown,⁹ *Myh9*^{-/-} proplatelet buds were larger than WT ones. However, the distribution of VWF-positive granules was similar in WT and *Myh9*^{-/-} MKs, being linear with the bud size (Figure 3B). These results suggested that myosin does not play a major role in granule transport along proplatelet shafts to the proplatelet buds, which was surprising in view of the abnormal granule distribution in *Myh9*^{-/-} platelets. We thus wondered how an

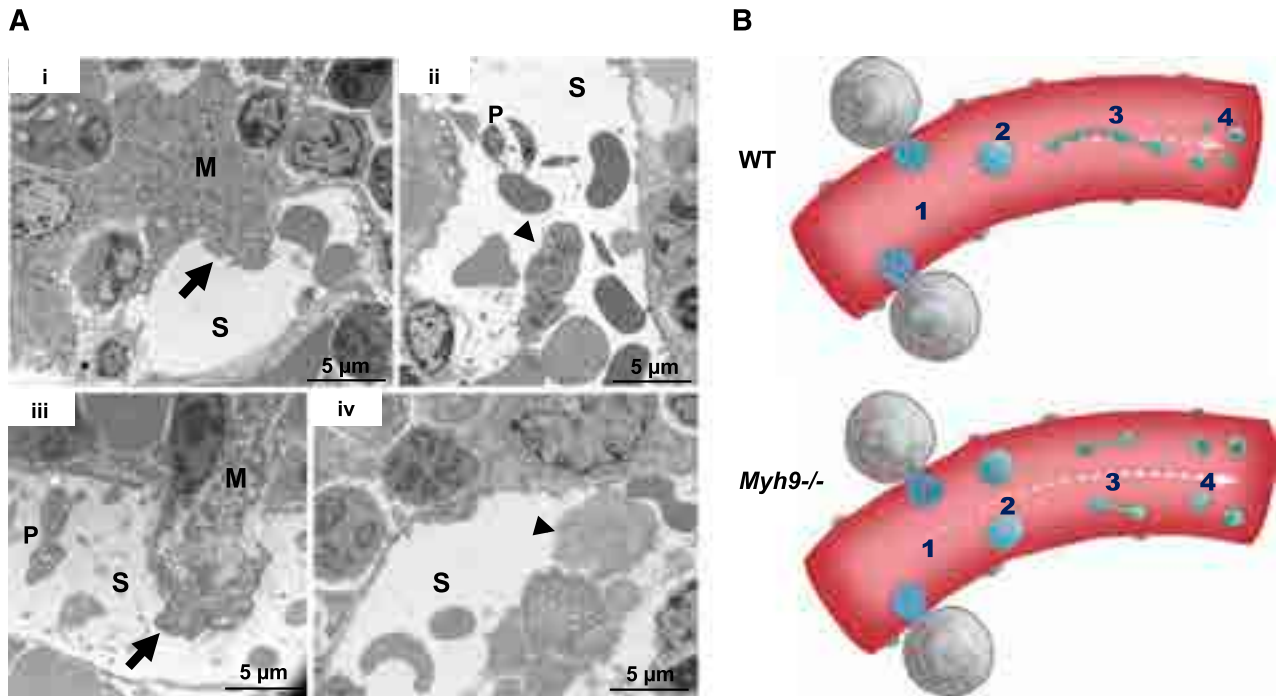


Figure 4. Abnormal distribution of organelles in *Myh9*^{-/-} MK fragments shed into the sinusoids. (A) In situ bone marrow TEM images showing MKs in the process of shedding large fragments into a sinusoid (i,iii) (arrows) or fragments already released (ii,iv) (arrowheads). (i-ii) WT bone marrow; (iii-iv) *Myh9*^{-/-} bone marrow. Note the fragment almost devoid of granules in *Myh9*^{-/-} marrow (iv, arrowhead). S, sinusoid vessel; P, platelet. (B) Scheme recapitulating the importance of organelle positioning within MKs for normal organelle distribution within platelets. An impaired granule distribution in *Myh9*^{-/-} MKs (1) leads to low-content or high-content preplatelet fragments (2) which are reorganized into low-content or high-content platelets (4), despite normal traffic along proplatelets microtubular tracks (3).

organelle distribution defect in MKs could translate into a similar distribution defect in platelets without affecting organelle transport to the proplatelets.

***Myh9*^{-/-} large MK fragments shed into the sinusoids have an unbalanced granule distribution**

To find answers to this apparent paradox, we examined the bone marrow more closely. In native WT bone marrow, we observed some MK fragments in the process of passing through the sinusoids as well as detached large fragments within the sinusoid vessels (Figure 4Ai-ii), in agreement with intravital studies.^{12,13} These fragments, larger in size than individual platelets, contained all the organelles that would ultimately be found in the future-released platelets. In *Myh9*^{-/-} bone marrow, the MK fragments were heterogeneous with respect to their organelle distribution and some of them contained very few organelles (Figure 4Aiii-iv). It would seem unlikely that such MK fragments poor in organelles would subsequently be able to remodel into platelets with normal granule content. On the basis of these observations, we propose that the defective granule distribution observed in *Myh9*^{-/-} MKs, which leads to an abnormal granule content in a subset of circulating MK fragments, is responsible for the heterogeneous granule distribution in circulating *Myh9*^{-/-} platelets, despite normal traffic along microtubules in the proplatelet shafts (Figure 4B).

Myosin IIA interacts with the surface of platelet organelles

To understand how myosin may control organelle distribution within MKs, we examined whether myosin IIA was present at the surface of platelet organelles. Human platelet organelles were isolated and washed to eliminate the cytoplasmic myosin pool, and colabeled for myosin IIA and VWF as an α granule marker. Colocalization was observed (Figure 5A), showing that myosin IIA can associate with

granules. To achieve a better resolution, immunogold labeling was performed on whole WT mouse platelets and the distribution of myosin according to its intracellular location was quantified by electron microscopy. As expected, myosin was mainly present in the cytosol but also appeared to specifically associate with the cytoplasmic face of organelle membranes (Figure 5B-C). As it has been reported that platelet granules are surrounded with short actin filaments,¹⁴ we investigated whether myosin might interact with organelles through binding to actin. Latrunculin A was used to depolymerize actin filaments in resting human platelets¹⁵ (supplemental Figure 1A). Immunoelectron microscopy analysis showed that incubation of human platelets with latrunculin A (100 μ M) for 1 hour did not decrease the myosin IIA labeling at the surface of organelles but rather increased it, possibly through release of myosin from the actin cytoskeleton or unmasking antigens (Figure 5D; supplemental Figure 1B). This suggested that myosin IIA interacts with organelle membranes independently of F-actin. To confirm that this association was specific to organelles, we isolated platelet granules and mitochondria from latrunculin A-treated platelets and performed western blotting experiments on the lysates of these organelles. As expected, latrunculin A treatment decreased the association of F-actin with organelles, but not the association of myosin which appears to be independent on F-actin (Figure 5E). Overall, myosin IIA binds to the surface of platelet organelles, raising the question of a role for this molecular motor in organelle motility.

Absence of myosin IIA affects granule movement

To examine whether organelle movements were affected by absence of myosin IIA, we performed real-time videomicroscopy on living MKs. After 5 days in culture, MKs were incubated with AF-488-fibrinogen to label α granules. In WT cells, fluorescently labeled granules moved in an apparently random manner. Within

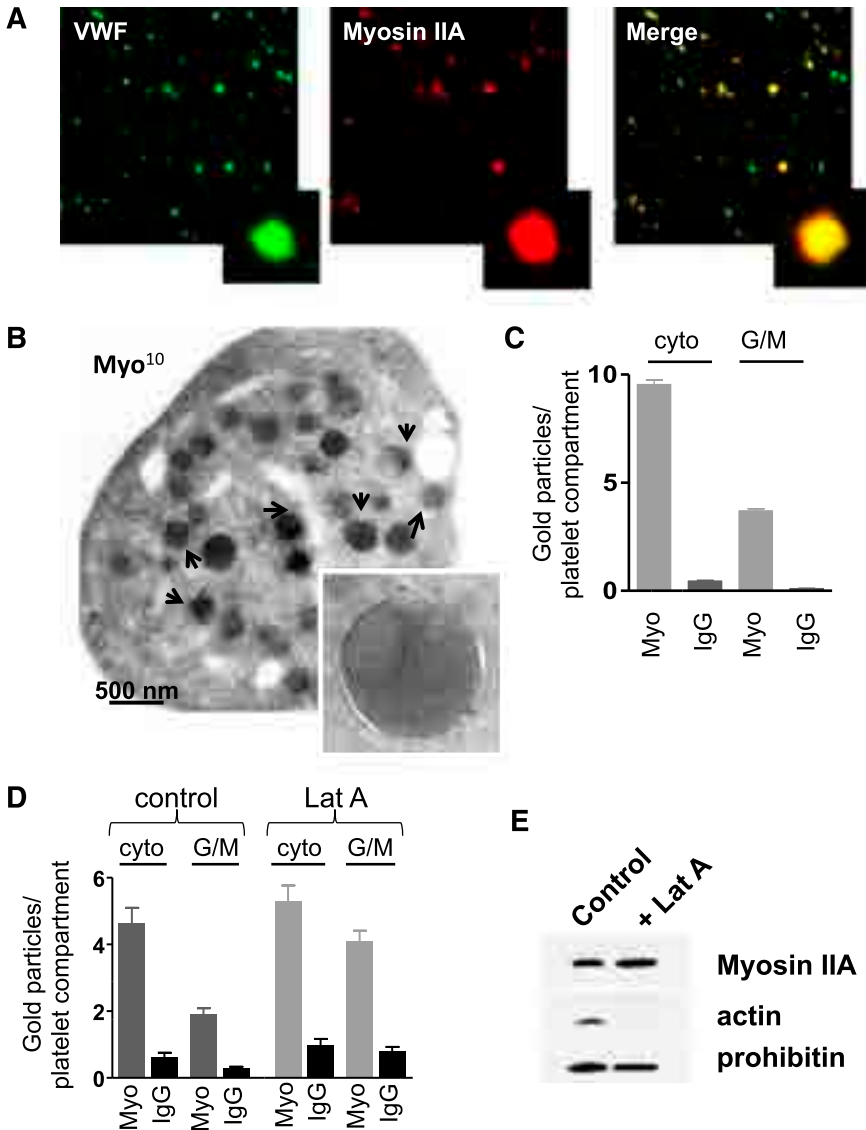


Figure 5. Presence of myosin IIA at the surface of platelet organelles. (A) Confocal observation of isolated human platelet organelles immunolabeled with anti-VWF antibody and anti-myosin IIA antibody showing the presence of myosin at the surface of VWF-positive α granules. (B) Immunogold labeling (anti-myosin IIA, 10 nm) of WT mouse platelets, showing the presence of myosin IIA at the cytoplasmic face of organelles. Inset, α granule labeled with 2 gold particles. (C) Quantification of the numbers of gold particles according to their localization in WT mouse platelets, either cytoplasmic or at the cytoplasmic face of granules or mitochondria. Results are mean \pm SEM; n = 20-22 platelets. (D) Quantification of gold particles in human platelets treated or not with latrunculin A (100 μ M). Data are mean \pm SEM; n = 20. (E) Western blots performed on granules isolated from human platelets pretreated or not with latrunculin A (100 μ M). While latrunculin A treatment removed F-actin from the surface of organelles, myosin IIA remained associated with organelles. Prohibitin, a mitochondrial protein, was used as a loading control and blots are representative of 3 separate experiments. cyto, cytoplasmic; G/M, granules or mitochondria; IgG, immunoglobulin G (isotype-matched control antibody); Lat A, latrunculin A; Myo, anti-myosin IIA antibody.

a cell, some granules moved quite fast, with saltatory motion, sometimes with back and forth movements (supplemental Video 6). Others were more stationary, with movements appearing to be confined to a smaller area. In the absence of myosin IIA, some cells clearly exhibited clusters of fluorescently labeled granules (Figure 6A). Although a few granules still had a fast and long distance movement, especially at the periphery of the cell, many of them moved over shorter distances than WT ones (supplemental Video 7). To quantify granule movements, fluorescent granules were tracked in 4 dimensions. In WT MKs, granules moved at a mean speed of $4.63 \pm 0.04 \mu\text{m} \times \text{min}^{-1}$ (mean \pm SEM) that was similar to *Myh9*^{-/-} granules ($4.72 \pm 0.05 \mu\text{m} \times \text{min}^{-1}$) (Figure 6B, left). In contrast, the displacement, meaning the distance between the first and last time points of a track, was decreased by 15% in *Myh9*^{-/-} MKs ($1.70 \pm 0.02 \mu\text{m}$ vs $1.43 \pm 0.02 \mu\text{m}$ for the WT and *Myh9*^{-/-} MKs, respectively, $P < .0001$) (Figure 6B, right). These data indicate that whereas myosin deficiency does not affect organelle movement speed, it may limit the distance of organelle traveling.

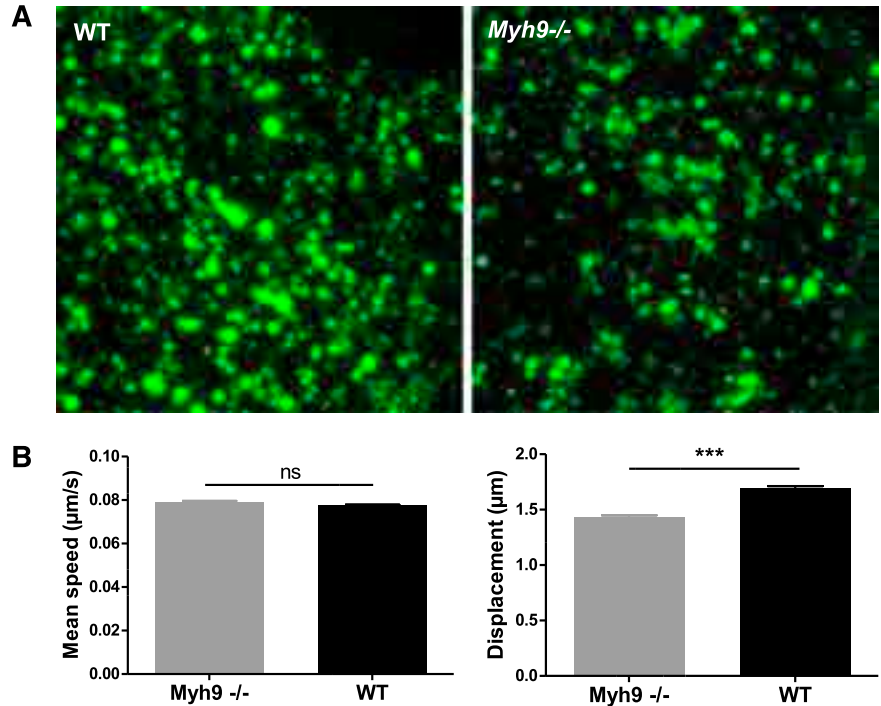
Absence of myosin IIA impairs F-actin organization

Within cells, organelle transport is strongly dependent on the dynamics of microtubule and actin cytoskeletal tracks.¹⁶ Actin filaments serve as

“rails” for the myosin-based traveling of organelles,¹⁶⁻¹⁸ and as a support for their location and distribution.¹⁹⁻²¹ We therefore investigated whether the F-actin cytoskeleton was affected by the absence of myosin. Progenitor cells from bone marrow were cultured for 4 days and allowed to adhere to a fibronectin-coated surface. Actin filaments were then labeled with AF-488 phalloidin. Compared with the WT, *Myh9*^{-/-} MKs exhibited strongly defective actin rearrangement following adhesion to fibronectin. The actin filaments on the basal side of the cells appeared to be shorter and stress fibers were absent. Unlike in WT MKs, where F-actin was strongly present in the cell cortex and distributed relatively evenly throughout the cytoplasm, *Myh9*^{-/-} cells had little cortical F-actin. Moreover, clusters of F-actin were observed in the cytoplasm of these MKs (Figure 7A) suggesting that myosin IIA is involved in structuring the actin cytoskeleton network.

To determine whether F-actin organization was also affected in *Myh9*^{-/-} MKs in situ and could explain the abnormal granule clustering, we further analyzed the F-actin cytoskeleton by confocal microscopy using AF-488 phalloidin labeling of bone marrow fragments (Figure 7B). F-actin was again abundant in the cell cortex of WT MKs, forming a belt in the peripheral zone and delineating the DMS in the cytoplasm, as previously reported.²² In smaller immature

Figure 6. Impaired organelle motility in *Myh9*^{-/-} MKs. (A) Cultured *Myh9*^{-/-} and WT MKs were imaged using videomicroscopy after AF-488–fibrinogen incorporation. Image showing the maximal confocal projection of a MK cytoplasm portion (5.5 μm thickness). (B) Labeled organelles were tracked and their mean speed and displacement were measured. Only tracks that were longer than 25 seconds were evaluated to reliably determine the displacement. Data are mean ± SEM of 5260 (WT) and 3479 (*Myh9*^{-/-}) granules from at least 3 independent experiments. ****P* < .0001. ns, not significant.



MKs, F-actin appeared to be more diffuse in the cytoplasm and did not form clusters. Conversely, no such high peripheral F-actin content was observed in *Myh9*^{-/-} MKs. In addition, clusters of F-actin similar to those observed in vitro were present in the cytoplasm of the *Myh9*^{-/-} cells (Figure 7B), indicating a strongly defective F-actin organization. These F-actin aggregates did not colocalize with VWF-positive granules as observed by confocal microscopy of *Myh9*^{-/-} MKs in situ (not shown), suggesting that granule clusters do not result from localized tethering onto these F-actin clusters.

Actin filaments are dynamic structures constantly submitted to polymerization and depolymerization. To find out whether myosin affects actin dynamics, we measured actin polymerization in thrombin-activated platelets by flow cytometry. Actin polymerization was significantly reduced in myosin IIA-deficient platelets (43% less actin polymerization) compared with WT cells (supplemental Figure 2).

Overall, these data demonstrate the involvement of myosin IIA in actin cytoskeleton organization and dynamics and suggest that the defective F-actin network in *Myh9*^{-/-} MKs affects the intracellular organelle and distribution.

Discussion

In the present study, we show that myosin IIA deficiency in the mouse or a myosin IIA mutation in a patient alters the organelle distribution pattern in platelets. The main findings are that the absence of myosin critically modifies F-actin organization within MKs and impairs organelle motility in the cytoplasm of these cells. As a result, abnormal organelle clustering in MKs directly translates into a heterogeneous organelle distribution in platelets.

On the grounds of early in situ electron microscopy visualization and more recent in vivo real-time imaging in living mice, it is now well documented that MKs shed cytoplasmic fragments exceeding the platelet size into the bone marrow sinusoids.^{12,23-25} This is compatible with the model of proplatelets, assuming that these represent large MK

fragments which are thought to remodel into proplatelets within the bloodstream before releasing platelets of normal size.^{3,26} On the basis of this model it may be expected that the organelle delivery to platelets will depend on (1) the organelle distribution in the released MK fragments, which stems from the distribution pattern in MKs, and (2) the individual organelle traffic along microtubule tracks, during shear-induced proplatelet remodeling in the blood circulation.

We propose here that the heterogeneity of the granule distribution in *Myh9*^{-/-} platelets originates from the abnormal organelle distribution already present in MKs. Indeed, organelle transport along the proplatelet shaft does not appear to be affected in *Myh9*^{-/-} mice, as shown by the normal α granule content of the proplatelet buds formed by cultured MKs (Figure 3). These results are consistent with previous work⁵ showing that granule translocation along the microtubules lining the proplatelet shafts is independent of actin and confirm that unlike the microtubular cytoskeleton, the actomyosin cytoskeleton is not crucial for the traffic within proplatelets. Hence, the presence of empty or crowded platelets can be explained by the heterogeneity in the organelle content already present in the large preplatelet fragments released in the sinusoid vessels. In agreement with this hypothesis, we observed in *Myh9*^{-/-} bone marrow sinusoids some MK fragments with either very few or numerous organelles, which would inevitably result in low-content or high-content platelets, respectively (Figure 4A). In turn, this heterogeneity in the preplatelet content directly reflects the abnormal organelle distribution present in the cytoplasm of *Myh9*^{-/-} MKs. This is summarized in Figure 4B.

The way granules are distributed in the cytoplasm during MK maturation is still unresolved. Interestingly, we observed that in immature WT MKs, maturing granules and mitochondria form clusters close to the nucleus, in proximity or juxtaposed to membrane structures such as RER or developing DMS (Figure 2B; supplemental Figure 1). Upon maturation, organelles will be homogeneously redistributed to the granular zone. These observations in immature WT MKs are reminiscent of the abnormal granule positioning observed in “mature” *Myh9*^{-/-} MK/platelets (Figure 2B), suggesting

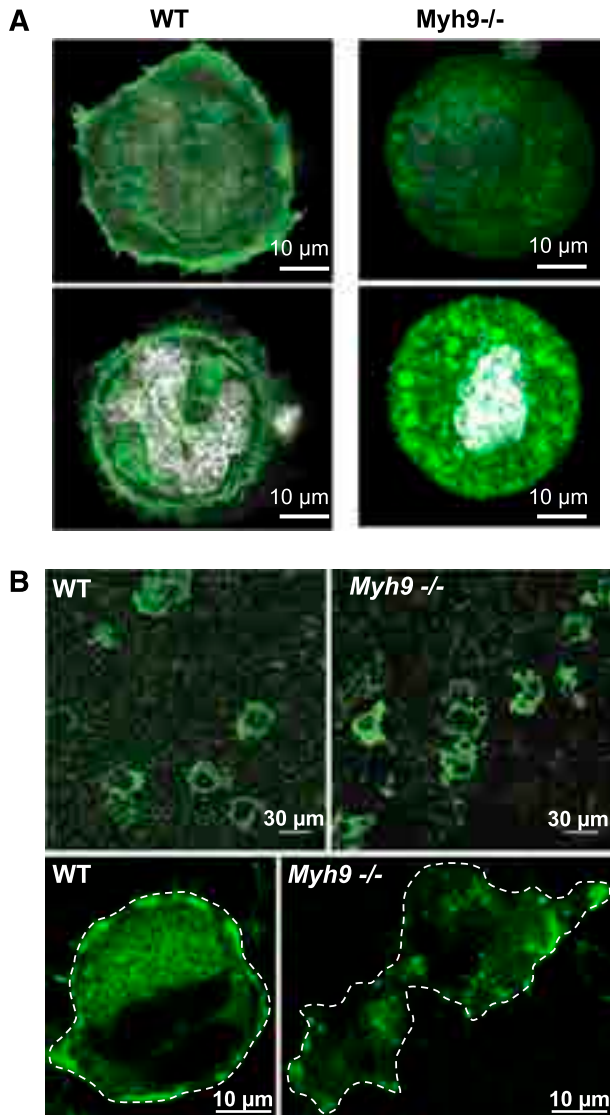


Figure 7. Defective actin organization in *Myh9*^{-/-} MKs. (A) In vitro-differentiated WT and *Myh9*^{-/-} MKs were allowed to adhere to fibronectin-coated coverslips for 1 hour and F-actin was visualized by AF-488 phalloidin labeling. Confocal images were taken at the base of a cell in contact with the coverslip (top panels) and in the plane of the white-labeled nucleus of the same cell (bottom panels). Images are representative of 3 independent experiments. (B) F-actin labeling of bone marrow using AF-488 phalloidin. (Top panels) Wide fields from WT and *Myh9*^{-/-} marrow samples. (Bottom panels) Detail showing the F-actin distribution within a WT (left) and a *Myh9*^{-/-} (right) MK. Dotted lines delineate the MKs. Images are representative of at least 3 different bone marrow samples for each genotype.

that *Myh9*^{-/-} MKs granule redistribution is impaired during the maturation process. Because granules and DMS are often found in close proximity in immature WT MKs, and DMS is impaired in *Myh9*^{-/-} MKs,⁹ it could be that normal granule distribution within the platelet territories of mature MKs directly depends on DMS organization, or that both the DMS development and the granule distribution depend on actomyosin activity.

In this work, we show that myosin IIA is associated with the cytoplasmic face of platelet granules and mitochondria. The way in which myosin IIA binds to platelet organelles is still unknown, and it could bind as a single molecule like in lytic granules of natural killer cells²⁷ or as larger microfilaments. F-actin has been suggested to be present at the periphery of individual platelet organelles,¹⁴ but our results demonstrate that the association of myosin with organelle

membranes is mainly independent of F-actin. Myosin IIA could bind directly to the lipid bilayer,^{28,29} or it may associate indirectly through binding to organelle-associated proteins.³⁰ Its constitutive association with the platelet granule surface might play a role in anchorage of the granules to F-actin network to allow positioning within the mature MK. F-actin networks indeed provide the scaffold for the anchorage and positioning of secretory granules,^{20,31,32} and F-actin-disrupting agents in melanocytes have for instance been shown to result in the formation of melanosome aggregates.³³⁻³⁵

We observed here that myosin deficiency modestly but significantly impairs organelle motility within MKs, in terms of mean displacement (Figure 6). Of note, our observations of granule movements within live MKs took into account all types of displacement involving both microtubules and F-actin, which may have underestimated the real impact of myosin deficiency on F-actin-mediated transport. Because the mean speed is unchanged, myosin IIA bound to the organelle is probably not a critical motor per se for the motion of granules. This is in accordance with the view that myosin IIA, in contrast to nonconventional myosins which can exhibit processive activity, is unlikely to directly transport cargo over long distances.^{31,36} By contrast, the decreased mean displacement of *Myh9*^{-/-} granules, although modest, suggests modifications of cytoskeletal tracks. It was indeed previously shown that F-actin growth increases the distances traveled by organelles by increasing the effective transport track's length.^{17,18,37} In accordance with this hypothesis, we observed that the spatial organization of F-actin is abnormal in *Myh9*^{-/-} MKs and actin polymerization is decreased in these platelets, indicating a role of myosin IIA in F-actin dynamics in MKs. The involvement of myosin II in actin polymerization/structuration has already been documented for F-actin cross-linking^{38,39} or for catalyzing actin assembly at focal adhesions³⁹ or in dynamic structures where rapid actin filament turnover is required.⁴⁰⁻⁴²

Thus, myosin IIA is likely to contribute to organelle distribution by organizing the actin meshwork necessary for organelle tethering and transport. This is in agreement with previous data using mouse lines deficient in ADF/cofilin in which actin turnover is impaired. In these mice, the platelets present an aberrant granule distribution similar to what is observed in *Myh9*^{-/-} platelets.⁴³ Similarly, mice deficient in actin interacting protein-1 (AIP1), an actin-binding protein accelerating cofilin activity, display macrothrombocytopenia and an irregular distribution of granules in both platelets and MKs.⁴⁴

In summary, our data shed new light on the mechanisms of granule distribution in platelets. We show here that myosin IIA is required for normal granule positioning during MK maturation, by mechanisms involving a role of myosin IIA in F-actin cytoskeleton structuration. Our results indicate that in addition to a proper traffic of organelles along microtubular tracks present in the proplatelets, an even distribution of organelles within platelets critically depends on prior homogeneous organelle distribution in the cytoplasm of mature MKs, which requires myosin IIA.

Acknowledgments

We thank Harry Heijnen for critical reading of the manuscript, Monique Freund for supervising the animal facilities, and Patricia Laeuffer for excellent technical assistance. We also thank Juliette N. Mulvihill for reviewing the English of the manuscript.

This work was supported by the Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique and the European

Union through the European Regional Development Fund. C.L. is the recipient of a “contrat d’interface” between the EFS and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

J.W. performed granule isolation and western blotting; C.L. and C.G. designed the study, supervised the experiments, interpreted the data, and wrote the manuscript; and F.L. interpreted the data and wrote the manuscript.

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

Correspondence: Catherine Léon, UMR_S949 Inserm-Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), 10, rue Spielmann, B.P. No. 36, 67065 Strasbourg Cedex, France; e-mail: catherine.leon@efs-alsace.fr.

Authorship

Contribution: F. Pertuy performed experiments and prepared the figures; A.E., F. Proamer, and J.-Y.R. performed electron microscopy;

References

- Zucker-Franklin D. Megakaryocytes and platelets. In: Zucker-Franklin D, Grossi CE, eds. *Atlas of Blood Cells*, Vol. 2. Milan, Italy: Edi. Ermes, 2003: 788-791.
- Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-189.
- Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol*. 2010;47(3):220-226.
- 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.
- Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 2005;106(13): 4066-4075.
- 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.
- Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet*. 2001;69(5): 1033-1045.
- 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.
- 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.
- Strassel C, Eckly A, Léon C, et al. Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp Cell Res*. 2012;318(1):25-32.
- Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes [published online ahead of print October 23, 2013]. *Blood*.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317(5845):1767-1770.
- 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.
- Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood*. 2005;105(10):3879-3887.
- Woronowicz K, Dilks JR, Rozenvayn N, et al. The platelet actin cytoskeleton associates with SNAREs and participates in alpha-granule secretion. *Biochemistry*. 2010;49(21):4533-4542.
- Ross JL, Ali MY, Warsaw DM. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(1): 41-47.
- Semenova I, Burakov A, Berardone N, et al. Actin dynamics is essential for myosin-based transport of membrane organelles. *Curr Biol*. 2008;18(20): 1581-1586.
- Zajac AL, Goldman YE, Holzbaur EL, Ostap EM. Local cytoskeletal and organelle interactions impact molecular-motor-driven early endosomal trafficking. *Curr Biol*. 2013;23(13):1173-1180.
- Boldogh IR, Pon LA. Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol*. 2007;17(10):502-510.
- Hume AN, Seabra MC. Melanosomes on the move: a model to understand organelle dynamics. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(5):1191-1196.
- Minin AA, Kulik AV, Gyoeva FK, Li Y, Goshima G, Gelfand VI. Regulation of mitochondria distribution by RhoA and formins. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 4):659-670.
- Schulze H, Korpál M, Hurov J, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*. 2006;107(10):3868-3875.
- Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl*. 1998;61: 3-23.
- Lichtman MA, Chamberlain JK, Simon W, Santillo PA. Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release. *Am J Hematol*. 1978;4(4):303-312.
- Penington DG, Streatfield K, Roxburgh AE. Megakaryocytes and the heterogeneity of circulating platelets. *Br J Haematol*. 1976;34(4): 639-653.
- Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol*. 2010;191(4): 861-874.
- Sanborn KB, Mace EM, Rak GD, et al. Phosphorylation of the myosin IIA tailpiece regulates single myosin IIA molecule association with lytic granules to promote NK-cell cytotoxicity. *Blood*. 2011;118(22):5862-5871.
- Li D, Miller M, Chantler PD. Association of a cellular myosin II with anionic phospholipids and the neuronal plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(3):853-857.
- Murakami N, Elzinga M, Singh SS, Chauhan VP. Direct binding of myosin II to phospholipid vesicles via tail regions and phosphorylation of the heavy chains by protein kinase C. *J Biol Chem*. 1994;269(23):16082-16090.
- Wu X, Sakamoto T, Zhang F, Sellers JR, Hammer JA III. In vitro reconstitution of a transport complex containing Rab27a, melanophilin and myosin Va. *FEBS Lett*. 2006;580(25):5863-5868.
- Loubéry S, Coudrier E. Myosins in the secretory pathway: tethers or transporters? *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(18):2790-2800.
- Brown AC, Oddos S, Dobbie IM, et al. Remodelling of cortical actin where lytic granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy. *PLoS Biol*. 2011;9(9):e1001152.
- Barral DC, Seabra MC. The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res*. 2004;17(2):111-118.
- Koyama YI, Takeuchi T. Differential effect of cytochalasin B on the aggregation of melanosomes in cultured mouse melanoma cells. *Anat Rec*. 1980;196(4):449-459.
- Rogers SL, Gelfand VI. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr Biol*. 1998;8(3):161-164.
- O'Connell CB, Tyska MJ, Mooseker MS. Myosin at work: motor adaptations for a variety of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(5): 615-630.
- Schuh M. An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat Cell Biol*. 2011; 13(12):1431-1436.
- Shutova M, Yang C, Vasiliev JM, Svitkina T. Functions of nonmuscle myosin II in assembly of the cellular contractile system. *PLoS ONE*. 2012; 7(7):e40814.
- Rossier OM, Gauthier N, Biais N, et al. Force generated by actomyosin contraction builds bridges between adhesive contacts. *EMBO J*. 2010;29(6):1055-1068.
- Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Rossier O, et al. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*. 2007; 128(3):561-575.
- Medeiros NA, Burnette DT, Forscher P. Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat Cell Biol*. 2006;8(3):215-226.
- Rex CS, Gavin CF, Rubio MD, et al. Myosin IIb regulates actin dynamics during synaptic plasticity and memory formation. *Neuron*. 2010;67(4): 603-617.
- Bender M, Eckly A, Hartwig JH, et al. ADF/cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. *Blood*. 2010; 116(10):1767-1775.
- Kile BT, Panopoulos AD, Storzaker RA, et al. Mutations in the cofilin partner Aip1/Wdr1 cause autoinflammatory disease and macrothrombocytopenia. *Blood*. 2007;110(7): 2371-2380.

Supplemental material

Supplemental Materials and Methods

Materials

Gold-conjugated protein A was from Cell Microscopy Center (Utrecht, Netherlands). Taxol (paclitaxel) and AF-488 phalloidin were from Cytoskeleton (Denver, CO). Anti-von Willebrand Factor antibody was from Dako (Les Ulis, France). AF488-fibrinogen was from Invitrogen (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Percoll, thrombin, latrunculin A, TRITC-conjugated phalloidin and anti-non muscle myosin IIA antibody were from Sigma-Aldrich (Rueil-Malmaison, France). Human recombinant thrombopoietin and the lineage depletion kit were from StemCell (StemSep mouse hematopoietic progenitor cell enrichment kit, Grenoble, France). Recombinant hirudin was kindly provided by Transgène (Strasbourg, France) and RAM1 anti-GPIIb β antibody was produced in our laboratory.

Patient

Patient S.D., aged 55 at the time of the study, was first examined in 1988 when the diagnosis of May-Hegglin anomaly was proposed on the grounds of thrombocytopenia (47×10^9 platelets/L), large platelets and the inclusion of Döhle-like bodies in neutrophils. While platelet aggregation was normal, a contractile platelet shape change in response to platelet agonists was absent (data not shown). The diagnosis of MYH9-RD has since been confirmed at the genetic level, the disease being associated with an already reported *MYH9* (p.Asp1424Asn) mutation¹. The patient provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Organelle isolation. Human platelets ($1-2 \times 10^9$ in 13mL) were disrupted by nitrogen cavitation (4 cycles, 95-99% efficiency as evaluated by microscopy). After centrifugation at 1500 g, the crude suspension was centrifuged twice at 12,000g (4°C, 15 min), the pellet was loaded onto a Percoll step gradient and membranes and organelles were separated by centrifugation at 79,000g (4°C, 15 min). The fractions corresponding to platelet granules and mitochondria (positive for P-selectin, CD63 and prohibitin) were pooled and washed and the total protein content was determined using BCA.

Immunolabeling was performed following adhesion of organelles onto poly-L-lysine coated slides for 4h, 4% PFA fixation, incubation with anti-myosin IIA antibody followed by AF-555-labeled secondary antibody, and finally FITC-labeled anti-vWF antibody.

Electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), pellets of washed platelets or flushed bone marrow cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon. Ultrathin sections (100 nm) were processed and observed under a CM120 transmission electron microscope (FEI, The Netherlands). The number of organelles per platelet were counted on longitudinal sections, by selecting only those cells where the cross-sectioned microtubules were visible at each platelet pole. Organelles refer to α and δ granules, lysosomes and mitochondria.

For immunolabeling, platelets or organelles were fixed in 2% PFA and 0.2% glutaraldehyde, infiltrated with 2.3M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Ultrathin sections (70nm) were incubated with anti-myosin or irrelevant antibodies (10 μ g/mL) followed by 10nm gold-conjugated protein A and then stained with 1.8% uranyl acetate/0.2% methylcellulose.

Focused ion beam (FIB)/scanning electron microscopy (SEM) was used to visualize the entire platelet at the resolution of electron microscopy. Briefly, platelets were processed as for TEM except that a contrast-enhancing step, consisting of incubating the cells in 1.5% potassium

ferrocyanide/1% osmium tetroxide in 0.1M sodium cacodylate buffer, was added directly after the fixation step. The blocks were mounted on SEM stubs, coated with platinum/palladium and examined under a Helios NanoLab dual beam microscope (FEI). Samples were milled with the FIB (30 kV, 700 pA) at a thickness of 20nm per section and images were acquired in backscattering mode (3kV, 1nA). 3D reconstructions were obtained with Amira software (v.5.4, Visualization Sciences Group).

***In vitro* MK differentiation and proplatelet formation**

Mouse bone marrow was flushed from femurs and tibias, the cells were mechanically dissociated and lineage depletion was performed. The Lin⁻ population was cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 50U/mL penicillin, 50µg/mL streptomycin, 100U/mL hirudin and 30ng/mL TPO. Proplatelets were visualized after 5 days of culture, following fixation of the cells, cytospinning onto glass microscopy slides coated with poly-L-lysine and immunolabeling with an anti-GPIIb/IIIa antibody (RAM1). Anti-VWF labeling was used to visualize α granules within proplatelets. Z stacks were acquired and all VWF-positive α granules present in a proplatelet bud were counted using the maximal Z stack projection.

Videomicroscopy and organelles tracking

Megakaryocytes cultured for five days were incubated for 2h with AF488-fibrinogen (150 µg/mL) as described², washed and allowed to adhere on poly-L-lysine for 2h. Megakaryocytes presenting fluorescent organelles were observed by confocal microscopy and granule movement recorded for 5 min. Imaging was performed on fields of 24.6x24.6µm with Z-stacks of twelve steps covering 5.5µm. One stack was acquired every 2.5seconds over 5 minutes, resulting in 120 stacks per video. Of note, the fluorescence of organelles from *Myh9*-

/- MKs were generally weaker, requiring more excitation to be sufficiently labeled for software tracking. Organelle tracking was performed using Imaris software (v7.5). Fluorescent spots of approximately 0.5 μ m in diameter were detected as organelles from each Z-stacks, and then connected between consecutive time-frames in order to reconstitute organelle motions. Only movements lasting for at least 25s (10 time frames) were analyzed. Mean speed and displacement (the distance between the first and the last positions of an organelle track) were extracted for each tracks.

Platelet F-actin measurement. Platelet F-actin polymerization was analyzed by flow cytometry in resting or activated (1U/mL thrombin for 10min) washed mouse platelets fixed with 3% paraformaldehyde in Tyrode's-albumin buffer containing 100U/mL hirudin, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and stained with TRITC-phalloidin (2 μ g/mL). Results are expressed as the fluorescence intensity ratio for activated platelets over resting platelets.

F-actin visualization

For visualization of F-actin in bone marrow MKs, mouse femurs were directly flushed into 4% formaldehyde containing 4.10⁻⁵M taxol and labeled. The marrows were mildly disrupted by one aspiration into a 21 gauge needle so as to keep some small fragments intact, labeled for F-actin with AF-488 phalloidin (100nM) and mounted in Mowiol for confocal microscopy (TCS SP5 microscope, Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

F-actin visualization in MKs differentiated *in vitro* was performed following 1h-adhesion of Lin- cells cultured for 4 days to fibronectin-coated coverslips, fixation in 4% PFA and labeling with AF-488 phalloidin (100nM).

References

1. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet.* 2001;69(5):1033-1045.
2. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood.* 2005;106(13):4066-4075.
3. 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.

Supplemental Figure Legends

Figure S1. Presence of organelles associated with RER in WT immature MK. TEM observation of *in situ* bone marrow showing stage I immature WT MK containing organelles (granules and mitochondria) closely associated with RER (arrows).

Figure S2. Presence of myosin IIA at the surface of platelet organelles independently of F-actin. (A) Washed human platelets were left untreated or treated with latrunculin A (100 μ M) for 1 h. Latrunculin A treatment decreased the amount of F-actin present in resting platelets, as shown by AF-488 phalloidin labeling and flow cytometric analysis. (B) Immunogold labeling of myosin IIA in latrunculin-treated human platelets, showing the persistence of myosin IIA at the surface of organelles (arrows).

Figure S3. Decreased F-actin polymerization in *Myh9*^{-/-} platelets. Washed platelets from WT and *Myh9*^{-/-} mice were left untreated or activated in suspension with thrombin (1 U/mL). F-actin was quantified by flow cytometric analysis of AF-488 phalloidin labeled platelets. The level of F-actin in resting platelets was 1.4 times higher in *Myh9*^{-/-} mice, probably due to the increased cell size as already described for other types of giant platelet³. We therefore calculated the ratio of F-actin in thrombin-stimulated platelets vs. resting platelets, which reflects the level of F-actin assembly. Results are expressed as the mean ratio of the activated and resting fluorescence signals (\pm SEM) and are from 4 independent experiments. * $p < 0.05$ using Mann-Whitney test.

Videos

Video1. FIB/SEM acquisition of WT washed platelets suspension. WT resin embedded washed platelets were observed using FIB/SEM. Video of 216 images representing 12.8x11.61 μm and a depth of 8.64 μm .

Video2. FIB/SEM acquisition of *Myh9*^{-/-} washed platelets suspension. *Myh9*^{-/-} resin embedded washed platelets were observed using FIB/SEM. *Myh9*^{-/-} “low content” and “high content” platelets are indicated by arrowheads and an arrows, respectively. Video of 216 images representing 15x13.61 μm and a depth of 8.64 μm .

Video 3. 3D reconstruction of WT platelet. Plasma membrane is orange, dense granules are black and alpha granules, lysosomes and mitochondria are green.

Video 4. 3D reconstruction of “high content” *Myh9*^{-/-} platelet. Plasma membrane is orange, dense granules are black and alpha granules, lysosomes and mitochondria are green.

Video 5. 3D reconstruction of “low content” *Myh9*^{-/-} platelet. Plasma membrane is orange, dense granules are black and alpha granules, lysosomes and mitochondria are green.

Video 6. Videomicroscopy of WT mouse MK after AF488-fibrinogen incorporation. Maximal projection of repeated Z-stacks from a WT MK. Z-stacks were acquired every 2.5 seconds for five minutes Green dots are organelles.

Video 7. Videomicroscopy of *Myh9*^{-/-} mouse MK after AF488-fibrinogen incorporation.

Maximal projection of repeated Z-stacks from a *Myh9*^{-/-} MK. Z-stacks were acquired every 2.5 seconds for five minutes. Green dots are organelles.

Fig. S1. Presence of organelles associated with RER in WT immature MK

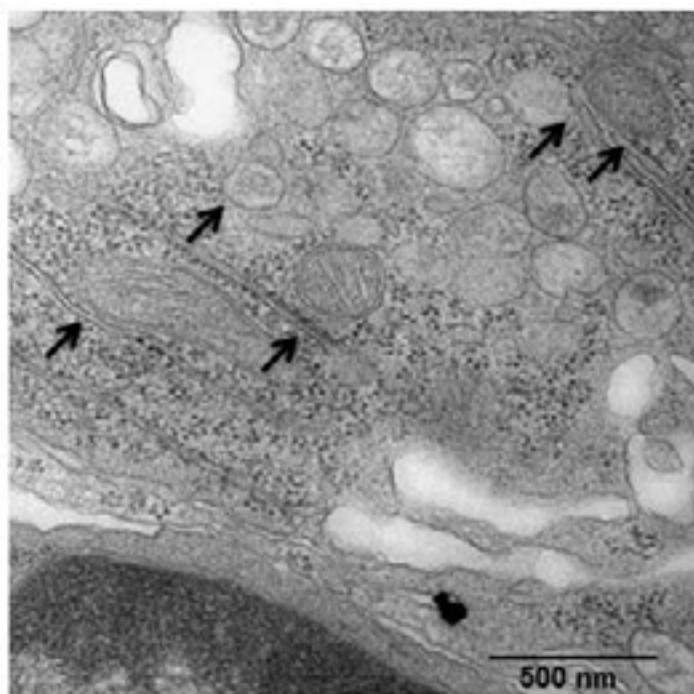
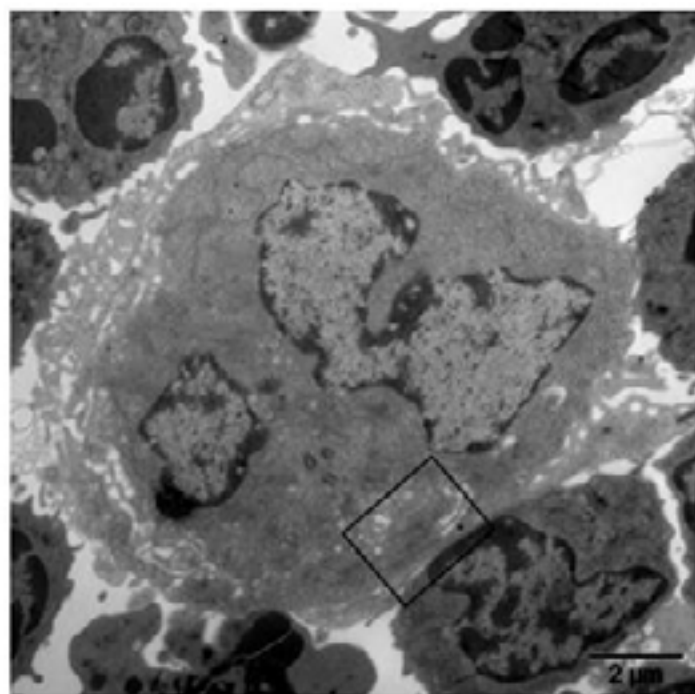


Fig. S2. Presence of myosin IIA at the surface of platelet organelles independently of F-actin

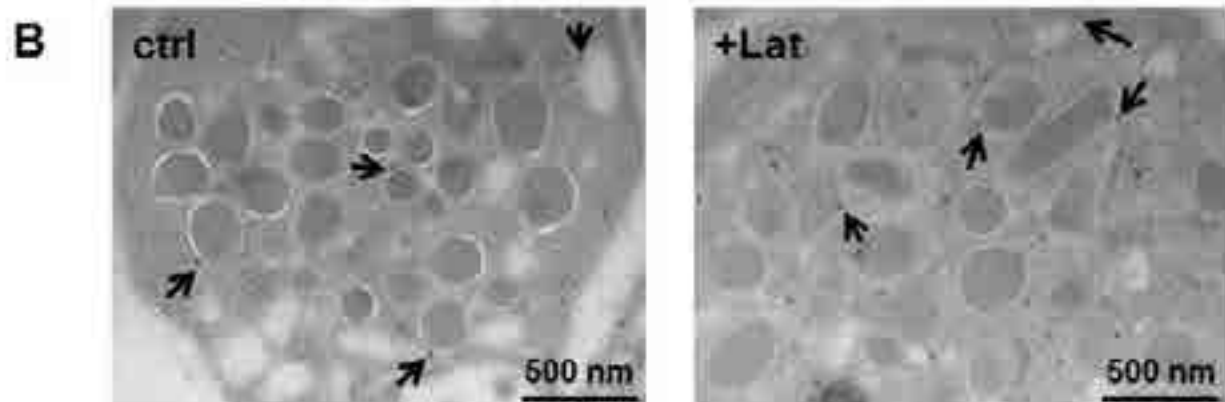
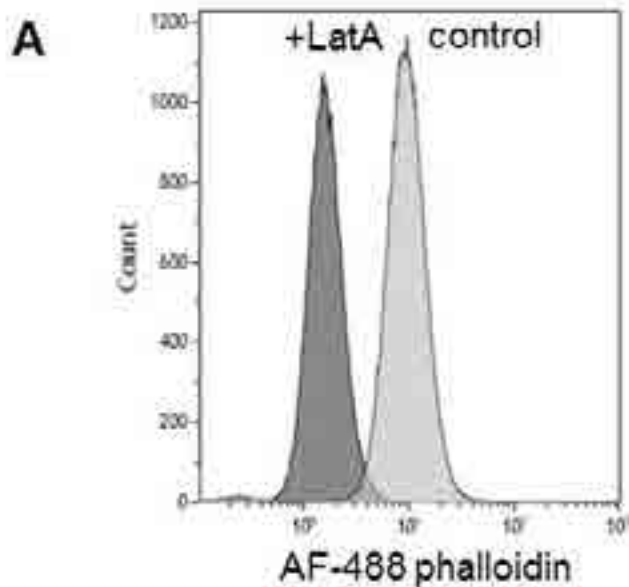
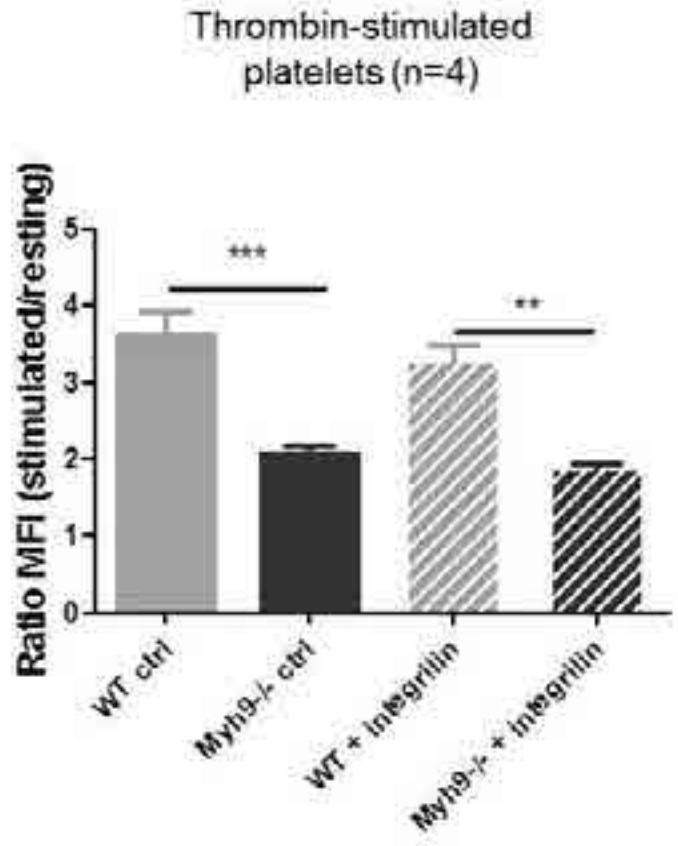


Fig. S3. Decreased F-actin polymerization in *Myh9*^{-/-} platelets



Discussion

Nous avons montré que l'absence de myosine IIA fonctionnelle dans les mégacaryocytes affecte le contenu plaquettaire en termes d'organelles. Nous avons également montré que la distribution cytoplasmique des organelles est anormale dans le mégacaryocyte *Myh9*^{-/-}, avec la présence d'amas qui semblent être due à un défaut de redistribution au cours de la maturation. Notre étude suggère que la distribution hétérogène des organelles dans les plaquettes proviendrait du mégacaryocyte *via* la libération dans le flux sanguin de larges fragments cellulaires, ayant eux-mêmes un contenu hétérogène. En revanche, le trafic des organelles le long des rails de microtubules formant les proplaquettes ne semble pas affecté par l'absence de myosine IIA, comme en témoigne le contenu normal des boutons plaquettaires obtenus *in vitro*. Le défaut observé dans les mégacaryocytes serait lié à la perturbation du cytosquelette d'actine, dont l'organisation et la dynamique sont anormales en absence de myosine IIA. Nous avons montré que la myosine IIA est en effet associée à une partie des organelles et pourrait constituer un lien entre l'actine et le trafic des organelles. De plus, l'absence de myosine affecte négativement le déplacement des organelles dans les mégacaryocytes *Myh9*^{-/-}.

La formation des organelles prend place dans la zone périnucléaire du mégacaryocyte, proche de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Ce processus débute dans les mégacaryocytes de stade I à II et entraîne la formation d'amas d'organelles. Ces organelles sont normalement redistribuées à travers le cytoplasme au cours de la maturation du mégacaryocyte, mais les mécanismes impliqués dans cette distribution sont inconnus. Le trafic des organelles dans le mégacaryocyte pourrait aussi bien impliquer l'actomyosine que les microtubules. L'absence de myosine dans les mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} perturbe ce processus, et nous avons montré que l'absence de myosine perturbe également la dynamique de polymérisation de l'actine, suggérant une implication claire de l'actomyosine. En revanche, nous ne pouvons pas exclure l'implication des microtubules dans cette étape. Les plaquettes de souris *Myh9*^{-/-} présentent en effet une réorganisation anormale des microtubules lorsqu'elles adhèrent (observations personnelles, Catherine Léon), et que leur bande marginale ne se contracte pas lorsqu'elles sont stimulées en suspension (observations personnelles, Catherine Léon). Les deux composantes du cytosquelette pourraient ainsi être impliquées dans ce processus de redistribution des organelles.

Défauts des mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} : répartition des organelles.

Nous avons également observé que l'internalisation du fibrinogène semblait diminuée dans les mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} (observation personnelles, Fabien Pertuy). Ceci pourrait être lié au défaut de signalisation outside-in précédemment relevé dans les plaquettes de ces souris (Léon et al., 2007), et suggère que le contenu granulaire pourrait être anormal en cas de défaut de myosine IIA. Ces observations posent la question du contenu granulaire chez les patients atteints de maladies liées à *MYH9*.

En conclusion, ce travail nous a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme concourant à la maturation des mégacaryocytes. Ces données suggèrent que la myosine IIA serait impliquée dans certains trafics intracellulaires au niveau du mégacaryocyte, probablement en partie *via* la régulation de la dynamique de l'actine.

Défauts des mégacaryocytes Myh9^{-/-} : répartition des organelles.

Partie II - Mégacaryocytes et environnement médullaire : rôle des intégrines.

Etude du rôle des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

Peu de données sont disponibles *in vivo* sur le rôle des intégrines dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse. Parmi ces données, les travaux réalisés sur des souris dont la lignée plaquettaire est déficiente pour les intégrines de type $\beta 1$ (*Itgb1*^{-/-}) ou de type $\beta 3$ (*Itgb3*^{-/-}) ne relèvent pas de défauts au niveau de ces mécanismes (voir « Les intégrines mégacaryocytaires » page 33). Cependant, en considérant le fait que les intégrines reconnaissent des ligands communs (voir Table 3), il est tout à fait possible qu'une redondance fonctionnelle entre $\beta 1$ et $\beta 3$ ne permette pas de dévoiler un phénotype quand ces intégrines sont inactivées individuellement. Dans cette logique, nous avons décidé d'étudier la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse chez une souris déficiente à la fois pour ces deux familles d'intégrines (*Itgb1*^{-/-}/*Itgb3*^{-/-}). Ces souris ont été comparées à la lignée témoin *Pf4-cre*, ainsi qu'aux souris *Itgb1*^{-/-} et *Itgb3*^{-/-}. Nous avons également utilisé les souris déficientes pour l'intégrine αIIb (*Itga2b*^{-/-}) dans certaines expériences.

Matériel et méthodes

Matériel

L'anticorps bloquant anti-intégrine $\beta 3$ utilisé dans l'expérience des explants (IgG monoclonale de hamster arménien, clone 2C9.G2) provient, comme l'immunoglobuline non-immune correspondante, de chez Biolegend. L'integrilin est fourni par GlaxoSmithKline. Le cocktail d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine et glutamine) vient de chez Invitrogen. L'albumine humaine stérile pour injection intraveineuse utilisée pour le tampon de Tyrode est préparée à l'EFS-Alsace. Le sérum de souris utilisé dans les expériences d'explants est préparé au laboratoire. Les gels SDS-polyacrylamide (Criterion TGX 4-25%), les membranes de transfert en polyfluorure de vinylidène (PVDF) et le réactif de révélation (Clarity) viennent de Bio-Rad. L'anticorps primaire anti-intégrine $\beta 3$ (IgG2a monoclonale de rat, clone Luc.A5) est fourni par Emfret, l'anticorps anti-intégrine $\beta 1$ (IgG monoclonale de lapin, clone EP1041Y) est obtenu auprès d'Epitomics, et l'anticorps anti-actine (IgG2a monoclonale de souris, clone AC40) vient de Sigma-Aldrich. Les films autoradiographiques (Amersham Hyperfilm ECL) sont obtenus auprès de GE Healthcare. Les anticorps secondaires couplés anti-lapin-HRP et anti-rat-HRP sont achetés chez Jackson Immunoresearch, et l'anticorps anti-souris-HRP vient de ThermoScientific. Le cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOMplete) est obtenu auprès de Roche.

Animaux

L'utilisation d'animaux dans cette étude s'est effectuée dans le respect de la directive européenne 2010/63/UE relative aux animaux utilisés à des fins scientifiques. Les souris C57BL/6J ont été obtenues auprès du laboratoire Charles River (L'Arbresle, France) ou ont été reproduites dans l'animalerie de l'EFS-Alsace. Les souris *Itgb1^{flox/flox}* et *Itgb3^{flox/flox}* ont été croisées avec la souris *Pf4-cre* (Tiedt et al., 2007) afin de générer des souris déficientes dans la lignée mégacaryocytaire (*Itgb1^{-/-}* et *Itgb3^{-/-}*). Ces deux lignées ont été croisées pour obtenir les souris *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}*, qui n'expriment ni l'intégrine β 1, ni l'intégrine β 3 au niveau des plaquettes (Figure - II-1D). La lignée déficiente pour l'intégrine α IIb (*CD41-YFP* (Zhang et al., 2007), désignée par la suite sous le nom *ItgA2b^{-/-}*) a été croisée avec la lignée *Itgb1^{-/-}* pour obtenir les souris *Itgb1^{-/-}/Itga2b^{-/-}*. Toutes les souris, hormis celles de la lignée *Itga2b^{-/-}*, ont un fond génétique C57BL/6J. Les souris *Itga2b^{-/-}* ont un fond génétique mixte (80% C57BL/6J, et partiellement 129 et SJL), ainsi que les souris *Itgb1^{-/-}/Itga2b^{-/-}* (90% C57BL/6J, et partiellement 129 et SJL). Les souris *Itgb1^{-/-}*, *Itgb3^{-/-}* et *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* sont comparées à la lignée *Pf4-cre*, notamment en raison de variations de la numération plaquettaire observée entre cette lignée et la lignée C57BL/6J sauvage (voir Figure - II-2A et « **Article en préparation** - Evidence for non-hematopoietic Cre activity in Pf4-Cre mice. » page 84). Les lignées *Itga2b^{-/-}* et *Itgb1^{-/-}/Itga2b^{-/-}* ne possèdent pas de lignée témoin appropriée à leur fond génétique mixte et sont comparées aux lignées C57BL/6J sauvage et *Pf4-cre*.

Numération plaquettaire

Le sang est obtenu par prélèvement caudal sur des souris anesthésiées par un mélange d'oxygène médical contenant 2% d'isoflurane. Les animaux sont maintenus à 38°C sur une plaque chauffante. L'extrémité de la queue d'une souris est sectionnée à l'aide d'un scalpel, la première goutte de sang est éliminée sur une compresse gaze stérile et six à dix microlitres de sang sont prélevés de la seconde goutte. Le sang prélevé est immédiatement mélangé à un volume égal de NaCl 0,9% contenant 12mM d'EDTA. L'extrémité de la queue de la souris est compressée pour stopper le saignement puis cautérisée pour éviter les hémorragies importantes chez les souris thrombopathiques (*Itgb3^{-/-}*, *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}*, *Itga2b^{-/-}*). Dans un souci de reproductibilité et de comparaison, les souris non thrombopathiques sont également cautérisées. Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages et suivis jusqu'à leur réveil.

Le sang ainsi prélevé est analysé sur un compteur vétérinaire Scil Vet'ABC spécialement calibré pour les souris de laboratoire.

Formation de proplaquettes en explant de moelle osseuse

La moelle osseuse d'un fémur de souris est expulsée de l'os directement dans du tampon Tyrode-albumine (NaCl 136,9 μ M, KCl 2,7 μ M, NaHCO₃ 11,9 μ M, NaH₂PO₄H₂O 0,4 μ M, MgCl₂*6H₂O 1 μ M, CaCl₂*6H₂O 2 μ M, HEPES 50 μ M, D-glucose 0,1% et albumine 0,35%, ajusté à pH 7,3 et 295 mOsm/L). La moelle est découpée en sections transverses de 0,5 mm puis plongée dans du tampon Tyrode-albumine supplémenté de 5% de sérum de souris et d'antibiotiques préchauffé à 37°C. Dix sections sont placées dans une chambre d'incubation constituée de deux lamelles de 0,18 mm séparées par un écarteur en caoutchouc de 1 mm. Les sections sont repérées sur un schéma et numérotées. Le montage est incubé à 37°C et observé sur un microscope optique inversé à contraste de phase (Leica DMI 4000). Les mégacaryocytes sont identifiés sur le pourtour de chaque section après trois heures, puis six heures d'incubation et classés parmi trois catégories : A) mégacaryocyte rond, B) mégacaryocyte allongé présentant des protrusions et C) mégacaryocyte formant des proplaquettes. La proportion de mégacaryocytes formant des proplaquettes est calculée à partir de ces résultats.

Dans certaines conditions, l'ajout d'anticorps bloquant l'intégrine β 3 (10 μ g/ml) ou d'integrilin (40 μ g/ml, soit 48 μ M) est effectué juste avant le montage de la chambre d'incubation.

Microscopie électronique à transmission

Pour observer l'ultrastructure des mégacaryocytes *in situ*, la moelle osseuse d'un fémur de souris est expulsée de l'os directement dans du glutaraldéhyde 2,5% en tampon cacodylate à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 21 gauges. La moelle est incubée au moins une heure à température ambiante en fixateur puis rincée en tampon cacodylate, contrastée une heure à température ambiante dans une solution de tétraxide d'osmium 1% en tampon cacodylate. L'échantillon est rincé cinq minutes en tampon cacodylate, puis deux fois cinq minutes en eau bi-distillée avant d'être incubé une heure à 4°C en acétate d'uranyle 4%. L'échantillon est alors rincé trois fois cinq minutes en eau bi-distillée puis déshydraté par des bains d'éthanol quatre fois cinq minutes à 75%, trois fois vingt minutes à 90% et trois fois vingt minutes en éthanol absolu, la déshydratation continue par deux incubations de quinze minutes en oxyde de propylène. L'échantillon est ensuite imprégné de résine épon avec un bain de trente minutes dans un mélange oxyde de propylène 1:1 épon, incubé sous agitation une nuit en épon pur, puis incubé quatre heures supplémentaires dans un nouveau bain d'épon pur. Pour finir l'échantillon est positionné dans un moule ou dans une gélule de gélatine, recouvert d'épon et incubé un à deux jours à 70°C pour polymériser la résine.

Mégacaryocytes et environnement médullaire : rôle des intégrines.

L'échantillon inclus est sectionné en coupes de 100nm à l'ultramicrotome, les coupes sont montées sur des grilles de cuivre puis recontrastées cinq minutes en acétate d'uranyle et deux minutes en citrate de plomb. Chaque bain est suivi de trois fois cinq minutes de rinçage dans de l'eau bi-distillée. Les coupes sont finalement observées à 120kV dans un microscope électronique à transmission FEI CM120. Les images sont acquises avec une caméra Olympus Veleta.

Western Blot

La vérification de l'absence d'expression des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ chez la souris *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* est effectuée sur un lysat plaquettaire. Les plaquettes lavées (voir Cazenave et al., 1983) sont lysées dans un tampon SDS (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM Na₃VO₄ 5 mM, NaF 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Calpeptine 2 μ M, Phenantroline 300 nM, SDS-glycine 1% et cocktail d'inhibiteurs de protéases « cOmplete » 1x). Les protéines sont titrées par la méthode BCA et dénaturées 5 minutes à 100°C en tampon Laemmli (Tris-HCl 65,8 mM, SDS 2,1%, glycérol 26,3%, bleu de bromophénol 0,01%) supplémenté de 0,5% de β -mercaptoéthanol. Les protéines (20 μ g) sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE 30 minutes à 200V en tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 μ M, SDS 0,1%), puis transférées sur une membrane de PVDF. Les zones correspondant aux tailles connues des protéines d'intérêt en conditions dénaturantes sont incubées 1h sous agitation avec les anticorps primaires correspondants (anti-intégrine $\beta 1$ (1/1000^e), anti-intégrine $\beta 3$ (1/100^e) ou anti-actine (1/500^e)) en PBS-Tween-BSA (Tween 0,05%, BSA 0,1%) après un blocage en PBS-Tween-lait (Tween 0,05%, lait 5%). Les trois lavages intermédiaires de 5 minutes sont réalisés en PBS-Tween 0,05%. Les membranes sont ensuite incubées 1h sous agitation avec un anticorps secondaire adapté couplé à la peroxydase du raifort (1/20000^e), lavées comme indiqué précédemment puis incubées 2 minutes avec le réactif de révélation avant d'être exposées sur un film autoradiographique.

Résultats

L'absence d'intégrines de type $\beta 3$, mais pas $\beta 1$, affecte négativement la thrombopoïèse.

Conformément à ce qui a été précédemment rapporté (Tiedt et al., 2007), la numération plaquettaire des souris *Itgb1*^{-/-} est similaire à celle de la lignée témoin (1021 ± 32.10^3 plaquettes/ μ l et 966 ± 26.10^3 plaquettes/ μ l, respectivement) (Figure - II-1A). En revanche, alors que Morgan *et al.* décrivent une faible tendance, statistiquement non significative, à la diminution de la numération plaquettaire des souris *Itgb3*^{-/-} (Morgan et al., 2010), nous observons une diminution significative de 30% du nombre de plaquettes circulantes (694 ± 42.10^3 plaquettes/ μ l) par rapport à la lignée *Pf4-cre* (966 ± 26.10^3 plaquettes/ μ l). La lignée *Itgb1*^{-/-}/*Itgb3*^{-/-} montre une diminution similaire à celle observée pour les souris déficientes en intégrines $\beta 3$ (632 ± 53.10^3 plaquettes/ μ l), suggérant que cet effet résulte de la seule inactivation de l'intégrine $\beta 3$.

Afin de vérifier si cette thrombopénie pourrait être due à un défaut de thrombopoïèse, nous avons évalué la capacité des mégacaryocytes différenciés *in situ* à produire des proplaquettes en utilisant la technique des explants de moelle (Figure - II-1B). Les mégacaryocytes *Itgb1*^{-/-} forment des proplaquettes en proportions similaires aux mégacaryocytes de souris *Pf4-cre* ($56 \pm 4\%$ et $51 \pm 2\%$, respectivement). En revanche, les mégacaryocytes de souris *Itgb3*^{-/-} ($23 \pm 3\%$) émettent deux fois moins de proplaquettes que les mégacaryocytes témoins *Pf4-cre*, suggérant un rôle de l'intégrine $\beta 3$ dans la formation des plaquettes. La double inactivation de $\beta 1$ et $\beta 3$ n'entraîne pas de diminution supplémentaire de la formation de proplaquettes ($28 \pm 3\%$). Ainsi, contrairement à notre hypothèse initiale, il ne semble pas y avoir de redondance fonctionnelle entre les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ au niveau de la thrombopoïèse *in vivo*.

Etant donné que les intégrines $\beta 3$ semblent jouer un rôle dans la thrombopoïèse, et puisque plusieurs travaux réalisés *in vitro* suggèrent que ces intégrines influent sur le déclenchement de la formation des proplaquettes (Larson and Watson, 2006; Leven, 1995; Leven and Tablin, 1992), nous avons cherché à vérifier si le blocage de l'intégrine $\beta 3$ dans des mégacaryocytes sauvages pouvait reproduire l'inhibition observée avec les mégacaryocytes *Itgb3*^{-/-} (Figure - II-1C). Les mégacaryocytes exposés à un anticorps bloquant la sous-unité $\beta 3$ forment des proplaquettes dans des proportions similaires aux mégacaryocytes exposés à une immunoglobuline témoin ($59 \pm 5\%$ et $60 \pm 3\%$ de mégacaryocytes formant des proplaquettes, respectivement). De la même manière, l'intégrilin, un peptide cyclique antagoniste des intégrines α IIb $\beta 3$ et α V $\beta 3$, n'affecte pas la formation de proplaquettes à des concentrations inhibant la liaison du fibrinogène *in vitro* ($59 \pm 4\%$ de mégacaryocytes formant des proplaquettes contre $63 \pm 3\%$ pour la condition témoin,

Figure - II-1C). Ces résultats suggèrent que l'intégrine $\beta 3$ ne serait pas impliquée dans le déclenchement de la formation des proplaquettes.

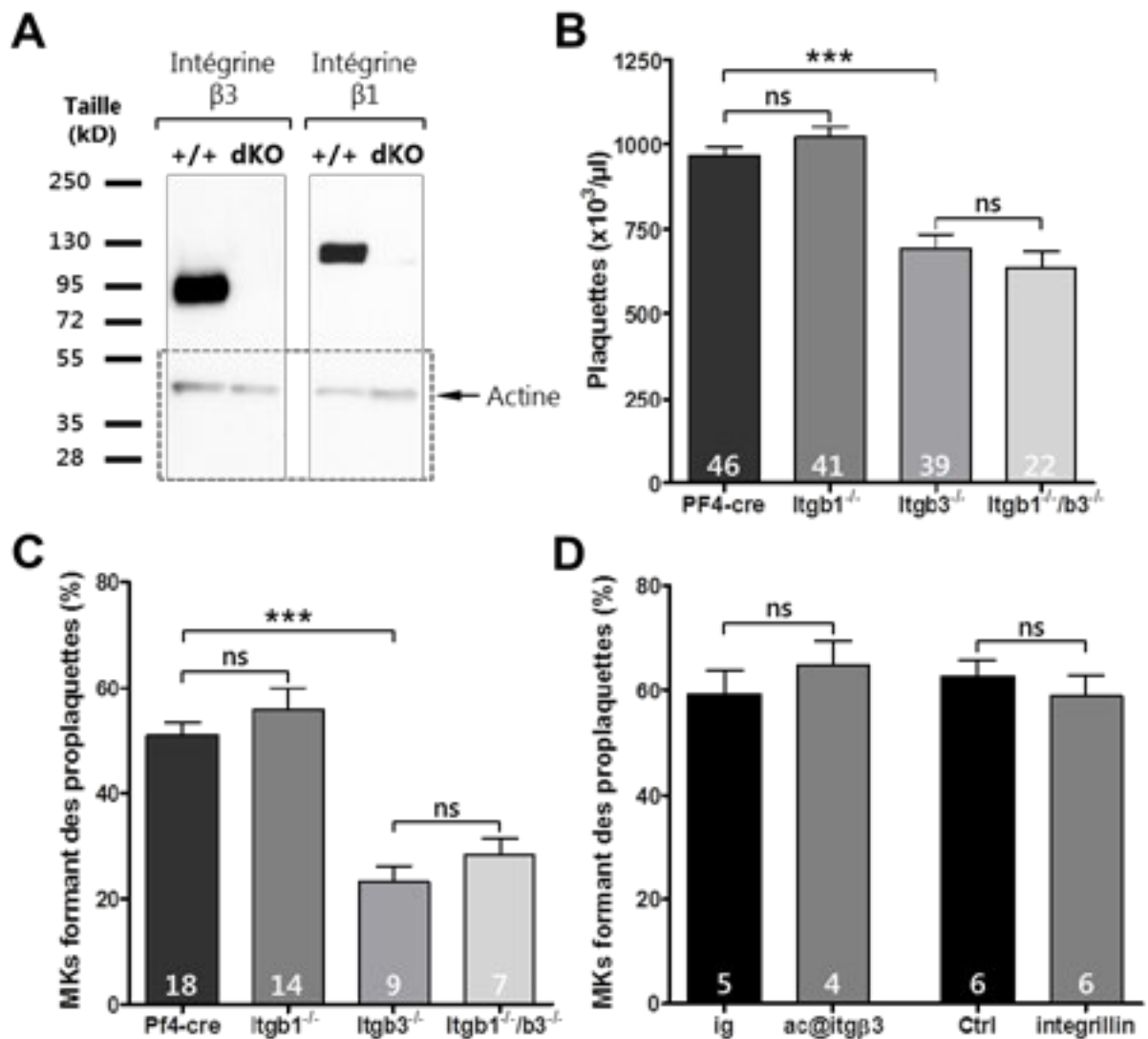


Figure - II-1 : Les intégrines de type $\beta 3$, mais pas de type $\beta 1$, jouent un rôle clé dans la thrombopoïèse

(A) Vérification de l'absence d'expression des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans les plaquettes de souris *Itgb1*^{-/-}/*Itgb3*^{-/-} par Western Blot. (B) Numération des plaquettes sanguines. (C,D) Quantification des mégacaryocytes formant des proplaquettes dans la méthode des explants. (B-D) Les effectifs sont indiqués en blanc pour chaque condition et les résultats ont été comparés avec par une analyse de la variance à un facteur et un post-test de Bonferroni. *** = $p < 0,0001$; ns = $p > 0,05$. dKO = *Itgb1*^{-/-}/*Itgb3*^{-/-}.

L'absence d'intégrine α IIb ne perturbe pas la production des plaquettes.

Afin de déterminer si la diminution de numération plaquettaire observée dans la lignée *Itgb3^{-/-}* résulte de l'absence d'intégrine α IIb β 3, nous avons évalué ce paramètre chez les souris *Itga2b^{-/-}*, de fond génétique mixte 80% C57BL/6J, 129 et SJL (Figure - II-2A). Ces souris présentent une numération plaquettaire légèrement diminuée par rapport aux souris C57BL/6J (1010 ± 26.10^3 plaquettes/ μ l contre 1144 ± 30.10^3 plaquettes/ μ l, respectivement), comme récemment rapporté dans la littérature (Gekas and Graf, 2013). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que cette légère différence soit attribuable à la différence de fond génétique. La lignée *Itga2b^{-/-}* présente une numération plaquettaire similaire à celle des souris *Itgb1^{-/-}/Itga2b^{-/-}* et des témoins *Pf4-cre* (1010 ± 26.10^3 contre 1005 ± 37.10^3 et 966 ± 26.10^3 plaquettes/ μ l, respectivement), suggérant que l'intégrine α IIb β 3 n'est pas ou peu impliquée dans la production de plaquettes.

Par ailleurs, la proportion de mégacaryocytes formant des proplaquettes est similaire entre les lignées C57BL6J, *Pf4-cre* et *Itga2b^{-/-}* ($56 \pm 2\%$, $51 \pm 2\%$ et $60 \pm 3\%$ de mégacaryocytes formant des proplaquettes, respectivement) (Figure - II-2B). Globalement ces données indiquent que l'intégrine α IIb β 3 ne joue pas un rôle clé dans la thrombopoïèse, suggérant que le défaut observé chez les souris *Itgb3^{-/-}* serait lié à α V β 3.

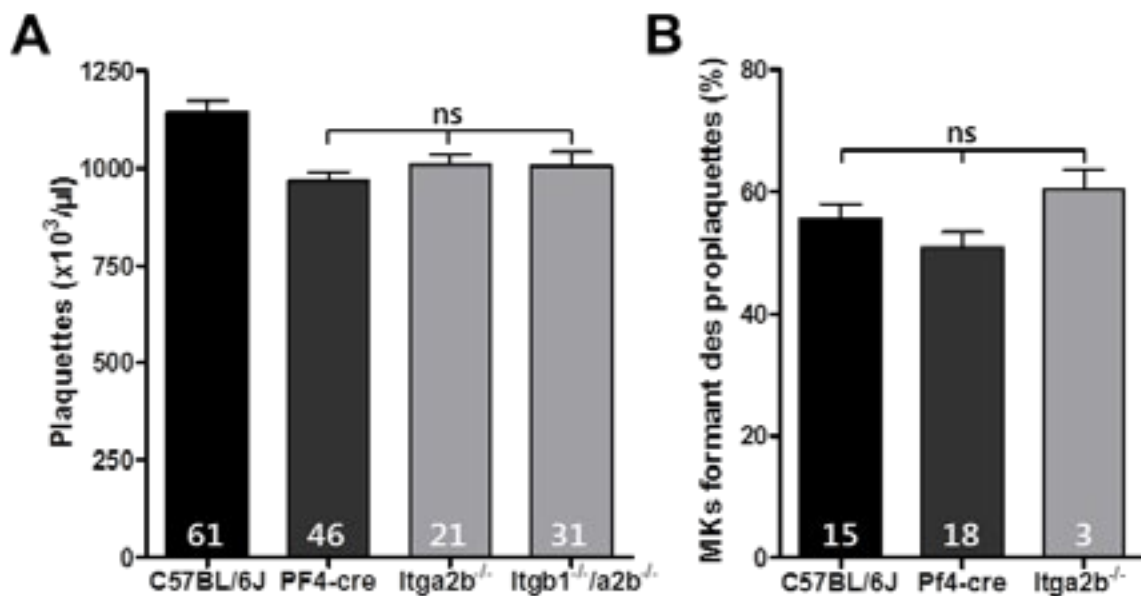


Figure - II-2 : L'intégrine α IIb n'est pas nécessaire à la formation des plaquettes

(A) Numération des plaquettes sanguines. (B) Quantification des mégacaryocytes formant des proplaquettes dans la méthode des explants. (A,B) Les effectifs sont indiqués en blanc pour chaque condition et les résultats ont été comparés avec par une analyse de la variance à un facteur et un post-test de Bonferroni. ***= $p < 0,0001$; ns= $p > 0,05$.

La suppression des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ entraîne un défaut d'organisation du DMS dans les mégacaryocytes *in situ*.

Au vu de la perturbation de la capacité des mégacaryocytes *Itgb3*^{-/-} à former des proplaquettes et de la numération plaquettaire diminuée de ces souris, nous avons souhaité vérifier l'ultrastructure *in situ* des mégacaryocytes déficients pour les différentes intégrines β . Les mégacaryocytes *Itgb1*^{-/-}, *Itgb3*^{-/-} et leur témoin *Pf4-cre* présentent une ultrastructure normale, avec une taille importante, un noyau multilobé de grande taille, un DMS développé occupant la majorité du cytoplasme et délimitant des territoires plaquettaires, tous les types d'organelles plaquettaires et une zone périphérique (Figure - II-3). Si l'ultrastructure normale des mégacaryocytes déficients pour l'intégrine $\beta 1$ paraît cohérente avec les résultats précédents, l'absence de perturbation au niveau des mégacaryocytes déficients pour l'intégrine $\beta 3$ suggère que les défauts de thrombopoïèse observés chez ces souris ne proviennent pas d'un défaut de structuration du mégacaryocyte. En revanche, les mégacaryocytes *Itgb1*^{-/-}/*Itgb3*^{-/-} présentent une organisation anormale du DMS, avec des territoires plaquettaires de grande taille et des accumulations de membranes finement accolées entre ces territoires plaquettaires (Figure - II-3). Les mégacaryocytes de ces souris ne semblent pas développer d'autres défauts d'organisation par rapport aux cellules témoins. La présence de ce défaut observé uniquement en absence de toute intégrine suggère que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ sont impliquées dans la structuration du DMS et peuvent se compenser mutuellement. Toutefois, cette organisation anormale du DMS ne semble pas impacter la thrombopoïèse dans nos conditions expérimentales.

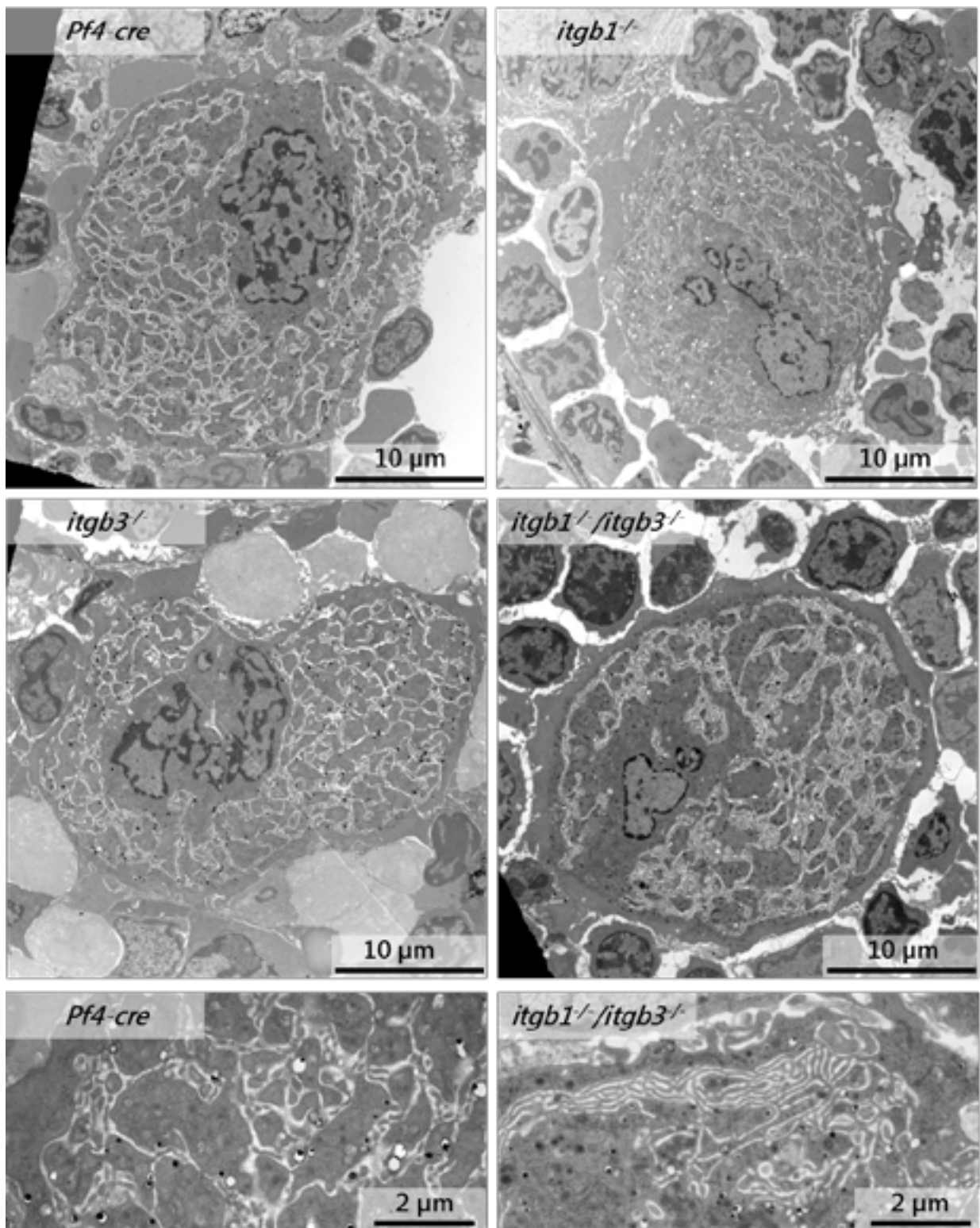


Figure - II-3 : Ultrastructure *in situ* des mégacaryocytes *Itgb1^{-/-}*, *Itgb3^{-/-}* et *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}*

Ultrastructure de mégacaryocytes *Pf4-cre*, *Itgb1^{-/-}*, *Itgb3^{-/-}* et *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* en MET. Les mégacaryocytes *Itgb1^{-/-}* et *Itgb3^{-/-}* ont une ultrastructure similaire à celle des mégacaryocytes *Pf4-cre*. En revanche, les mégacaryocytes *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* présentent un réseau de DMS très dense qui forme des amas de membranes organisés en couches successives, délimitant des territoires plaquettaire de grande taille. Images représentatives des mégacaryocytes observés dans la moelle des différents génotypes. Pour plus d'images, consulter les figures Figure - II-4 et Figure - II-5.

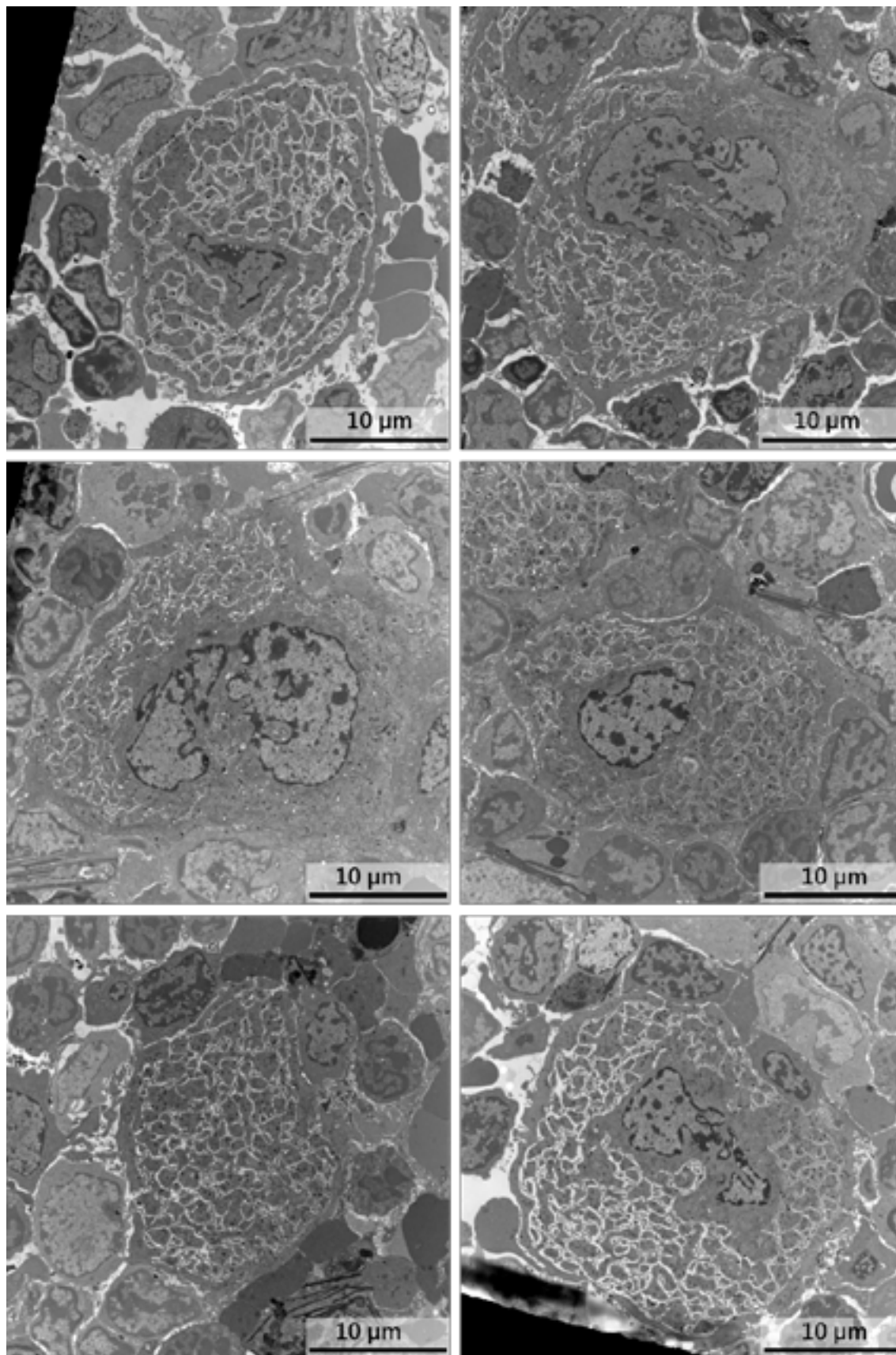


Figure - II-4 : Planche d'images représentatives des mégacaryocytes *Pf4-cre* en MET.

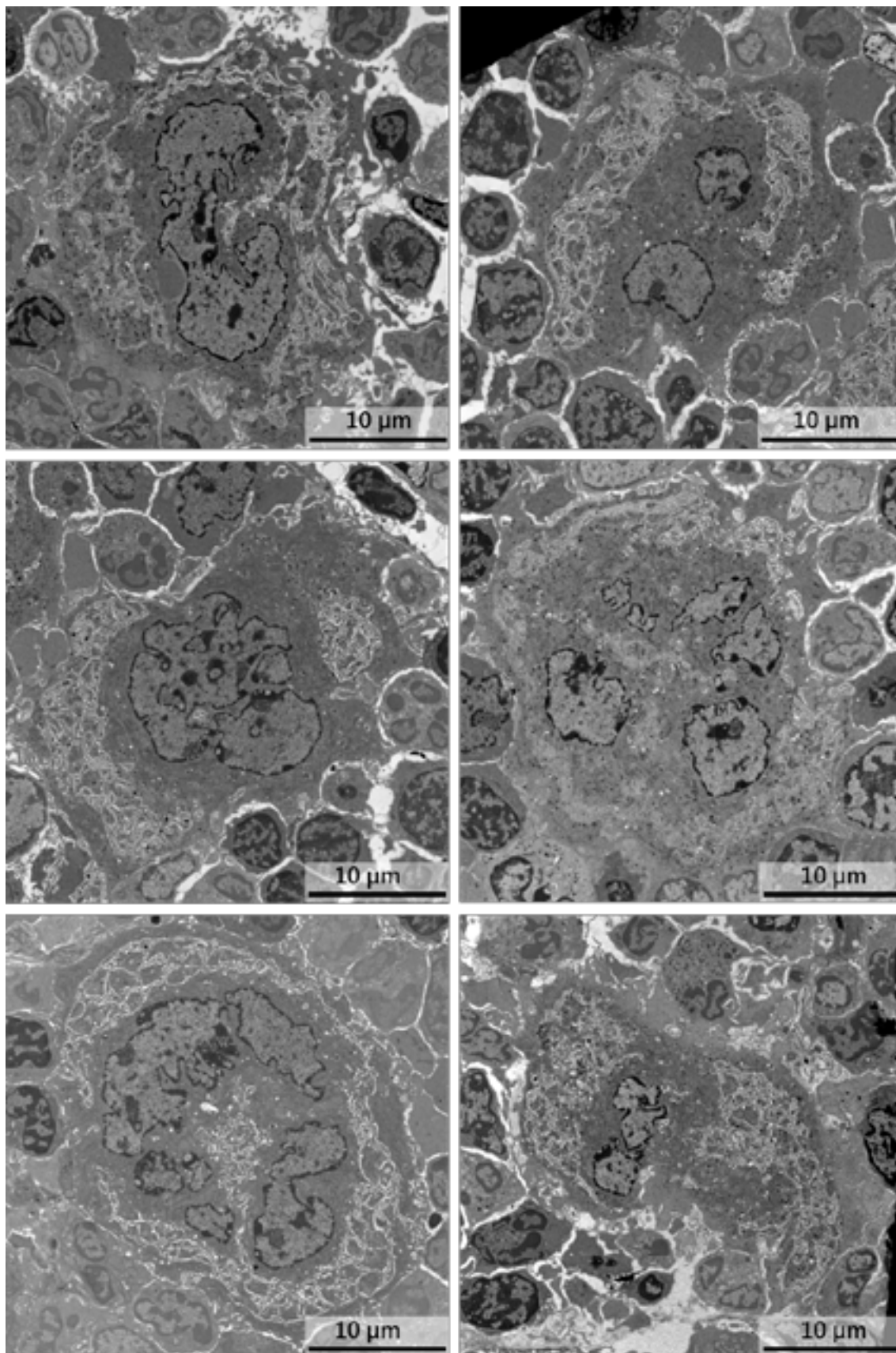


Figure - II-5 : Planche d'images représentatives de mégacaryocytes *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* en MET.

Discussion

Nous montrons dans cette étude que les mégacaryocytes de souris déficientes pour les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ développent un défaut d'organisation du DMS en comparaison aux mégacaryocytes témoins, et contrairement aux souris déficientes soit pour $\beta 1$, soit pour $\beta 3$. Cette observation conforte notre hypothèse de départ et suggère une redondance fonctionnelle entre ces deux types d'intégrines pendant la maturation des mégacaryocytes. Cependant, cette anomalie de structuration du DMS ne semble pas avoir de conséquences sur la formation des plaquettes, puisqu'aucun effet additionnel n'est observé dans les souris *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* par rapport aux souris *Itgb3^{-/-}*. Cette observation est particulièrement intéressante et suggère que les intégrines sont impliquées dans la structuration du DMS et l'organisation du cytoplasme. L'étude de cette question fait partie de nos perspectives dans la poursuite de ce travail.

Nous avons pu observer que l'absence d'intégrine $\beta 3$ entraîne un défaut de thrombopoïèse qui se traduit par une diminution de la numération plaquettaire et une diminution de la proportion de mégacaryocytes formant des proplaquettes chez les souris *Itgb3^{-/-}*. L'observation de ces défauts était inattendue sur la base des travaux précédemment publiés avec cette souris (Morgan et al., 2010). En revanche, de manière cohérente avec les données publiées, les souris déficientes pour l'intégrine $\beta 1$ ne présentent pas de défaut sur ces paramètres dans nos expériences (Tiedt et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les intégrines de type $\beta 3$ sont impliquées dans la formation des plaquettes, sans pour autant être indispensables à ce processus.

Le blocage de l'intégrine $\beta 3$ avec un anticorps spécifique ou avec l'integrilin, un inhibiteur peptidique de petite taille, n'affecte pas la formation de proplaquettes par des mégacaryocytes sauvages. Ces observations suggèrent que les intégrines ne seraient pas impliquées dans le déclenchement de la formation des proplaquettes, mais plutôt en amont au cours de la maturation des mégacaryocytes. Toutefois, les expériences de formation de proplaquettes ont été réalisées avec la technique des explants de moelle, et nous ne pouvons pas exclure que l'absence d'effet ne soit pas dû à un problème d'accessibilité de l'anticorps anti-intégrine $\beta 3$ ou de l'integrilin aux mégacaryocytes présents au sein des explants. Il faut également garder à l'esprit que l'integrilin a une affinité plus élevée pour l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ que pour $\alpha V\beta 3$, et que si la concentration utilisée dans ces expériences (48 μM) permet de bloquer efficacement $\alpha IIb\beta 3$, elle n'inhibe que faiblement l'intégrine $\alpha V\beta 3$ (Scarborough et al., 1993). Il est donc possible que l'effet observé sur la formation des proplaquettes chez les souris déficientes en intégrines $\beta 3$ ne soit pas dû à l'absence d' $\alpha IIb\beta 3$ mais à celle d' $\alpha V\beta 3$. Ceci semble confirmé par le fait que l'inactivation

Mégacaryocytes et environnement médullaire : rôle des intégrines.

spécifique d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (souris *Itga2b*^{-/-}) n'entraîne de défauts ni dans la numération plaquettaire, en accord avec la littérature (Larson and Watson, 2006), ni au niveau de la formation de proplaquettes dans la technique des explants. Ces résultats suggèrent que parmi les intégrines β3 , ce ne serait pas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ mais $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ qui jouerait un rôle dans la formation des plaquettes. Ainsi, alors qu' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ joue un rôle prépondérant par rapport à $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ dans les fonctions plaquettaires, l'importance fonctionnelle de ces deux intégrines pourrait être inversée au niveau du mégacaryocyte. Nous avons deux possibilités afin d'explorer plus avant cette hypothèse : utiliser un inhibiteur spécifique d' $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, comme le cilengitide (Dechantsreiter et al., 1999; Mas-Moruno et al., 2010), ou générer une lignée de souris déficiente pour l'intégrine αV en croisant les lignées *Pf4-cre* et *ItgaV*^{flox/flox} (Lämmermann et al., 2008; McCarty et al., 2005). Actuellement les deux approches sont envisagées, mais ni le cilengitide ni aucune des lignées *ItgaV*^{flox/flox} ne sont disponibles commercialement et des demandes sont en cours pour l'obtention de ces différents outils.

En conclusion, nos premières observations montrent que les intégrines β1 et β3 semblent impliquées dans la maturation du mégacaryocyte, notamment au niveau de la structuration du DMS. Nous montrons également que l'absence d'intégrine β3 seule entraîne un défaut dans la formation des plaquettes, contrairement aux informations disponibles dans la littérature (Morgan et al., 2010). D'après nos données, cet effet pourrait être dû à $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ et suggérerait des rôles distincts pour les deux intégrines de type β3 , $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ dans la mégacaryopoïèse et $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ dans les fonctions plaquettaires. Des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de tester cette hypothèse et d'identifier les mécanismes impliquant les intégrines dans la régulation de la formation des proplaquettes et la maturation des mégacaryocytes.

Partie III - Mégacaryocytes et environnement médullaire : Culture 3D.

Influence de l'environnement sur les fonctions cellulaires

La biologie cellulaire intégrée s'attache à comprendre le fonctionnement de cellules individuelles en tenant compte de leur régulation au sein d'un tissu. Ce fonctionnement dépend d'un environnement cellulaire en perpétuel changement et dont l'influence rend les études sur cellules vivantes très complexes *in situ*, malgré leur pertinence physiologique. La culture cellulaire permet de contrôler partiellement cet environnement, et constitue ainsi un outil de choix pour relever ce défi. Ainsi, les résultats expérimentaux obtenus dans un environnement maîtrisé sont beaucoup plus reproductibles et compatibles avec l'établissement de conclusions fiables. Néanmoins, et par nature, la culture cellulaire la plus basique n'est pas capable de récapituler la complexité, et donc la pertinence physiologique, de l'environnement *in situ*. Afin de minimiser les biais expérimentaux inhérents à ce système, il est possible d'affiner le milieu de culture par exemple en y ajoutant des mélanges de cytokines, en utilisant des cellules nourricières, des matrices de rigidité variable ou encore de supports organisés en trois dimensions (3D). Ces éléments permettent de progressivement assembler des composantes clés de l'environnement *in situ* et laissent penser qu'à l'avenir les phénomènes les plus complexes pourront être reproduits *in vitro*, comme par exemple la production de plaquettes fonctionnelles dans une optique transfusionnelle.

Dans ce contexte, il est nécessaire d'adopter une approche rationnelle qui implique de caractériser l'impact de chaque élément individuellement, de manière à maîtriser la complexification de l'environnement de culture. Dans le cas particulier des mégacaryocytes plusieurs travaux ont déjà permis de dégager l'importance de l'utilisation de cytokines (Cortin et al., 2005) ou d'éléments de la MEC (Hunt et al., 1993; Larson and Watson, 2006; Leven, 1995; Leven and Tablin, 1992; Malara et al., 2011; Strassel et al., 2012; Tajika et al., 1996). Par comparaison, l'organisation tridimensionnelle et la rigidité restent des aspects de l'environnement médullaire encore peu étudiés. On sait cependant que les cellules se développent différemment dans un milieu en deux dimensions (2D) ou en trois dimensions (3D) (Hoffman, 1993; Raab et al., 2012; Vogel and Sheetz, 2006; Yamada et al., 2003), et que la rigidité du substrat auquel elles sont exposées influence leur comportement (Engler et al., 2006; Raab et al., 2012; Shin et al., 2011).

Les systèmes de culture cellulaire en trois dimensions (3D)

In vivo les cellules s'intègrent à des tissus organisés en 3D, contrairement à la culture cellulaire « classique » où les cellules sont en contact avec un support en 2D. Pour se rapprocher des conditions *in situ*, diverses matrices 3D ont été développées. On peut différencier parmi ces

Mégacaryocytes et environnement médullaire : Culture 3D.

méthodes l'utilisation de supports poreux rigides ou semi-rigides, et l'utilisation d'hydrogels (Tibbitt and Anseth, 2009).

Dans l'optique de simuler l'environnement retrouvé au niveau de la moelle osseuse, il est évident que les supports poreux solides sont idéaux pour mimer la composante osseuse (Fricain et al., 2013), puisqu'ils sont similaires à une surface d'adhésion en 2D recourbée pour former une structure 3D. En revanche, les hydrogels seront plus proches de la composante « molle » (Shin et al., 2013) qui correspond au compartiment cellulaire du tissu. En utilisant ce type de gels, toute la surface de nos cellules est exposée à une matrice souple, de manière similaire à l'organisation de la moelle (Figure - III-1). Ces gels peuvent être utilisés comme des structures réticulées non cellularisées, nécessitant une colonisation cellulaire, ou comme un support cellularisé par encapsulation de cellules (Weiss et al., 2010).

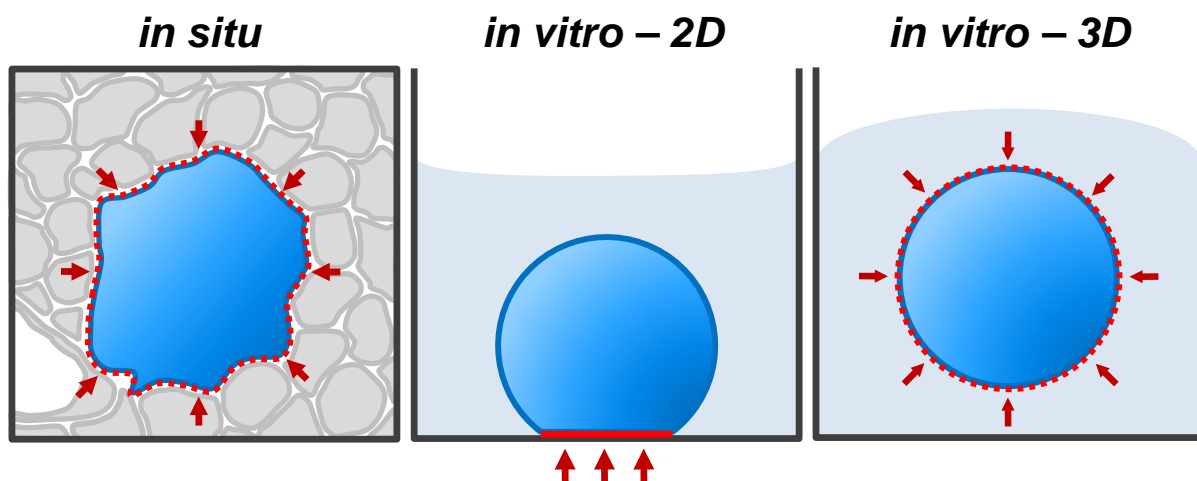


Figure - III-1 : Différences d'organisation *in situ* et *in vitro* en 2D et 3D

Schéma de mégacaryocytes représentés *in situ* dans la moelle, et *in vitro* en culture cellulaire 2D ou 3D dans le cas d'un hydrogel. Les contraintes auxquelles la cellule est exposée (flèches) et les surfaces qui lui permettent d'adhérer (lignes rouges pleine ou pointillées) sont différentes et influencent son comportement.

Notre objectif est d'étudier le mégacaryocyte en tant que cellule isolée dans un milieu en 3D de rigidité ajustable, dans lequel nous pourrions ajouter au besoin des éléments de MEC. Nous avons donc choisi de nous tourner dans un premier temps vers des hydrogels permettant l'encapsulation cellulaire plutôt que vers ceux qui nécessitent une colonisation cellulaire. En effet, ces derniers, comme par exemple des gels d'acide hyaluronique modifié, impliquent d'étudier des cellules possédant des capacités invasives (David et al., 2004) ou d'exposer les cellules à une chimiokine qui stimulera leur migration au sein du gel (Demange et al., 2012). Ce type de procédé est particulièrement adapté à l'étude de cellules tumorales ou de progéniteurs capables de migrer, qui se développeront sous forme de colonies sphéroïdes (Hoffman, 1993). Les arguments

Mégacaryocytes et environnement médullaire : Culture 3D.

qui nous ont poussés à mettre de côté ce type de supports pour la première phase de notre étude sont l'exposition des cellules à des chimiokines et les contacts intercellulaires impliqués par la formation de colonies sphéroïdes. Ces deux éléments risquent en effet d'interférer avec la réaction des cellules au contact d'éléments de MEC, notamment puisque les cadhérines et les intégrines entraînent parfois une signalisation similaire (Weber et al., 2011).

Parmi les hydrogels permettant une encapsulation, on retrouve des gels à base de MEC composés d'éléments purifiés ou en mélanges, comme par exemple le matrigel qui contient des laminines, du collagène IV, des héparanes sulfate et de l'entactine. Cependant, afin de simplifier l'interprétation de nos expériences en cas d'addition d'éléments de la MEC, nous avons préféré utiliser un gel peu réactif dont l'effet propre sur les mégacaryocytes serait limité : la méthylcellulose (MC). La MC est un dérivé méthylé hydrosoluble de la cellulose qui présente les propriétés d'un gel thermoréversible (Lam et al., 2006). Elle permet donc d'encapsuler des cellules en travaillant en dessous de son point de gélification, ce qui est le cas à environ 20°C pour les conditions que nous avons choisies, et de former un gel en incubant les cellules à 37°C.

Notre premier objectif était d'étudier l'influence de protéines de MEC purifiées sur les mégacaryocytes différenciés *in vitro* en gel de MC, afin de reproduire un réseau de MEC organisé en 3D comme c'est le cas dans la moelle. Cependant, nos premiers résultats nous ont incités à caractériser l'influence de cet hydrogel sur les mégacaryocytes sans ajout de MEC dans un premier temps.

Article en preparation - **Improved megakaryocyte differentiation using 3D hydrogel progenitor culture**

Fabien Pertuy *et al.*

Introduction

Platelets are produced by megakaryocytes, their precursor cells, following a complex process of differentiation and maturation. Megakaryocytes are the progeny of hematopoietic stem cells (HSC) from which they differentiate in hematopoietic progenitor cells (HPC) and mature through a succession of well-orchestrated mechanisms. During this process, megakaryocytes undergo several rounds of endomitoses, acquiring a large multilobulated polyploid nucleus (Nagata et al., 1997; Vitrat et al., 1998), and synthesize unique components such as the platelet granules (Heijnen et al., 1998; Youssefian and Cramer, 2000) and the demarcation membrane system (DMS), a large network of intracellular membranes which serves as a reservoir for the membranes of the future platelets (Radley and Haller, 1982). One megakaryocyte has been estimated to release hundreds to thousands of platelets (Kaufman et al., 1965b; Mahaut-Smith et al., 2003).

This differentiation process can be mimicked *in vitro* in the presence of thrombopoietin (TPO) (Lecine et al., 1998). Mature cells are then able to extend proplatelets, long and thin processes at the end of which the bulbous tip will constitute the future platelet (Italiano et al., 1999). However the production of platelets *in vitro* remains very inefficient compared to the *in vivo* process and will need considerable improvements in view of potential future therapeutic applications.

We hypothesized that mimicking *in vitro* the *in situ* environment of progenitors may improve megakaryocyte differentiation and maturation, leading to higher platelet yield production. Indeed, unlike *in vitro*, hematopoietic progenitors do not grow in liquid suspension within the bone marrow but rather in a complex environment. Bone marrow is a soft tissue composed of numerous hematopoietic and stromal cells, and a loose network of extracellular matrix. Unlike in liquid culture, bone marrow is organized in three dimensions (3D) and exposes cells to a defined stiffness (Shen and Nilsson, 2012; Shin et al., 2013).

The relationship between substrate stiffness and cell differentiation has been well studied in other cellular systems and it is now admitted that substrate rigidity can direct stem cell fate (Engler et al., 2006). Megakaryocytic differentiation and proplatelet formation appears to be improved by decreasing external stress with the use of soft matrices or internal stress by myosin II inhibition (Shin et al., 2011). However these studies have been performed on 2D substrate and cells are

Mégacaryocytes et environnement médullaire : Culture 3D.

thought to behave differently when grown in 2D and 3D environment (Cukierman et al., 2001; Tibbitt and Anseth, 2009; Vogel and Sheetz, 2006).

To mimic the natural environment encountered during HPC differentiation, we used a 3D hydrogel culture system using methylcellulose (MC). MC has been used for a long time for hematopoietic cell cultures in clonogenic tests (Hara and Ogawa, 1978), allowing the formation of CFU-MK, and is non-bioactive. The mechanical properties of this thermoreversible hydrogel can be tuned to a range of stiffnesses by modifying the solution concentration or molecular weight range. We show here that megakaryocyte differentiation from mouse bone marrow progenitors is improved in 3D MC culture, compared to liquid 2D culture, in terms of ultrastructural intracellular organization and distinctive differentiation markers such as polyploidy. As a result, a larger proportion of megakaryocytes are able to extend proplatelets when grown in MC gel. In addition, and unlike liquid culture, the hydrogel culture can recapitulate morphological defects of *Myh9*^{-/-} megakaryocytes observed *in situ*. This suggests that MC constitutes an *in vitro* environment able to mimic features of the bone marrow. As such, MC-based cultures could represent a relevant system to study patho-physiological cell behavior during megakaryocyte differentiation.

Material and methods

Materials

DMEM medium and antibiotics cocktail (penicillin, streptomycin, glutamine) were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Recombinant human TPO (rhTPO), fetal bovine serum (FBS) and the mouse hematopoietic progenitor cell enrichment kit were purchased from Stem Cell Technologies (Vancouver, BC, Canada). Monoclonal antibody against mouse CD41 (RAM.2) was produced in our laboratory (Perrault et al., 2001) and coupled to AlexaFluor 647 dye. RNase A, propidium iodide, BSA and DAPI were from Sigma-Aldrich (Rueil-Malmaison, France). Recombinant hirudin rHV2-Lys47 (r-hirudin) was kindly provided by Transgène (Strasbourg, France). Methylcellulose was from R&D (Minneapolis, Minnesota, USA). Elastic bottom petri dishes (ESS 28kPa) were from IBIDI (Planegg, Germany).

Animals

All mice were on a C57BL/6 background and 2-4 month old. WT mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The *Myh9^{flox/flox}* strain was crossed with *Pf4-Cre* mice to obtain mice with deletion of the *Myh9* exon 1 (*Myh9^{-/-}* mice) in the megakaryocytic lineage only, as described previously (Léon et al., 2007).

Culture of mouse bone marrow progenitor cells

Bone marrow cells were flushed from the femurs and tibias of 2 to 4 month-old male C57BL/6 mice and successively passed through 21-, 23- and 25-gauge needles. Nucleated cells were counted using ADAM-MC cell counter (NanoEnTek, Seoul, Korea), (typically 5 to 10 x10⁷ cells per mouse), pelleted at 300 g for 7 min and resuspended at 1 x10⁸ cells/ml in PBS supplemented with 5% (v/v) rat serum and 2 mM EDTA to perform a Lin negative (Lin⁻) selection (Stem Cell Technologies). The Lin⁻ population was adjusted to 2 x10⁶ cells/ml in DMEM containing 2 mM L-glutamine, penicillin/streptomycin, 10% FBS, TPO (50 ng/ml) and hirudin (100U/ml). For MC gel culture, cells were encapsulated within the gel at room temperature. Cultures were performed in 24-well tissue culture plates with 500 µl per well of cell suspension in liquid medium or MC gel and incubated at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere for up to 5 days.

In vitro proplatelets formation

To visualize proplatelet formation from megakaryocytes differentiated in MC gels, cells were recovered after 4 days of culture by 1:10 dilution of MC in PBS and centrifuged at 300 g. Cell

Mégacaryocytes et environnement médullaire : Culture 3D.

pellets were resuspended in twice the initial volume in liquid medium. To avoid any artifact from cell manipulation, control cells grown in liquid medium were subjected to similar dilution and centrifugation. After another 24h culture, the culture is photographed (obj. 20x, 10 fields per well, 2-4 wells per condition) and the proportion of megakaryocyte extending proplatelets is established by manual counting on the pictures.

Physical measurements (stiffness)

Physical parameters of the MC gel were measured in a rotational rheometer in collaboration with Dominique Collins (Institut Charles Sadron, Strasbourg).

Transmission electron microscopy (TEM)

Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde directly in the culture well to prevent possible DMS reorganization due to cell resuspension in liquid medium. Following MC dilution and centrifugation, cells were embedded in Epon. Ultrathin sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a CM120 transmission electron microscope (TEM) (FEI, The Netherlands) as previously described (Eckly et al., 2012).

Flow cytometry

Cells were recovered from megakaryocytes differentiated in MC gels or liquid culture at day 4 by 1:10 dilution in PBS, centrifuged at 100g 5min and resuspended in the initial volume for nucleated cells counting using ADAM-MC cell counter (NanoEnTek, Seoul, Korea). Cells were divided in order to use $0.5-1 \times 10^6$ cells per tube and processed as previously described (Eckly et al., 2009). Briefly, cells were labeled with an antibody against CD41 coupled to AlexaFluor 647 (RAM.2-647), cells were fixed in 70% ice cold ethanol and stained with propidium iodide (50 μ g/ml) in presence of RNase A (100 μ g/ml). Ploidy level and CD41 expression were determined on a 5-color Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Some adherent cells cannot be detached from the plastic when grown in liquid medium, whereas no cells were adherent in MC gels. To avoid a bias in ploidy classes frequencies (biggest cells were never adherents) we performed liquid cultures in elastic bottom petri dishes to recover the entire cell population.

Results

Megakaryocyte maturation requires bone marrow environment

In a previous work, we developed improved liquid culture condition from mouse bone marrow progenitors so as to obtain megakaryocytes forming proplatelets after a 5-day culture (Strassel et al., 2012). In the course of this study, we sought to evaluate the maturity of megakaryocytes differentiated in liquid culture compared to those of bone marrow. TEM examination of megakaryocytes grown under these conditions showed striking differences in their ultrastructural organizations compared to those of the bone marrow (Figure - III-2A and B). *In situ* differentiated megakaryocytes exhibit a well-developed DMS, with closely apposed membranes delineating the so-called platelet territories which appear to fragment the cytoplasm into small portions (Figure - III-2A). By contrast, *in vitro* differentiated megakaryocytes exhibit membranes that are not closely apposed but rather appear dilated (Figure - III-2B) and loosely organized so that only a few platelet territories may be delineated. This suggests that the absence of some component of the bone marrow environment is responsible for an incomplete structuration of the DMS in liquid culture due to a less mature state.

Another indication that liquid culture conditions did not reproduce all of the aspects of the bone marrow came from our previous studies of *Myh9*^{-/-} mice which showed that the absence of myosin IIA impairs proplatelets formation *in situ* but not *in vitro* (Eckly et al., 2009, 2010). We show here that at the ultrastructural level, the bone marrow environment is also required to visualize the defective structuration of the *Myh9*^{-/-} megakaryocyte compared to the WT one (Figure - III-2C). *In situ*, *Myh9*^{-/-} megakaryocytes had a complex shape, appearing loose between the other marrow cells (Eckly et al., 2009). By contrast, when progenitors were differentiated in liquid culture, the ultrastructure of *Myh9*^{-/-} megakaryocytes cannot be distinguished from that of WT mice (Figure - III-2D).

These observations indicate a missing “factor” in liquid culture which seems to impair part of the megakaryocytic differentiation, and led us to investigate the influence of a system that could better mimic the bone marrow environment.

Improved demarcation membranes organization in 3D MC gel culture

We thus reasoned that recreating a 3D environment during the course of progenitor culture may improve the differentiation process. Toward that aim we used a MC hydrogel. At day 0, Lin-

Mégacaryocytes et environnement médullaire : Culture 3D.

progenitors were seeded either in liquid culture or encapsulated within a 2% MC gel. After a 5-day culture, cell viability was found to be comparable between both conditions (not shown). Ultrastructure was observed by TEM and we focused on the more mature megakaryocytes containing granules and DMS. Contrary to liquid culture where DMS is rather dilated and does not appear to be organized (Figure - III-3A), the DMS MC-grown megakaryocytes was composed of membranes more closely apposed, appearing less vacuolar. These membranes were also more structured so that platelet territories were clearly observed (Figure - III-3B). Although larger, these territories strikingly resembled the ones observed *in situ* (Figure - III-3C).

Increasing gel stiffness improves DMS structuration

To examine whether cell maturation was dependent on MC concentration, and thus on medium stiffness, we performed megakaryocyte culture in MC ranging from 0.8% to 2% and established scores based on the morphology of the DMS, "0" corresponding to a megakaryocyte with absence of platelet territories, and "4" to a cell with the presence of platelet territories mostly resembling the *in situ* differentiation (Figure - III-3D). The higher the MC concentration, the more organized was the DMS, with an optimal concentration at 2%. Only very few viable cells were recovered at 2.5% (data not shown). These data suggest that increasing the viscosity, hence stiffness, of the growth environment led to a maturation level closer to that occurring in the bone marrow. We evaluated the physical properties of MC and found that at a concentration of 0.8% MC behaves as a viscous liquid. By contrast, at a concentration of 2%, the hydrogel acquires a solid-type response after 4h at 37°C, with a stiffness (storage modulus or elastic modulus, G') ranging from ≈ 2 Pa after 6h to ≈ 700 Pa after 78h at 37°C (Figure - III-4). This stiffness is in the same order of magnitude than that measured in mouse bone marrow, determined to be 300 Pa (Shin et al., 2013). Thus, increasing stiffness up to that of the marrow tissue may recreate some physical constraints that could explain in part the improvement in cytoplasmic architecture of the megakaryocyte.

MC culture reproduces *in situ* morphological defects of *Myh9*^{-/-} megakaryocytes

We then asked whether 2% MC hydrogel culture could recreate some abnormal features observed in the bone marrow of *Myh9*^{-/-} mice. As shown in Figure - III-4, *Myh9*^{-/-} bone marrow progenitors differentiated in MC gel adopted an abnormal morphology. Instead of being relatively spherical, some of them presented extensions or constricted area. These shapes resemble the invasive morphology present *in situ* (Figure - III-2C), thus further suggesting that the 3D culture in MC gel better reproduces *in situ* megakaryocyte differentiation.

Megakaryocytes differentiation is improved in MC cell culture

To examine whether the increased organization of DMS was associated with an overall increase in the differentiation of megakaryocytes, we looked at other markers. As shown by flow cytometry, CD41 expression was similar in liquid and MC culture conditions, indicating that culture in MC gel is not detrimental for platelet marker expression (Figure - III-6A). The second marker examined was ploidy, reflecting the endomitosis activity. We observed a shift towards higher ploidy values when cells were grown in MC gel (Figure - III-6B), with a modal ploidy of $\geq 8N$ cells of $28.09 \pm 2.41N$ in liquid cultured cells versus $36.49 \pm 3.84N$ in MC cultured cells. Overall, these data suggest that MC gel culture tends to increase megakaryocyte differentiation level.

Increased proplatelets formation from 3D cultured megakaryocytes

We next evaluated if this increased maturation level, especially the DMS organization improvement, resulted in an increased proplatelet formation. As MC-embedded megakaryocytes do not display proplatelets in a way that is comparable with liquid-grown cells, we re-suspended MC-cultured megakaryocytes in liquid medium at day 3. After 24 hours, the proportion of megakaryocytes forming proplatelets was counted by observation of the bottom of the wells. The morphology of megakaryocytes extending proplatelets was similar whether they had initially grown in liquid or gel medium (Figure - III-7A and B). By contrast, the proportion of megakaryocytes forming proplatelets was significantly increased when progenitors were differentiated in MC gel ($43 \pm 4\%$ proplatelets-forming megakaryocytes as compared to $30 \pm 3\%$ in liquid culture) (Figure - III-7C). Overall, these data suggest that the increased level of differentiation and DMS structuration in MC gel culture translates into increased proplatelets formation.

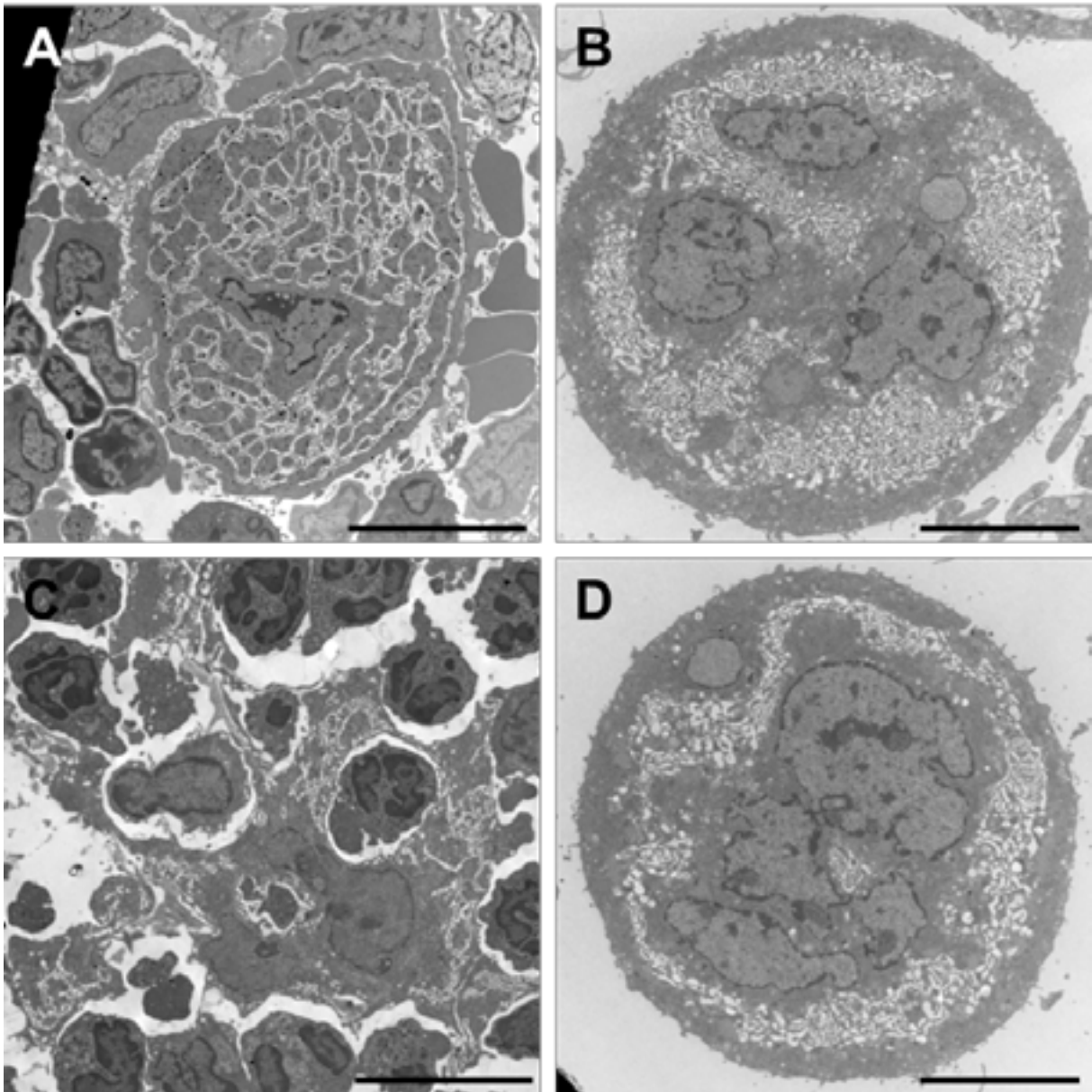


Figure - III-2: The bone marrow environment strongly influences WT and *Myh9*^{-/-} megakaryocytes maturation

TEM images from WT (A, B) and *Myh9*^{-/-} (C, D) megakaryocytes differentiated *in situ* (A, C) or *in vitro* (liquid) (B, D). WT and *Myh9*^{-/-} cells look very dissimilar *in situ* (A, C), while no difference can be seen when differentiated *in vitro* (B, D). Scale bars = 10µm.

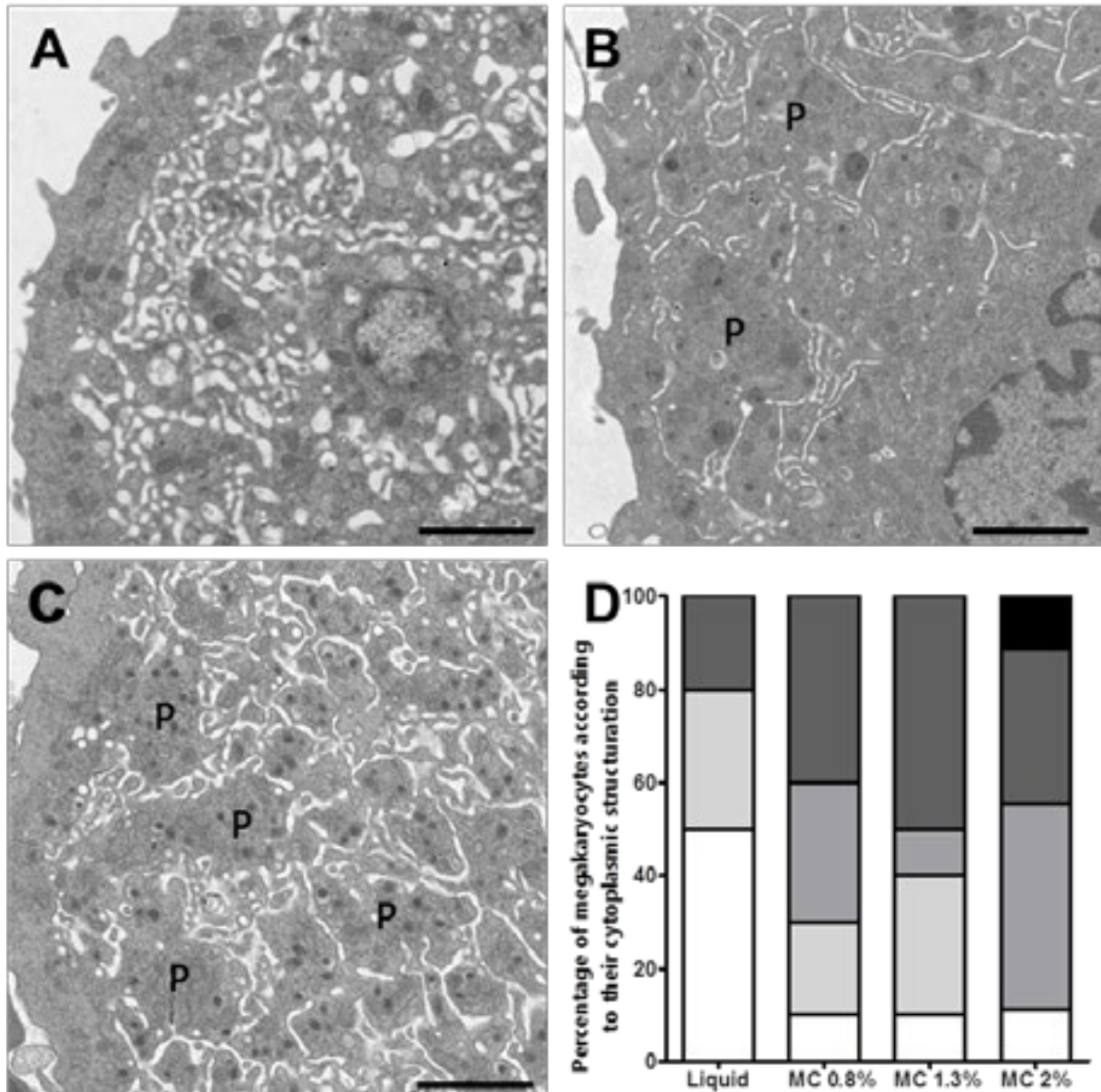


Figure - III-3 : MC-cultured WT megakaryocytes display an improved cytoplasm organization

TEM images from *in vitro* liquid-cultured (A) or MC-cultured (B), and *in situ* (C) megakaryocytes. (D) Quantification of the aspect of the cytoplasm according to MC concentration. Scores are 0 (□, no platelet territories), 1 (▤, one or two platelet territories), 2 (▥, several platelet territories can be seen but are restricted to a limited surface of the cytoplasm), 3 (▧, almost all cytoplasm is filled with platelet territories) as for (B), and 4 (■, similar to *in situ* megakaryocytes, cytoplasm is entirely partitioned into platelet territories and resemble *in situ* megakaryocytes). "P" indicates platelet territories. Scale bars = 2 μm.

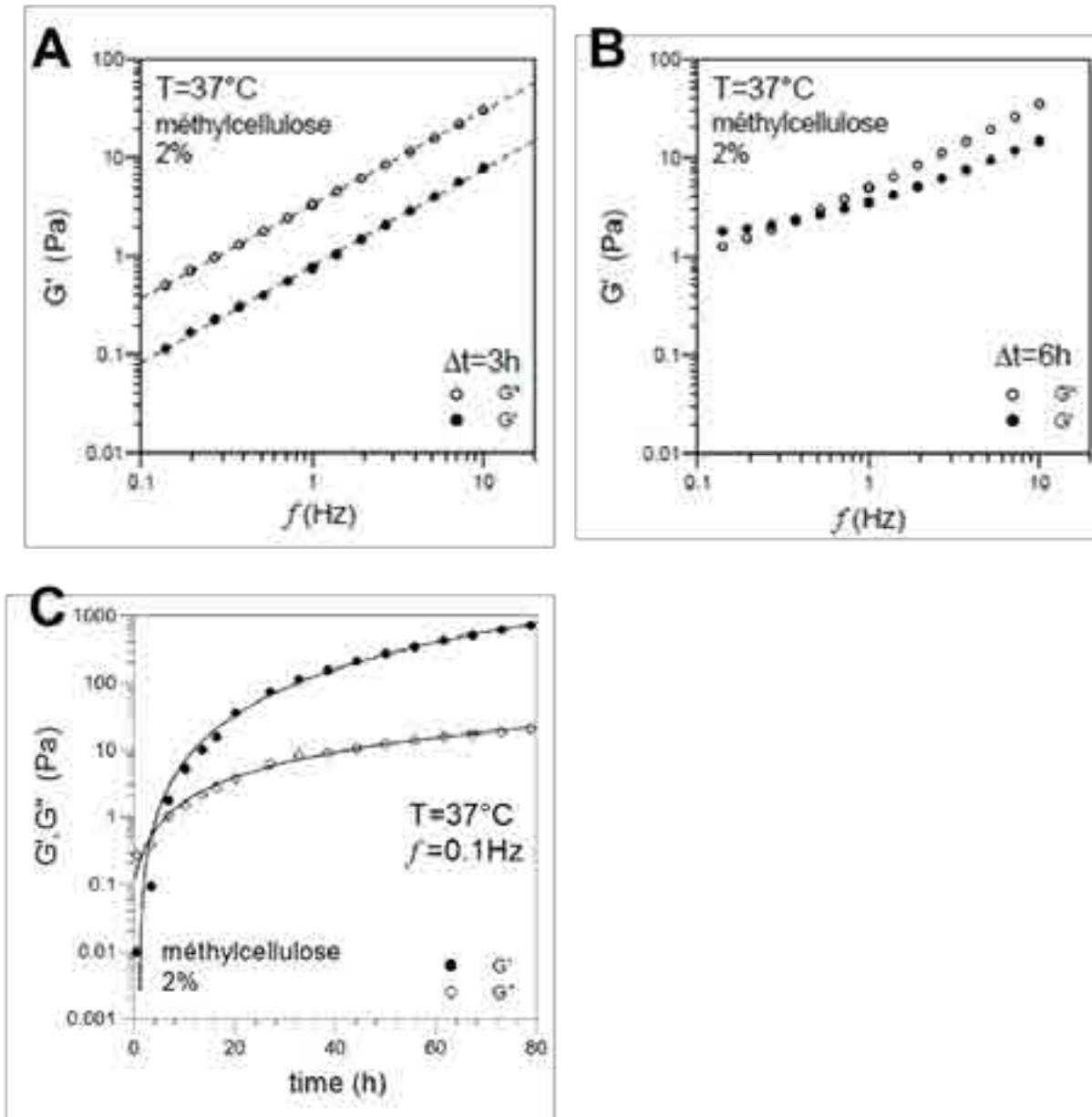


Figure - III-4 : Methylcellulose viscoelastic properties evolution at 37°C

Evaluation of elasticity (G') and viscosity (G''), according to frequency, of 2% MC heated to 37°C for 3h (A) (gel point of the solution as G' and G'' are parallel), and 6h (B), showing that MC has become a gel at this time (G' and G'' crosses). (C) Evolution of elasticity (G') and viscosity (G'') of the 2% MC solution at 37°C at a 0.1Hz frequency according to time. G' crosses G'' after 4h, indicating liquid to gel transition. (n=1)

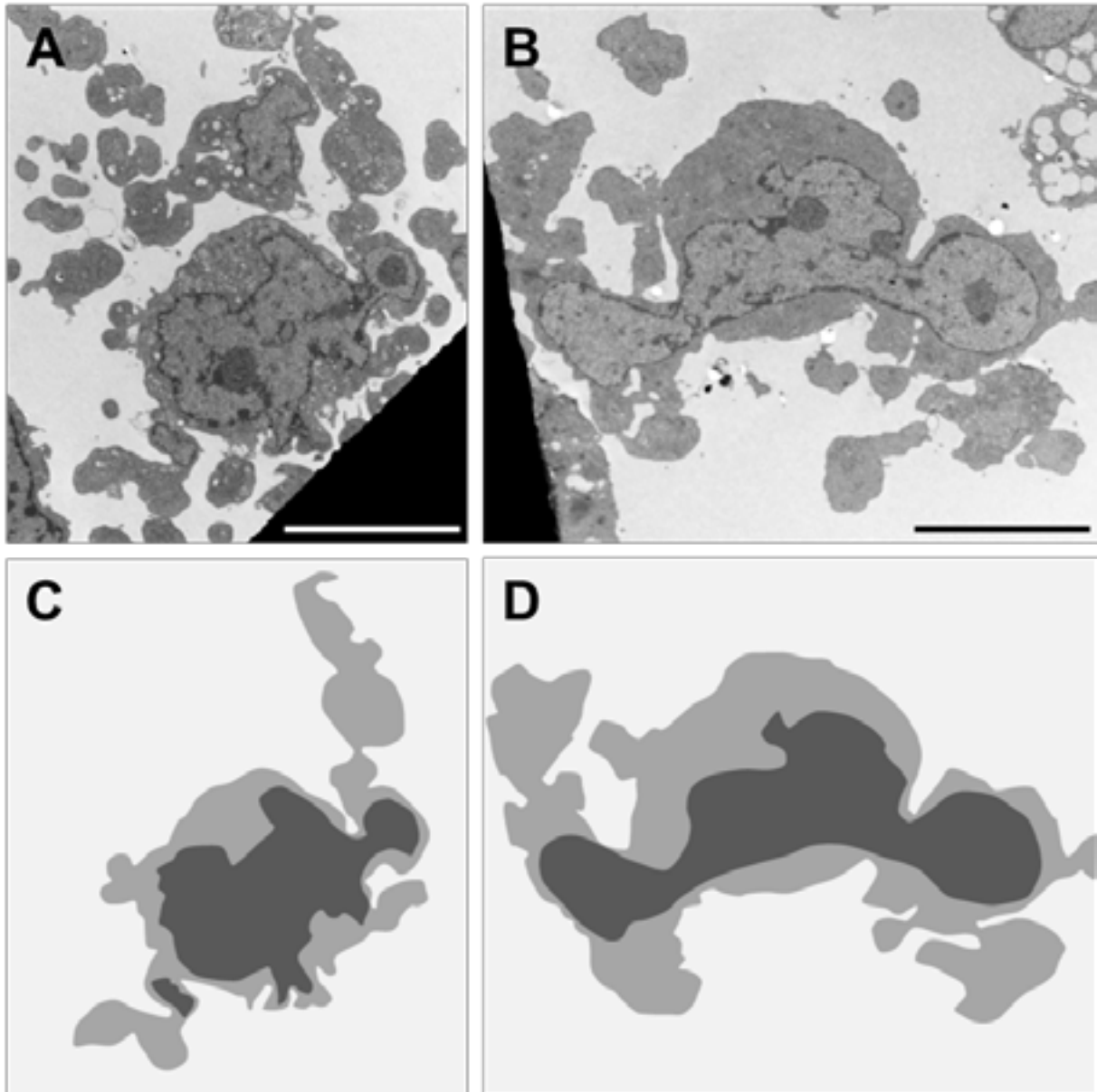


Figure - III-5 : MC-cultured *Myh9*^{-/-} megakaryocytes display an abnormal morphology

(A, B) Transmission electron microscope images from MC cultured *Myh9*^{-/-} megakaryocytes. Cells display abnormal morphology that resembles that of *in situ* *Myh9*^{-/-} megakaryocytes. Scale bars = 10 μ m. (C, D) Silhouettes of cytoplasm (■) and nucleus (■) of the megakaryocytes observed in A and B.

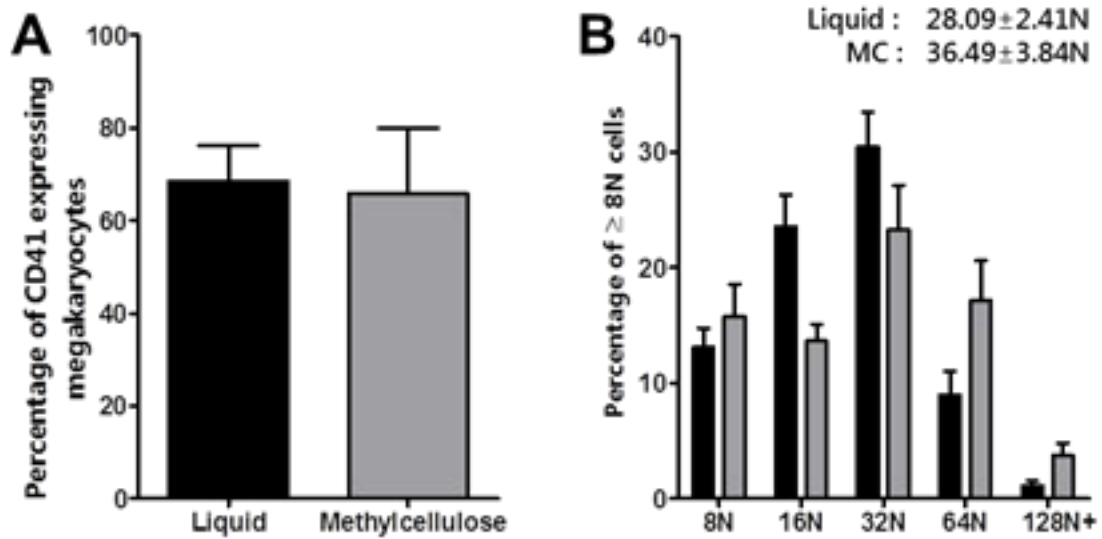


Figure - III-6 : MC culture improves megakaryocytes ploidy

(A) Flow cytometry measurement of CD41 expression in $\geq 8N$ megakaryocytes from day 4 cultures in liquid medium or MC gel (n=2). (B) Ploidy class frequencies among $\geq 8N$ megakaryocytes cultured in liquid medium (■) or MC gel (□). Modal ploidies are indicated at upper right. (n ≥ 4)

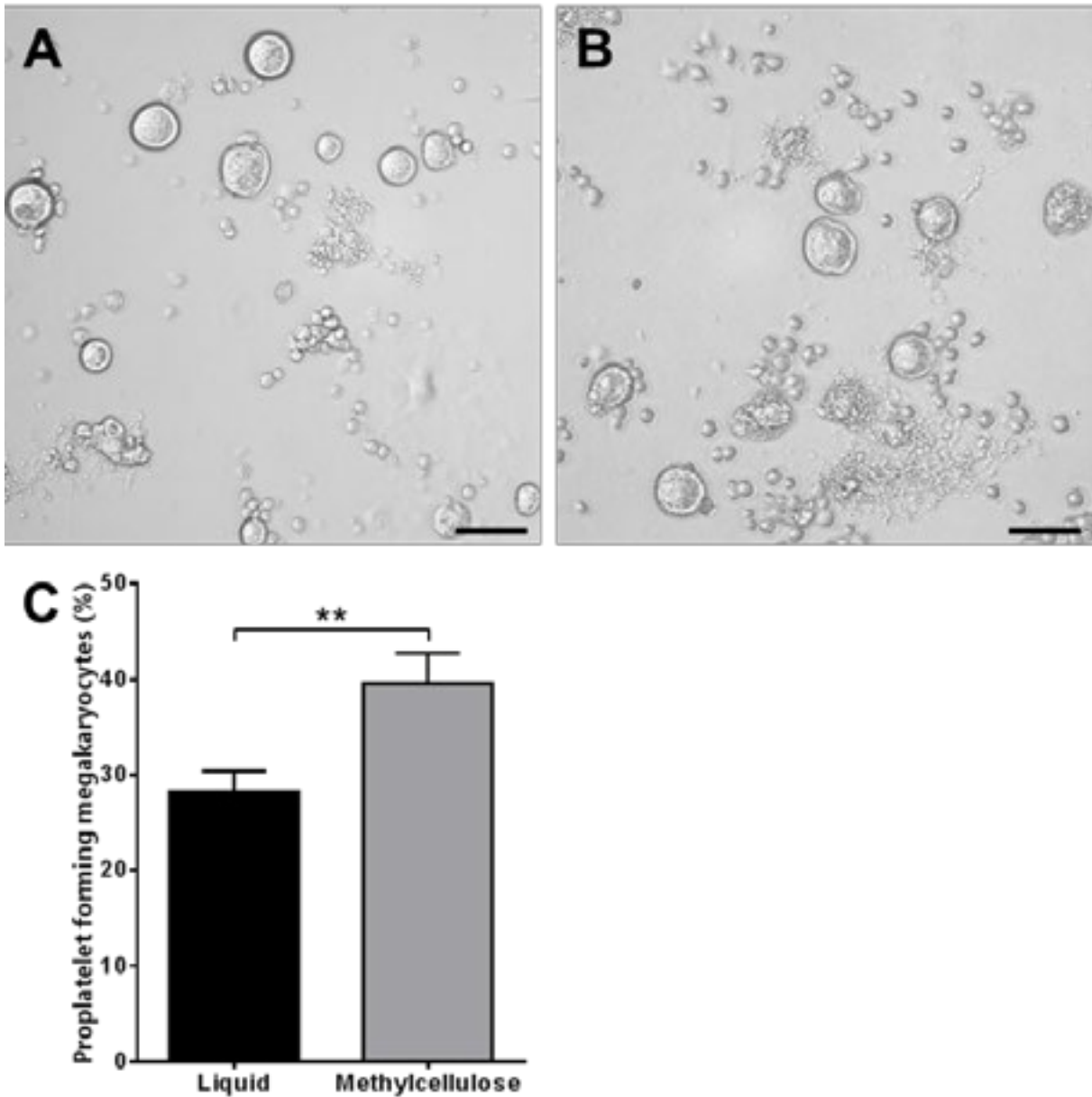


Figure - III-7 : More megakaryocytes form proplatelets when cultured in MC gel

Images of (A) liquid-cultured, and (B) MC-cultured proplatelets-forming megakaryocytes at day 4. (C) Quantification of proplatelets-forming megakaryocytes from liquid or MC cultures. (n=5, student T-test $p < 0.005$). Scale bars = 50 μm .

Discussion

Nous avons observé que la différenciation de progéniteurs mégacaryocytaires *in vitro* en milieu liquide entraîne l'apparition d'une ultrastructure qui diffère de celle observée *in situ* sur plusieurs points, dont notamment l'organisation du DMS. L'utilisation d'un gel de méthylcellulose à 2% permet d'améliorer notablement la structuration du DMS et du cytoplasme des mégacaryocytes, ainsi que d'augmenter leur ploïdie. Au final, ces mégacaryocytes forment des proplaquettes en proportion plus importante que lors d'une culture en milieu liquide. Tous ces points indiquent une amélioration de la maturation mégacaryocytaire dans notre système.

Ces travaux restent préliminaires et nous ne connaissons pas le ou les mécanisme(s) impliqué(s) dans cette amélioration. Nous avons pu mesurer que la méthylcellulose à 2%, qui constitue la concentration optimale, forme à 37°C un gel de rigidité faible (quelques centaines de Pascals), comparable à celle mesurée dans de la moelle osseuse (Shin et al., 2013). Ceci conforte l'hypothèse que la rigidité et une structure en 3D du milieu de culture influencent la différenciation mégacaryocytaire. Il a déjà été démontré que les supports de rigidité faible permettent d'augmenter la ploïdie des mégacaryocytes (Shin et al., 2011) selon un mécanisme myosine II dépendant. Il est par ailleurs connu que la cellule réagit à la rigidité du substrat via l'actomyosine (Engler et al., 2006). Ainsi, la myosine IIA, la seule myosine II retrouvée dans les mégacaryocytes matures, est impliquée dans des processus dynamiques sur des supports de faible rigidité et, au contraire, s'engage dans des adhésions stables sur des supports de rigidité élevée (Raab et al., 2012). Cet engagement concerne essentiellement les fibres de stress et l'activation des intégrines, deux éléments impliqués dans les adhésions focales. De manière intéressante, l'activation des intégrines dépend également de la rigidité du substrat (Wei et al., 2008). A la lumière de ces informations, il paraît pertinent d'étudier l'état d'activation des intégrines mégacaryocytaires et la dynamique de la myosine dans notre système de culture. Ces questions font partie de nos perspectives dans la poursuite de ce travail.

L'impact de protéines de MEC dans nos cultures en méthylcellulose est un point intéressant qui reste à tester. Il est connu que le mégacaryocyte synthétise et sécrète sa propre MEC (Kyriakides et al., 2003; de Larouzière et al., 1998; Malara et al., 2010, 2011) et, de même, les cellules stromales présentes dans nos cultures sont susceptibles de produire de la MEC. Il serait donc intéressant de pouvoir vérifier si les mégacaryocytes différenciés en hydrogel de méthylcellulose entrent en contact avec des éléments de MEC, et d'en évaluer l'impact sur leur maturation, notamment vis-à-vis des intégrines et de la myosine IIA. Ce raisonnement est soutenu par le fait que la culture de

Mégacaryocytes et environnement médullaire : Culture 3D.

mégacaryocytes *Myh9*^{-/-} en méthylcellulose 2% permet de reproduire des anomalies morphologiques similaires à celles observées *in situ*, contrairement à la culture en milieu liquide.

Toutefois, parmi les autres mécanismes envisageables, nous ne pouvons pas exclure que les effets que nous observons soient en partie dus à l'influence du gel de méthylcellulose sur la diffusion de facteurs solubles dans le milieu de culture. Il est notamment connu que des gels de cellulose modifiée limitent la diffusion de molécules solubles (Gao and Fagerness, 1995). Il est possible que cette influence puisse modifier la communication autocrine ou paracrine entre les cellules présentes dans nos cultures, par exemple en limitant la diffusion de facteurs inhibiteurs de la mégacaryopoïèse provenant de cellules stromales.

Dans la suite de ce travail, nous nous attacherons à comprendre les modifications qui interviennent lors de la maturation des mégacaryocytes en méthylcellulose, par rapport au milieu liquide. Une approche transcriptomique ciblée sur la régulation du cytosquelette et la signalisation des intégrines pourrait permettre de vérifier l'influence de la rigidité du gel sur ces paramètres.

Partie IV - Caractérisation de la souris Pf4-cre.

Etudes de la lignée MK grâce aux souris KO : nécessité du ciblage

L'étude des mécanismes biologiques s'appuie de manière importante sur des systèmes de gain/perte de fonction afin de déduire le rôle ou l'implication d'une protéine donnée chez l'animal. Cependant, modifier l'activité de certains gènes de manière ubiquitaire peut entraîner des phénotypes complexes, qui masquent un rôle plus subtil de la protéine ciblée dans certains types cellulaires. Dans ce contexte, la possibilité d'adopter une approche gain/perte de fonction de manière tissu-spécifique constitue un atout majeur. De tels systèmes ciblant les mégacaryocytes existent chez la souris et s'appuient sur l'activité du promoteur du gène de l'intégrine α IIb (CD41) ou du gène *Pf4* pour induire la surexpression ou l'inactivation d'un gène ciblé (Höckner, 2011; Nguyen et al., 2005; Nowakowski et al., 2011; Parrilla, 2011; Tiedt et al., 2007).

La lignée transgénique murine « Pf4-cre »

La souris « *Pf4-cre* » générée en 2007 par Ralph Tiedt et collaborateurs est aujourd'hui l'outil le plus utilisé (plus d'une soixantaine d'articles à ce jour, voir Table - IV-1) pour induire l'inactivation d'un gène spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire. La conception de cette lignée est basée sur des travaux indiquant l'expression spécifique du gène *Pf4* dans les mégacaryocytes (Poncz et al., 1987; Ravid et al., 1991). La construction de ce transgène repose sur l'insertion d'un BAC (Bacterial Artificial Chromosome) qui comporte les gènes de cinq cytokines : *Cxcl3*, *Cxcl4* (*Pf4*), *Cxcl5*, *Cxcl7* et *Cxcl15*. Le premier exon du gène *Pf4* a été remplacé par le gène de la cre recombinase, permettant l'action du système cre/lox sous contrôle du promoteur *Pf4* (Sauer and Henderson, 1988). S'il a été vérifié que cette construction n'est insérée qu'en une seule copie, la taille du transgène et son locus d'insertion ne sont pas connus (Tiedt et al., 2007). Il existe une autre lignée de souris exprimant la cre recombinase sous contrôle du promoteur *Pf4*, générée indépendamment de la première et qui se base sur une séquence promotrice courte du gène *Pf4* (Zhou et al., 2013). L'utilisation de cette seconde lignée semble limitée à une seule étude à l'heure actuelle.

Recombinaison non-hématopoïétique avec le système Pf4-cre

Une part importante de notre stratégie de recherche s'appuie sur l'utilisation de la souris *Pf4-cre*, or, la spécificité tissulaire de ce système est actuellement discutée. En effet, plusieurs études proposent une expression de *Pf4* dans plusieurs populations hématopoïétiques non

Caractérisation de la souris Pf4-cre.

mégacaryocytaires, telles que les monocytes, certains macrophages ou encore les cellules dendritiques (Furuya et al., 2012; Maier et al., 2009; Schaffner et al., 2005). Une étude récente suggère également, de manière alarmante, que cette construction Pf4-cre entrainerait une recombinaison allant jusqu'à 50% des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (Calaminus et al., 2012).

En plus de cela, nous avons récemment remarqué que certains paramètres diffèrent entre les souris *Pf4-cre* et les souris de référence C57BL/6J, de manière discrète mais statistiquement significative (numération plaquettaire diminuée de 15%, doublement de la quantité de CXCL5 plasmatique, données personnelles). Ces observations soulignent le fait qu'une attention particulière doit être portée au choix des lignées témoins lors d'une étude utilisant les souris *Pf4-cre*.

Pour finir, la cinétique d'expression du transgène n'est pas connue au cours de la mégacaryopoïèse, alors que cette information est capitale pour la bonne interprétation des travaux qui ciblent les étapes précoces de la mégacaryopoïèse (endomitoses, mise en place du DMS, apparition des granules,...). En effet, l'extinction d'une protéine avec ce système dépend d'abord de l'expression de la cre recombinase, puis dans un second temps de la stabilité de la protéine et de l'ARNm correspondant. Une expression précoce du transgène est donc essentielle pour affecter l'initiation de la mégacaryopoïèse.

L'ensemble de ces données nous a décidé à caractériser plus avant la souris *Pf4-cre*, avec comme problématiques la détermination du stade d'expression du transgène Pf4-cre dans la lignée mégacaryocytaire et la vérification de la spécificité tissulaire de cette construction. Dans un troisième temps nous avons également évalué l'impact de ce transgène sur les paramètres spécifiques de plaquettes et des mégacaryocytes (maturation, morphologie et densité des mégacaryocytes, numération plaquettaire, fonctions plaquettaires, expression des gènes de cytokines théoriquement présents dans cette construction).

Article en préparation - **Evidence for non-hematopoietic Cre activity in Pf4-Cre mice.**

Fabien Pertuy¹, Catherine Strassel¹, Anita Eckly¹, Jean-Noël Freund², Isabelle Duluc², Christian Gachet¹, François Lanza¹ and Catherine Léon¹

¹ UMR_S949, Inserm, Université de Strasbourg, EFS-Alsace, Strasbourg, France.

² UMR_S1113, INSERM, Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, France.

Abstract

Transgenic mice expressing the cre recombinase under the control of the *Pf4* promoter have become a critical tool for genetic modifications in the platelet lineage. However, the specificity of cre expression has recently been questioned and the expression schedule of the Pf4-cre transgene during megakaryopoiesis is still lacking. In order to characterize the expression of this transgene, we used double-fluorescent cre-reporter mice. Pf4-cre-mediated recombination occurs in all megakaryocytes, as early as stage I of maturation. In blood, whereas all platelets display the hallmark of recombination, less than 0.5% circulating leukocytes have recombined, which is at variance with a previous report. Strikingly, recombination occurred in infiltrated cells identified as a subpopulation of F4/80-positive macrophages present in all tissues observed. Unexpectedly, a subset of epithelial cells from the colon and rectum showed evidence for recombination due to endogenous Pf4-cre expression. This ectopic expression is likely cause of the tumor development in colon from *Apc^{flox/flox};Pf4-cre* mice. Altogether, our results indicate early recombination with full penetrance in megakaryopoiesis and confirm the usefulness of *Pf4-cre* mice for the genetic engineering of megakaryocytes and platelets. Nevertheless, care must be taken when using these mice since Pf4-cre-driven alteration of certain genes can lead to off-target parasite phenotypes.

Introduction

The availability of a mouse strain that allows inactivation of target genes in specific cells or tissues greatly improved the study of genes ubiquitously expressed or embryonic lethal. Such a transgenic line expressing the cre recombinase under the control of the Platelet factor 4 gene promoter (*Pf4*, also known as *Cxcl4*) allows gene inactivation in the megakaryocytic lineage (Tiedt et al., 2007). The "*Pf4-cre*" strain has been a very popular tool for testing the role of a series of genes in the platelet lineage, and has been used in more than 60 publications so far (See Table - IV-1).

However, a number of studies have raised questions on the reliability of the *Pf4-cre* mouse for megakaryocytic restricted recombination. Firstly, *Pf4* expression has been reported in non-megakaryocytic hematopoietic cells such as monocytes (Schaffner et al., 2005), dendritic cells (Maier et al., 2009) and macrophages (Adlard et al., 2014; Furuya et al., 2012). Secondly, a recent study using a *Pf4-cre* reporter strain reported 15-60% recombination in other myeloid and lymphoid lineages as well as in adult hematopoietic stem and progenitor cells (Calaminus et al., 2012). Another point that has not been fully explored concerns the expression schedule of the *Pf4-cre* transgene during megakaryopoiesis, questioning the reliability to inactivate genes expressed during the course of megakaryocyte maturation.

In this study, we address questions concerning *Pf4-cre*-mediated recombination in non-megakaryocytic hematopoietic cells, and more broadly in various embryo and adult mouse organs, as well as the expression schedule of the *Pf4-cre* transgene during megakaryocyte maturation. For this purpose, we used a global double-fluorescent Cre reporter mouse line (*mT/mG*) crossed with the *Pf4-cre* line. We show that *Pf4-cre* mediated recombination occurs as early as stage I of megakaryocytic development. Contrary to previous studies, we observed that only a subset of monocytes/macrophages has recombined. More surprisingly, we present evidence for an endogenous recombination in a subset of distal intestinal epithelial cells that may lead to unexpected phenotype in this particular tissue.

Material and Methods

Materials

Anti-Terr119-PerCP/Cy5.5 was from BD Biosciences (Rungis, France). CTAD (citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole) was from BD Vacutainer (Rungis, France). 7AAD was from Beckman Coulter (Nyon, Switzerland). Anti-CD45-AF647, Anti F4/80-AF647 (clone BM8) and streptavidin-PE/Cy7 were from Biolegend (London, UK). Anti- β -catenin (mouse clone 14) and anti-GFP were respectively from Transduction Lab, San Rose, CA and from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Anti-CD42 antibody (RAM.1) was produced in the lab (Perrault et al., 2001) and coupled with either AlexaFluor 647 or biotin. DAPI and Ficoll (Histopaque) were from Sigma-Aldrich (Rueil-Malmaison, France). Recombinant hirudin rHV2-Lys47 (r-hirudin) was kindly provided by Transgène (Strasbourg, France). Apyrase was homemade (Cazenave et al., 1983).

Animals

Reporter mice (B6.129(Cg)-*Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}*) (named hereafter *mT/mG*) (Muzumdar et al., 2007) were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). This transgenic mouse contains a cassette inserted at the *rosa26* locus and composed of a floxed gene encoding a membrane-targeted tdTomato (mT) (tandem dimer Tomato, a Red Fluorescent Protein variant), followed by a gene encoding a membrane-targeted eGFP (mG) (enhanced Green Fluorescent Protein). Recombination by the cre recombinase induces the excision of the tdTomato gene (loss of red fluorescence) and leads to the expression of eGFP (appearance of green fluorescence). Double heterozygous *mT/mG;Pf4-cre* mice were generated by crossing *mT/mG* mice (Muzumdar et al., 2007) with *Pf4-cre* mice (Tiedt et al., 2007). *Apc^{flox/flox}* mice carrying a conditionally targeted allele of *Apc* were generously provided by Bart O. Williams (Qian et al., 2008). *Apc^{flox/flox};Pf4-cre* mice were generated by crossing *Apc^{flox/flox}* mice with *Pf4-Cre* mice. Four week-old nu/nu female mice were purchased from Janvier Labs.

For grafting experiments, segments corresponding to the presumptive colon of 12.5 dpc embryos were implanted under the back skin of nu/nu mice as described (Duluc et al., 1994), and analyzed 5 to 8 weeks later.

Flow cytometry

Whole blood was drawn on a 2X anticoagulant buffer (1:1) to minimize platelet-leukocyte aggregate formation (1X anticoagulant buffer: 1:9 CTAD, 100 U/ml hirudin, 0.014 U/ml apyrase

Caractérisation de la souris Pf4-cre.

and 0.35% human albumin). Red blood cells lysis was induced by diluting blood at 1:19 in AcK buffer (Ammonium chloride 150 mM, potassium bicarbonate 10 mM, EDTA 0.1 mM). Blood cells were concentrated by centrifugation and suspended in 1X anticoagulant buffer. Cells were incubated with anti-CD42-biotin, anti-Terr119-PerCP/Cy5.5 and anti-CD45-AF647 antibodies for 30 min, washed in 1X anticoagulant buffer, incubated with streptavidin-PE/Cy7 for 30 min, centrifuged and resuspended in 1X anticoagulant buffer containing 7AAD viability dye.

Measurements were performed on a six colors Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) equipped with 488 nm and 633 nm lasers. Cell doublets were eliminated using side scatter pulse width/height, forward scatter pulse width/height and forward scatter pulse area/height methods. Viable cells were gated according to 7AAD negative staining. Leukocytes were gated according to side scatter and CD45 positive signals. Leukocyte/platelets aggregates were eliminated according to CD45 and CD42 double positive signal. The remaining CD45 and eGFP double positive events were considered as recombined leukocytes. Platelets were gated according to forward scatter and CD42 positive signal.

Confocal microscopy

Adult mouse tissues were fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in sucrose and frozen for cryosection. Embryos were harvested at 14.5 dpc, fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected and frozen in gelatin for cryosection. Slices of 6 μ m were cut and mounted unlabeled or immunolabeled. Leukocyte fraction of ficoll gradient was obtained from whole blood, fixed in 4% paraformaldehyde and cyospun on poly-L-lysine coated microscopy slides. Immunolabelings were performed using anti-CD42-AF647, anti-CD45-AF647 or anti-F4/80-AF647 antibodies. Nuclei were stained using DAPI.

Samples were observed under a TCS SP5 confocal microscope using Leica Application Suite Advanced Fluorescence software (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

Immunogold Transmission Electron Microscopy

For gold immunolabeling, *mT/mG;Pf4-cre* mouse bone marrows were fixed in 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde, infiltrated with 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Ultrathin sections (70 nm) were incubated with anti-GFP or irrelevant antibodies followed by 10 nm gold-conjugated protein A and then stained with 1.8% uranyl acetate/0.2% methylcellulose. Samples were observed under a CM120 transmission electron microscope (FEI, The Netherlands).

Immunohistochemistry

Fragments originating from the colon, from colonic tumors and from grafts were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (6 µm) were deparaffinized and heated in 10 mM citrate buffer pH6.2 in a pressure cooker for antigen retrieval.

Immunohistochemistry was performed with the appropriate primary antibodies and revealed with biotinylated secondary antibodies after amplification with the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories Inc), as recommended by the supplier.

Results

Early expression of Pf4-cre transgene in all megakaryocytes

Pf4-cre mice are widely used to inactivate genes in the megakaryocytic lineage, but its specificity has been challenged and the timing of Pf4-cre mediated recombination along megakaryocyte differentiation is still unknown. We crossed *Pf4-cre* mouse with *mT/mG* reporter mouse (Muzumdar et al., 2007) to investigate these points. Cre-mediated recombination, witnessed by the expression of eGFP, was then analyzed in the bone marrow by confocal microscopy analysis, revealing that all the CD42-positive megakaryocytes had recombined (Figure - IV-1A).

To more precisely evaluate the stage at which recombination occurs, we performed immunogold labeling using an anti-eGFP antibody and TEM observation. The earliest morphologically identifiable megakaryocytes (stage I, megakaryoblasts) were already gold-labeled, with a membranous distribution of eGFP (Figure - IV-1B-C). These results demonstrate that recombination occurs early in the course of megakaryocytic maturation, and affects the entire population of megakaryocytes.

Pf4-cre recombination is minor event among circulating leukocytes

Some CD42-negative eGFP-positive small nucleated cells were also observed in the bone marrow from *mT/mG;Pf4-cre* mice (Figure - IV-1A, arrows) in addition to recombined megakaryocytes. These could represent CD42-negative early megakaryocyte progenitors, or recombined cells from other hematopoietic lineages. To test for the second possibility, whole blood was analyzed by flow cytometry to check for recombined cells outside the platelet lineage by labeling with the pan-leukocyte marker CD45. To reduce leukocyte-platelet aggregates, we optimized the anticoagulant cocktail and we excluded the remaining aggregates from the analysis (approximately 5% of total leukocytes). As expected, all the platelets were recombined (Figure - IV-2A) ($99.14 \pm 0.18\%$ eGFP-positive platelets, compared to a background signal of $0.11 \pm 0.02\%$ in C57BL/6 control mice, mean \pm sem, $n \geq 10$). In the leukocyte population, we found that only $0.31 \pm 0.09\%$ (mean \pm sem, $n=3$) of CD45-positive cells were eGFP-positive in the reporter mice, as compared to a background signal of $0.02 \pm 0.01\%$ in C57BL/6 control mice (Figure - IV-2B). Confocal microscopy observation of the leukocyte fraction isolated from whole blood confirmed that eGFP-positive nucleated cells were rarely observed (Figure - IV-2C). Such cells exhibited both membranous eGFP signal and CD45 labeling, which distinguish them from platelet-leukocyte

aggregates (Figure - IV-2D-E). These results demonstrate that Pf4-cre expression does occur outside the megakaryocytic lineage, in a very small proportion of circulating leukocytes.

Recombined infiltrated cells in mouse embryo and adult organs.

The presence of eGFP-positive cells outside the megakaryocytic lineage led us to explore other tissues. To view multiple tissues at once, we observed whole 14.5 dpc embryo cryosections by confocal microscopy. Large eGFP-positive cells with multilobulated nuclei were identified as megakaryocytes in the fetal liver, confirming recombination in this lineage at this embryonic stage (Figure - IV-3A, C). Small eGFP-positive CD42-negative cells were also observed in several organs throughout the embryo (Figure - IV-3B, Figure - IV-8) or forming clusters in the fetal liver (Figure - IV-3D). Some of these cells appeared to be infiltrating the non-hematopoietic tissues and were positive for F4/80 labeling (Figure - IV-3E), indicating a monocyte/macrophage origin.

Infiltrated eGFP-positive small cells were also present in all adult organs that were observed (brain, liver, heart, kidney, stomach, lungs) (Figure - IV-4A, i-vi). The vast majority of these recombined cells were positive for F4/80 labeling (Figure - IV-4Bi-ii). However, we observed that not all F4/80 positive cells were eGFP-positive, suggesting that recombination is restricted to a subpopulation of these macrophages (Figure - IV-4Bi). Taken together, these results indicate the presence of recombined monocytes/macrophages infiltrated in many tissues.

Pf4-cre expression in the distal intestine can lead to unexpected phenotype.

Concerning the intestine of adult mice, infiltrated cells were observed similarly to other tissues (Figure - IV-5A-E). Unexpectedly, eGFP-positive epithelial cells were also present, restricted to the colon and rectum (Figure - IV-5D-F). Recombination occurred in dispersed glands throughout the epithelium of these tissues, leading to a mosaic pattern. Frequently, only one part of the gland was eGFP-positive (Figure - IV-5F), suggesting recombination had taken place in a few progenitor cells. Recombination was not observed in the intestine in 14.5dpc *mT/mG;Pf4-cre* embryos (Figure - IV-8) or newborn mice (data not shown), indicating that it takes place after birth during intestinal maturation.

This result sheds new light on defects observed within the intestine of mice obtained from a cross between *Pf4-cre* mice and *Apc^{flox/flox}* mice (Adenomatous Polyposis Coli). This strain was originally developed to evaluate the role of this microtubule binding protein and Wnt pathway regulator in the platelet lineage. Unexpectedly, *Apc^{flox/flox};Pf4-cre* mice developed rectal prolapses and exhibited an abnormal mortality rate, dying around the age of 80 days (Figure - IV-6A).

Caractérisation de la souris Pf4-cre.

Histological analysis of the intestinal tract revealed colon and rectum adenocarcinomas (Figure - IV-6B). Immunostaining of β -catenin showed accumulation of this protein with a cytoplasmic and nuclear pattern in contrast to the normal submembranous accumulation (Figure - IV-6B-C). Such β -catenin translocation is characteristic of tumor cells lacking the tumor suppressor APC (Kobayashi et al., 2000; Sheng et al., 1998).

Pf4-cre expression is endogenous in the distal intestine.

The mosaic recombination pattern observed in the distal intestine of *mT/mG;Pf4-cre* mice may indicate direct expression of the *Pf4-cre* transgene in a population of stem or progenitor intestinal cells, or fusion of a recombined monocyte/macrophage with a stem or progenitor intestinal cell. To evaluate the first possibility, we engrafted 12.5 dpc fetal presumptive colon from the *mT/mG;Pf4-cre* mice under the skin of adult nude mice (Duluc et al., 1994). This allows for maturation of the donor intestinal epithelium during several weeks in a foreign environment devoid of *Pf4-cre* expressing monocyte/macrophage. EGFP-positive epithelial cells were present in the transplanted colons (Figure - IV-7), providing evidence that the recombination observed in *Pf4-cre* mice originates from an endogenous expression of the transgene in the epithelial cells of the colon.

Discussion

In the present study we show that Pf4-cre mediated recombination occurs i) in all megakaryocytes as early as stage I of maturation, and as consequences affects all the circulating platelets; ii) in a minor proportion of non-megakaryocytic cells which were identified as a subset of monocytes/macrophages; and iii) more unexpectedly outside of the hematopoietic lineage, in epithelial cells from the colon and rectum, potentially leading to a phenotype unrelated to megakaryocytes and platelets.

Recombination in non-megakaryocytic hematopoietic cells in a subset of monocytes/macrophages is consistent with the reported detection of PF4 transcript and protein in a small fraction of monocytes and dendritic cells (Maier et al., 2009; Schaffner et al., 2005), and with the observation that $\beta 1$ integrin was not deleted in leukocytes from *Itgb1^{flox/flox};Pf4-cre* mice (Tiedt et al., 2007). Our results differ from those recently published by Calaminus *et al.* who crossed *Pf4-cre* transgenic mice with Rosa26-tdRFP reporter mice (Calaminus et al., 2012). There, expression of the tdRFP reporter gene was observed in a high proportion (15-60%) of cells from all hematopoietic lineages, including stem and progenitor cells (Calaminus et al., 2012). Technical issues could account for this discrepancy, in particular the efficiency of platelet-leukocyte aggregate removal. Another important parameter could be the inflammatory status of the mice. *Pf4* expression has indeed been reported in dendritic cells, T lymphocytes, monocytes and macrophages under a number of pro-inflammatory conditions (Adlard et al., 2014; Lasagni et al., 2007; Maier et al., 2008, 2009; Pitsilos et al., 2003). Further support for an activation of the *Pf4* promoter under inflammatory conditions has been reported during the course of our study, as the activity of the *Pf4-cre* transgene was induced in T lymphocytes following their *in vitro* activation (Shi et al., 2014).

It should be noted that recombined infiltrated cells in non-hematopoietic tissues that were negative for monocytes/macrophages marker F4/80 were scarcely observed. Whether those cells belong to some specialized F4/80-negative macrophage subpopulation (Gordon et al., 2011) or to another lineage remains to be determined. Observation of recombined cells outside the hematopoietic lineage has never been reported to our knowledge and was unexpected. Recombination in the colon and rectum epithelia is likely the explanation for the unexplained tumor development in the distal intestine of *Apc^{flox/flox};Pf4-cre* mice. Two mechanisms could contribute to this "off-target" recombination, i) cell fusion between epithelial cell and *Pf4-cre* expressing monocyte/macrophage, or ii) endogenous activation of the *Pf4* promoter in the

intestine. Cell fusion events have been reported in several tissues including the intestine (Powell et al., 2011; Rizvi et al., 2006; Silk et al., 2013), which could support this hypothesis. However, occurrence of recombined epithelial cells in the grafts implanted in nude mice, where no monocyte/macrophage expresses *mT/mG;Pf4-cre*, demonstrated intrinsic *Pf4-cre* expression in colon and rectum epithelial cells.

Although PF4 protein has long been considered as a selective marker for the megakaryocytic lineage, there has been in the last 10 years several indications for its presence in other hematopoietic lineages (Adlard et al., 2014; Furuya et al., 2012; Maier et al., 2009; Schaffner et al., 2005). Yet, regulation of *Pf4* expression outside of megakaryocytes has received little attention. RUNX1, in combination with ETS-1 and CBF β or FLI-1, has been suggested to synergistically activate the *Pf4* promoter (Okada et al., 2011, 2013). These transcription factors are also active in other non-hematopoietic cells, especially members of the ETS family have been described to control epithelial maturation in the intestine (Jedlicka et al., 2009). In addition to the unknown reason for *Pf4* expression in these tissues, it should be noted that Pf4-cre mediated recombination occurs only in some glands, and most frequently in only one half of a gland, in the intestine of *mT/mG;Pf4-cre* mice. This observation may suggest that for some yet unknown reason, only a fraction of stem cell progeny undergo recombination. Whether this is due to normal endogenous *Pf4* expression in some epithelial progeny cells or to the way the transgenic mouse line was generated is still unclear.

The *Pf4-cre* mice have been generated by insertion of a BAC construct containing four *Cxcl* genes in addition to the Pf4-cre transgene (Tiedt et al., 2007). Possible repercussions of the insertion locus or the duplication of several chemokines genes cannot be ruled out. We found that at least one of the *Cxcl* genes is active since a significant two fold increase in plasmatic level of CXCL5 has been measured in *Pf4-cre* mice (116.8 ng/mL as compared to 54.5 ng/ml in C57BL/6 controls, $p < 0.005$, personal data). We also observed a small, yet significant, 15% decrease of platelet count in *Pf4-cre* mice when compared to C57BL/6 controls (975 ± 29 and $1144 \pm 29 \times 10^3$ platelets/ μ l, respectively, $p < 0.0001$), which might be related to the BAC transgene. Yet, we did not see any difference in platelet function nor megakaryocyte number or proplatelets production between these two strains (data not shown). Nonetheless, these data indicate that *Pf4-cre* mice are the proper control to *Pf4-cre* mediated genetically modified mice, and should be chosen over the floxed-allele control in order to rule out potential differences resulting from the transgene construct.

Caractérisation de la souris *Pf4-cre*.

The precise onset of recombination during megakaryopoiesis in *Pf4-cre* mice has remained elusive. It is an important information to attribute a role of a particular gene product in megakaryopoiesis. We show by TEM that recombination occurs as early as stage I of megakaryocyte differentiation. These data suggest that *Pf4-cre* mice can be used to obtain genetic alterations of stage I-II megakaryocytes, when cells have already entered endomitosis cycles and have started to synthesize granules and the demarcation membrane system. Knowing that the total maturation time from stage I to platelet release has been estimated to 43-75 hours in the rat (Ebbe and Stohlman, 1965), and that the disappearance of a protein will vary depending on its mRNA and protein turnovers, it is not surprising that variations are observed in the disappearance of targeted proteins, some showing full extinction in megakaryocytes whereas others still have minor residual persistence in megakaryocytes or platelets (See Table - IV-1).

Taken together, our results confirm that the *Pf4-cre* mice remain the best available tool for the genetic engineering of megakaryocytes and platelets. Nevertheless, the differences observed between *Pf4-cre* and C57BL/6J mice in platelets parameters and *Cxcl* gene expression suggest that *Pf4-cre* mice must be chosen as the right control of any *Pf4-cre*-mediated engineered mice. Since *Pf4-cre* expression can take place in some other hematopoietic cells and in epithelial cells from the distal intestine, one must be cautious when evaluating the role of platelets in processes outside hemostasis and when interpreting any unexpected phenotype.

Figures

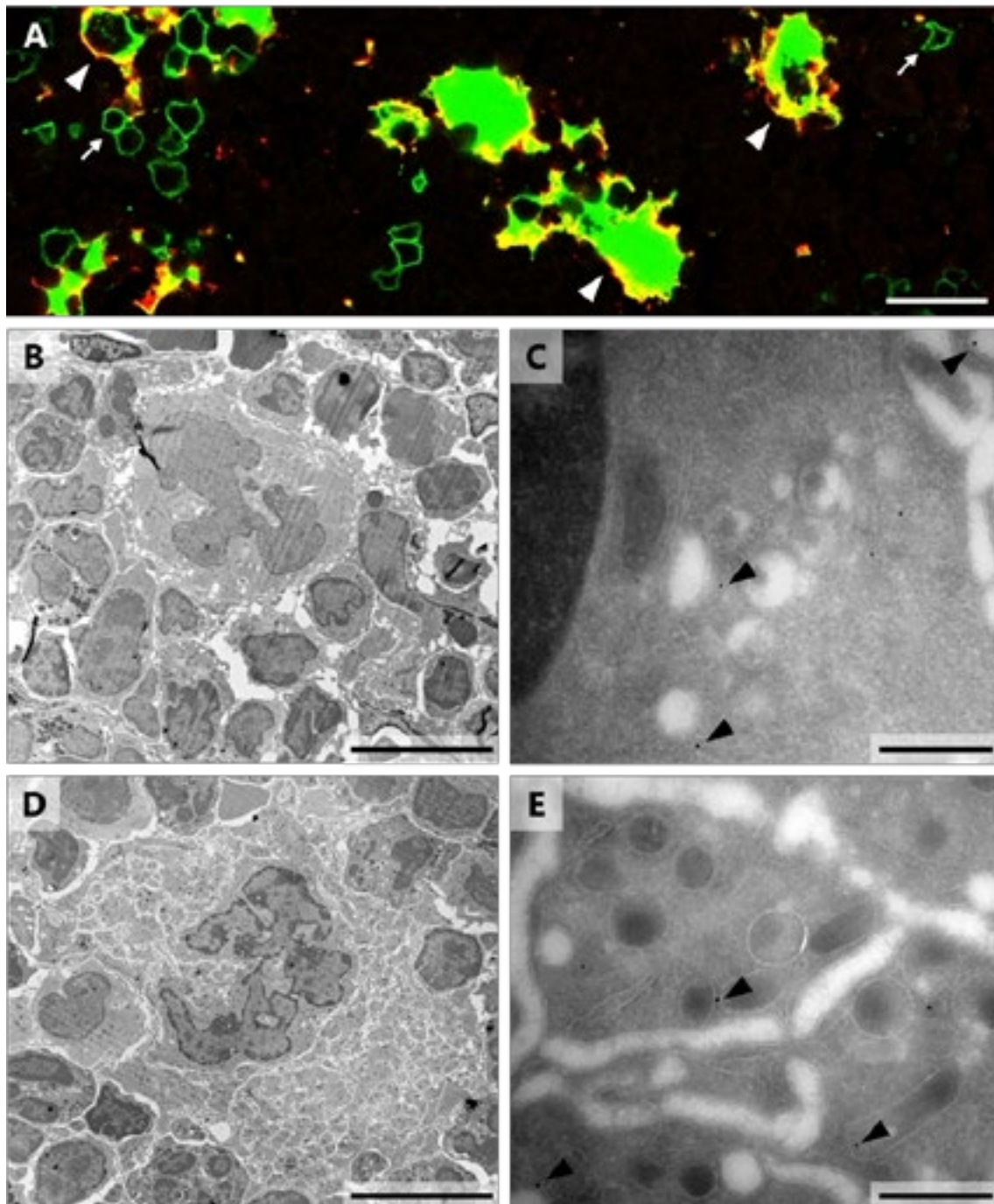


Figure - IV-1 : Pf4-cre mediated recombination occurs early in megakaryopoiesis

(A) Confocal imaging from *mT/mG;Pf4-cre* mouse bone marrow. Cre-mediated recombination is visualized by eGFP expression (green). Megakaryocytes are labeled with anti-CD42 (red) and appear yellow as they co-express CD42 and eGFP (arrowheads). Some smaller CD42-negative cells also exhibit recombination (arrows); image representative of at least 3 mouse bone marrow. (B-D) EGFP immunogold labeling of *mT/mG;Pf4-cre* bone marrow cryosections. (B) Stage I-II megakaryocyte. Such cells display gold beads (arrow heads) (C) at the surface of forming granules or DMS. (D) Stage III (mature) megakaryocyte. Such cells display gold beads (arrow heads) at the surface of granules or DMS (E). (A) Scale bar = 25 μ m, (B, D) scale bar = 10 μ m, (D, E) scale bar = 500nm

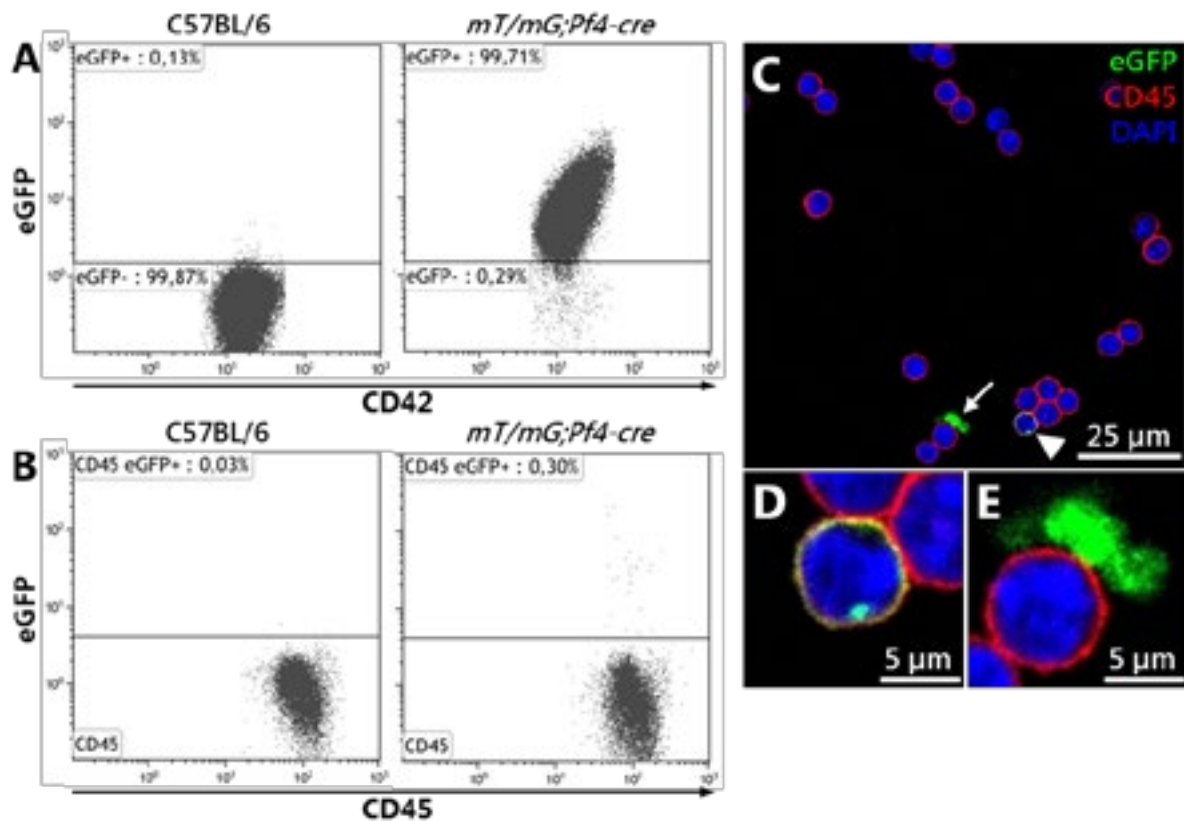


Figure - IV-2 : Minor Pf4-cre recombination among circulating CD45⁺ cells

(A) Whole blood flow cytometry analysis showing that the vast majority of platelet-sized CD42-positive events are eGFP-positive. Dot plot representative of at least 10 mice. (B) Whole blood flow cytometry analysis showing that only a minor fraction of CD45-positive cells has been recombined (eGFP+) in *mT/mG;Pf4-cre* mice (right) compared to background in control C57BL/6 mice (left). Dot plot representative of at least 3 independent experiments. (C) Confocal observation of CD45-positive blood cells. One leukocyte expresses eGFP (arrowhead, see close-up in (D)), and one cell forms an aggregate with eGFP-positive platelets (arrow, see close-up in (E)). Blue is DAPI, Green is eGFP, red is CD45 immunolabeling.

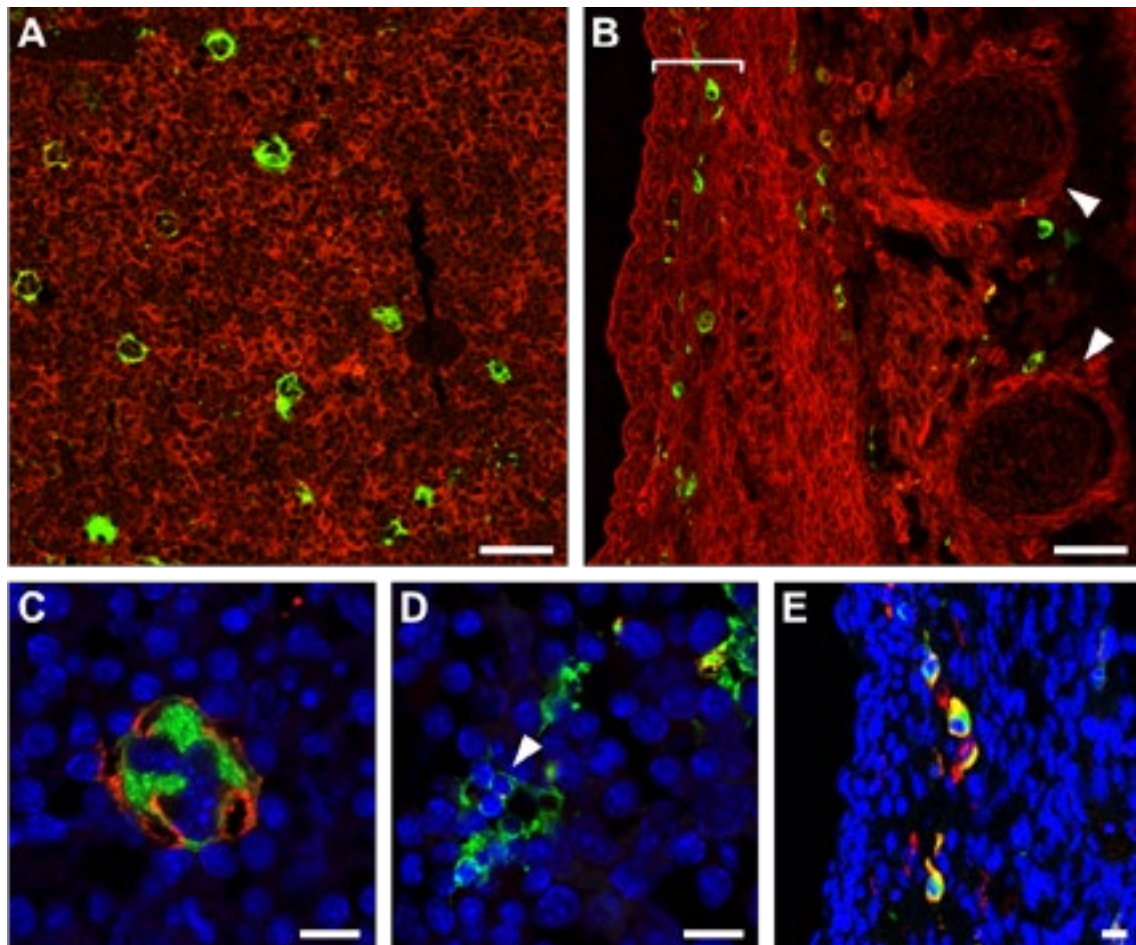


Figure - IV-3 : Recombined cells in *mT/mG;Pf4-cre* embryo

Confocal images of the fetal liver (A, C and D) and of skin (B, bracket) and somites (B, arrow heads). Fetal liver contains megakaryocytes (A and C) displaying strong eGFP fluorescence, and small non-megakaryocytic recombined cells (D). Recombined cells from non-hematopoietic tissues are F4-80 positive monocytes/macrophages (E). (A-B) Red is tdTomato and green is eGFP. (C-D) Blue is DAPI, red is CD42 immunolabeling and green is eGFP. (E) Blue is DAPI, red is F4-80 immunolabeling and green is eGFP. (A-B) scale bars = 50 μ m. (C-E) scale bars = 10 μ m.

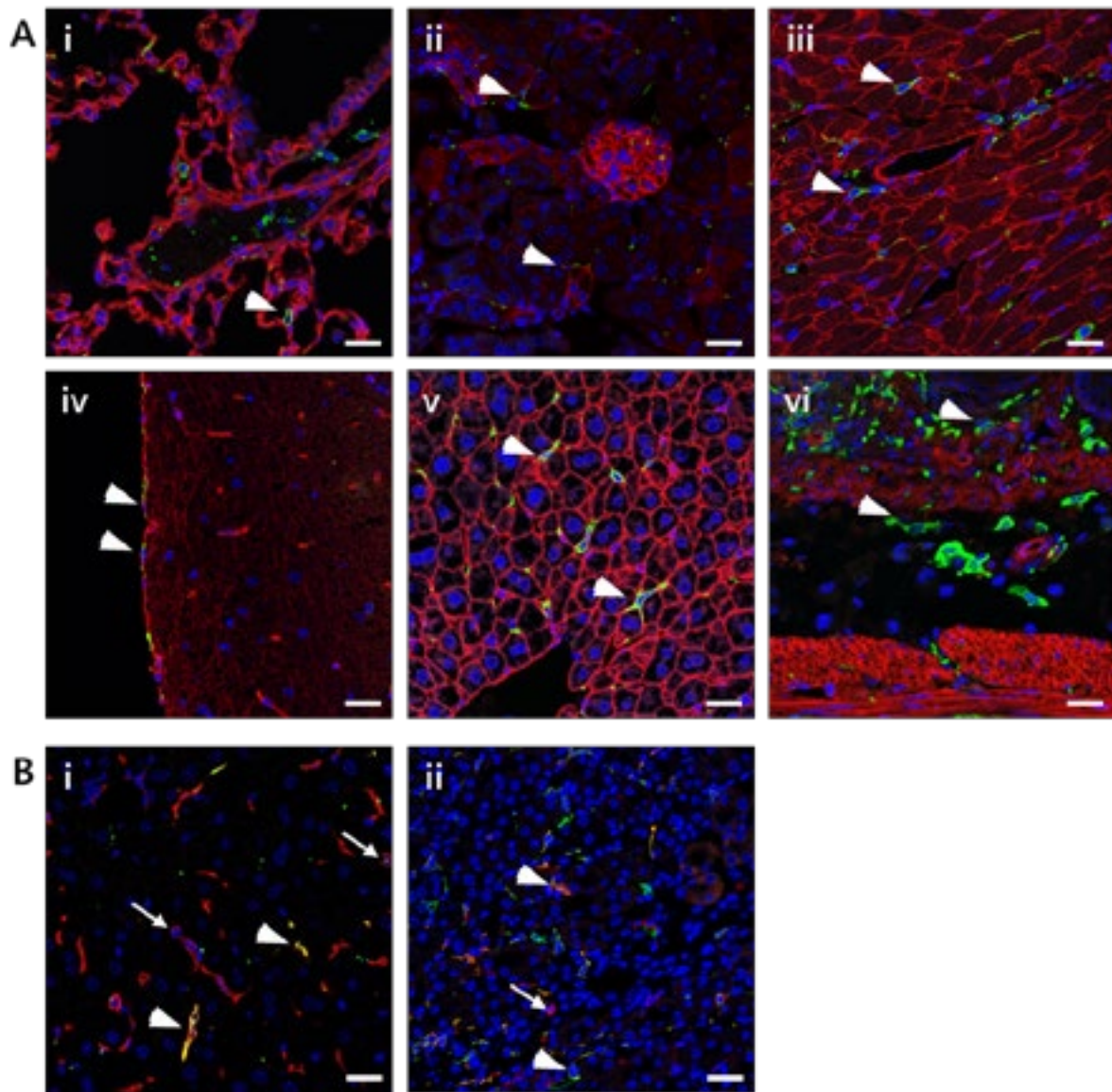


Figure - IV-4 : Recombined cells in *mT/mG;Pf4-cre* adult organs

(A) Confocal imaging of lung (i), kidney (ii), heart (iii), brain (iv), liver (v) and stomach (vi) from *mT/mG;Pf4-cre* mice showing the presence of recombined infiltrated cells in all organs (arrows heads). (B) Recombined infiltrated cells represent a subpopulation of F4/80-positive macrophages. (i) liver and (ii) kidney display both eGFP and F4/80 double-positive cells (arrowheads) and F4/80-positive only cells (arrows). Blue is DAPI, red is F4-80 immunolabeling and green is eGFP. Scale bars = 25 μ m.

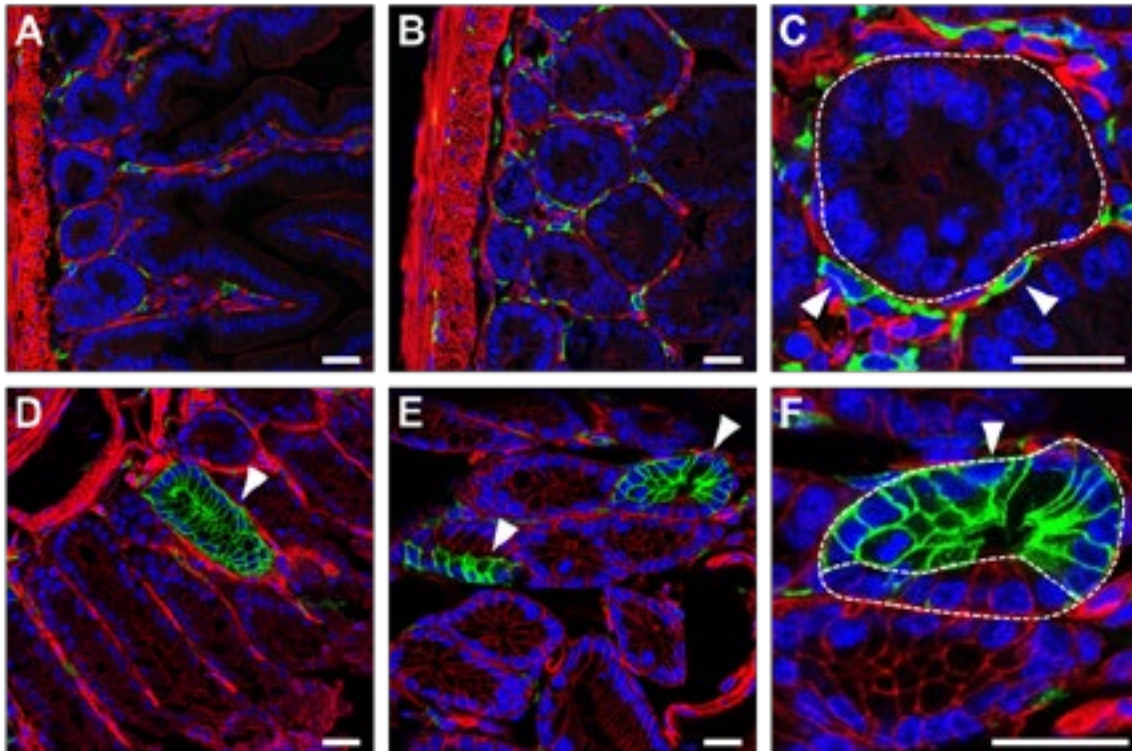


Figure - IV-5 : Pf4-cre activity in the distal intestine

Confocal images of small intestine (A), caecum (B,C), colon (D) and rectum (E,F). All sections of the intestine display recombined infiltrated cells (see arrowheads in caecum close-up (C), dashed line delineates a gland) whereas only colon and rectum display recombined epithelial cells (arrowheads, D-E). These recombined glands exhibit a mosaic pattern as seen in colon close-up (F) where only part of the gland expresses eGFP (arrowhead, dashed line delineates both parts of a gland). Blue is DAPI, red is tdTomato and green is eGFP. Scale bars = 25 μ m.

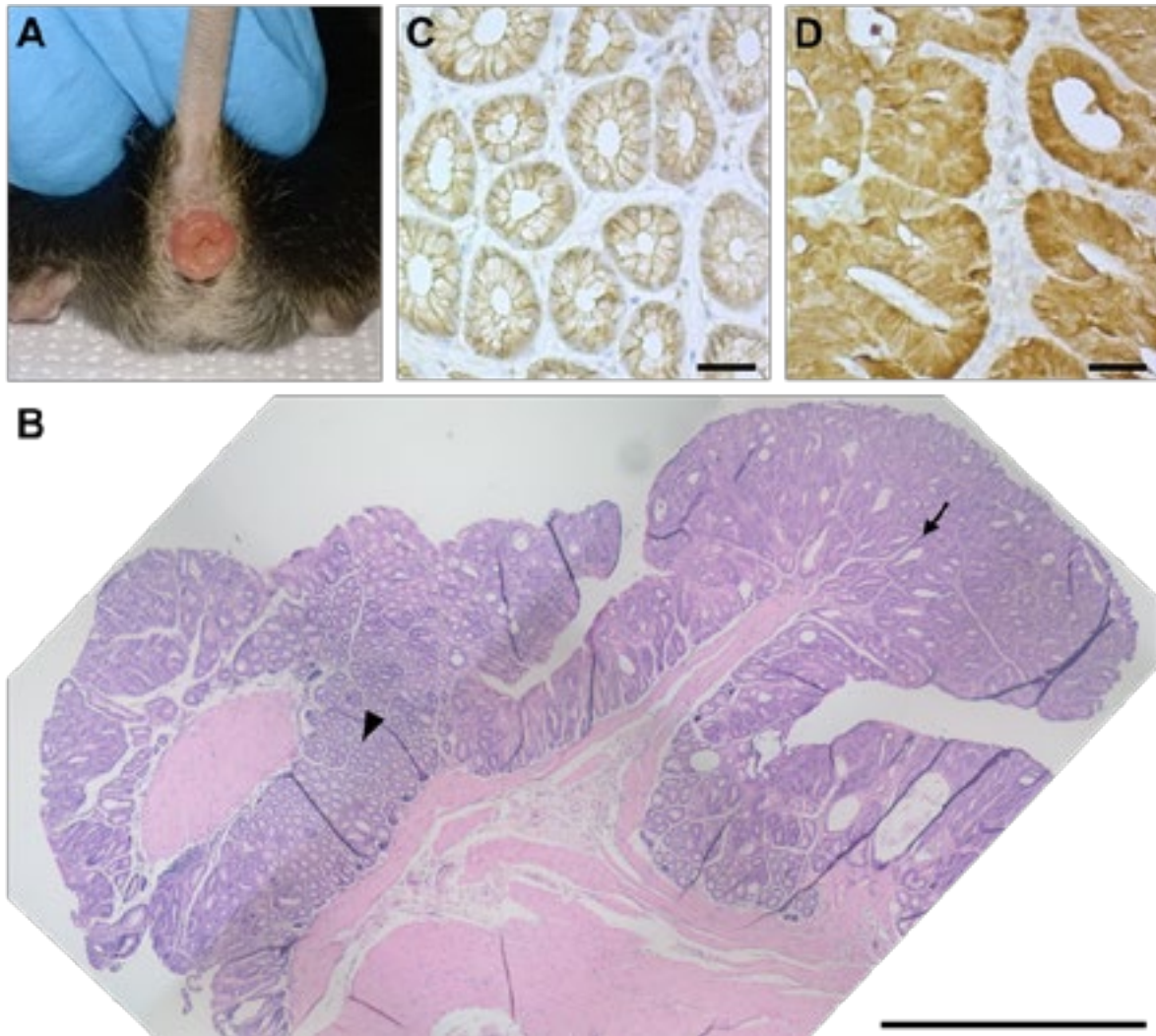


Figure - IV-6 : $Apc^{flox/flox}; Pf4\text{-cre}$ mice develop adenocarcinoma in the distal intestine

(A) $Apc^{flox/flox}; Pf4\text{-cre}$ mice exhibit rectal prolapses. (B) Hematoxylin-Eosin staining of $Apc^{flox/flox}; Pf4\text{-cre}$ rectum displaying adenomatous (arrowhead) and carcinomatous (arrow) tissues. Adenomatous tissue (C) shows normal plasma membrane localization of β -catenin (brown), whereas carcinomatous tissue (D) is associated with β -catenin nuclear translocation in rectal epithelial cells of $Apc^{flox/flox}; Pf4\text{-cre}$ mice. (B) scale bar = 1mm, (C, D) scale bars = 25 μ m.

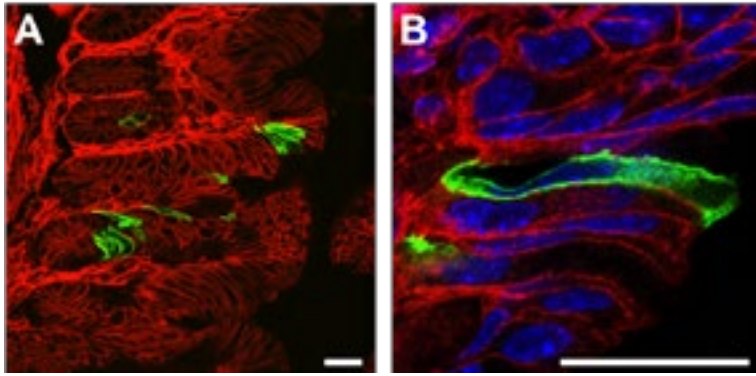


Figure - IV-7 : Pf4-cre activity is intrinsic to the distal intestine

(A) Confocal image of *mT/mG;Pf4-cre* embryonic colon grafts in nude mice after 5 weeks. Some epithelial cells display eGFP fluorescence (green) as the mark of intrinsic *Pf4-cre* activity whereas all other cells express tdTomato (red). (B) Close-up view of a recombined epithelial cell. Blue is DAPI, Green is eGFP and Red is tdTomato. Scale bars = 25 μ m.

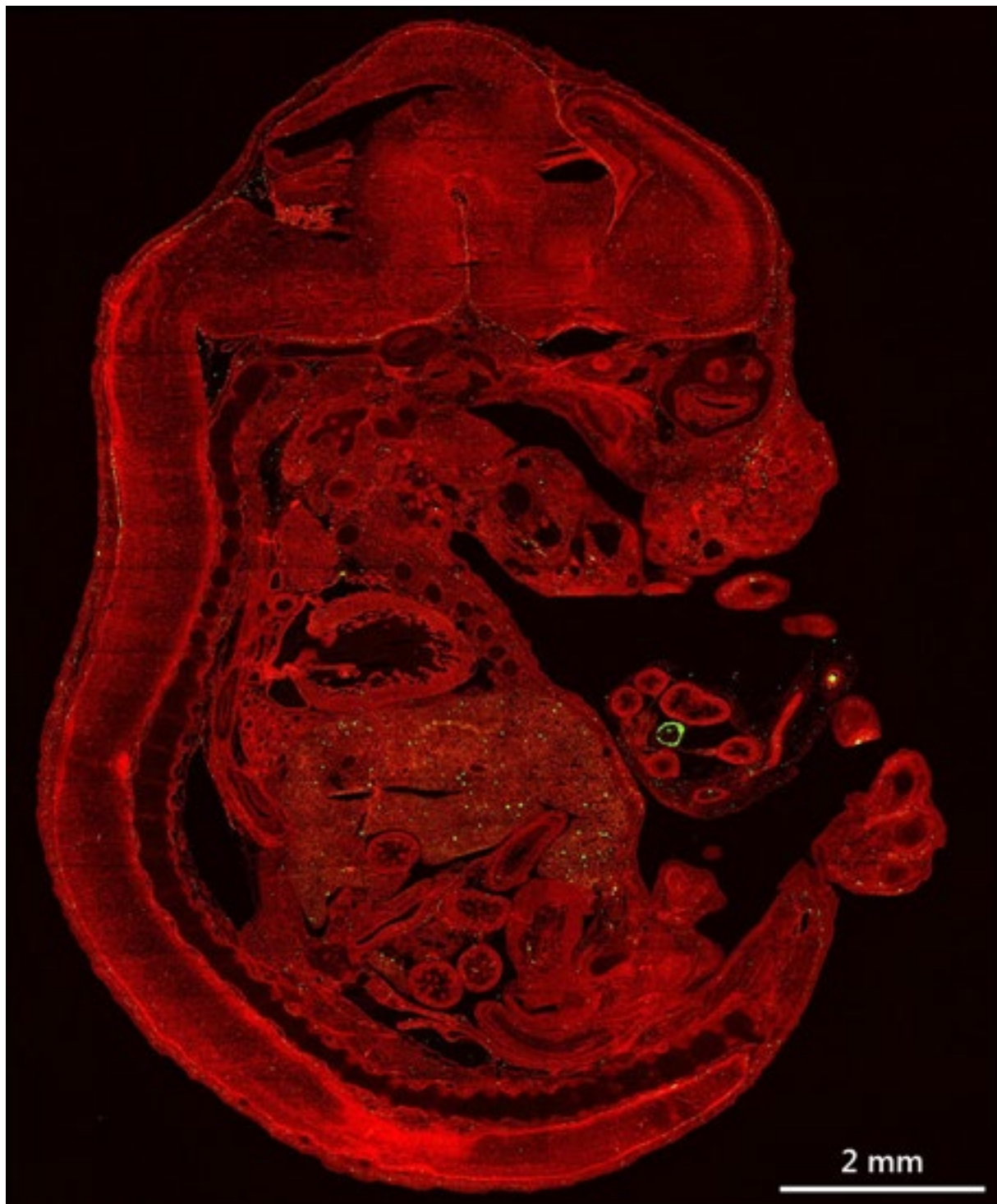


Figure - IV-8 : Mosaic reconstitution of a *mT/mF;Pf4-cre* 14.5dpc embryo

EGFP expressing cells (green) are visible throughout the whole section whereas tdTomato (red) is expressed by all unrecombined cells.

Protein target for deletion		Studies	Protein extinction
ADAM10	(A disintegrin and metallopeptidase domain 10)	9, 32	+
Bax	(Bcl2-associated X protein)	21, 23, 33	+
Bcl-x	(Bcl-2-like protein 1)	14, 23, 30, 33	+/-
CAPNS1	(Calpain small subunit 1)	45	+/-
Cd40lg	(CD40 ligand)	62	ND
Cdc42	(Cell division cycle 42)	53	+
cGKI	(cGMP dependent Protein Kinase I)	60	+
Clec1b	(C-type lectin domain family 1, member b)	31	+
Cosmc		38	ND
Crry	(Complement receptor 1-related gene/protein y)	41	+/-
CypD	(Cyclophylin D)	49	ND
ERp57		57	+
FAK	(Focal Adhesion Kinase)	4, 19, 54	+
FlnA	(Filamin A)	22	+
G6b-B		50	+
Grb2	(Growth-factor receptor-bound protein 2)	44	+
IKK β	(I κ B Kinase β)	47, 59	+/-
Integrin α 2		46	+
Integrin α 6		55	ND
Integrin β 1		3, 55	ND
Integrin β 3		16	+
Mcl1	(Myeloid Cell Leukemia sequence 1)	30, 33	+
Mkl2	(Megakaryoblastic leukemia 2)	37	ND
Myosin IIA		1, 6, 12, 34, 52	+/-
n-Cofilin		8	+
PDI	(Protein Disulfide Isomerase)	48	+
PKD1	(Phosphoinositide-dependent protein kinase 1)	43	+
PIP5K1 γ	(Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase γ)	58	+/-
Podxl	(Podocalyxin)	25	+
Rac1	(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)	28, 35, 53	+
RhoA	(Ras homolog gene family, member A)	26, 56	+
RUNX1	(Runt-related transcription factor 1)	51	+
SCL	(Stem Cell Leukemia)	20	+/-
sGC β 1	(soluble Guanylyl Cyclase subunit β 1)	27	+/-
Shp1	(Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1)	50	+
Shp2	(Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2)	50	+
Slp76	(SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	10, 42	ND
Srf	(Serum Response Factor)	13, 37	ND

Stim1	(Stromal interaction molecule 1)	18	+
Sur	(Survivin)	7	ND
Syk		31	+
Syntaxin 4		39	+
TF	(Tissue Factor)	17	ND
TGFβ1	(Transforming Growth Factor β1)	24	+/-
Tln	(Talin)	2, 5	+/-
Vcl	(Vinculin)	15	+/-
Transgene target for expression		Studies	Protein expression
eYFP reporter	ROSA26-LoxP-Stop-LoxP-eYFP	10, 13, 40, 63	MK, PLT, activated T cells
JAK2V ₆₁₇ F	FF1	61	ND
LacZ reporter	ROSA26-lacZ	3	MK, PLT
Diphtheria Toxin A	LacZbpa-DTA	11	ND
Lifect-GFP	LoxP-Stop-LoxP-Lifect-mEGFP	36	PLT
tdRFP reporter	ROSA26-tdRFP	29	All hematopoietic lineages and HSC

Table - IV-1 : Non-exhaustive list of the studies using Pf4-cre mice in gene depletion or transgene expression strategies

Studies are indicated according to their deletion target or expression transgene. In case of deletion strategy, total protein extinction in megakaryocytes or platelets is indicated as "+", partial extinction is indicated as "+/-". In case of transgene expression, reported expressing cell populations are indicated. Unreported extinction/expression control is indicated as "ND" (Not Determined). MK, megakaryocytes; PLT, platelets; HSC, hematopoietic stem cells. References of the studies are indicated below.

1. 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):3183–91.
2. Petrich BG, Marchese P, Ruggeri ZM, et al. Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *J. Exp. Med.* 2007;204(13):3103–11.
3. 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):1503–6.
4. Hitchcock IS, Fox NE, Prévost N, et al. Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage specific FAK knockout. *Blood*. 2008;111(2):596–604.

Caractérisation de la souris Pf4-cre.

5. Wang Y, Litvinov RI, Chen X, et al. Loss of PIP5KIgamma, unlike other PIP5KI isoforms, impairs the integrity of the membrane cytoskeleton in murine megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* 2008;118(2):812–9.
6. 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):3182–9.
7. Wen Q, Leung C, Huang Z, et al. Survivin is not required for the endomitotic cell cycle of megakaryocytes. *Blood.* 2009;114(1):153–6.
8. Bender M, Eckly A, Hartwig JH, et al. ADF/n-cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. *Blood.* 2010;116(10):1767–75.
9. Bender M, Hofmann S, Stegner D, et al. Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases. *Blood.* 2010;116(17):3347–55.
10. Bertozzi CC, Schmaier A a, Mericko P, et al. Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood.* 2010;116(4):661–70.
11. Carramolino L, Fuentes J, García-Andrés C, et al. Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis. *Circ. Res.* 2010;106(7):1197–201.
12. Eckly A, Rinckel J-Y, Laeuffer P, et al. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(10):2243–51.
13. Halene S, Gao Y, Hahn K, et al. Serum response factor is an essential transcription factor in megakaryocytic maturation. *Blood.* 2010;116(11):1942–50.
14. Kodama T, Takehara T, Hikita H, et al. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Gastroenterology.* 2010;138(7):2487–98, 2498.e1–7.
15. Mitsios J V, Prévost N, Kasirer-Friede A, et al. What is vinculin needed for in platelets? *J. Thromb. Haemost.* 2010;
16. Morgan E a, Schneider JG, Baroni TE, et al. Dissection of platelet and myeloid cell defects by conditional targeting of the beta3-integrin subunit. *FASEB J.* 2010;24(4):1117–27.
17. Pawlinski R, Wang J-G, Owens a P, et al. Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood.* 2010;116(5):806–14.
18. Ahmad F, Boulaftali Y, Greene TK, et al. Relative contributions of stromal interaction molecule 1 and CalDAG-GEFI to calcium-dependent platelet activation and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 2011;9(10):2077–86.

Caractérisation de la souris Pf4-cre.

19. Bhavaraju K, Lakhani PR, Dorsam RT, et al. G(12/13) signaling pathways substitute for integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -signaling for thromboxane generation in platelets. *PLoS One*. 2011;6(2):e16586.
20. Chagraoui H, Kassouf M, Banerjee S, et al. SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis. *Blood*. 2011;118(3):723–35.
21. Josefsson EC, James C, Henley KJ, et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J. Exp. Med*. 2011;
22. Jurak Begonja A, Hoffmeister KM, Hartwig JH, Falet H. FlnA-null megakaryocytes prematurely release large and fragile platelets that circulate poorly. 2011.
23. Kodama T, Takehara T, Hikita H, et al. BH3-only activator proteins Bid and Bim are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets. *J. Biol. Chem*. 2011;286(16):13905–13.
24. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*. 2011;20(5):576–90.
25. Pericacho M, Alonso-Martín S, Larrucea S, et al. Diminished thrombogenic responses by deletion of the podocalyxin gene in mouse megakaryocytes. *PLoS One*. 2011;6(10):e26025.
26. Pleines I, Hagedorn I, Gupta S, et al. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood*. 2011;1054–1063.
27. Rukoyatkina N, Walter U, Friebe a, Gambaryan S. Differentiation of cGMP-dependent and -independent nitric oxide effects on platelet apoptosis and reactive oxygen species production using platelets lacking soluble guanylyl cyclase. *Thromb. Haemost.* 2011;106(5):922–33.
28. Thomas SG, Calaminus SDJ, Machesky LM, Alberts a S, Watson SP. G-protein coupled and ITAM receptor regulation of the formin FHOD1 through Rho kinase in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2011;9(8):1648–51.
29. Calaminus SDJ, Guitart A V, Sinclair A, et al. Lineage tracing of pf4-cre marks hematopoietic stem cells and their progeny. *PLoS One*. 2012;7(12):e51361.
30. Debrincat M a, Josefsson EC, James C, et al. Mcl-1 and Bcl-x(L) coordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood*. 2012;119(24):5850–8.
31. Finney B a, Schweighoffer E, Navarro-Núñez L, et al. CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood*. 2012;119(7):1747–56.

32. Hofmann S, Vögtle T, Bender M, Rose-John S, Nieswandt B. The SLAM family member CD84 is regulated by ADAM10 and calpain in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(12):2581–92.
33. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, et al. Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages. *Cell Death Differ.* 2012;1–14.
34. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun.* 2012;3:717.
35. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood.* 2012;119(8):e45–56.
36. Schachtner H, Li A, Stevenson D, et al. Tissue inducible Lifeact expression allows visualization of actin dynamics in vivo and ex vivo. *Eur. J. Cell Biol.* 2012;2–8.
37. Smith EC, Thon JN, Devine MT, et al. MKL1 and MKL2 play redundant and crucial roles in megakaryocyte maturation and platelet formation. *Blood.* 2012;120(11):2317–29.
38. Wang Y, Jobe SM, Ding X, et al. Platelet biogenesis and functions require correct protein O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(40):16143–8.
39. Ye S, Karim Z a, Al Hawas R, et al. Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion. *Blood.* 2012;120(12):2484–92.
40. 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.
41. Barata L, Miwa T, Sato S, et al. Deletion of Crry and DAF on murine platelets stimulates thrombopoiesis and increases factor H-dependent resistance of peripheral platelets to complement attack. *J. Immunol.* 2013;190(6):2886–95.
42. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J. Clin. Invest.* 2013;123(2):908–16.
43. Chen X, Zhang Y, Wang Y, et al. PDK1 regulates platelet activation and arterial thrombosis. *Blood.* 2013;121(18):3718–26.
44. Dütting S, Vögtle T, Morowski M, et al. Grb2 Contributes to (hem)ITAM-Mediated Signaling in Platelets. *Circ. Res.* 2013;
45. Elagib KE, Rubinstein JD, Delehanty LL, et al. Calpain 2 activation of P-TEFb drives megakaryocyte morphogenesis and is disrupted by leukemogenic GATA1 mutation. *Dev. Cell.* 2013;27(6):607–20.
46. Habart D, Cheli Y, Nugent DJ, Ruggeri ZM, Kunicki TJ. Conditional knockout of integrin $\alpha 2\beta 1$ in murine megakaryocytes leads to reduced mean platelet volume. *PLoS One.* 2013;8(1):e55094.

47. Karim Z a, Zhang J, Banerjee M, et al. I κ B kinase phosphorylation of SNAP-23 controls platelet secretion. *Blood*. 2013;121(22):4567–74.
48. Kim K, Hahm E, Li J, et al. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood*. 2013;122(6):1052–61.
49. Liu F, Gamez G, Myers DR, et al. Mitochondrially Mediated Integrin α IIb β 3 Protein Inactivation Limits Thrombus Growth. *J. Biol. Chem*. 2013;288(42):30672–81.
50. Mazharian A, Mori J, Wang Y-J, et al. Megakaryocyte-specific deletion of the protein-tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 causes abnormal megakaryocyte development, platelet production, and function. *Blood*. 2013;121(20):4205–20.
51. Pencovich N, Jaschek R, Dicken J, et al. Cell-autonomous function of Runx1 transcriptionally regulates mouse megakaryocytic maturation. *PLoS One*. 2013;8(5):e64248.
52. Pertuy F, Eckly A, Weber J, et al. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood*. 2013;
53. Pleines I, Dütting S, Cherpokova D, et al. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42. *Blood*. 2013;122(18):3178–87.
54. Roh ME, Cosgrove M, Gorski K, Hitchcock IS. Off-targets effects underlie the inhibitory effect of FAK inhibitors on platelet activation: studies using Fak-deficient mice. *J. Thromb. Haemost*. 2013;11(9):1776–8.
55. Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin α 6 β 1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation*. 2013;128(5):541–52.
56. Suzuki A, Shin J-W, Wang Y, et al. RhoA is essential for maintaining normal megakaryocyte ploidy and platelet generation. *PLoS One*. 2013;8(7):e69315.
57. Wang L, Wu Y, Zhou J, et al. Platelet-derived ERp57 mediates platelet incorporation into a growing thrombus by regulation of the α IIb β 3 integrin. *Blood*. 2013;122(22):3642–50.
58. Wang Y, Zhao L, Suzuki A, et al. Platelets lacking PIP5KI γ have normal integrin activation but impaired cytoskeletal-membrane integrity and adhesion. *Blood*. 2013;121(14):2743–52.
59. Wei S, Wang H, Zhang G, et al. Platelet I κ B kinase- β deficiency increases mouse arterial neointima formation via delayed glycoprotein Iba shedding. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2013;33(2):241–8.
60. Zhang L, Lukowski R, Gaertner F, et al. Thrombocytosis as a response to high interleukin-6 levels in cGMP-dependent protein kinase I mutant mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2013;33(8):1820–8.

Caractérisation de la souris Pf4-cre.

61. Etheridge SL, Roh ME, Cosgrove ME, et al. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;2–7.
62. Horrillo A, Fontela T, Arias-Salgado EG, et al. Generation of mice with conditional ablation of the Cd40lg gene: new insights on the role of CD40L. *Transgenic Res.* 2014;23(1):53–66.
63. Shi G, Field DJ, Ko K, et al. Platelet factor 4 limits Th17 differentiation and cardiac allograft rejection. *J. Clin. Invest.* 2014;

Discussion

Nous avons confirmé que la souris *Pf4-cre* permet de cibler la lignée plaquettaire avec une pénétrance complète, et nous avons montré que la recombinaison a lieu à partir du stade I de la mégacaryopoïèse. Nous avons également montré que ce transgène entraîne une recombinaison dans une population mineure de leucocytes circulants, ainsi que dans une partie des monocytes/macrophages infiltrés au sein des tissus. De manière nouvelle et inattendue, nous avons observé que certaines cellules épithéliales intestinales sont recombinées à la suite de l'expression du transgène Pf4-cre. Cette recombinaison est limitée à certaines cellules de l'intestin terminal (côlon et rectum), et semble intrinsèque à ces cellules. Enfin, nous montrons qu'il existe des variations significatives entre les souris *Pf4-cre* et la lignée de référence C57BL/6J, notamment au niveau de la numération plaquettaire et de l'expression de certaines cytokines.

La génération de souris génétiquement modifiées s'appuie principalement sur la souris *Pf4-cre* pour cibler la lignée plaquettaire. Cette souris permet l'expression de la cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Pf4*, qui est décrit pour s'exprimer spécifiquement dans la lignée plaquettaire. Cependant, certaines études ont récemment remis en question cette spécificité. Alors que la protéine PF4 semble être exprimée au niveau de populations cellulaires hématopoïétiques en conditions inflammatoires (Adlard et al., 2014; Lasagni et al., 2007; Maier et al., 2008, 2009; Pitsilos et al., 2003), certains auteurs décrivent également une recombinaison liée à Pf4-cre dans toutes les lignées hématopoïétiques ainsi que les cellules souches hématopoïétiques (Calaminus et al., 2012). Afin de valider l'utilisation des souris *Pf4-cre* dans certaines de nos études, nous avons vérifié la spécificité d'expression de ce transgène en utilisant une souris rapportrice qui permet l'expression de l'eGFP suite à une recombinaison par la cre recombinase. Nous avons ainsi confirmé la validité de la souris *Pf4-cre* pour entraîner une recombinaison à partir du stade I de la maturation mégacaryocytaire. Nous soulignons toutefois que l'extinction d'une protéine par ce système dépend également de la durée de vie du transcrite et de celle de la protéine ciblée. Ainsi, si nous observons une pénétrance complète de la recombinaison induite par Pf4-cre dans la lignée mégacaryocytaire, il faut garder à l'esprit que le contrôle de l'extinction de la protéine ciblée doit être effectué pour toute nouvelle lignée. Ensuite, nous n'observons de recombinaison que dans une proportion mineure de leucocytes circulants, contrairement aux résultats rapportés dans une étude récente (Calaminus et al., 2012). Cette divergence pourrait s'expliquer soit par une différence technique au niveau de l'exclusion des agrégats leuco-plaquettaires lors des analyses, soit par une différence au niveau de l'état

Caractérisation de la souris Pf4-cre.

sanitaire des animaux utilisés. Il a en effet récemment été rapporté que les lymphocytes T peuvent exprimer le transgène Pf4-cre lorsqu'ils sont activés (Shi et al., 2014), et que l'expression de PF4 par les macrophages, ou par les cellules dendritiques augmente en conditions inflammatoires (Adlard et al., 2014; van Bon et al., 2014). Ainsi, il est tout à fait possible qu'une recombinaison due au transgène Pf4-cre puisse être entraînée par un état inflammatoire des animaux. Ceci implique la nécessité de vérifier et de maîtriser l'état sanitaire dans lequel sont maintenus les animaux portant la construction Pf4-cre.

En outre, nous montrons pour la première fois que les souris *Pf4-cre* peuvent entraîner une recombinaison dans des cellules non-hématopoïétiques. Nos souris rapportrices expriment en effet l'eGFP au niveau de certaines cellules épithéliales du colon et du rectum. Pour une raison encore inconnue, cette expression concerne des glandes disséminées à travers le tissu et ne touche souvent qu'une partie de la glande, aboutissant ainsi à un motif en mosaïque. Ce motif en mosaïque pourrait impliquer une recombinaison au niveau de certaines cellules souches ou de certains progéniteurs, dont la descendance occuperait une glande précise ou la moitié de cette glande et exprimerait l'eGFP. Nous avons émis deux hypothèses concernant la recombinaison de ces cellules : i) l'expression endogène du transgène Pf4-cre, ou ii) la fusion de macrophages recombinés avec une cellule épithéliale. La première hypothèse se base sur l'expression dans les cellules épithéliales de plusieurs facteurs de transcription décrits pour être capables de réguler l'expression du promoteur Pf4 (Jedlicka et al., 2009; Okada et al., 2011, 2013). La seconde hypothèse est fondée sur la description de fusions entre macrophages et cellules épithéliales de manière physiologique chez la souris (Davies et al., 2009; Rizvi et al., 2006). Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons réalisé la greffe de côlons embryonnaires provenant de nos souris rapportrice, à un stade où la recombinaison n'a pas encore eu lieu, sous la peau de souris nude. Lors de cette expérience, les côlons peuvent se développer dans un environnement dépourvu de macrophages recombinés, excluant toute possibilité pour les cellules épithéliales des greffons de montrer des signes de recombinaison suite à une fusion. Nos résultats montrent la présence de cellules recombinées dans l'épithélium de ces greffons, indiquant ainsi que les cellules épithéliales peuvent exprimer le transgène *Pf4-cre* de manière intrinsèque. Nous pouvons ainsi expliquer notre observation initiale, sans toutefois exclure totalement la seconde hypothèse. Cette recombinaison au sein des cellules épithéliales de l'intestin terminal constitue une explication plausible pour une autre de nos observations : la présence de tumeurs au niveau du côlon et du rectum des souris *Apc^{flox/flox};Pf4-cre*. Ces souris, initialement générées pour étudier le rôle de la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) dans les plaquettes, développent des

Caractérisation de la souris Pf4-cre.

tumeurs du côlon et un prolapsus rectal qui réduisent leur espérance de vie à trois à quatre mois. Cette lignée est un exemple type des effets indésirables de l'expression de Pf4-cre en dehors de la lignée plaquettaire, et souligne qu'il est nécessaire de rester prudent quant aux conclusions que l'on peut tirer face à l'observation d'un phénotype inattendu chez ces souris.

Enfin, le transgène porté par les souris Pf4-cre est issu d'une construction BAC contenant les gènes de quatre cytokines de la famille CXCL (*Cxcl3*, *Cxcl5*, *Cxcl7* et *Cxcl15*) (Tiedt et al., 2007). La séquence exacte qui s'est insérée pour générer la lignée *Pf4-cre* n'est pas connue, ni son locus d'insertion. Ainsi, on ne peut pas exclure que certains paramètres diffèrent entre cette lignée et la lignée de référence C57BL/6J. Nous avons notamment pu observer que les souris *Pf4-cre* présentent une diminution de la numération plaquettaire, de faible ampleur (15%) mais statistiquement significative, par rapport aux souris sauvages. De plus, nous avons mis en évidence que la cytokine CXCL5 est présente en concentration deux fois plus importante dans le plasma des souris *Pf4-cre*. Nous n'avons cependant pas relevé de différences entre ces deux lignées au niveau de la densité de mégacaryocytes retrouvés dans la moelle, de leurs paramètres de maturation (ploïdie, expression de CD41 ou CD42, ultrastructure) ou de leur capacité à former des proplaquettes, et les fonctions plaquettaires sont également similaires entre ces souris. Toutefois, nos résultats suggèrent que des souris portant le transgène Pf4-cre devraient être utilisées comme témoins pour toute lignée utilisant ce système, alors que dans de nombreux cas seules les souris présentant la construction cible flanquée de sites loxP ont été utilisées.

En conclusion, nous soutenons la validité de la souris *Pf4-cre* pour la modification génétique de la lignée plaquettaire, mais nous insistons sur le fait que les processus impliquant les monocytes/macrophages, les cellules épithéliales de l'intestin terminal ou des conditions inflammatoires peuvent entraîner des phénotypes qui ne sont pas nécessairement liés à une atteinte plaquettaire.

Discussion générale

Le point de départ de mon sujet de thèse, l'influence de l'environnement médullaire sur la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse, vient d'observations réalisées chez les souris *Myh9*^{-/-} : les mégacaryocytes déficients en myosine IIA développent des défauts importants *in situ*, mais pas *in vitro*, en terme de morphologie (voir Figure - III-3) et de production de proplaquettes (Eckly et al., 2009). Ces différences entre les mégacaryocytes différenciés *in vivo* et *in vitro* suggèrent que l'environnement médullaire joue un rôle dans la maturation des mégacaryocytes. Afin d'explorer cette hypothèse, nous nous sommes orientés vers trois composantes absentes du milieu *in vitro* et susceptibles d'influencer la différenciation du mégacaryocyte : les interactions avec la MEC ou les autres cellules, l'organisation 3D et la rigidité du tissu. Nous avons souhaité nous concentrer dans un premier temps sur l'interaction mégacaryocyte/MEC, puis dans un deuxième temps sur l'importance de l'organisation 3D et de la rigidité.

Les interactions cellule/MEC ou cellule/cellule impliquent des récepteurs membranaires de la famille des molécules d'adhésion. Parmi ces récepteurs nous avons choisi de commencer par étudier les intégrines, qui ont la particularité de reconnaître à la fois la MEC et certains récepteurs cellulaires, et qui sont couplées au cytosquelette d'actomyosine. Notre choix aurait également pu se porter sur d'autres récepteurs exprimés par les mégacaryocytes comme les immunoglobulines de la super famille CAM (ICAM, PECAM), le complexe GPIb-V-IX, la GPVI, ou encore les récepteurs DDR (Discoidin Domain Receptor) ou LAIR (Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor). Cependant, les intégrines constituent la famille la plus représentée en termes de densité membranaire au niveau de la plaquette, et donc potentiellement du mégacaryocyte, mais également la famille la plus étudiée à la fois au niveau des plaquettes et des mégacaryocytes, et donc la mieux connue. La meilleure connaissance de ces protéines nous permet d'avoir accès à une panoplie d'outils afin d'évaluer ou d'entraîner leur activation ou leur inhibition (souris déficientes dans la lignée plaquettaire, inhibiteurs plus ou moins sélectifs, anticorps bloquants). Notre approche dans l'étude du rôle des intégrines mégacaryocytaires a tout d'abord été de

généraliser des souris déficientes pour les sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 3$ dans la lignée plaquettaire, puis pour $\beta 1$ et $\beta 3$ simultanément, afin de virtuellement supprimer toute intégrines à la surface des mégacaryocytes. L'intérêt de cette approche est de pouvoir observer le comportement des mégacaryocytes *in situ*, sans être exposé aux effets collatéraux d'une molécule injectable qui agirait également sur les autres populations cellulaires.

Un deuxième aspect dont nous avons voulu déterminer l'influence sur les mégacaryocytes est la rigidité de l'environnement cellulaire. Nous avons choisi d'évaluer cette composante par l'utilisation *in vitro* d'un hydrogel : la méthylcellulose. Notre but initial, en adoptant cette stratégie, était de reproduire *in vitro* un environnement plus proche de la moelle osseuse, et alliant une culture en 3D (cellules en suspension dans l'hydrogel) et la présence de MEC dans un milieu de rigidité contrôlée. Les résultats que nous avons obtenus en hydrogel de méthylcellulose seul nous suggèrent que l'utilisation d'un milieu de rigidité proche de celle observée dans la moelle améliore la maturation des mégacaryocytes et permet de reproduire certains défauts observés seulement *in situ* dans le cas des mégacaryocytes *Myh9*^{-/-}. Par la suite, l'inclusion de protéines de matrice nous permettra d'évaluer l'importance de la rigidité dans la signalisation induite par la MEC au niveau du mégacaryocyte. L'un des points clé de ce travail sera de mettre en évidence des voies de signalisation activées de manière différentielle entre ces conditions de culture, afin de mieux comprendre comment est régulée la différenciation des mégacaryocytes.

En plus de ces aspects, j'ai eu l'occasion de poursuivre l'étude du rôle de la myosine IIA dans la mégacaryopoïèse en exploitant des observations réalisées *in situ* chez les souris *Myh9*^{-/-}. La présence d'amas d'organelles au niveau des mégacaryocytes de ces souris nous a amenés à mettre en évidence un rôle de la myosine dans la distribution de ces structures. D'après nos données, la myosine IIA pourrait participer au trafic des organelles par son association à la membrane de ces dernières, et par son implication dans l'organisation de l'actine et la régulation de sa dynamique de polymérisation. Nous proposons que la distribution homogène des organelles à travers le cytoplasme du mégacaryocyte, notamment avec la participation de la myosine, soit cruciale pour la formation de plaquettes présentant un contenu homogène.

De manière plus générale, les trois facettes de mon sujet de thèse sont liées. Les intégrines permettent en effet aux cellules de ressentir la rigidité de leur environnement, *via* la mécanotransduction, et impliquent le cytosquelette d'actomyosine dans ce processus en s'engageant ou non dans la formation d'adhésions focales. Ainsi, il a été montré qu'une faible rigidité entraîne 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). Simultanément,

les supports de rigidité faible entraînent 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). On peut supposer que, comme suggéré dans le cas de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Zou et al., 2009), ces deux processus se produisent dans la moelle, qui est un tissu de faible rigidité (Shin et al., 2013). Ceci pourrait permettre d'expliquer pourquoi *in vitro* le contact des mégacaryocytes avec des éléments de MEC sur des supports de rigidité élevée entraîne une inhibition de la formation de proplaquettes par rapport à l'utilisation de supports de plus faible rigidité (Hunt et al., 1993; Larson and Watson, 2006; Malara et al., 2011; Sabri et al., 2004; Schick et al., 1998; Shin et al., 2011; Tablin et al., 1990; Topp et al., 1990). Dans la moelle les intégrines seraient donc impliquées dans l'absorption par endocytose d'éléments de la MEC, comme c'est le cas pour le fibrinogène (Handagama et al., 1993), ainsi que dans la régulation du processus de formation des plaquettes, *via* des mécanismes qui pourraient être situés en amont de l'extension des proplaquettes, conformément à ce que nous observons chez les souris *Itgb3^{-/-}*. Dans ce contexte, l'étude de mégacaryocytes *in vitro* en hydrogel en présence de protéines de MEC pourrait permettre de vérifier si ce mécanisme d'internalisation a bien lieu, et le cas échéant de tester son importance en utilisant des cellules provenant de souris déficientes pour la myosine IIA ou pour les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$.

A court terme, les perspectives de ce sujet sont principalement fondamentales, et visent à mieux comprendre la régulation de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse vis-à-vis de l'environnement cellulaire. L'étude de certains aspects essentiels de cette régulation, comme la reconnaissance de la MEC par des récepteurs d'adhésion et l'engagement du cytosquelette, en comparant la différenciation mégacaryocytaire *in vivo* et *in vitro*, pourra permettre de transposer les éléments clés de l'environnement médullaire dans un système de culture cellulaire. De cette manière, on peut penser que l'amélioration de notre capacité à mimer au plus près les mécanismes physiologiques de formation des plaquettes débouchera, à plus long terme, sur des perspectives cliniques. Ces perspectives sont actuellement le point de convergence de nombreuses équipes travaillant sur les mégacaryocytes : la production *in vitro* de plaquettes fonctionnelles, utilisables dans une optique transfusionnelle. La transfusion de ces plaquettes produites en milieu contrôlé pourrait être envisagée comme substitut aux plaquettes issues de don de sang.

Durant ce travail de thèse, j'ai également eu l'occasion d'observer une différence de numération plaquettaire entre les souris témoin *Pf4-cre* et la lignée de référence C57BL/6J. Cette différence statistiquement significative, bien que de faible ampleur, m'a incité à comparer

systématiquement les paramètres étudiés dans mes différents projets entre ces deux lignées. Cette comparaison est à l'origine du projet de re-caractérisation de l'expression du transgène Pf4-cre présenté dans la partie IV de ce manuscrit. Bien qu'elle ne soit pas directement reliée à mon sujet de thèse, cette étude était nécessaire à la validation de nos projets utilisant des souris *Pf4-cre*, et a permis de trouver une explication plausible au développement de tumeurs intestinales chez les souris *Apc^{flox/flox};Pf4-cre*.

Au final, mon travail de thèse a abouti à la publication d'un article sur le rôle de la myosine IIA dans la distribution des organelles mégacaryocytaire, accepté dans la revue *Blood*, et un article sur l'expression du transgène Pf4-cre en dehors de la lignée plaquettaire, prochainement soumis auprès de la revue *Blood*. J'ai également pu participer à une étude sur l'influence du romiplostim, un agoniste de c-MPL, sur la souris *Myh9^{-/-}* en tant que modèle de maladie liée à MYH9 (voir Annexe 1), et à une étude sur la formation du DMS au sein des mégacaryocytes (voir Annexe 2).

Annexe 1 – Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD.

blood

2012 119: 3333-3341
Prepublished online January 10, 2012;
doi:10.1182/blood-2011-08-373811

Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD

Catherine Léon, Katja Evert, Frank Dombrowski, Fabien Pertuy, Anita Eckly, Patricia Laeuffer, Christian Gachet and Andreas Greinacher

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/119/14/3333.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Platelets and Thrombopoiesis](#) (427 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>



Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD

Catherine Léon,¹ Katja Evert,² Frank Dombrowski,² Fabien Pertuy,¹ Anita Eckly,¹ Patricia Laeuffer,¹ Christian Gachet,¹ and Andreas Greinacher³

¹Unité Mixte de Recherche_S949 Inserm, Université de Strasbourg and Etablissement Français du Sang-Alsace, Strasbourg, France; and ²Institut für Pathologie and ³Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Greifswald, Germany

Macrothrombocytopenia in MYH9-related disease (MYH9-RD) results from defects in nonmuscular myosin-IIA function. Thrombopoietin receptor agonists (eltrombopag; romiplostim) seem to improve hemostasis, but little is known about their biologic effects in MYH9-RD. We administered romiplostim to *Myh9*^{-/-} mice (100 µg/kg, every 3 days, during 1 month). MKs increased to similar numbers in *Myh9*^{-/-} and wild-type (WT) mice (with an increase in immature MKs), but

***Myh9*^{-/-} platelet count response was much less (2.5-fold vs 8-fold increase). A strong increase in MK nuclei emboli in the lung, in WT and *Myh9*^{-/-} mice, indicates increased transmigration of MKs from the BM. Prolonged (but not acute) treatment with romiplostim decreased expression of GPIb-IX-V complex and GPVI, but not of GPIIb/IIIa, and bleeding time increased in WT mice. Microcirculation was not altered by the increased number of large platelets in any of the assessed**

organs, but in *Myh9*^{-/-} mice a much stronger increase in BM reticulin fibers was present after 4 weeks of romiplostim treatment vs WT mice. These data further encourage short-term use of thrombopoietic agents in patients with MYH9-RDs; however, myelofibrosis has to be considered as a potential severe adverse effect during longer treatment. Reduction of GPIbIX/GPVI expression by romiplostim requires further studies. (*Blood*. 2012;119(14):3333-3341)

Introduction

MYH9-related disorders (MYH9-RDs) are a group of rare diseases characterized by congenital macrothrombocytopenia that results from mutations in the *MYH9* gene encoding the nonmuscle myosin IIA, the only isoform of myosin present in platelets.¹ Thrombocytopenia ranges from mild to severe and remains relatively stable in a person throughout life. Patients may experience easy bruising, epistaxis, and menorrhagia, in some rare occasions requiring blood transfusion. Other manifestations may occur later in life such as cataract, hearing loss, and nephropathy; the mechanism leading to these additional symptoms is presently unknown.^{2,3} In these patients, thrombocytopenia results from defective platelet production, probably resulting from impairment in marrow MK maturation because of decreased or abnormal myosin IIA, leading to a strong decrease in their capacity to extend proplatelets.^{4,5}

Second-generation thrombopoietic agents, which stimulate megakaryocytopoiesis by binding to the thrombopoietin (TPO) receptor,⁶ may be an option for increasing the platelet count in MYH9-RDs. Two of these TPO receptor agonists have completed phase 3 trials in primary immune thrombocytopenia (eltrombopag, a nonpeptide TPO receptor agonist, and romiplostim, a peptide TPO receptor agonist^{7,8}) and have been recently approved in several countries for treatment of certain patients with immune thrombocytopenia.

Eltrombopag administration has recently been tested in patients with MYH9-RDs in a phase 2, multicenter trial, showing moderate increase in platelet counts and reduction in bleeding tendency,⁹ suggesting that these new thrombopoietic agents could also represent an interesting therapeutic option for patients with MYH9-RDs. However, platelets in MYH9-RDs differ from platelets in idio-

pathic thrombocytopenic purpura, and it is unknown whether stimulation of megakaryocytopoiesis by TPO receptor agonists may cause additional changes in these MYH9-RD platelets. Furthermore, many of the giant platelets are larger than the diameter of capillaries, and little is known about their rheology. Increasing the number of circulating giant platelets may increase the risk for microthrombotic events. This is especially relevant in MYH9-RDs, because these patients are also at risk of developing renal insufficiency. Clustering of giant platelets in the capillaries of the glomerula might increase the risk of damage of the renal tissue, potentially aggravating the risk of renal failure.

To evaluate the possibility that an increase in giant platelets alters the microcirculation, we took advantage of a mouse model of MYH9-related macrothrombocytopenia.¹⁰ Romiplostim was injected into *Myh9*^{-/-} mice during a 1-month period, and the consequences in terms of platelet production and microcirculation were evaluated. We found a much less pronounced response of platelet count increase and increased myelofibrosis compared with wild-type (WT) mice, but no evidence of impairment of the microcirculation induced by the increased number of large platelets was observed. Interestingly, romiplostim induced a decrease in platelet GPIbIX and GPVI expression in both WT and *Myh9*^{-/-} mice.

Methods

Animals

Myh9^{-/-} mice have already been described¹⁰ and are on a C57BL/6 background (back-crossed for 11 generations). C57BL/6 mice were used as

Submitted August 15, 2011; accepted January 2, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, January 10, 2012; DOI 10.1182/blood-2011-08-373811.

There is an Inside *Blood* commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

control. All animal studies were performed according to the regulations of the Université de Strasbourg.

Protocol design

Ten-week-old WT and *Myh9*^{-/-} mice (5 males and 5 females in each group) received subcutaneous injections of either vehicle (saline) or romiplostim (100 µg/kg of body weight; Amgen) every 3 days, during 1 month. Doses and administration schedules were selected according to previous studies in mice.¹¹ Blood samples were analyzed for platelet count and platelet volume before the onset of the experiment and at days 8, 18, and 29. At day 33, mice were killed. Blood was drawn from the abdominal aorta for platelet isolation and electron microscopy observations. Organs (brain, lungs, pancreas, kidneys, psoas muscles, gut, and BM) were removed and immersed into 4% paraformaldehyde for histologic analysis.

Bleeding time

Bleeding time was performed on other groups of mice treated for 1 month, 10 days, or 6 hours, by sectioning 3 mm of the tail tip and immersing the tail in saline at 37°C, as previously described.¹⁰

Platelet count, volume determination, P-selectin, glycoprotein level, annexin V, and mitochondrial potential measurement

Blood was taken from the tail tip of isoflurane-anesthetized mice and anticoagulated with EDTA (6mM). Platelet count was determined with an automated platelet counter (Scil Vet ABC, Scil Animal Care Company), and platelet volume modifications were evaluated by flow cytometry (Gallios; Beckman Coulter France) after GPIbβ (RAM1 Ab¹⁰) labeling. Platelet P-selectin exposure, GPIIb/IIIa activation, and glycoprotein levels were evaluated by flow cytometry in whole blood by labeling with an anti-P-selectin Ab (Becton Dickinson) or with Jon/A-PE Ab (Emfret) or with monoclonal Abs directed against GPIbα (RAM6), GPIbβ (RAM1), GPV (Gonc2; Emfret), GPIIb/IIIa (RAM2), or GPVI (JAQ1; Emfret) in blood samples taken after 28 days of romiplostim treatment. The data are presented as mean fluorescence intensity in arbitrary units. Exposition of negatively charged phospholipids was checked by flow cytometry with the use of FITC-annexin V labeling, and putative modifications of the mitochondrial potential were evaluated with the fluorescent probe TMRM followed by flow cytometric analysis.

Platelet isolation and electron microscopy

ACD anticoagulated whole blood was centrifuged, and platelet-rich plasma was washed in Tyrodes buffer as described.¹² Platelets were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, containing 2% sucrose, and processed as described previously.¹² Ultrathin sections were examined under a Philips CM120 Biotwin electron microscope (FEI) at 120 kV. For ultrastructural observation of BM, femurs were flushed, fixed, and processed as described for platelets.

Western blot analysis

Platelet lysates were prepared by resuspending washed platelets (200 × 10⁹/L) in SDS buffer (1% SDS final concentration). Proteins were separated by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions, transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and incubated with the primary Ab directed against GPIIIa (LucA5; Emfret), GPIbα (RAM6), GPIbβ (RAM1), GPVI (JAQ1; Emfret), or actin for normalization.

Histology

The mouse tissue samples were dehydrated and embedded in paraffin. Slides of 2- to 3-µm thickness were cut and stained by H&E and afterward digitized with the NanoZoomer 2.0 (Hamamatsu). The amount of MKs in the spleen was counted in an area of 2.62 mm² with the use of ImageScope v11.0.2.716 software (<http://www.aperio.com>). For this purpose we counted every MK that showed a nucleus within the analyzed area.

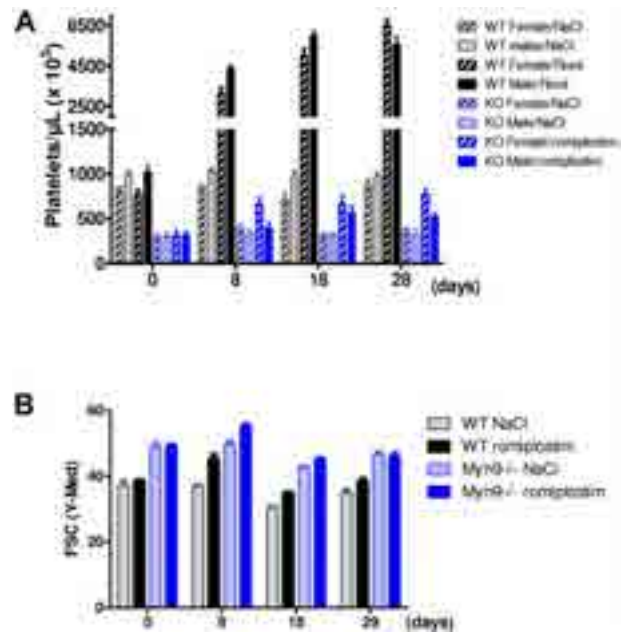


Figure 1. Romiplostim-induced increase in platelet number and size. (A) Platelet counts of WT and *Myh9*^{-/-} mice before (day 0) and after 8, 18, and 28 days of romiplostim administration. Each bar represents the mean ± SEM of 5 animals. (B) Relative platelet size variation during romiplostim treatment as visualized by flow cytometry (forward scatter parameter) in the GPIIb/IIIa-positive population. Mean ± SEM of 10 animals. Of note, the platelet size increase after start of romiplostim was transient in the *Myh9*^{-/-} mice, indicating that it is not only the effect of TPO receptor stimulation.

To quantify the amount of MK emboli in the lung we used relative units to compare the surface of the lung with their varying ventilation.¹³ We quantified the surface area as described.¹⁴ In brief, 4 parallel lines with a distance of 7 cm were superimposed on the computer screen (789-fold magnification). First, we counted the intersections of the alveolar walls with the lines; thereafter, we separately counted the MK emboli within this section. Finally, we calculated the ratio of MK emboli per 500 intersections of alveolar walls with the lines.

Myelofibrosis was detected on BM paraffin sections with the use of the Gomori stain for reticular silver staining. Scores were attributed according to the absence or moderate or abundant presence of fibers. The observations were made on 4-5 mice per experiment.

Statistics

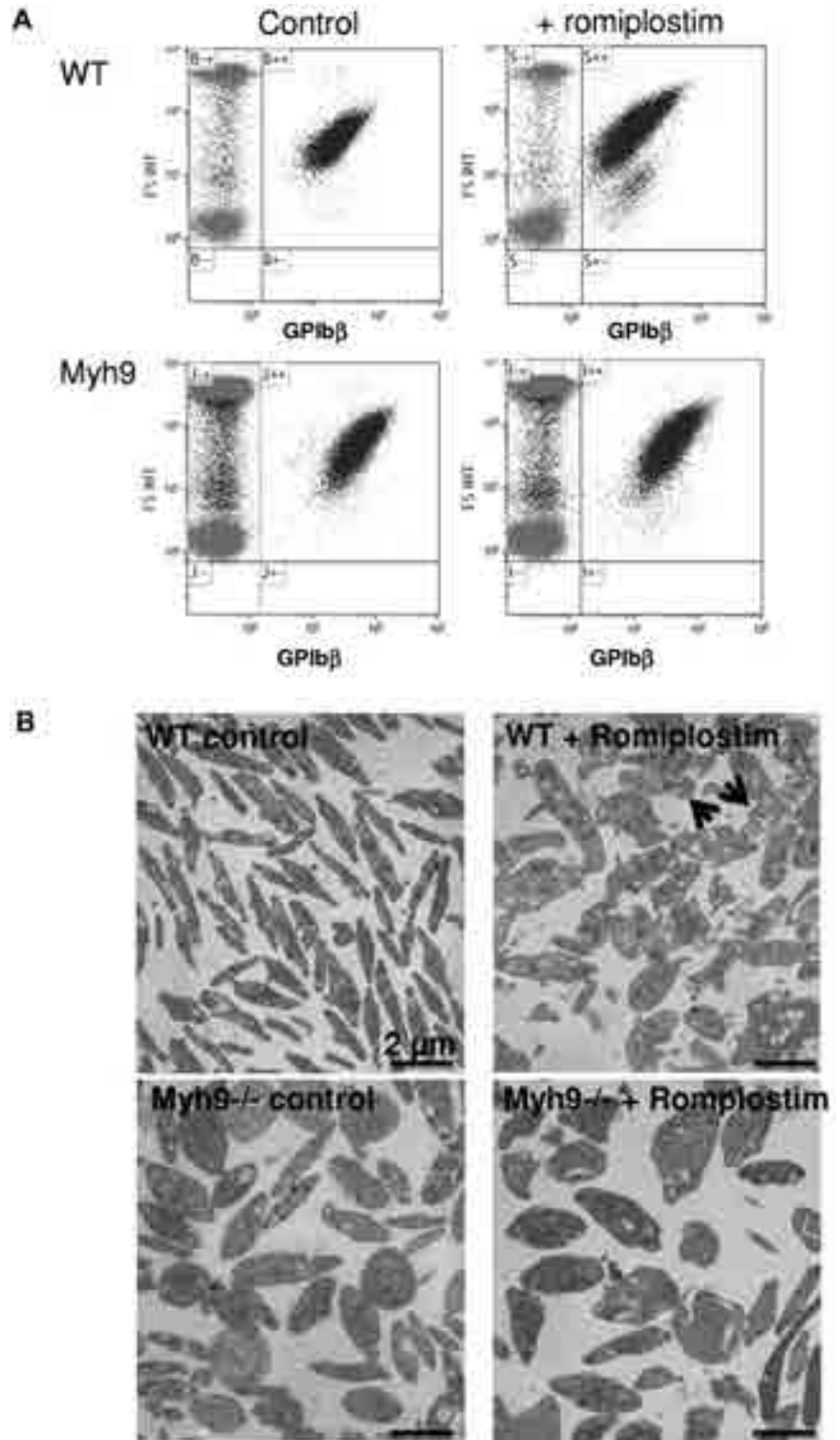
Statistical analyses were performed with 1-way ANOVA and Bonferroni posttest (**P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .0001).

Results

Romiplostim increases the platelet count in *Myh9*^{-/-} mice less than in WT mice

Romiplostim (100 µg/kg) injection to WT mice every 3 days led to a 4-fold increase in platelet count 8 days after the beginning of the protocol for both males and females (Figure 1A). Platelet count further increased after 1 month of treatment, reaching an 8-fold increase for females and 6-fold increase for males (Figure 1A). Romiplostim also increased platelet counts in *Myh9*^{-/-} mice, although to a lesser extent, with a 2.5-fold increase for females and 1.7-fold increase for males (Figure 1A). As expected platelet volume was higher for *Myh9*^{-/-} mice at baseline, and a transient increase in the mean platelet volume was observed in both genotypes after the start of romiplostim treatment (Figure 1B).

Figure 2. Romiplostim-induced increase in circulating platelet debris. (A) Presence of GPIIb/IIIa-positive debris as observed by flow cytometry in the romiplostim-treated WT mice. (B) Transmission electron microscopy shows platelet ultrastructure of romiplostim-treated animals compared with controls. Arrows show poorly contrasted platelets in the romiplostim-treated WT mice.



Effect of romiplostim on platelet structure

Romiplostim treatment led to the formation of circulating platelet debris as observed by flow cytometry (Figure 2A). These debris were more numerous in WT-treated mice, probably reflecting the stronger increase in platelet count. By electron microscopy after 1 month of treatment, the increased platelet size was still evident in romiplostim-treated WT mice (Figure 2B). In addition, platelet fragments were present, together with poorly contrasted platelets (Figure 2B arrows). Myh9^{-/-} platelet structure was altered as

previously shown, with larger and ovoid platelets, presenting heterogeneity in organelle content and distribution. Romiplostim treatment did not improve or modify their structure, but the presence of debris was less evident compared with WT mice.

Romiplostim increases MK numbers in the spleen

Quantification of MKs in the spleen with the use of histology sections (Figure 3A) indicates that, as previously reported for BM,¹⁵ the number of MKs was higher in control Myh9^{-/-} mice

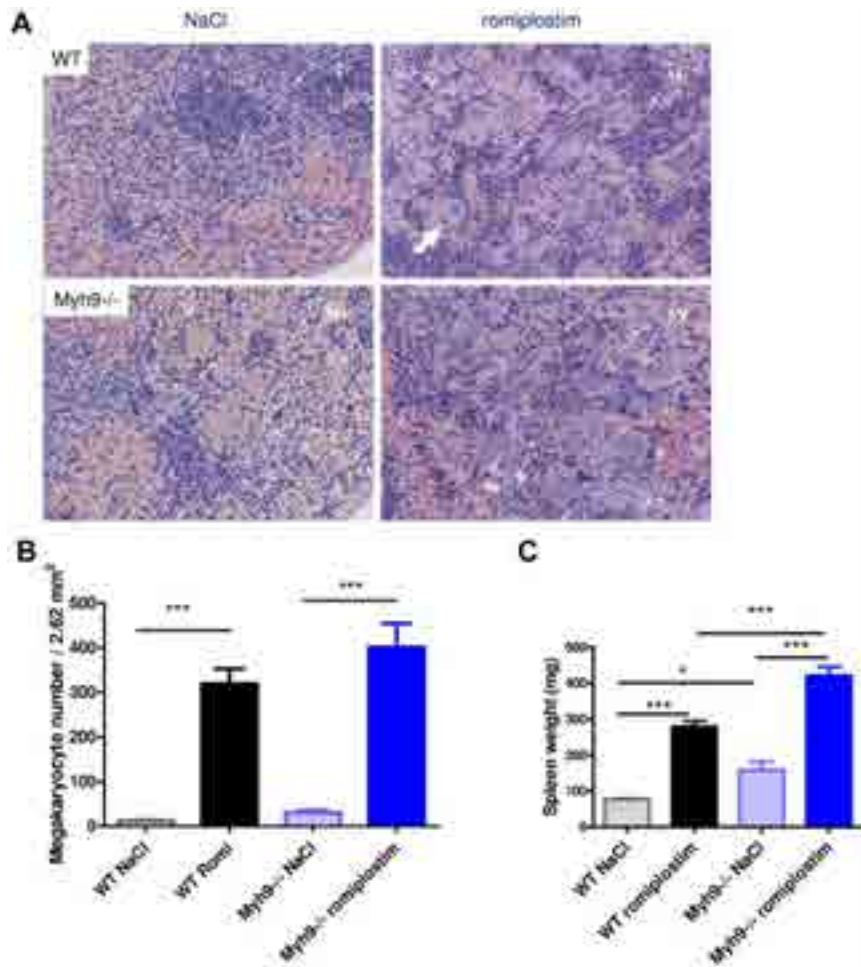


Figure 3. Romiplostim-induced increase in splenic MKs. (A) H&E-stained paraffin sections of the spleen of romiplostim-treated and control mice. Animals treated with romiplostim (ii,iv) show a clearly visible increase of MKs in the spleen compared with the untreated animals (i,iii). Of note, the number of MKs was already slightly increased in Myh9^{-/-} mice at baseline (iii). The arrow in panel ii shows a mitosis of a MK (original magnification, ×789). (B) Quantification of MK numbers in the spleen (mean ± SEM of 9-10 animals per column). (C) Spleen weight; mean ± SEM of 9-10 animals per column.

compared with control WT mice (11.7 MKs/field vs. 30.2 MKs/field for control WT and Myh9^{-/-} spleen, respectively; Figure 3Ai,ii,B).

Romiplostim treatment strongly increased the MK number in both WT and Myh9^{-/-} mice compared with their respective controls. The absolute number of MKs was even higher in Myh9^{-/-} mice compared with WT mice, with a mean value of 400 MKs/field for treated Myh9^{-/-} mice and 319.3 MKs/field in the treated WT mice (Figure 3Aii,iv,B). However, the relative increase in megakaryocyte numbers during administration of romiplostim was much lower in Myh9^{-/-} mice (13-fold) than in WT mice (27-fold). This may explain in part the lower increase in Myh9^{-/-} platelet count. As a probable consequence of increased extramedullary megakaryocytopoiesis, the spleen was enlarged after romiplostim injections in both Myh9^{-/-} mice and WT mice (Figure 3C). Romiplostim-treated mice also showed an increased number of cluster-forming MKs in the spleen, with some MKs being in mitosis (Figure 3Aii).

Romiplostim increases the proportion of immature MKs

Romiplostim also increased total MK numbers of the BM to a similar level in WT and Myh9^{-/-} mice (Figure 4A). Ultrastructural observations showed that the proportion of immature versus mature MKs was modified by the treatment, with a higher proportion of immature MKs (Figure 4B).

However, the number of visible naked nuclei remained very low and did not increase in the romiplostim-treated marrow. Thus,

when calculating their percentage in the BM, it was decreased in romiplostim-treated marrow because the number of MKs increased (Figure 4C). This observation was surprising in the view of the large increase in MK numbers and the 8-fold increase in platelet count in WT mice treated with romiplostim and suggests that MK nuclei elimination is either increased to maintain a low level of naked nuclei by some regulation or that an increased number of intact MKs transmigrate into the sinusoid circulation.

Romiplostim-induced MK nuclei emboli in the pulmonary microvasculature

Because the presence of MKs in lung capillaries from TPO-treated mice was previously observed,¹⁶ we investigated whether MKs were also present in the lungs from romiplostim-treated mice. Histologic lung sections showed a large amount of emboli composed mostly of MK nuclei present in the capillaries of both WT and Myh9^{-/-} mice treated with romiplostim (Figure 5A-B). This observation favors an increased transmigration of intact MKs to the sinusoid circulation in romiplostim-treated mice and explains the finding of a low number of naked MK nuclei despite a big increase in total MK numbers. Of note, nontreated control Myh9^{-/-} mice had slightly more emboli than nontreated WT control mice, although the difference was not significant (Figure 5B), probably resulting from the increased baseline levels of MKs in Myh9^{-/-} mice.

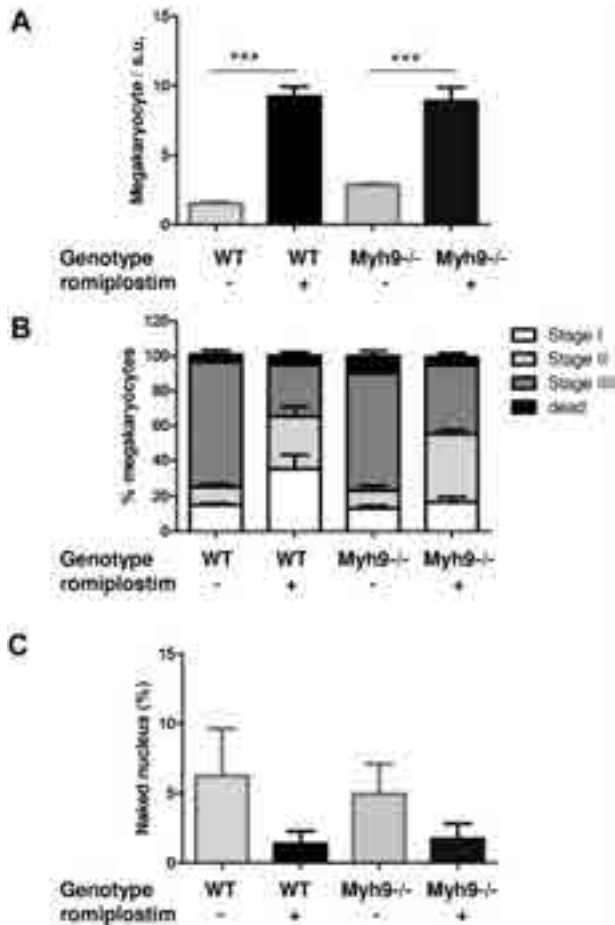


Figure 4. Romiplostim-induced an increase in immature MKs. (A) Quantification of BM MKs as observed by electron microscopy, per surface unit (s.u.; 12 945 μm^2). Each bar represents the mean \pm SEM of 3 BMs, for a total number of 99-205 counted MKs. (B) Classification of the MKs according to their maturation stages: stage I (presence of granules), stage II (developing DMS not yet organized), stage III (DMS organized in platelet territories). Data are represented as the percentage of total MKs. (C) Quantification of naked MK nuclei inside the BM. Each bar represents the percentage of naked nuclei relative to the total number of MKs counted.

Romiplostim treatment did not lead to obstruction of the microvasculature in other organs

To investigate whether an increase in the number of circulating large platelets could lead to obstruction of the microcirculation, the organs, in particular brain, gut, pancreas, lungs, spleen, kidney, and psoas muscle, were removed for histologic analyses. No occlusions were observed in all examined tissues either from WT mice or from Myh9^{-/-} mice after 1 month of romiplostim treatment.

Romiplostim induces a relative deficiency of the GPIb-IX-V complex and of GPVI but no increase in P-selectin exposure or GPIIb/IIIa activation

Expression of GPIb-IX-V complex and GPVI decreased during treatment with romiplostim for 28 days, as assessed by flow cytometry. In contrast, expression of GPIIb/IIIa did not change significantly (Figure 6Ai-iv). No difference of GPIb complex or GPVI surface expression was observed after 6 hours of romiplostim treatment (not shown). This indicates that reduction of GPIb α and GPVI surface expression is not caused by direct platelet activation by romiplostim but by a more complex mechanism. Western blot experiments to visualize total platelet GPIb α , GPIb β , GPIIIa, and

GPVI protein also showed a slight decrease of GPVI after romiplostim treatment but no significant decrease in GPIb α or GPIb β , suggesting that the decrease in surface expression of the GP is more likely caused by cleavage or internalization rather than by romiplostim-induced decrease of protein synthesis (Figure 6B). However, no increase in P-selectin exposure could be detected after romiplostim treatment or no signs of GPIIb/IIIa activation as measured by Jon/A-PE labeling, indicating no major platelet activation (Figure 6C).

Effect of romiplostim on bleeding time

Romiplostim treatment did not reduce the bleeding time in Myh9^{-/-} mice after 1 month of treatment. Surprisingly, the bleeding time was increased in WT mice. This prolongation of bleeding time persisted throughout romiplostim treatment and was already present after only 10 days of treatment (not shown; Figure 6D). On the contrary, romiplostim administration for only 6 hours did not modify the bleeding time in WT mice (not shown).

Romiplostim enhances reticulin fibers in the BM of Myh9^{-/-} mice to a larger extent than in WT mice

We also observed a difference in the amount of reticulin fibers in the BM of Myh9^{-/-} mice compared with WT mice after romiplostim treatment. None of the nontreated WT mice showed reticulin fibers in the BM, and only one of the control Myh9^{-/-} mice showed mild fibrosis. However, in sections from 4 of 5 independent

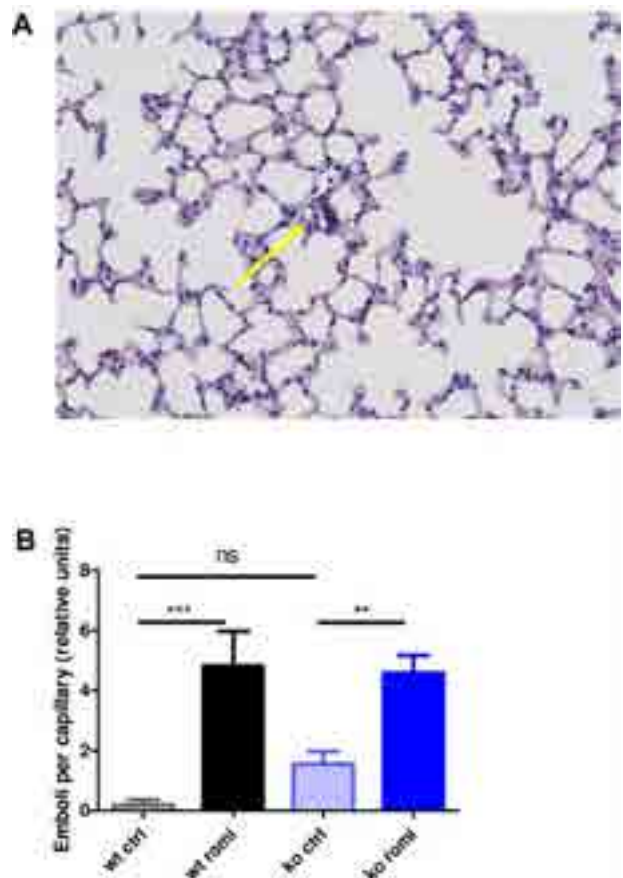


Figure 5. Romiplostim-induced increase in MK nuclei lung emboli. (A) H&E-stained lung tissue of a WT animal treated with romiplostim showing a representative lung embolus (arrow). (B) Quantification of the emboli per capillary in lung tissue. Each bar represents the mean \pm SEM of 10 animals.

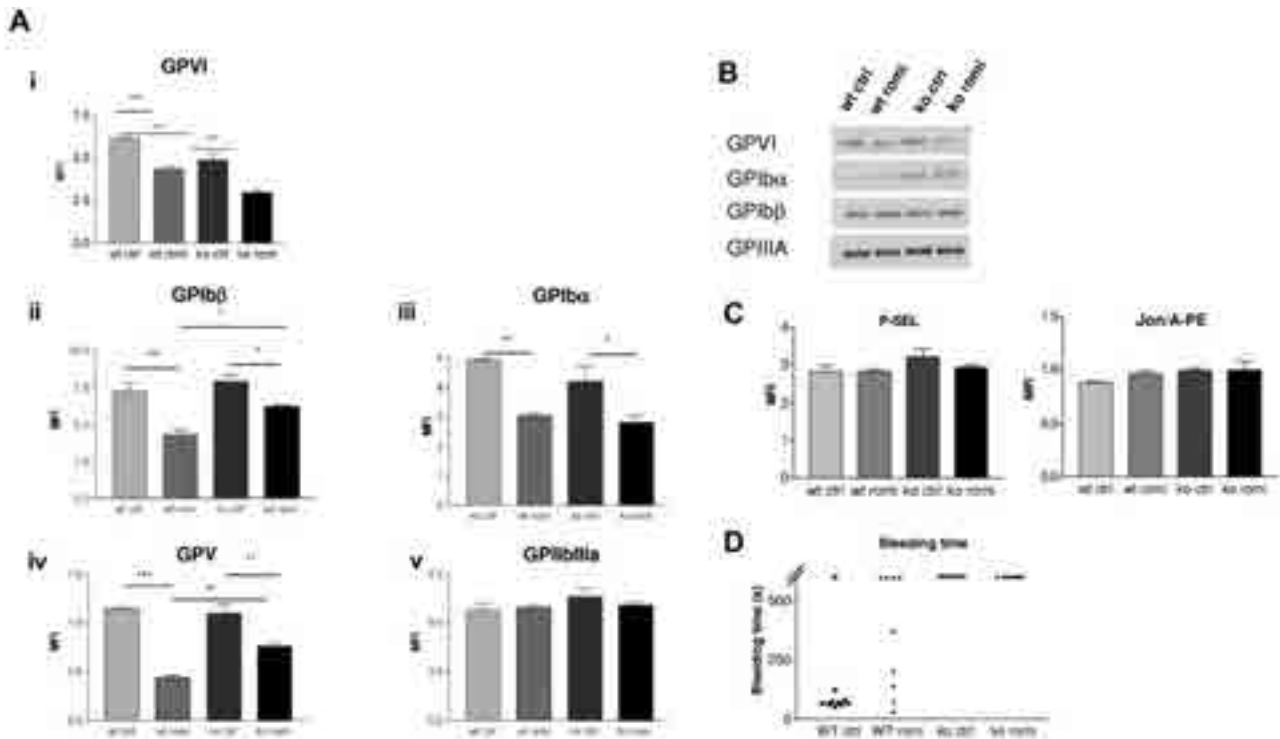


Figure 6. Romiplostim induces a reduction of GPVI and GPIb-IX-V complex expression. (A) Flow cytometric experiment showing in both WT mice and *Myh9*^{-/-} mice a reduced surface expression of GPVI and GPIb-IX-V complex during romiplostim treatment (i-iv), whereas expression of GPIIb/IIIa (v) remained normal. Blood samples were taken after 28 days of romiplostim treatment. Results are expressed as the mean fluorescent intensity ± SEM (n = 8 for GPVI and n = 4 for other proteins). (B) Western blot analysis showing total GPVI, GPIIbα, and GPIIIa expression (lysate from a pool of 8-10 mice, after 1 month of treatment, representative of 2 separate experiments). (C) Flow cytometric experiment showing absence of P-selectin exposure or Jon/A-PE labeling after romiplostim treatment (n = 4-5). (D) Bleeding time, measured by the tail tip sectioning, was not reduced in *Myh9*^{-/-} mice treated with romiplostim for 1 month, whereas it was increased in treated WT mice.

Myh9^{-/-} BMs a much stronger increase in reticulin fibers was present after 4 weeks of romiplostim treatment compared with sections from BM of 4 WT mice (Figure 7). This finding is important for safety considerations for long-term treatment with TPO receptor agonists of patients with MYH9-RDs.

Discussion

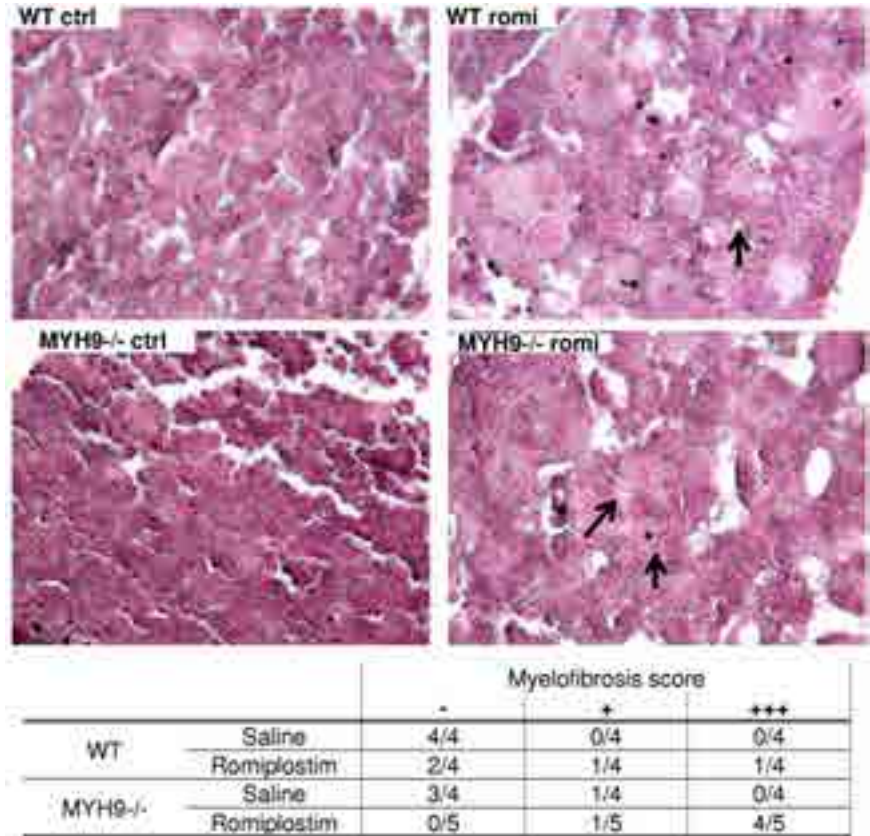
In this study we made 3 important observations. First, we show that the increase in the number of giant platelets in *Myh9*^{-/-} mice by the TPO receptor agonist romiplostim does not affect the microcirculation to an extent that causes changes in histology. Second, our study provides first in vivo evidence that the risk of increased myelofibrosis induced by romiplostim treatment might be enhanced in patients with MYH9-RDs compared with patients with immune-thrombocytopenia. Third, romiplostim induces a reduction of the GPIbIX complex and of GPVI in *Myh9*^{-/-} and WT mice.

Especially the first 2 findings are important in view of a recent clinical evaluation of another TPO receptor agonist, namely eltrombopag, in patients with MYH9-RDs.⁹ That pivotal study suggested that second-generation thrombopoietic agents could represent new therapeutic strategies in patients with MYH9-RDs presenting with symptomatic bleeding tendency. Although the increase in giant platelet numbers reduced the bleeding tendency clinically, it remained unclear whether the increase in circulating giant platelets could have deleterious consequences for the microcirculation, especially of the renal glomerula.

We evaluated the effects of administration of romiplostim over 1 month to *Myh9*^{-/-} mice. These mice differ from patients with

MYH9-RDs, because they lack the nonmuscular myosin IIA protein, whereas the protein is present albeit structurally changed in patients. However, the mice reproduce the macrothrombocytopenia of patients with MYH9-RDs.¹⁰ Although romiplostim was effective in these mice in terms of an increase in platelet counts, the effect was only modest (2-fold) compared with WT mice (7-fold). This was surprising because the absolute maximum number of MKs in the spleen of *Myh9*^{-/-} mice after romiplostim treatment was even higher than in WT mice. In this regard, the mouse model reflects the observation of the clinical study with eltrombopag in patients with MYH9-RDs. These patients also showed a moderate increase in platelet counts only, and some of the patients did not respond to eltrombopag at all.⁹ Our study provides evidence that the reason for the moderate response to TPO receptor agonists could be in part the limited response dynamic of the *Myh9*^{-/-} BM because of the increased baseline number of MKs that results from a higher amount of circulating TPO.¹⁵ Therefore, the mean fold increase in MK numbers both in the spleen and in the BM was significantly lower for *Myh9*^{-/-} mice than for WT mice. Another reason is probably also the increased mortality and the intrinsic decreased capacity of *Myh9*^{-/-} MKs to effectively produce platelets as previously reported.⁴ As observed by electron microscopy, the ultrastructural defects already observed in *Myh9*^{-/-} BM¹⁵ were still present after romiplostim treatment, namely the invasive/leaky aspect, absence of peripheral zone, and abnormal development/organization of the demarcation membrane system (data not shown), indicating that stimulation of megakaryocytopoiesis does not improve *Myh9*^{-/-} MK maturation or their ability to release platelets.

Figure 7. Myosin-deficiency increased myelofibrosis induced by romiplostim. Histologic sections stained for reticulin fibers (appearing black, arrows) showing the absence of fibrosis in control WT or Myh9^{-/-} BM, compared with the presence of fibrosis after 1 month of romiplostim treatment. Quantification was performed according to the absence of fibers (-), presence of a few fibers (+), or presence of numerous fibers (+++). Fibrosis was more extensive in Myh9^{-/-} mice. Similar data were obtained with a second series of animals treated with the same romiplostim protocol (not shown).



A major concern was whether the increase in numbers of circulating giant platelets in Myh9^{-/-} mice may cause tissue infarcts because of occlusion of microvessels. Indeed MYH9-RD does not necessarily protect against cardiovascular diseases and thromboses despite reduced platelet number as observed in a few patients.¹⁷⁻¹⁹ Thus, agents that increase platelet count may indeed be considered with caution. To evaluate this possibility, histology on various tissues were performed to check for the presence of microthrombi. Histology of the microcirculation in brain, gut, pancreas, lungs, spleen, kidney, heart, and psoas muscle did not show any signs of microthrombi. These data suggest that increasing platelet counts in patients with macrothrombocytopenia may not worsen microcirculation and argue in favor of the use of thrombopoietic agents in patients with MYH9-RDs when needed.

However, our study also raises the relevant issue that the romiplostim-induced increase in BM reticulin fibers seems to be much more enhanced in Myh9^{-/-} mice than in WT mice. Given the relatively good prognosis related to morbidity because of major bleeding in patients with MYH9-RDs, this finding in animal experiments indicates that a very careful risk-benefit assessment is necessary before patients with MYH9-RDs are treated for longer periods of time with TPO receptor agonists. Furthermore, this finding from animal experiments advises to control the BM in such patients to recognize patients with an increased risk for myelofibrosis in time. The observation of increased myelofibrosis is plausible and consistent with our finding of an increased death rate of Myh9^{-/-} MKs in the BM. These dying cells probably release substances that promote myelofibrosis. That impaired storage of platelet α granule contents causes myelofibrosis is well known from the gray platelet syndrome.²⁰⁻²²

Our study also provides further information on more settle effects of romiplostim treatment. The romiplostim-induced in-

crease in BM and spleen MK numbers was accompanied by an increase in MK transmigration as shown by the higher number of MK nuclei emboli counted in pulmonary vasculature (Figure 5). The presence of MKs or MK nuclei in the lungs has long been reported^{16,23,24} and is particularly increased in cases of reactive thrombopoiesis or after TPO treatment¹⁶ in agreement with the present observations. In addition, infusion of mature MKs into mice mostly localized to the pulmonary vasculature where they release platelets.²⁵ This indicates that the pulmonary vascular bed represents indeed a major trap for circulating MKs. Our observations that the number of naked nuclei was not increased in the BM after romiplostim administration may suggest that most of the MKs produced in response to romiplostim exit the BM. A similar number of MK emboli were found in WT and Myh9^{-/-} mouse lungs, indicating that Myh9^{-/-} MKs are able to transmigrate to a similar extent as WT ones. In nontreated animals, only Myh9^{-/-} mice exhibited a few MK nuclei emboli that may reflect the basal higher MK number present in their BM.

Interestingly, for both genotypes we observed an increase in platelet size after the start of romiplostim treatment, which was present until day 28 in WT mice, whereas it was reversible in Myh9^{-/-} mice (Figure 1B). This suggests that the stimulation of megakaryocytopoiesis results in a change of platelet production with formation of larger platelets and potentially also in changes in the platelet membrane. The reversible pattern of platelet size increase in the Myh9^{-/-} mice could be because of an increase in platelet debris, which overall may result into a decrease in mean platelet volume. When assessed by electron microscopy, also the Myh9^{-/-} platelets appeared larger at day 33 (data not shown).

This prompted us to measure the expression of platelet membrane glycoproteins that showed a reduced expression of the GPIbIX complex and of GPVI after the start of romiplostim in both

WT and Myh9^{-/-} mice. This effect has not been described for TPO receptor agonists so far. Because we also observed in parallel a small increase in platelet size, the absolute decrease of receptor expression might even be underestimated. Reduction of membrane GPs can result from shedding by metalloproteases, from internalization, or from apoptosis. Both GPIb α and GPVI are cleaved by metalloproteinases after platelet activation.²⁶ However, we found no evidence for platelet activation as indicated by the absence of P-selectin exposure or GPIIb/IIIa activation. Although GPVI was reduced in the Western blot analyses, probably because of shedding, no decrease in GPIb α and GPIb β was observed, which rules out putative romiplostim-induced decrease in protein synthesis. Platelet apoptosis is also unlikely to explain the decreased glycoproteins surface expression because both annexin V labeling and mitochondrial potential were unaffected by romiplostim treatment (not shown).

GPIb shedding might also be the reason for the observed decrease in the GPIb/GPIIb/IIIa ratio in patients with MYH9-RDs,²⁷ who have increased TPO levels, which might already trigger a reduction of GPIb expression. Because recent studies imply a potentially important role of the GPIbIX complex for thrombin generation,^{28,29} the observed decrease in GPIb-V-IX complex on platelet function and thrombin generation potential should be further assessed in patients receiving TPO receptor agonists.

Romiplostim treatment did not decrease the bleeding time in the Myh9^{-/-} mice, indicating that in our model platelet dysfunction is not overcome by doubling the platelet count. Surprisingly, the bleeding time even increased in the treated WT mice. Although we have no evidence why this phenomenon occurs, it may be because of a combination of effects. These may include of course the decrease in the GPIb complex, and in GPVI, but also an increase in VWF consumption resulting from the high amount of circulating platelets, as already reported for thrombocytopenia.³⁰ A direct effect of romiplostim on platelet function is unlikely because romiplostim administration for 6 hours did not increase the bleeding time.

A potential limitation of our study is that we used Myh9^{-/-} mice and not mice showing a heterozygous mutation of the Myh9 gene, which would reflect the exact situation in patients with MYH9-RDs. Furthermore, in our mouse model Myh9 is knocked out in the megakaryocytic lineage only, whereas in affected humans other organs are also affected. Thus, our study is primarily informative about platelet and MK-related effects. However, because the platelet phenotype observed in MYH9-RDs is autosomal dominant, and because Myh9^{-/-} mice present with platelet characteristics of the human disease, including enlarged platelets, our model should sufficiently rule out the main issue of impairment of the microcirculation by increasing the number of giant platelets. Having an even more severe platelet phenotype in terms of total absence of contractile functions and higher mean platelet volume, compared with a heterozygous mutation as reported recently by

Zhang et al,³¹ allows drawing stronger conclusions about the potential risks of such a treatment. A second note of caution relates to the duration of observation. Because our study was performed over a period of 1 month, the data do not exclude more pronounced adverse effects on myelofibrosis and microcirculation during long-term treatment.

In conclusion, we showed that romiplostim is able to increase, although modestly, the number of circulating platelets in a murine MYH9-RD model. Despite the presence of increased circulating large platelets, no occlusion of the microcirculation was observed whatever the organs examined. These data, together with a previous study that used eltrombopag in patients,⁹ are encouraging and further suggest that a short-term use of thrombopoietic agents could have a role in reducing the bleeding tendency in patients with MYH9-RDs without the risk for major adverse effects. However, during longer treatment of patients with MYH9-RDs with thrombopoietic agents, myelofibrosis has to be considered as a potential severe adverse effect, and patients should be carefully monitored. A more generally relevant finding is the reduction of GPIbIX and GPVI expression on platelets during treatment with TPO receptor agonists. This needs to be further assessed in patients receiving TPO receptor agonists.

Acknowledgments

The authors thank Josiane Weber for excellent technical assistance and Monique Freund for animal management.

This work was supported by the Department of Cardiovascular Medicine at the Universitätsmedizin, Greifswald, and by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique). C.L. is the recipient of a "contrat d'interface" between the EFS and Inserm.

AMGEN provided romiplostim. The company had no role in planning or performing the study, evaluating the data, or writing the manuscript.

Authorship

Contribution: C.L., F.P., A.E., and P.L. performed the mouse experiments and the electron microscopy studies; K.E. and F.D. performed the histology and MK quantifications; C.L., C.G., and A.G. designed the study, supervised the experiments, interpreted the results, and wrote the manuscript; and all authors contributed to the final version of the manuscript.

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

Correspondence: Christian Gachet, UMR_S949 Inserm-Université de Strasbourg, EFS-Alsace, 10, rue Spielmann, BPN 36, 67065 Strasbourg Cedex, France; e-mail christian.gachet@efsalsace.fr.

References

1. Seri M, Pecci A, Di Bari F, et al. Myh9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(3):203-215.
2. Althaus K, Greinacher A. Myh9-related platelet disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2009;35(2):189-203.
3. Balduini CL, Pecci A, Savoia A. Recent advances in the understanding and management of myh9-related inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol*. 2011;154(2):161-74.
4. Eckly A, Rinckel JY, Laeuffer P, et al. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in MYH9 knock-out mice. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2243-2251.
5. Pecci A, Malara A, Badalucco S, et al. Megakaryocytes of patients with myh9-related thrombocytopenia present an altered proplatelet formation. *Thromb Haemost*. 2009;102(1):90-96.
6. Kuter DJ. Biology and chemistry of thrombopoietic agents. *Semin Hematol*. 2010;47(3):243-248.
7. Stasi R, Bosworth J, Rhodes E, Shannon MS, Willis F, Gordon-Smith EC. Thrombopoietic agents. *Blood Rev*. 2010;24(4-5):179-190.
8. Ghanima W, Bussel JB. Thrombopoietic agents in immune thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 2010;47(3):258-265.
9. Pecci A, Greslele P, Klersy C, et al. Eltrombopag for the treatment of the inherited thrombocytopenia

- deriving from myh9 mutations. *Blood*. 2010;116(26):5832-5837.
10. Leon 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.
 11. Hartley C, McElroy T, Molineux G, Begley G. The novel thrombopoietic agent AMG 531 is effective in pre-clinical models of chemo/radiotherapy induced thrombocytopenia. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 2005;46:1233.
 12. Leon C, Hechler B, Freund M, et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest*. 1999;104(12):1731-1737.
 13. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):394-418.
 14. Dombrowski F, Stieger B, Beuers U. Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Lab Invest*. 2006;86(2):166-174.
 15. 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.
 16. Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol*. 2000;157(1):69-74.
 17. McDunn S, Hartz W Jr, Ts'ao C, Green D. Coronary thrombosis in a patient with May-Hegglin anomaly. *Am J Clin Pathol*. 1991;95(5):715-718.
 18. Goto S, Kasahara H, Sakai H, et al. Functional compensation of the low platelet count by increased individual platelet size in a patient with May-Hegglin anomaly presenting with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 1998;64(2):171-177.
 19. Selleng K, Lubenow LE, Greinacher A, Warkentin TE. Perioperative management of MYH9 hereditary macrothrombocytopenia (Fechtner syndrome). *Eur J Haematol*. 2007;79(3):263-268.
 20. Kahr WH, Hinckley J, Li L, et al. Mutations in NBEAL2, encoding a beach protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet*. 2011;43(8):738-740.
 21. Gunay-Aygun M, Falik-Zaccai TC, Vilboux T, et al. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet*. 2011;43(8):732-734.
 22. Albers CA, Cvejic A, Favier R, et al. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat Genet*. 2011;43(8):735-737.
 23. Pedersen NT. Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. *Scand J Haematol*. 1978;21(5):369-375.
 24. Levine RF, Eldor A, Shoff PK, Kirwin S, Tenza D, Cramer EM. Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol*. 1993;51(4):233-246.
 25. Fuentes R, Wang Y, Hirsch J, et al. Infusion of mature megakaryocytes into mice yields functional platelets. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3917-3922.
 26. Gardiner EE, Arthur JF, Kahn ML, Berndt MC, Andrews RK. Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase. *Blood*. 2004;104(12):3611-3617.
 27. Di Pumbo M, Noris P, Pecci A, et al. Defective expression of GPIB/IX/V complex in platelets from patients with May-Hegglin anomaly and Sebastian syndrome. *Haematologica*. 2002;87(9):943-947.
 28. Ruggeri ZM, Zarpellon A, Roberts JR, McClintock RA, Jing H, Mendolicchio GL. Unravelling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*. 2010;104(5):894-902.
 29. Ravanat C, Strassel C, Hechler B, et al. A central role of GPIb-IX in the procoagulant function of platelets that is independent of the 45-kDa GPIb-alpha N-terminal extracellular domain. *Blood*. 2010;116(7):1157-1164.
 30. van Genderen PJ, van Vliet HH, Prins FJ, et al. Excessive prolongation of the bleeding time by aspirin in essential thrombocythemia is related to a decrease of large von Willebrand factor multimers in plasma. *Ann Hematol*. 1997;75(5-6):215-220.
 31. Zhang Y, Conti MA, Malide D, et al. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood*. 2012;119(1):238-250.

Annexe 2 – Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes.

blood

2014 123: 921-930
Prepublished online October 23, 2013;
doi:10.1182/blood-2013-03-492330

Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes

Anita Eckly, Harry Heijnen, Fabien Pertuy, Willie Geerts, Fabienne Proamer, Jean-Yves Rinckel, Catherine Léon, François Lanza and Christian Gachet

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/123/6/921.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Platelets and Thrombopoiesis](#) (427 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.

Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes

Anita Eckly,¹ Harry Heijnen,^{1,2,3} Fabien Pertuy,¹ Willie Geerts,⁴ Fabienne Proamer,¹ Jean-Yves Rinckel,¹ Catherine Léon,¹ François Lanza,¹ and Christian Gachet¹

¹Unité mixte de recherche S949 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace, Strasbourg, France; ²Cell Microscopy Center, Department of Cell Biology and ³Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands; and ⁴Department of Molecular Cell Biology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

Key Points

- Using state-of-the-art three-dimensional electron microscopy approaches, we show that the onset of the DMS formation is at the megakaryocyte plasma membrane.
- A pre-DMS structure is formed in the perinuclear region, through a PM invagination process that resembles cleavage furrow formation.

The demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes forms the plasma membrane (PM) of future platelets. Using confocal microscopy, electron tomography, and large volume focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM), we determined the sequential steps of DMS formation. We identified a pre-DMS that initiated at the cell periphery and was precisely located between the nuclear lobes. At all developmental stages, the DMS remained continuous with the cell surface. The number of these connections correlated well with the nuclear lobulation, suggesting a relationship with cleavage furrow formation and abortive cytokinesis. On DMS expansion, Golgi complexes assembled around the pre-DMS, and fusion profiles between *trans*-golgi network-derived vesicles and the DMS were observed. Brefeldin-A reduced DMS expansion, indicating that the exocytic pathway is essential for DMS biogenesis. Close contacts between the endoplasmic reticulum (ER) and the DMS were detected, suggesting physical interaction between the 2 membrane systems. FIB/SEM revealed that the DMS forms an intertwined tubular membrane network resembling the platelet open canalicular system. We thus propose the following steps in DMS biogenesis: (1) focal membrane assembly at the cell periphery; (2) PM invagination and formation of a perinuclear pre-DMS; (3) expansion through membrane delivery from Golgi complexes; and (4) ER-mediated lipid transfer. (*Blood*. 2014;123(6):921-930)

Introduction

The maturation of megakaryocytes (MKs) includes the development of a unique and extensive membrane system known as the demarcation membrane system (DMS), which divides the cytoplasm into small platelet territories. One MK is thought to produce an average of 4000 platelets. Although it has been known for many years that the DMS ultimately forms the cell membrane of the future platelets,^{1,2} the exact mechanism of the formation of this unique membrane system remains unclear. Early electron microscopy (EM) examination of late stage mature MKs led to the proposal that the DMS demarcates already preformed platelets.³ Observations by De Bruyn of long MK extensions protruding into the sinusoidal lumen modified this idea and suggested that the DMS divides the MK cytoplasm into intertwined and compacted cylindrical regions.⁴ Such a model had already been proposed earlier by Thiery and Bessis, who observed that MKs from bone marrow (BM) explants extended elongated projections they called proplatelets.⁵ Studies using cultured MKs led to a more refined model, where the DMS appears to function as a membrane reservoir for the extension of proplatelets, which would then fragment into platelets along their length⁶ or at their tips.⁷⁻⁹ More recently, using intravital microscopy to visualize platelet

generation in mice, Junt et al¹⁰ have provided evidence that MKs extend voluminous processes into the lumen of sinusoids, which are sheared off by the flowing blood and thereby produce proplatelets that subsequently fragment into individual platelets.^{2,11-13}

Although the DMS has been well characterized at the end stages of MK maturation, little is known about the biogenesis of this unique membrane system during the initial stages of MK development. Various subcellular origins have been proposed as a source of DMS biogenesis: (1) the MK plasma membrane (PM), (2) specializations of the endoplasmic reticulum (ER) or the Golgi apparatus, and (3) de novo membrane formation.^{2,14-16} The current view favors a mechanism involving invagination of the MK plasma membrane. This is supported by EM studies using extracellular tracers that demonstrated that the DMS is continuous with the extracellular environment. Using live cell imaging of mature MKs, Mahaut-Smith et al¹⁷ showed that the DMS is electrophysiologically contiguous with the peripheral plasma membrane. In this context, it was recently proposed that the term “invaginated membrane system” would be more appropriate than DMS.^{6,8,18} However, continuity of the DMS with the PM does not provide definitive evidence that

Submitted March 26, 2013; accepted October 16, 2013. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 23, 2013; DOI 10.1182/blood-2013-03-492330.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* commentary on this article in this issue.

© 2014 by The American Society of Hematology

PM invagination is the sole source of these membranes. Considering the large amount of membrane required for the biogenesis and expansion of the DMS, it follows that fast de novo membrane synthesis must also be essential. It remains to determine whether the DMS is formed intracellularly from the Golgi and then directed to the cell surface or whether newly formed membrane is first delivered to the PM and then rapidly invaginates. It also remains to define the exact contribution of the ER, the largest intracellular membrane source in eukaryotic cells, where lipids are synthesized and lipid transfer takes place.

In the present study, we used confocal microscopy imaging and high resolution EM and tomography to investigate the biogenesis and expansion of the DMS, both in situ in mouse BM MKs and in vitro in cultured MKs generated from progenitors. In immature MKs, we found the pre-DMS to be a centrally located well-defined membrane complex, which at its earliest detectable stage was continuous with the cell surface. Moreover, we found that it originates from a distinct focal site at the plasma membrane. Our data further show that Golgi-derived membranes and close ER contacts contribute to a continuous membrane supply for DMS growth.

Materials and methods

See supplemental Materials on the *Blood* Web site for details. All procedures for animal experiments are performed in accordance with the guide for the care and use of laboratory animals as defined by the European laws (Animal Facility Agreement C-67-482-10).

Megakaryocyte culture

The mouse BM progenitor cells were obtained after Lin⁻ selection (Stem Cell Technologies) and prepared as described previously.¹⁹ In some experiments, brefeldin-A (BFA; 1 μg/mL) was added to the cultures on day 1, and the cells were fixed after 4 hours.

Confocal microscopy

The cells were fixed at the indicated times using 2% paraformaldehyde and prepared as described.¹⁹ The following antibodies were used at 10 μg/mL: Alexa488-conjugated anti-glycoprotein Ib β (GPIbβ), anti-β-tubulin, anti-protein regulator of cytokinesis 1 (PRC-1), anti-γ-tubulin, and anti-giantin. The appropriate secondary antibodies were conjugated with Alexa 546. 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) was applied for nucleus staining. Cells were examined under a confocal microscope (TCS SP5; Leica). Confocal analysis of BM tissue was performed according to the method described previously.²⁰

Pulse-chase surface-labeling experiments

Lin⁻ BM cell were first labeled with 10 μg/mL Alexa488-conjugated antibody against GPIbβ at 4°C for 15 minutes. In parallel, nonspecific binding of irrelevant IgG was determined. The unbound antibodies were removed by 3 washes of phosphate-buffered saline, and the cells were then cultured in Dulbecco's modified Eagle medium for various chase times (5 minutes and 1, 2, and 4 hours). In some experiments, cycloheximide (100 μg/mL) was added in the culture medium. The cells were fixed with 2% paraformaldehyde, washed, cytospun, counterstained with DAPI, and prepared for confocal microscopy.

EM

For transmission electron microscopy (TEM), BM were fixed with 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon as described previously.²¹ In some experiments, the fixed samples were incubated with 1% tannic acid for 1 hour. For immunoelectron microscopy, BM was fixed with 2.5% paraformaldehyde

and 0.5% glutaraldehyde, infiltrated with 2.3 M sucrose, and frozen in liquid nitrogen as described.²²

For EM tomography, samples were processed as for TEM. Dual-axis tilt series of selected MKs were recorded using a Tecnai 20 (FEI) and processed as previously described.²² The tilt series were aligned and three-dimensionally (3D) reconstructed using IMOD (Boulder Laboratory).²³

For focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM), samples were prepared as described previously.²⁴ Briefly, glutaraldehyde-fixed BM cells were incubated with 1.5% potassium ferrocyanide and 1% osmium (contrast-enhancing step), processed as for TEM, and examined under a Helios NanoLab microscope (FEI). The 3D models were computed using Amira software.

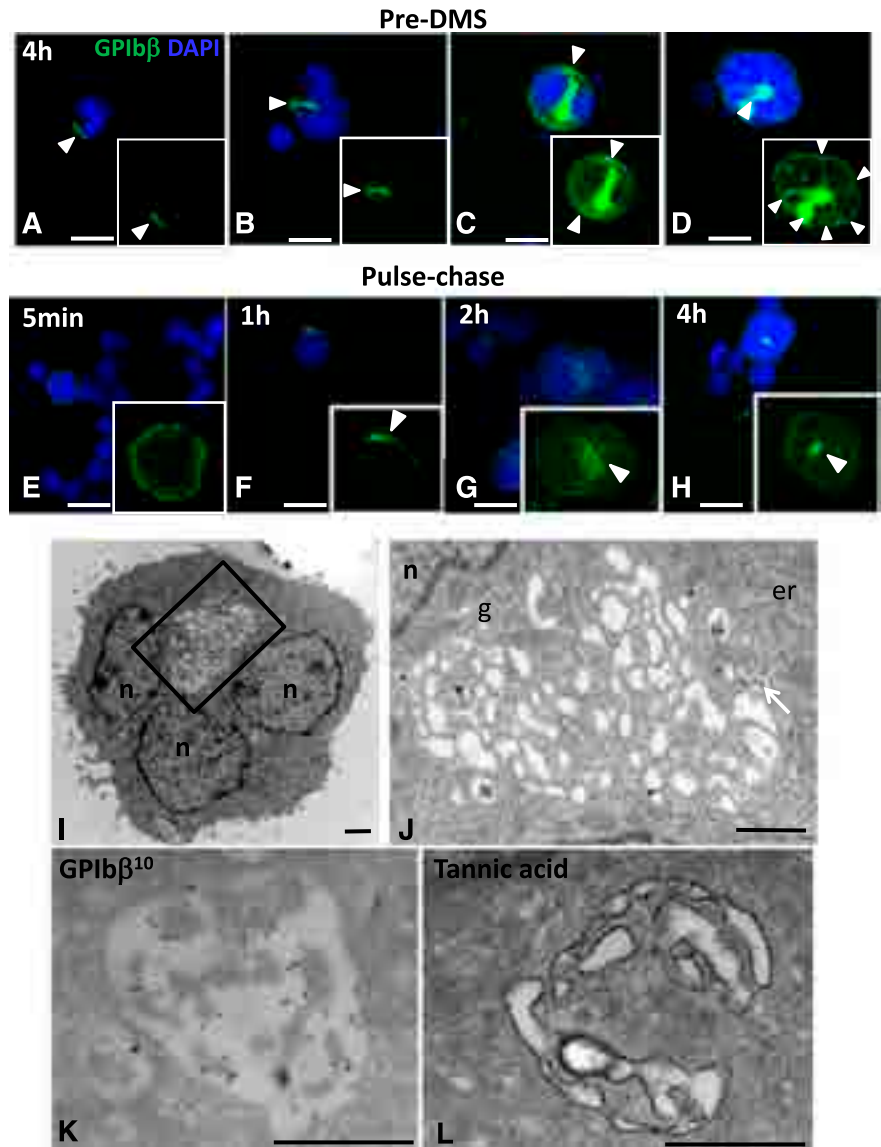
For correlative light and electron microscopy (CLEM), cells were pulse-labeled for 1 hour using the anti-GPIb antibody, fixed, allowed to settle on prepatterned Aclar supports, and processed as previously reported.²⁵

Results

Characterization of a DMS precursor: the pre-DMS

DMS formation starts at focal locations at the cell surface. The major difficulty in performing a detailed study of the earliest developmental stages of the DMS is related to the low frequency of immature MKs in fresh BM samples (~8% of the total MKs).²¹ Therefore, in our first experiments, we used an in vitro MK culture system that enables the enrichment of immature MKs. Lin⁻ BM cells were fixed after short (4 hours) or long periods (1–4 days), stained for the platelet lineage-specific markers GPIbβ (Figure 1) or αIIbβ3 (supplemental Figure 1), and examined by confocal microscopy. Although the cells appeared heterogeneous in their developmental stage, we could define 4 characteristic stages on the basis of the GPIbβ staining pattern during the first 4 hours of culture (Figure 1A–D). Remarkably, GPIbβ appeared to be clustered on the cell surface (Figure 1A, arrowhead) or localized in a polarized fashion just beneath the cell surface (Figure 1B). More frequently, labeling was found both at the cell surface and in the center of the cell (Figure 1C). Complete Z-stack analysis of whole cells revealed that at these early stages the cell surface pool of GPIbβ is continuous with the centrally located GPIbβ-positive spot (supplemental Movies 1–4). The percentage of MKs showing these 4 characteristic stages was 16 ± 5, 12 ± 3, 13 ± 3, and 8 ± 1, respectively (average of 3 independent experiments; total GPIbβ-positive cells counted, 799). Importantly, no intracellular GPIbβ was detected in cells expressing the distinct cell surface clusters (Figure 1A; supplemental Movie 1). In MKs examined on days 1 and 2, the GPIbβ-positive area increased in size until it covered the entire cytoplasm by day 3 (supplemental Figure 1A). On day 4, fully mature MKs extending proplatelets with GPIbβ surface staining were observed (supplemental Figure 1A). We called these developmental stages, respectively, pre-DMS (Figure 1A–D), intermediate DMS, and late DMS (supplemental Figure 1A). Similar immunofluorescence (IF) images were obtained using an anti-αIIbβ3 antibody (supplemental Figure 1B). To better evaluate the kinetics of the membrane invagination, we performed pulse-chase experiments using Alexa488-conjugated GPIbβ antibodies (supplemental Figure 1B). Lin⁻ BM cells were pulse-labeled for 15 minutes, washed, and fixed after 5 minutes and 1, 2, and 4 hours, respectively. IF in antibody-incubated living cells was lower than in permeabilized cells (Figure 1A–D). However the sequence of events was similar. MKs exhibited an even staining of the cell surface at 5-minute chase. After 1 hour, GPIbβ-positive focal points appeared at the cell surface. After 2 and 4 hours, staining was observed at the cell center with

Figure 1. DMS onset and expansion in cultured MKs. (A-D) Confocal images from MK cultures fixed after 4 hours. Cells were stained with anti-GPIIb β (green) and DAPI (blue); full Z-stacks of the representative DMS developmental stages are assembled as maximum intensity projections. (A-B) Distinct GPIIb β -positive territories at and just beneath the cell surface (arrowheads) were observed in MKs. Note the connection with the cell surface (supplemental Movies 1 and 2). (C-D) In larger MKs, GPIIb β -positive areas (pre-DMS) were centrally located between the nuclear lobes and displayed numerous tubular connections with the cell surface (arrowheads in D). Bars, 10 μ m. (E-H) Pulse-chase kinetics of anti-GPIIb β in cultured MKs. Lin⁻ BM cells were pulse-labeled for 15 minutes with Alexa488-conjugated anti-GPIIb (green), washed, and subsequently fixed after 5 minutes and 1, 2, and 4 hours, respectively. Representative maximal projections of whole cells are shown. Bars, 10 μ m. (I-L) Ultrastructural characterization of the pre-DMS in cultured MKs. TEM images showing pre-DMS in MKs cultured for 4 hours. (I) At this stage, the pre-DMS is a well-defined circular membrane network located between the lobes of the nucleus. (J) Higher magnification of the network. (K) Immunogold labeling with anti-GPIIb β (10 nm protein A gold particles) showing that the pre-DMS contains GPIIb β . (L) Tannic acid staining reveals that the pre-DMS is connected to the cell surface. Bars, 1 μ m. er, endoplasmic reticulum; g, golgi; n, nucleus.



numerous connections with the surface (Figure 1E-H). These results suggest that plasma membrane invagination represents the first event leading to the formation of the DMS. To determine whether there might be a preexisting intracellular membrane pool formed in parallel to plasma membrane invagination, we performed pulse-chase experiments in presence of cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis (supplemental Figure 2). The same sequence of events was observed under these conditions, albeit with lower fluorescence intensities, probably due to inhibition of protein synthesis. CLEM was used to determine whether there exists an intracellular membrane pool at a stage that shows the GPIIb β -positive cell surface patch (supplemental Figure 3), and we found no internal pre-DMS at the ultrastructural level.

Pre-DMS is continuous with the cell surface. To better identify the GPIIb β -positive structures in the perinuclear region (Figure 1C), we performed a detailed EM analysis (Figure 1I-L). Similarly as in our IF experiments, well-defined pre-DMS membrane networks were detected between the nuclear lobes (Figure 1I) and were clearly distinguishable from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus (“er” and “g” in Figure 1J). Immunoelectron microscopy confirmed that these membrane networks contained

GPIIb β , which is compatible with the view that they represent the emerging DMS (Figure 1K). In agreement with this hypothesis, incubation of the cells with tannic acid, an electron-dense extracellular tracer, revealed that the centrally located membranes were already at this stage continuous with the cell surface (Figure 1L) and could thus be regarded as early stages of the DMS (pre-DMS as defined above).

Formation of the pre-DMS in situ in BM MKs. To evaluate the biological relevance of these observations, we also studied the development of the DMS in its natural bone marrow environment (Figure 2A). Confocal microscopic analysis of BM sections revealed the same developmental stages as observed in cultured MKs. An overview of mouse BM showing representative maturation stages of the DMS is presented in Figure 2A and a high magnification of a typical pre-DMS area in situ in Figure 2B. Similarly, as in cultured MKs, the pre-DMS appeared to be connected to the surface, and this was confirmed by Z-stack analysis (supplemental Movie 5). Quantification of the number of cells exhibiting pre-DMS showed that they represented $5 \pm 2.7\%$ of the total MKs ($n = 103$ cells analyzed in 3 independent experiments). We used the same criteria as before to define the different stages of development of the DMS at the EM

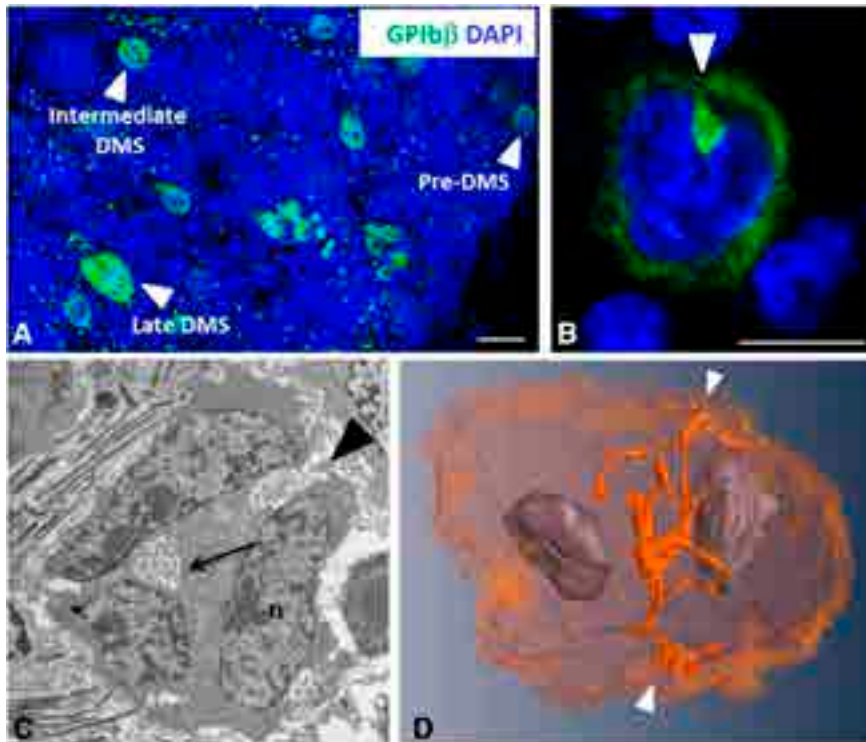


Figure 2. Detection of pre-DMS in bone marrow MKs. (A) View of a 100- μ m-thick BM section with immunofluorescence staining as indicated on the figure. The different stages of development of the DMS (pre-, intermediate, and late) are identified by the anti-GPIb β antibody. Bar, 20 μ m. (B) Higher-magnification confocal image of a typical stage I MK showing GPIb β at the cell periphery and the pre-DMS (arrow) connected to and located just beneath the cell surface, between the nuclear lobes (see supplemental Movie 3 for the complete Z-stack analysis). Bar, 10 μ m. (C) Representative TEM image of the pre-DMS. Note the well-defined boundary, the precise localization in the perinuclear region (arrow) between the nuclear lobes, and the connection with the cell surface (arrowhead). Bar, 2 μ m (D) 3D reconstruction from an FIB/SEM analysis of the pre-DMS (orange) in a bilobulated immature MK. Note that the pre-DMS is precisely positioned between the 2 lobes of the nucleus and is already branched at this early stage of development. The arrowhead indicates a connection with the cell surface.

level. As in cultured MKs, pre-DMS was predominantly found between the nuclear lobes (Figure 2C, arrow) and seemed to be continuous with the cell surface (Figure 2C, arrowhead; supplemental Figure 4). We then adopted a 3D approach using FIB/SEM technology. This method allows a detailed visualization of large cellular volumes, thereby providing a complete 3D representation of the pre-DMS with respect to its intracellular position and connections to the cell surface. A 3D reconstruction of a pre-DMS analyzed by FIB/SEM is shown in Figure 2D. Two cell surface connections are connected to a centrally located pre-DMS structure (Figure 2D, arrowhead; supplemental Movie 6).

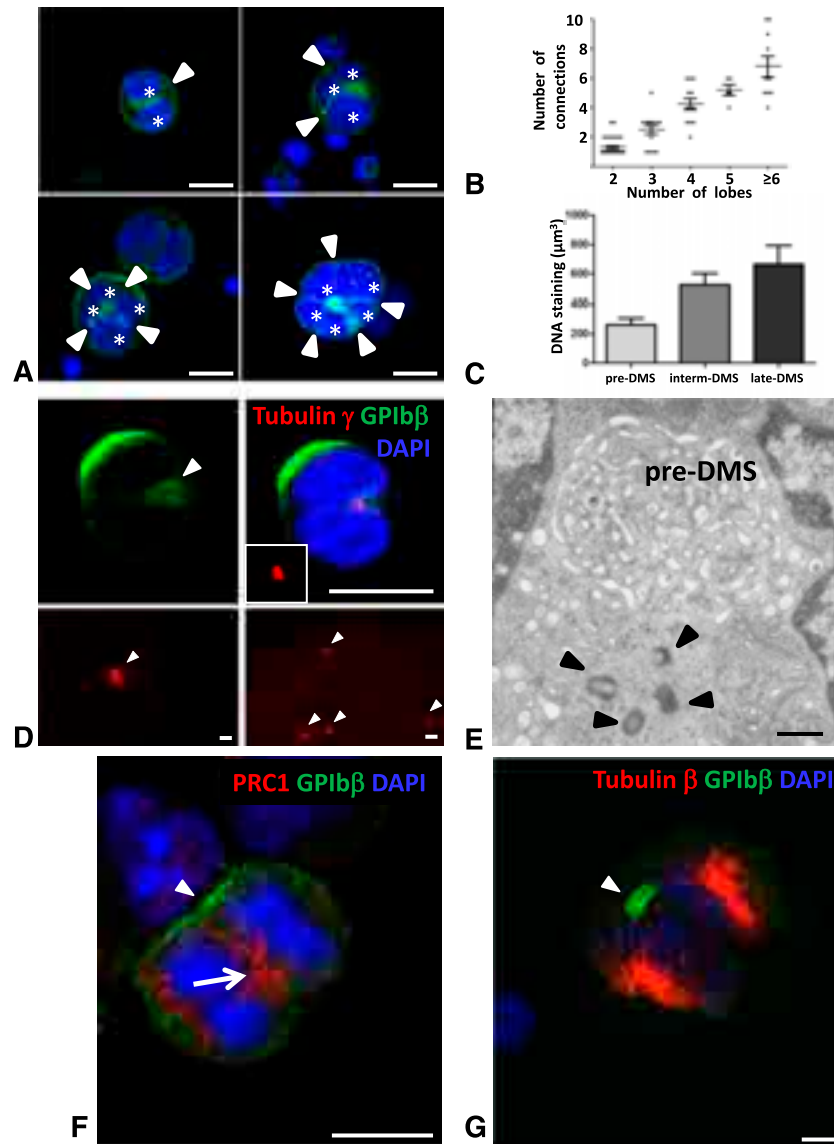
Relationship with the endomitotic process. As these structures were systematically found between the lobes of the MK nucleus, we wanted to investigate the possible relationship of these pre-DMS invaginations with the MK endomitotic cell cycle. From our IF observations using DAPI and GPIb β , it became apparent that the inward growth of the PM was not random but rather seemed to coincide with the nuclear lobulation (Figure 3A). To further characterize this, we performed a detailed Z-stacks analysis in cultured MKs and quantified the number of cell surface connections and the total number of nuclear lobes. Interestingly, we found that the number of connections exactly correlated ($r = 0.994$) with the number of nuclear lobes (Figure 3B). We also observed a proportional increase in DNA content when comparing pre-, intermediate, and late DMS-containing MKs (Figure 3C). We next used an anti- γ -tubulin antibody to further correlate the number of pre-DMS connections with γ -tubulin fluorescent spots, representing the centrosomes. At the early stages, it appeared difficult to quantify the exact ploidy level of the cell based on γ -tubulin staining, because the centrosomes remain detected as a single fluorescent spot (Figure 3D, upper panel). However, the size of γ -tubulin-positive spots were larger in the early stages compared with the late stage MKs (Figure 3D, lower panel), suggesting that multiple centrosomes assemble at these stages of pre-DMS formation. Indeed using TEM analysis, we regularly found centrosome doublets

closely positioned at pre-DMS sites (compare Figure 3E with upper panel of Figure 3D). Of note, the position of the centrosomes near the nucleus indicates that the MKs are in a nonmitotic stage. To further assess the correlation between the pre-DMS and the endomitotic process, we analyzed the pre-DMS in anaphase cells transitioning from 2N to 4N (Figure 3F-G). MKs in this anaphase were identified using the PRC-1 staining, a microtubule-binding protein that controls the midzone organization, and the β 1-tubulin staining of the mitotic spindle. Cells in anaphase are rare, but on occasion we could observe MKs where PRC-1 labeling was centrally localized between the nuclei, and clustered GPIb was at a focal area on the cell surface (Figure 3F). On another image (Figure 3G), β -tubulin staining identified 2 opposite mitotic spindles, and the GPIb-positive pre-DMS was located at 1 extremity of the midzone. Altogether, these observations support the concept that pre-DMS formation is somehow linked to the endomitotic process.

Golgi apparatus contributes to DMS biogenesis and its expansion

Multiple Golgi complexes assemble at pre- and intermediate DMS. As the pre-DMS was located in the perinuclear region, which is the exit site of the *trans*-Golgi network (TGN) in many mammalian cells, we next investigated the possible contribution of this secretory pathway. Immunofluorescence was used to correlate the distribution pattern of known Golgi markers (giantin and GM130) with GPIb β at the different stages of MK development. Although pre-DMS (green) was often found in close proximity to giantin-positive structures (red), it never colocalized with them (arrowheads and inset in Figure 4A). At stages where intermediate DMS were formed (1-2 days of culture), the giantin-positive areas became larger, suggesting the assembly of multiple Golgi complexes. Golgi complexes remained in close proximity, but distinct from the intermediate DMS (arrowhead in Figure 4B). At stages when late DMS became apparent, numerous

Figure 3. Relationship with the endomitotic process. (A-C) The number of invaginating pre-DMS correlates with the number of nuclear lobes. (A) Confocal images show that the tubular membrane connections (green) are situated between the nuclear lobes (blue). Note that the number of cell surface connections (arrowheads) increased with the number of nuclear lobes (stars). Bars, 10 μm . (B) Quantification of the number of invaginating pre-DMS and nuclear lobes using Z-stack analysis on whole cells. Note that the number of nuclear lobes are not equal to the number of chromosome copies. The Z-step size was 0.25 μm . Overall, a total of 80 MKs (39 \times 2 lobes; 14 \times 3 lobes; 12 \times 4 lobes, and 10 \times >6 lobes) were included in our analysis, and the means \pm standard error of the mean are presented. (C) Quantification of the DNA staining as a function of the different developmental stages of the DMS (pre-, intermediate, and late DMS). The Z-step size was 0.25 μm , and the Amira Software was used to calculate the DNA content in whole cells. (D) Immunostaining for the centrosome marker γ tubulin reveals the presence of a single fluorescent spot with an increased fluorescent size (arrowhead in upper left panel) compared with γ tubulin staining in late stage MK cells (arrowheads in lower right panel), suggesting multiple centrosomes assembly. The images are maximum projections of whole cells. Bars: upper panels, 10 μm ; lower panels, 1 μm . (E) TEM image showing the presence of four centrioles (arrowheads) in proximity to the pre-DMS. Bar, 500 nm. (F) Image of an MK undergoing its first anaphase. Immunostaining for PRC-1, a marker of the midzone. PRC-1 is localized between the condensed chromosomes (arrow). Note the distinct GPIIb β -positive cell surface pool (arrowhead). Bar, 10 μm . (G) Identification of a pre-DMS (arrowhead) in MKs undergoing the first anaphase. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100, stained with β -tubulin and DAPI to characterize the mitotic spindle and the condensed chromosomes, respectively. Bar, 10 μm .



distinct but smaller giantin-positive spots appeared dispersed throughout the cytoplasm (Figure 4C). The same results were obtained using the *cis*-Golgi marker GM130. To further evaluate the contribution of Golgi-derived vesicular transport, cells were exposed to the fungal toxin BFA, a potent inhibitor of anterograde Golgi trafficking (Figure 4E). BFA treatment did not modify the MK proliferation and the ploidy levels as measured by cell counting and FACS, respectively (data not shown). The Golgi staining was completely lost (Figure 4E, inset), and the number of MKs displaying pre-DMS was significantly increased compared with the control (arrows in Figure 4D-E and F) ($38 \pm 4.6\%$ vs $22 \pm 2.2\%$, respectively). These findings suggest that inhibition of anterograde Golgi transport slows down the progression of DMS formation.

To better examine the Golgi contribution, we performed a detailed 3D analysis. As expected from the IF results, Golgi complexes were frequently located in close position to the pre-DMS (on average, 2-4) (Figure 4G and compare with Figure 4A). With respect to the intermediate DMS, the number of stacks increased up to as many as 10 (Figure 4H and compare with Figure 4B). Using FIB/SEM large volume analysis (ie, 34 μm^3 corresponding to $\sim 2\%$ of a whole MK),

we were able to detect 12 individual Golgi stacks surrounded by numerous vesicles in close proximity to the DMS (Figure 4I-L; supplemental Movie 7). Thus, the FIB/SEM data confirmed our IF results showing that Golgi complexes were randomly distributed through the cytoplasm but remained in close proximity to the DMS.

Membrane delivery from TGN to the pre-DMS. Golgi complexes always appeared to be oriented with the *trans*-sites (TGN) facing the pre- and intermediate DMS. Numerous clathrin-coated and uncoated vesicles were located between the Golgi stacks and the DMS, some of them in close apposition (arrowhead in Figure 5A), which suggests active trafficking. Immunoelectron microscopy analysis revealed that these vesicles were positive for the TGN marker TGN 38 (supplemental Figure 5). In search of fusion profiles of TGN-derived vesicles, we analyzed the cells by dual axis electron tomography, focusing on TGN exit sites and pre-DMS. Besides small vesicles fusing with the DMS (arrowheads in Figure 5B-C; supplemental Movie 8), we found numerous large electron-lucent vesicles aligned along the pre-DMS. These vesicles have the characteristics of immature secretory granules. Some of them were captured in our tomograms in

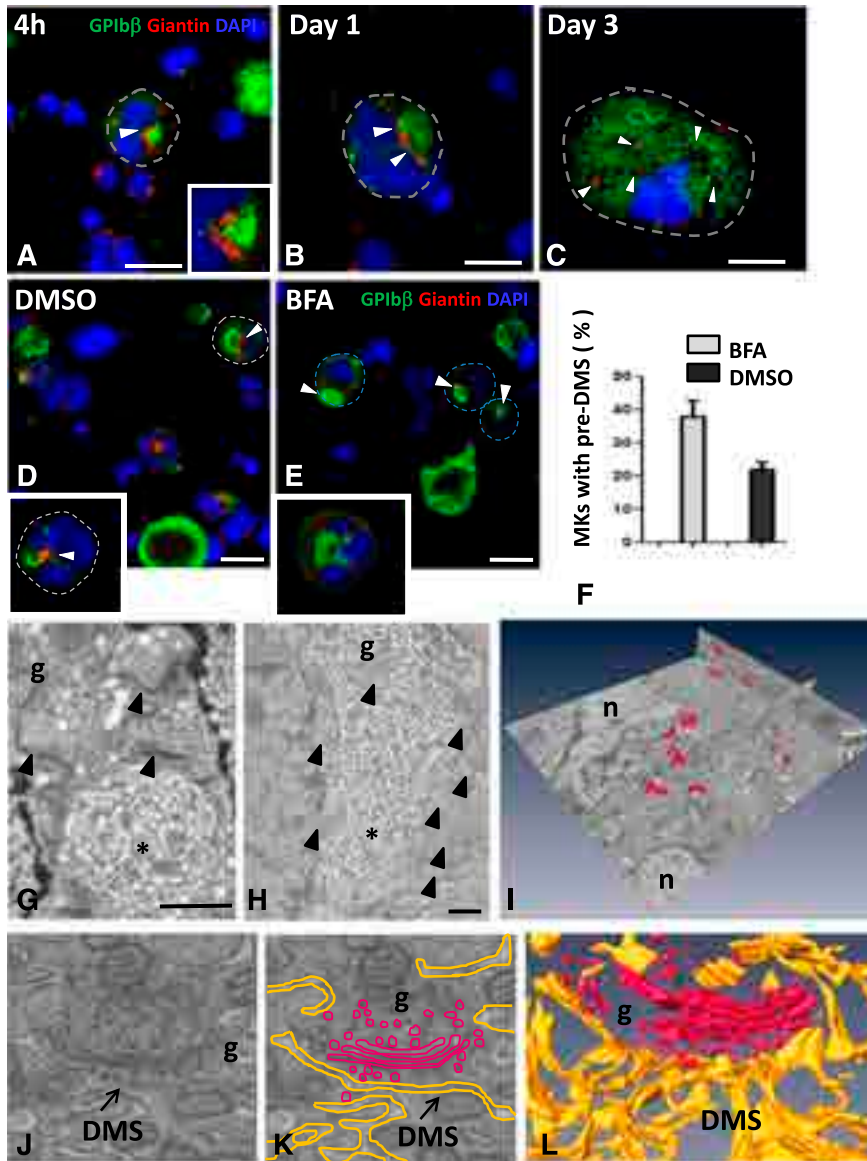


Figure 4. Golgi complexes are in close position to the pre-DMS and contribute to DMS growth. MKs were cultured for 4 hours or for 1 or 3 days. The cells were permeabilized and immunostained for the Golgi marker giantin (red) and GPIIb β (green). (A-C) Representative confocal images are shown at different developmental stages of the DMS. (A) Giantin staining is confined to the perinuclear region and lies close to the pre-DMS (inset of boxed area). (B) Close association but no colocalization of giantin with the intermediate DMS. Note that the size of the giantin spots increases at these later stages (white arrowheads). (C) Giantin spots become randomly distributed in MKs at the latest stages of maturation (white arrowheads). Bars, 10 μ m. (D-E) Confocal images of MKs cultured for 20 hours and treated as indicated. Note the absence of Golgi staining after BFA treatment. Dotted lines indicate cell perimeters. Bars, 10 μ m. (F) Quantification of the number of MKs displaying typical pre-DMS areas. (G-H) Electron micrographs showing the presence of Golgi complexes (arrowheads) in proximity to the pre-DMS between (G) 2 nuclear lobes or (H) the intermediate DMS. Bars, 500 nm. (I) A typical FIB/SEM analysis illustrating the 3D visualization of all the Golgi complexes (red) detected in a large volume ($\sim 34 \mu\text{m}^3$) of a stage II MK. (J) Higher magnifications of the FIB/SEM analysis showing close apposition of Golgi-derived vesicles at the boundary of the DMS. (K) Segmentation of the DMS (yellow) and the Golgi (red). (L) 3D reconstruction. *DMS. Bars, 1 μ m. g, Golgi stacks; n, nucleus.

clear continuity with the pre-DMS (Figure 5D-E; supplemental Movie 9). Overall, these observations suggest that membrane delivery from the TGN exit site occurs at all developmental stages of DMS formation and involves multiple vesicle populations.

DMS forms close contacts with specific domains of the ER

It is well established that the ER contributes to the delivery of lipids for membrane building.²⁶ In the later stages of DMS development, we frequently found the ER and DMS to be in close proximity, as illustrated in the TEM image of Figure 6A (arrowhead). High-resolution dual axis electron tomography enabled us to define the nature of these contacts. The 2 tomographic sections in Figure 6B-C, which represent the boxed area of Figure 6A in different orientations, revealed tight contact but no apparent membrane continuity. In 6 separate tomograms, we measured an average distance of 23.5 ± 1.4 nm ($n = 40$ contact sites; Figure 6D). This is further illustrated in Figure 6E-H, where several ER cisternae are seen in close proximity (arrowheads) to

the DMS. Importantly, these ER-DMS contact sites were free of ribosomes and contained filamentous electron-dense material possibly reflecting cross-linking/anchoring molecules (supplemental Movie 10).

Discussion

A combination of high-resolution microscopy approaches (IF, immunogold electron microscopy [IEM], EM tomography, and FIB/SEM) was used to perform a detailed characterization of the DMS at various stages of MK development, both in cultured cells and in situ BM MKs. Use of GPIIb as a platelet lineage-specific plasma membrane marker revealed distinct peripheral GPIIb-positive loci at the cell surface, which became centrally located in the perinuclear region at later stages, thereby maintaining their plasma membrane connections. We called this earliest recognizable membrane network the pre-DMS and established that it originated at the

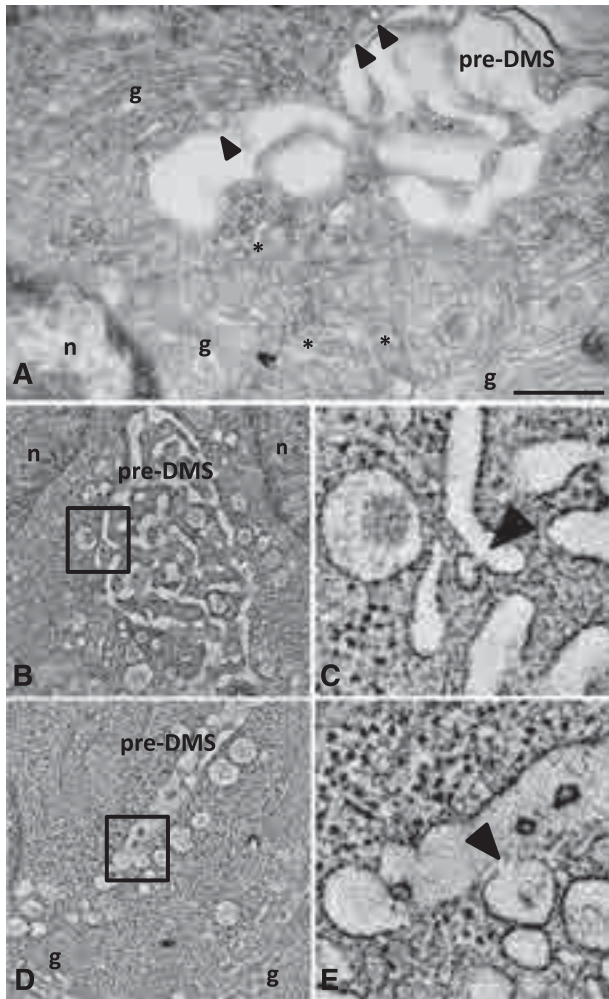


Figure 5. Dual axis electron tomography of the TGN and DMS reveals fusion of vesicles with the pre-DMS. (A) TEM image of the Golgi complexes oriented so that the *trans*-sites (TGN) lie facing the pre-DMS. Some vesicles are in close apposition to the pre-DMS (arrowheads). Bar, 500 nm. (B-C) Selected tomographic sections showing fusion of TGN-derived vesicles with the pre-DMS. A higher magnification of the boxed area in B is shown in C, and the arrowhead points to the zone of continuity between the membranes of the vesicle and the pre-DMS. (D-E) Alignment of larger vesicles along the pre-DMS. Fusion of a vesicle with the pre-DMS (arrowhead in D). g, Golgi stacks; n, nucleus.

plasma membrane. The pre-DMS displayed several characteristic features: (1) its territory was well defined with clear boundaries, (2) it was located between the lobes of the nucleus in the central region of the cell, (3) it was linked to the cell surface through tubular membrane connections, and (4) Golgi complexes were selectively positioned at the boundary of the pre-DMS.

With respect to the origin of the DMS, we here favor the option that DMS biogenesis starts at the cell surface as a GPIb-positive cluster. Our full confocal Z-stack analysis revealed that the intracellular GPIb β -positive membrane pools are all in connection with the cell surface and never present as isolated structures within the cytoplasm. Pulse-chase experiments using cell surface labeling also demonstrated the presence of an intracellular pre-DMS following a 2-hour chase. These experiments suggest that this intracellular pool derives from the cell surface. However, we cannot exclude the possibility of an independent preexisting intracellular pool. When we performed IEM analysis using an anti-GPIb antibody, we consistently found a small membrane pool but did not present the features

of the pre-DMS and corresponded to Golgi stacks and TGN-related vesicles (supplemental Figure 6). These vesicles likely represent the anterograde transport pathway and as such also contribute to membrane delivery. Using 4 different approaches (confocal Z-stack analysis, electron tomography, CLEM, and tannic acid tracer), we were unable to identify an isolated intracellular pre-DMS-like structure. However, it is still possible that other intracellular membrane populations (ie, GPIb negative) contribute to DMS biogenesis. We found that numerous Golgi complexes were clustered around the pre-DMS. The Golgi complexes were positioned in a fashion whereby the *trans*-Golgi sites (TGN) were facing the DMS. Tomography analysis revealed numerous TGN-derived membrane carriers of different sizes in close proximity to the DMS. Some vesicles were found to be continuous with the centrally located DMS structures, suggesting direct vesicular membrane insertion. The fact that BFA impaired DMS expansion suggests an important role of TGN-mediated delivery in DMS biogenesis. Because BFA may also have impact on endosomal trafficking, there may still be a role of the endocytic pathway in DMS biogenesis. This will require further investigation. Our study thus provides evidence that the growing DMS requires, besides invagination of the plasma membrane, the direct insertion of vesicular membrane from intracellular stores.

An interesting aspect of our study was that in early developmental stages, the tubular membrane connections were always positioned between the nuclear lobes, a characteristic that resembles cytokinesis. Using time-lapse confocal microscopy, it was previously shown that a cleavage furrow is induced normally from the 2N to 4N transition, which fails to close completely, resulting in cells with bilobulated nucleus.²⁷⁻³⁰ This is essentially what we observed when the pre-DMS was formed. TEM analysis and IF staining of γ -tubulin at the stages where the pre-DMS is apparent revealed that multiple centrosomes have assembled, suggesting that the MK at this stage have undergone at least one endomitotic cycle. Our Z-stack analysis also revealed that the number of tubular connections was proportional to the number of nuclear lobes. Together, these results recall several elements characteristic of the membrane growth observed during cellularization in *Drosophila melanogaster*.³¹ During this special kind of cytokinesis, the plasma membrane invaginates and separates each nuclear lobe, thereby forming a pseudo-cleavage furrow. Similarly as in our study, numerous Golgi stacks are targeted to the sites of furrow formation, thereby contributing to active membrane secretion.³² Little information is available regarding the fate of the Golgi during subsequent endomitotic cycles. During normal mitosis, the Golgi complexes disassemble and subsequently reform during telophase.^{33,34} Whether such a mechanism is also operational during endomitosis is not known. Occasionally we found MKs in anaphase cycle with typically polarized centrosomes³⁵ and mitotic spindles. During this typical event, the pre-DMS was located where the cleavage furrow will form and where proteins essential for division should be located. Indeed PRC1 was located essentially at this site. On the basis of the developmental stages of the DMS presented here, we hypothesize that formation of the pre-DMS is coupled to the process of abortive cytokinesis whereby the tubular invaginations represent an MK specific pseudo-cleavage furrow.^{36,37}

At later stages of MK development, ribosome-free ER domains were frequently observed in close contact with the DMS. Although we were unable to detect DMS-ER fusions, the average distance between the 2 membrane leaflets (30 nm) lay within the range recognized as a true association and would point to a functional role of ER-DMS communication.³⁸ Our tomograms indeed frequently revealed protein linkages between the 2 types of membrane, suggesting selective ER-DMS membrane tethering, possibly for

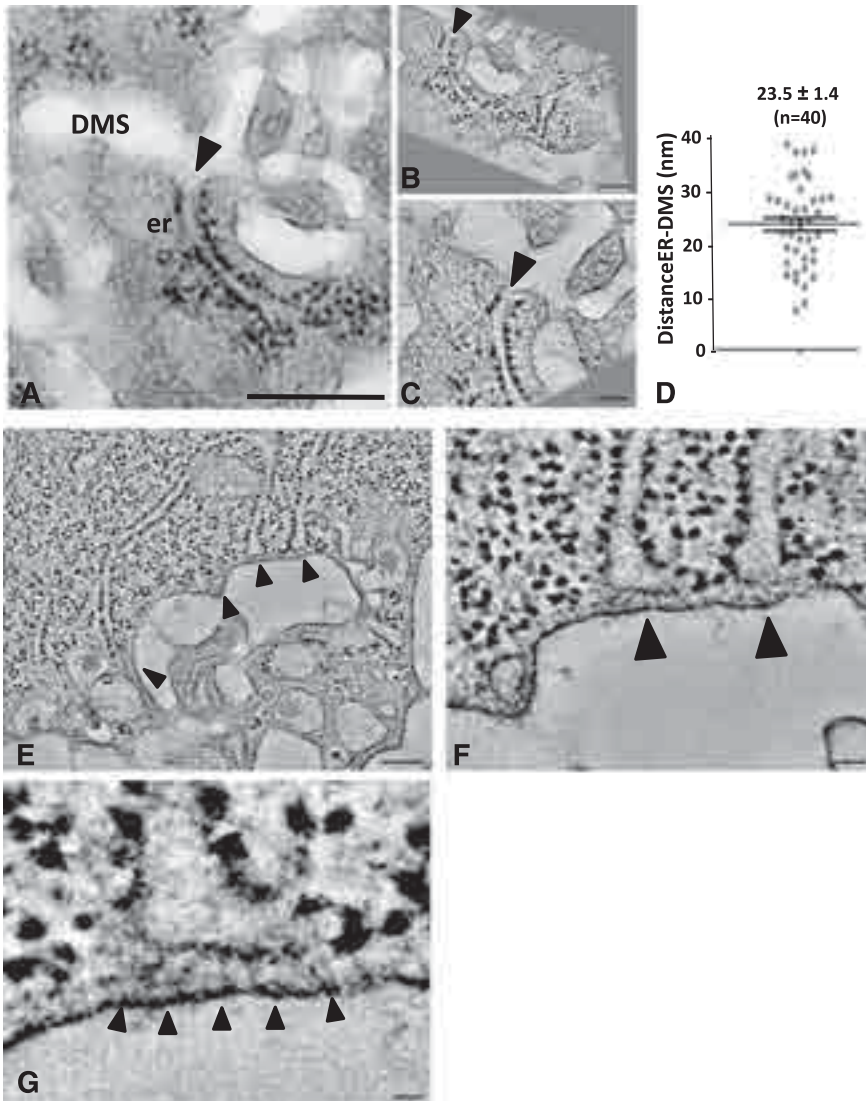


Figure 6. Dual axis electron tomography of ER-DMS contacts. (A) TEM image of a stage II MK showing a tubular ER cisterna extending toward the DMS. Bar, 500 nm. (B-C) Tomographic sections from a dual axis tomogram of the area in A. Note that the membranes of the DMS and ER are closely apposed but not in continuity (arrowheads). Bars, 100 nm. (D) Minimal distance in nm between the ER and DMS, as quantified from 40 contact sites in 6 tomograms. (E-G) Selected tomographic sections (~5 nm thick) of tubular ER cisternae (arrowheads) extending toward the DMS. Bar, 100 nm. (F-G) Selected Z-orientations from the tomogram revealing filamentous structures connecting ribosome-free ER domains with the DMS. Bars, 10 nm. er, endoplasmic reticulum.

lipid transfer. Nonvesicular lipid transport between the ER and other membranes has been suggested previously. Indeed, several studies have shown that physical membrane contacts exist between the ER and the PM (the so-called “plasma membrane-associated membranes” or “PAM fraction”)³⁸ and the mitochondria (“MAM”

fraction),³⁹ and this has been reported to be a prerequisite for lipid translocation between the 2 compartments. Vance et al⁴⁰ demonstrated that in mammalian cells a specific subfraction of the ER, highly enriched in enzymes responsible for phospholipid biosynthesis, is associated with the PM. Close ER contacts were also

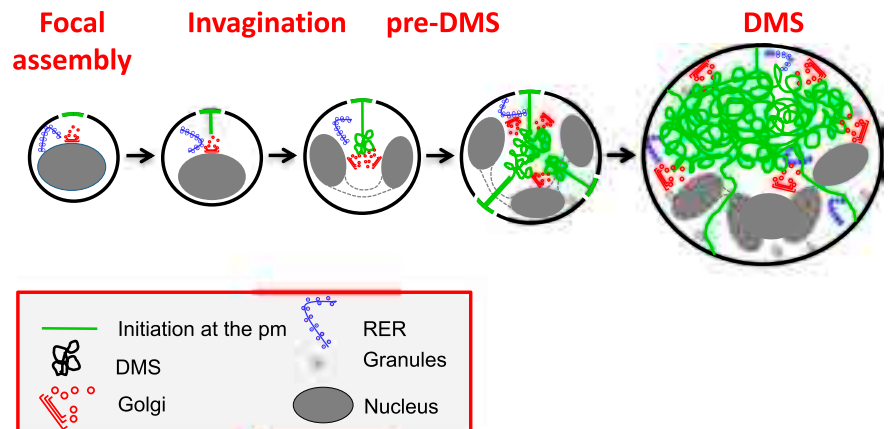


Figure 7. Proposed model of DMS formation and expansion. DMS formation initiates at focal areas on the cell surface. During subsequent MK maturation, a distinct pre-DMS structure is formed in the perinuclear region, through a PM invagination process that resembles cleavage furrow formation. Further expansion requires vesicular membrane delivery from multiple Golgi complexes that are targeted to the developing DMS and possibly via direct lipid transfer through ER-DMS tethering.

described recently in association with de novo membrane formation in the biogenesis and expansion of the autophagosomal membrane.⁴¹ Nevertheless, at this stage it must remain speculative as to what extent the observed tethering of the ER to the DMS may be required for lipid transfer and DMS expansion. In addition, the presence of ER subdomains in close proximity to the DMS could also support local calcium sequestration, which is required for membrane fusion events and directioning during expansion of the DMS. Such a mechanism has been proposed to occur during formation of the T-tubules in skeletal muscle.⁴²

In previous studies of guinea pig MKs,⁴³ it was suggested that membrane sheets were formed from tubular DMS structures through multiple fusion events. In our 3D analysis, we found tubules rather than sheets. It is well established that the DMS functions as a membrane reservoir for future platelets.⁸ On the basis of previous studies of DMS architecture, it has been proposed that the DMS has a “ball of yarn” configuration and that additional membrane for de novo platelets is obtained by sequestering membrane from the edge and continuously replenishing it from the interior. This is not consistent with large volume 3D analysis of the mature MKs (supplemental Figure 7), showing that the DMS is not a single membrane invagination but a highly intertwined membrane network with numerous side branches and multiple connections with the cell surface, which is similar to descriptions of the open canalicular system in platelets.²² This might suggest that the open canalicular system derives from the DMS.

In conclusion, we propose the following model for the biogenesis of the DMS (Figure 7): (1) DMS formation starts at focal points on the cell surface and (2) is followed by an invagination process resembling cleavage furrow formation; and (3) formation of the pre-DMS and its further expansion require vesicular membrane delivery from numerous Golgi complexes targeted to the DMS and possibly direct lipid transfer through ER-DMS tethering. Finally, abnormal development of the DMS has been implicated in several hereditary diseases with

thrombocytopenia including Bernard-Soulier syndrome and Myosin Heavy chain 9-related disorders.^{44,45} Thus, an understanding of the molecular mechanisms of DMS biogenesis and development is not only fundamentally important, but also highly relevant to understand how structural defects in the DMS are related to known and unknown diseases such as (macro/micro) thrombocytopenia.

Acknowledgments

The authors thank S. Moog for expert technical assistance.

This work was supported by Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique and the European Union through the European Regional Development Fund.

Authorship

Contribution: A.E. and H.H. conceived and designed the research, acquired the data, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript; F. Pertuy and C.L. acquired the confocal images on bone marrow sections; J.-Y.R. and F. Proamer acquired the TEM, IEM, and FIB/SEM data; W.G. participated in the acquisition of the dual axis tomography data; and F.L. and C.G. conceived and designed the research, wrote the manuscript, and handled funding and supervision.

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

Correspondence: C. Gachet, UMR S949, INSERM-Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), 10 rue Spielmann, B.P. N°36, 67065 Strasbourg Cedex, France; e-mail: christian.gachet@efs-alsace.fr.

References

- Nakao K, Angrist AA. Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte. *Nature*. 1968;217(5132):960-961.
- Behnke O. 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*. 1968;24(5):412-433.
- Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)*. 1957;29(3):267-290.
- 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.
- Thiery JP, Bessis M. [Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells]. *CR Hebd Seances Acad Sci*. 1956;242(2):290-292.
- Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*. 1982;60(1):213-219.
- 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.
- Schulze H, Korpál M, Hurov J, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*. 2006;107(10):3868-3875.
- Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1717-1724.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317(5845):1767-1770.
- Levine RF, Eldor A, Shoff PK, Kirwin S, Tenza D, Cramer EM. Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol*. 1993;51(4):233-246.
- Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol*. 2010;47(3):220-226.
- Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol*. 2000;157(1):69-74.
- Han SS, Baker BL. The Ultrastructure of Megakaryocytes and Blood Platelets in the Rat Spleen. *Anat Rec*. 1964;149:251-267.
- MacPherson GG. Origin and development of the demarcation system in megakaryocytes of rat bone marrow. *J Ultrastruct Res*. 1972;40(1):167-177.
- Shaklai M, Tavassoli M. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *J Ultrastruct Res*. 1978;62(3):270-285.
- Mahaut-Smith MP, Thomas D, Higham AB, et al. Properties of the demarcation membrane system in living rat megakaryocytes. *Biophys J*. 2003;84(4):2646-2654.
- Patel-Hett S, Wang H, Begonja AJ, et al. The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation. *Blood*. 2011;118(6):1641-1652.
- Strassel C, Eckly A, Léon C, et al. Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp Cell Res*. 2012;318(1):25-32.
- Takaku T, Malide D, Chen J, Calado RT, Kajigaya S, Young NS. Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy. *Blood*. 2010;116(15):e41-e55.
- Eckly A, Strassel C, Cazenave JP, Lanza F, Léon C, Gachet C. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol Biol*. 2012;788:175-192.
- van Nispen tot Pannerden H, de Haas F, Geerts W, Posthuma G, van Dijk S, Heijnen HF. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood*. 2010;116(7):1147-1156.
- Mastrorade DN. Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *J Struct Biol*. 1997;120(3):343-352.
- Murk JL, Lebink MN, Humbel BM, et al. 3-D Structure of multilaminar lysosomes in antigen presenting cells reveals trapping of MHC II on the internal membranes. *Traffic*. 2004;5(12):936-945.

25. Spiegelhalter C, Tosch V, Hentsch D, et al. From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure: novel integrated methods for high pressure freezing and correlative light-electron microscopy. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9014.
26. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(10):a004697.
27. Lordier L, Jalil A, Aurade F, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*. 2008;112(8):3164-3174.
28. Leysi-Derilou Y, Robert A, Duchesne C, Garnier A, Boyer L, Pineault N. Polyploid megakaryocytes can complete cytokinesis. *Cell Cycle*. 2010;9(13):2589-2599.
29. Geddis AE, Fox NE, Tkachenko E, Kaushansky K. Endomitotic megakaryocytes that form a bipolar spindle exhibit cleavage furrow ingression followed by furrow regression. *Cell Cycle*. 2007;6(4):455-460.
30. Papadantonakis N, Makitalo M, McCrann DJ, et al. Direct visualization of the endomitotic cell cycle in living megakaryocytes: differential patterns in low and high ploidy cells. *Cell Cycle*. 2008;7(15):2352-2356.
31. Lecuit T, Wieschaus E. Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo. *J Cell Biol*. 2000;150(4):849-860.
32. Papoulas O, Hays TS, Sisson JC. The golgin Lava lamp mediates dynein-based Golgi movements during *Drosophila* cellularization. *Nat Cell Biol*. 2005;7(6):612-618.
33. Levine TP, Misteli T, Rabouille C, Warren G. Mitotic disassembly and reassembly of the Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1995;60:549-557.
34. Persico A, Cervigni RI, Barretta ML, Colanzi A. Mitotic inheritance of the Golgi complex. *FEBS Lett*. 2009;583(23):3857-3862.
35. Anastasi J. Some observations on the geometry of megakaryocyte mitotic figures: Buckyballs in the bone marrow. *Blood*. 2011;118(24):6473-6474.
36. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun*. 2012;3:717.
37. Gao Y, Smith E, Ker E, et al. Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev Cell*. 2012;22(3):573-584.
38. Lebiecinska M, Szabadkai G, Jones AW, Duszynski J, Wieckowski MR. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(10):1805-1816.
39. Friedman JR, Voeltz GK. The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol*. 2011;21(12):709-717.
40. Vance JE. Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2003;75:69-111.
41. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(12):1433-1437.
42. Hayashi T, Martone ME, Yu Z, et al. Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca²⁺ signaling in the heart. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 7):1005-1013.
43. Fedorko ME, Levine RF. Tannic acid effect on membrane of cell surface origin in guinea pig megakaryocytes and platelets. *J Histochem Cytochem*. 1976;24(4):601-605.
44. 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.
45. Strassel C, Eckly A, Léon 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.

Supplemental Data

Materials and Methods

Materials

BSA, Saponin, Triton X-100, Brefeldin A, anti- γ tubulin (C7604) and anti- β tubulin 1 (T816) were from Sigma-Aldrich (Rueil-Malmaison, France). The goat anti-rabbit and anti-mouse, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin, streptomycin, and glutamine were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Rabbit giantin antibody was from AbCam (Cambridge, UK). Anti-PRC1 (sc-8356) was from Santa-Cruz (Texas, USA). Anti-TGN38 (AHP499G) was from Serotec. Glutaraldehyde and paraformaldehyde were from Euromedex (Souffelweyersheim, France). The Lin⁻ Easy Step and the recombinant mTPO were from StemCell Technologies (Vancouver, BC). Mouse antibodies against mouse integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (RAM.2-488) and glycoprotein (GP)Ib β (RAM.1-488) were produced and labeled in our laboratory.

Megakaryocyte culture

The mouse bone marrow progenitor cells were obtained after Lin selection (Stem Cell Technologies). The Lin⁻ cells were prepared as described [1]. Briefly, mouse BM was flushed from femurs and tibias with the DMEM medium and the cells were dissociated. After Lin⁻ selection, the cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Stem Cell Technologies), 2 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 50 ng/mL TPO and 100 U/mL hirudin. At different days of cultures (day 0 to 4), the cells were prepared for confocal microscopy. In experiments focusing on the most early developmental stages of DMS formation, fresh bone marrow samples and progenitor cells were cultured for 1 - 2 - 4 hours respectively and fixed directly after (see below).

Confocal microscopy on cultured MKs

Lin⁻ cells were permeabilized with 0.5% Saponin in PBS for 30 min and then incubated for 30 min with the primary antibodies followed by secondary Alexa 633-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies. In some experiments, single labeling was performed with an

anti-GPIIb β antibody, RAM.1-488 (10 μ g/mL, 30 min), followed by DAPI counterstaining of the nuclei. The slides were observed under a confocal microscope (TCS SP5, Leica Microsystems). No fluorescence was detected with isotype-specific control IgG. In some experiments, brefeldin A (1 μ g/mL) or vehicle (DMSO) was added to the cultures on day 1. The cells were fixed after treatment for 4 hours and prepared for immunofluorescence as described above. The number of MKs with pre-DMS was quantified in three different MK cultures and expressed as the percentage of the total number of GPIIb β -positive cells. The DNA staining was used to estimate the cell ploidy. The fluorescence was quantified on Z-stack of whole MKs (z-size 0.25 μ m) using the Amira software. Six cells were included for each DMS stage and the results were expressed as a mean \pm SEM.

Electron microscopy

Standard electron microscopy

BM obtained by flushing femora with 0.1 M sodium cacodylate buffer were fixed in 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon as described [3]. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a CM120 transmission electron microscope (FEI, The Netherlands). In some experiments, small BM blocks (1mm³) were fixed for 1 h with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. The samples were then incubated at room temperature with 1% tannic acid and processed for transmission electron microscopy. When stated in the text, serial thin sectioning has been performed to obtain a 3D map of the pre-DMS.

Immunoelectron Microscopy

Fresh BM was fixed with 2.5% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer for 1 h. The fixed samples were infiltrated with 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Ultrathin cryosections of ~70 nm were obtained at -110° C with a LEICA Ultracut UCT cryo-ultramicrotome (Leica Microsystems). Thin sections were rinsed in PBS containing 150 mM glycine (15min), PBS, PBS containing 0.1% acetylated BSA (BSAc, Aurion, 30 min), followed by 1 h incubation with primary antibody anti-GPIIb β or anti-TGN38 at 10 μ g/ml in PBS /0.1% BSA or a corresponding non-immune antibody, 1 h incubation with

protein-A coupled with 10 nm colloidal gold particles (PAG) (Cell Microscopy Center, University Medical Center Utrecht, the Netherlands), postfixation in 1% glutaraldehyde and embedding in 1.8% uranyl acetate/0.2% methylcellulose.

Dual axis electron tomography

About 300 nm thick sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. Dual-axis tilt series of selected MKs were recorded using a Tecnai 20 transmission electron microscope (FEI) equipped with a slow scan CCD camera (charge-coupled-device camera, Temcam F214; TVIPS, Gauting, Germany) as previously described [3]. Tilt series were acquired with a single-axis high-tilt tomography holder (model 670; Gatan, Munich, Germany) or a Fischione tomography holder (model 2020; Fischione Instruments, K-Vision BV, Huizen, The Netherlands). After a first series of tilts, the specimens were manually rotated over an angle of 90° and a second series was acquired. Subsequently, 1000×1000 pixel images were recorded automatically with Xplore 3D software (FEI) using an angular range of -60° to +60° with a 1° increment. The tilt series were aligned with IMOD (Boulder Laboratory, Colorado) [4-5] using the fiducial markers and combined into one 3D volume. Firstly, aligned single-axis tomograms were computed by resolution-weighted back-projection. These two volumes were then combined into one final volume. After reconstruction, each tomogram was unpacked into tiff format and adjacent tomograms were manually stitched together using Adobe Photoshop CS3. The tiff files were stacked back into a 3D volume (one per section) using IMOD.

FIB/SEM

The principle of this approach is that epon-embedded samples are serially sectioned using a focused ion beam (FIB) integrated into a scanning electron microscope (SEM) and the milled face is then imaged with the electron beam at high resolution. Iteration of these two “milling-imaging” steps generates a series of images which describe the 3D structure of the sample at regularly spaced intervals and can be computationally assembled into a volume representing a reconstruction of the sample. The specific advantage of this technique is that large cell volumes (up to 100×100×100 μm) can be investigated. For FIB/SEM, samples were prepared as described previously [6]. Briefly, BM cells were processed as for TEM except that a contrast-enhancing step, consisting of incubating the cells in 1.5% potassium ferrocyanide and 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer, was added directly after the fixation

step. The blocks were mounted on SEM stubs, coated with platinum/palladium and examined under a Helios NanoLab dual beam microscope (FEI). Samples were milled with the FIB (30 kV, 700 pA) at a thickness of 20 nm per section and images were acquired in backscattering mode (3 kV, 1 nA). Tomograms and 3D models were computed using Amira software.

Confocal microscopy on BM tissue

Confocal analysis of BM tissue was performed according to an adaptation of the method described by Takaku T [7]. Briefly, 1 mm thick transversal sections from 4% paraformaldehyde (PFA) fixed femurs were incubated with Alexa 555-conjugated anti-GPIIb β antibody (RAM.1-555; 10 μ g/ml, overnight) followed by DAPI counterstaining (1/20000, overnight). The fluorescently labeled BM tissue was placed cut-face down onto a 8 well μ -slide (IBIDI). The BM tissue beneath the bone edge was located and positioned using differential interference contrast (DIC) illumination. Series of x-y-z images of typically 455,9x455,9 μ m x-y size were collected along the z-axis at 0.5 μ m step size through 100 μ m of BM tissue, using a *HCX PL APO lambda blue 20.0x/0.70 IMM* objective and resonant scanner from a Leica SP5 confocal microscope. For quantitative analysis of MK number having a pre-DMS, BM specimens from 3 mice, each representing a typical volume of 456 x 456 x 100 μ m³ was examined.

1. Strassel, C., et al., *Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors*. *Experimental cell research*, 2012. **318**(1): p. 25-32.
2. Eckly, A., et al., *Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment*. *Methods Mol Biol*, 2012. **788**: p. 175-92.
3. Van Nispen tot Pannerden H, de Haas F, Geerts W, Posthuma G, van Dijk S, Heijnen HF. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood*. 2010;116(7):1147-1156.
4. Kremer JR, Mastrorade DN, McIntosh JR. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *Journal of Structural Biology*. 1996;116(1):71.
5. Mastrorade DN. Dual-Axis Tomography: An Approach with Alignment Methods That Preserve Resolution. *Journal of Structural Biology*. 1997;120(3):343-352.
6. Murk JL, Lebbink MN, Humbel BM, et al. 3-D Structure of multilaminar lysosomes in antigen presenting cells reveals trapping of MHC II on the internal membranes. *Traffic*. 2004;5(12):936-945.
7. Takaku, T., et al., *Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy*. *Blood*, 2010. **116**(15): p. e41-55.

Figure S1: alphaIIbeta3 immunostaining in cultured megakaryocytes. (A) DMS expansion in cultured MKs. Confocal images from MK cultures fixed after 1-4 days of culture. Cells were stained with anti-GPIIb3 (green) and DAPI (blue) and representative developmental stages of the DMS are shown. (Right panel) Intermediate DMS, (Middle panel) late DMS and (Left panel) MKs forming pro-platelets. Bars, 10 μ m. (B) alphaIIbeta3 immunostaining in cultured Mks. Confocal images from MK cultures fixed after respectively 4h and 4 days culture. Cells were stained with anti-alphaIIbeta3 (green) and DAPI (blue). Representative developmental stages of the DMS are shown. (a) Distinct alphaIIbeta3-positive territory is localized in the center of the cell, close to the nucleus (arrow). (b) alphaIIbeta3-positive pre-DMS with multiple tubular connections with the cell surface (arrows). (c) Intermediate DMS, late stage DMS (d) and (e) MK forming pro-platelets. Bars, 10 μ m.

Figure S2: Pulse-chase kinetics of anti-GPIIb β in cultured MKs in presence (B) or not (A) of cycloheximide (100 μ g/ml). Lin- BM cells were pulse-labeled for 15 min with Alexa488-conjugated anti-GPIIb (green), washed, and subsequently fixed after 5 min, 1, 2, and 4 hours respectively. The images show maximal projections of whole cells. Bars, 10 μ m.

Figure S3: Correlative light-electron microscopy of a cell displaying a surface GPIIb cap. Cells were pulse-labeled for 1h using an anti-GPIIb antibody, fixed and allowed to settle on pre-patterned Aclar supports. (A-C) Light microscopy: A cell showing a GPIIb-positive cell surface patch was located by bright field microscopy (arrow in A) and by fluorescence microscope (box in B) with the help of the “L1 pattern” and of two adjacent GPIIb-positive cells (green and red arrows in B). Higher magnification of the cell is shown using full Z-stack confocal microscopy (box in C). (D-F) Correlative EM images showing the same cell (boxed in C) at low magnification. Neighboring MKs are indicated by red and green arrowheads and the still visible pattern is shown by red puncta. (G-H) Higher magnification electron micrographs of the boxed areas in F and G. Shown is the first section of a series of 26 sections. No intracellular pre-DMS was detected in this section (H) and the others (not shown).

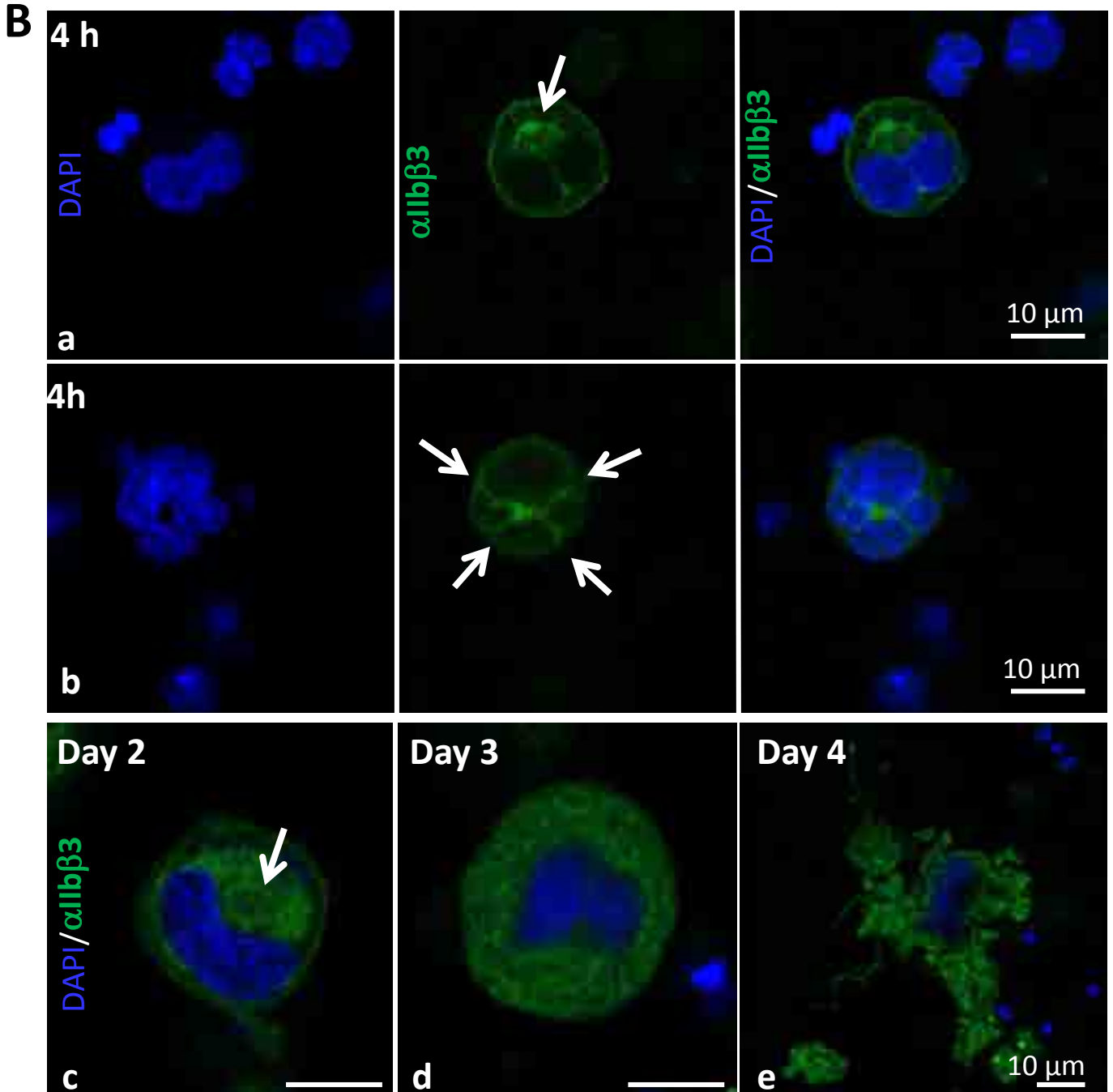
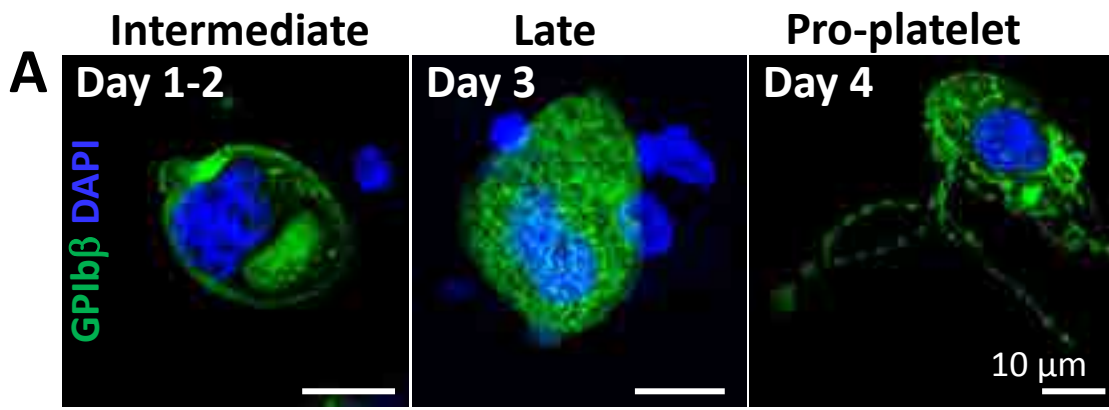
Figure S4: Ultrastructural characterization of the pre-DMS in bone marrow MKs. (A-D) TEM pictures showing the initial stage of DMS formation. (A) In situ stage I MK showing a round membrane network located between the lobulated nucleus. Bar, 2 μ m (B) Higher

magnification of the boxed area in A. Bar, 500 nm (C) IEM with the anti-GPIIb showing that the membrane network is positive for GPIIb indicating that these membranes correspond to the early stages of DMS formation. Bar: 500 nm (D) Tannic acid staining reveals that the pre-DMS is connected to the cell surface. Bar: 500 nm. The arrow indicates the pre-DMS. n: nucleus, pm: plasma membrane.

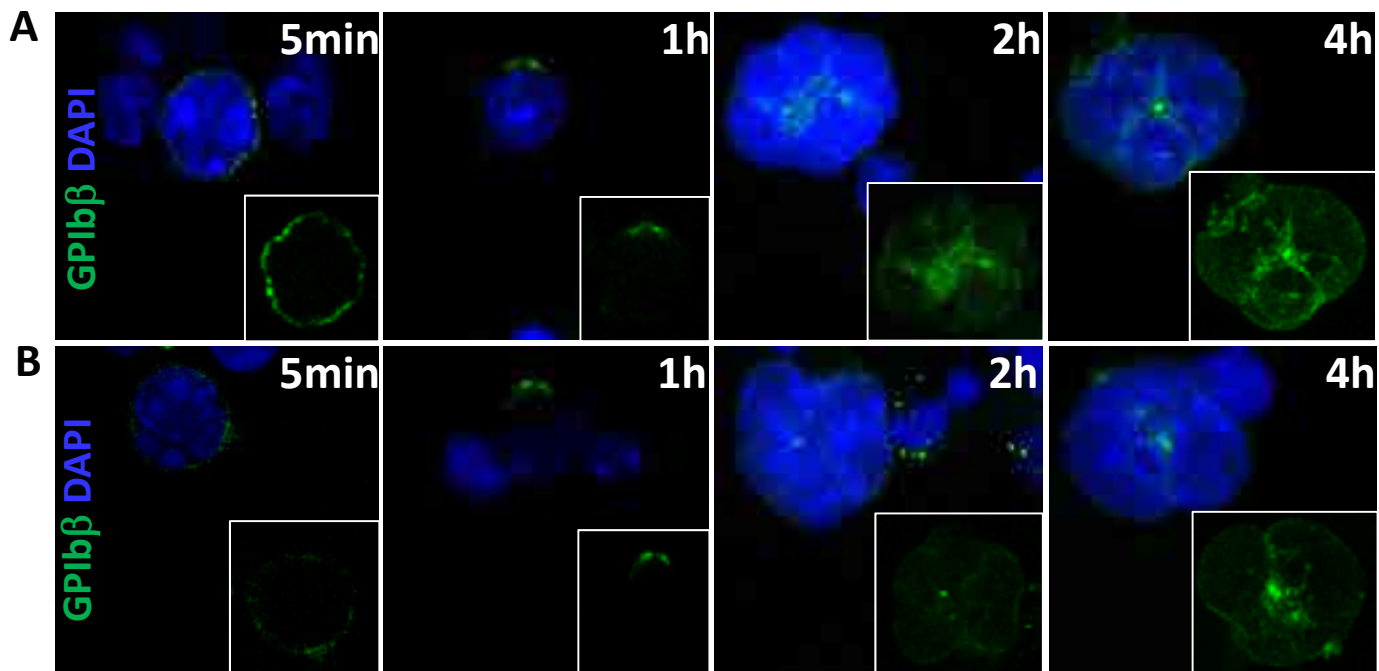
Figure S5: Contribution of the Golgi-derived vesicular transport to DMS biogenesis. (A) IEM experiments showing an overview of the TGN38-positive area (arrowheads) in close position to the pre-DMS. Bar, 1 μ m (B) High magnification example showing small TGN38-positive vesicles (arrowheads). Bar, 200 nm

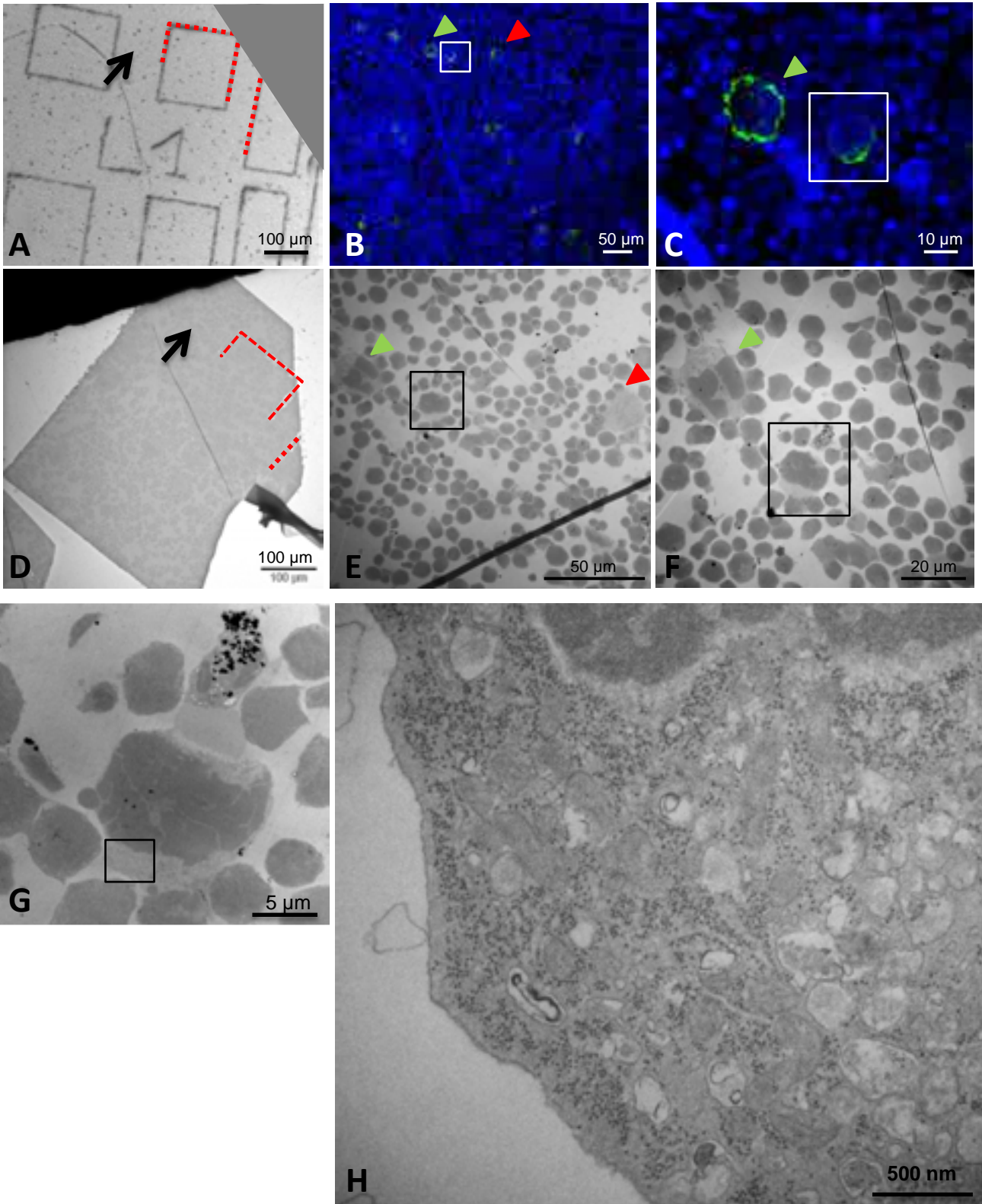
Figure S6: The intracellular GPIIb-positive membranes represent the Golgi and TGN-derived membrane vesicles. Cells displaying a GPIIb-positive cell surface patch were analyzed by IF and IEM. Maximum intensity projections of the Z stacks showing a faint intracellular GPIIb staining in the perinuclear region (inset). Immunogold labeling demonstrates that this represents Golgi stacks (g) and TGN-derived vesicles (tgn). Bar: 200nm.

Figure S7: Large volume 3D characterization of the completed DMS using FIB/SEM. At late stages of MK development, the DMS expands throughout the cytoplasm forming numerous branching points (arrow). DMS membranes are tubular with alternating small neck regions and it is continuous with the cell surface at multiple sites (arrowheads).

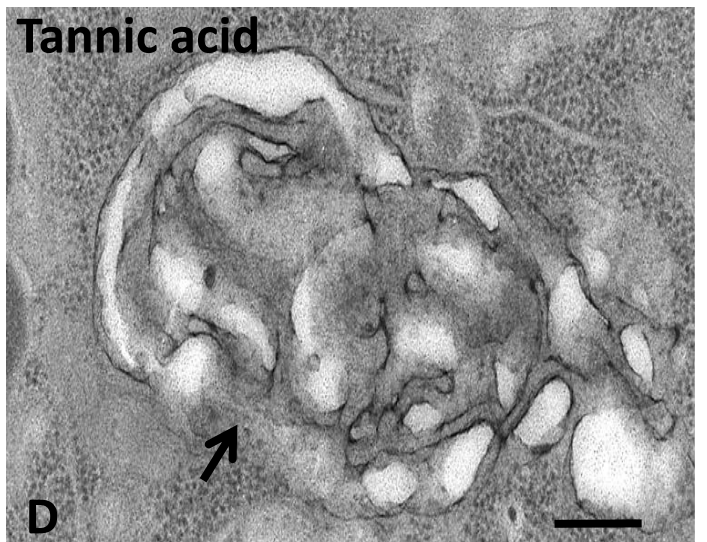
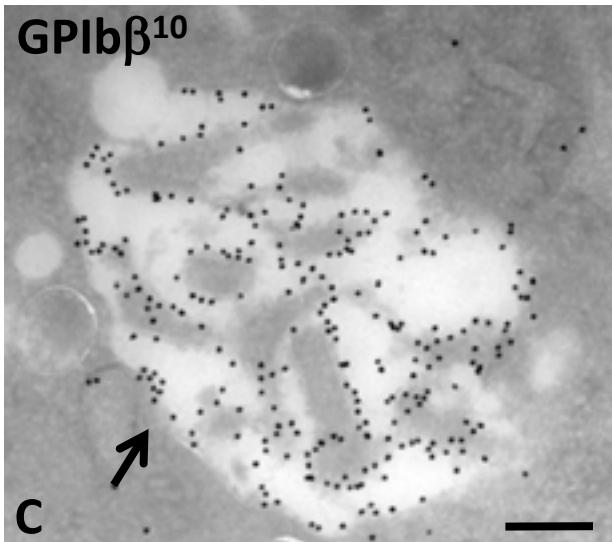
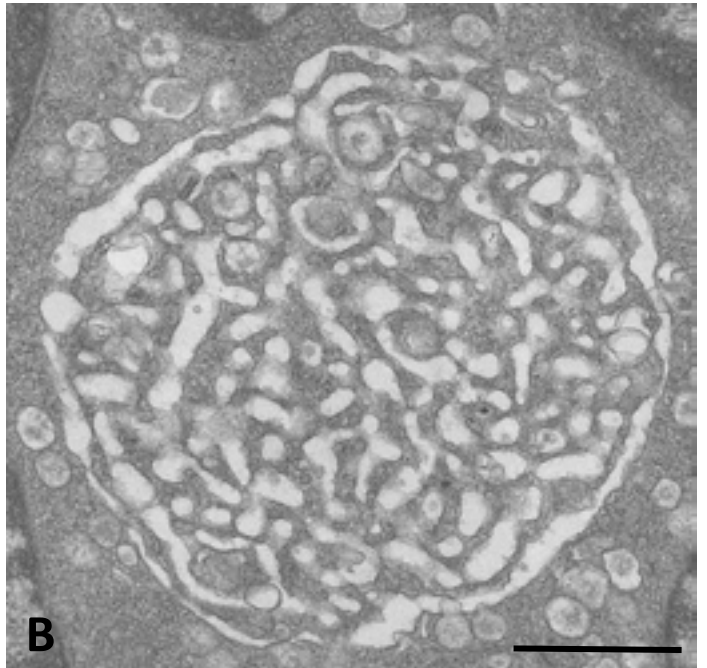
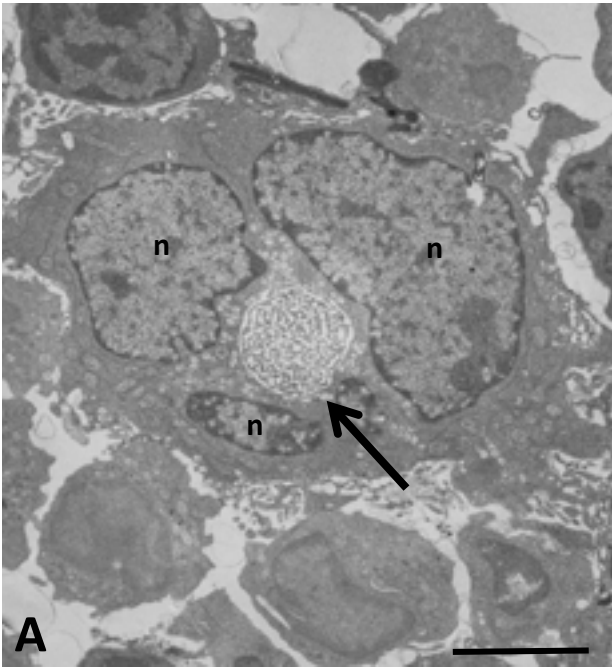


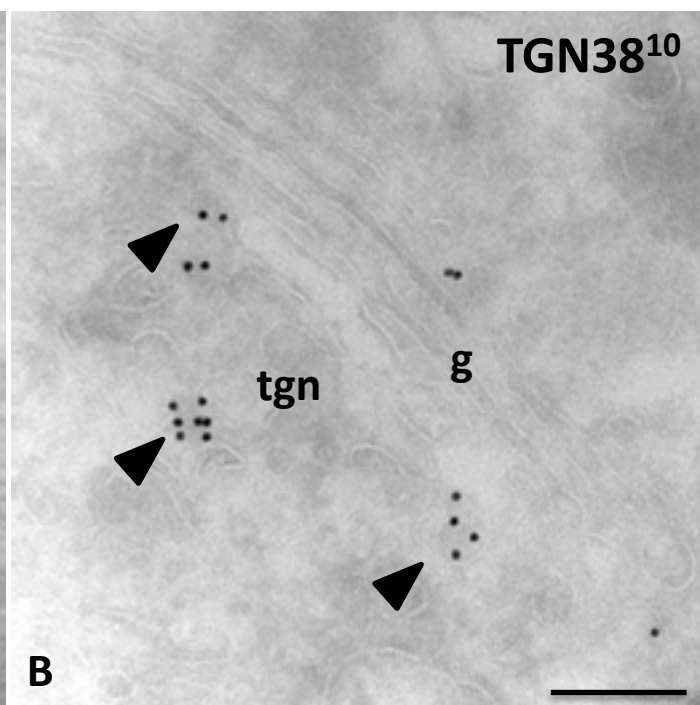
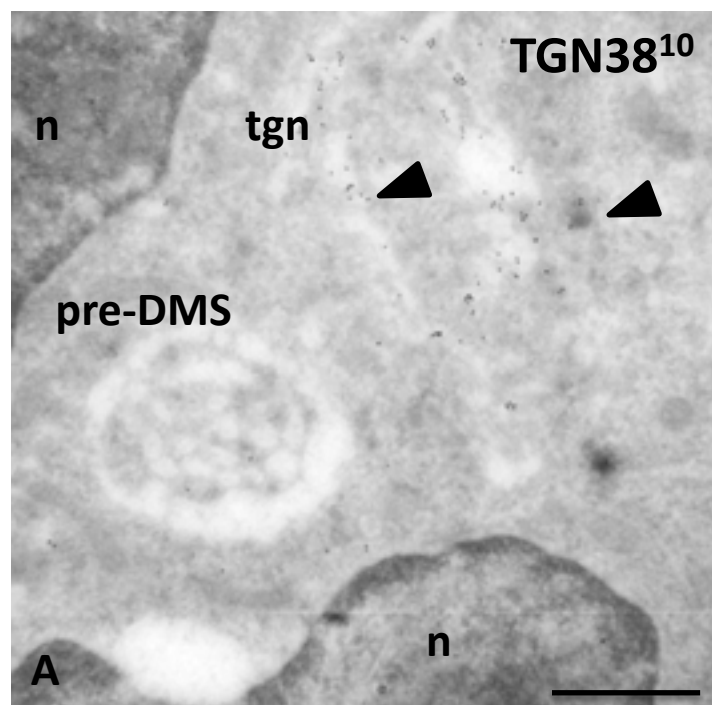
Supplemental Figure S1

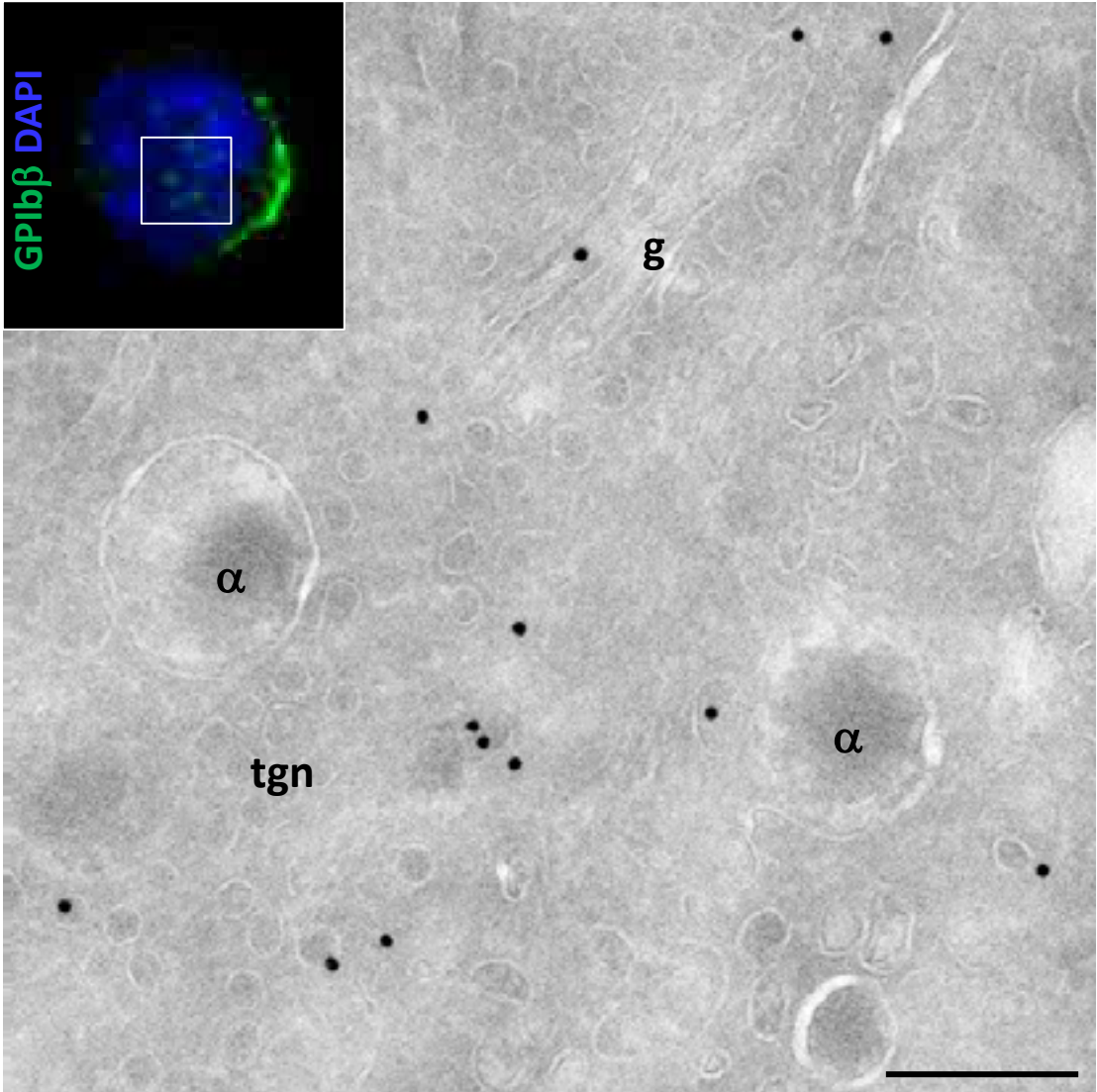




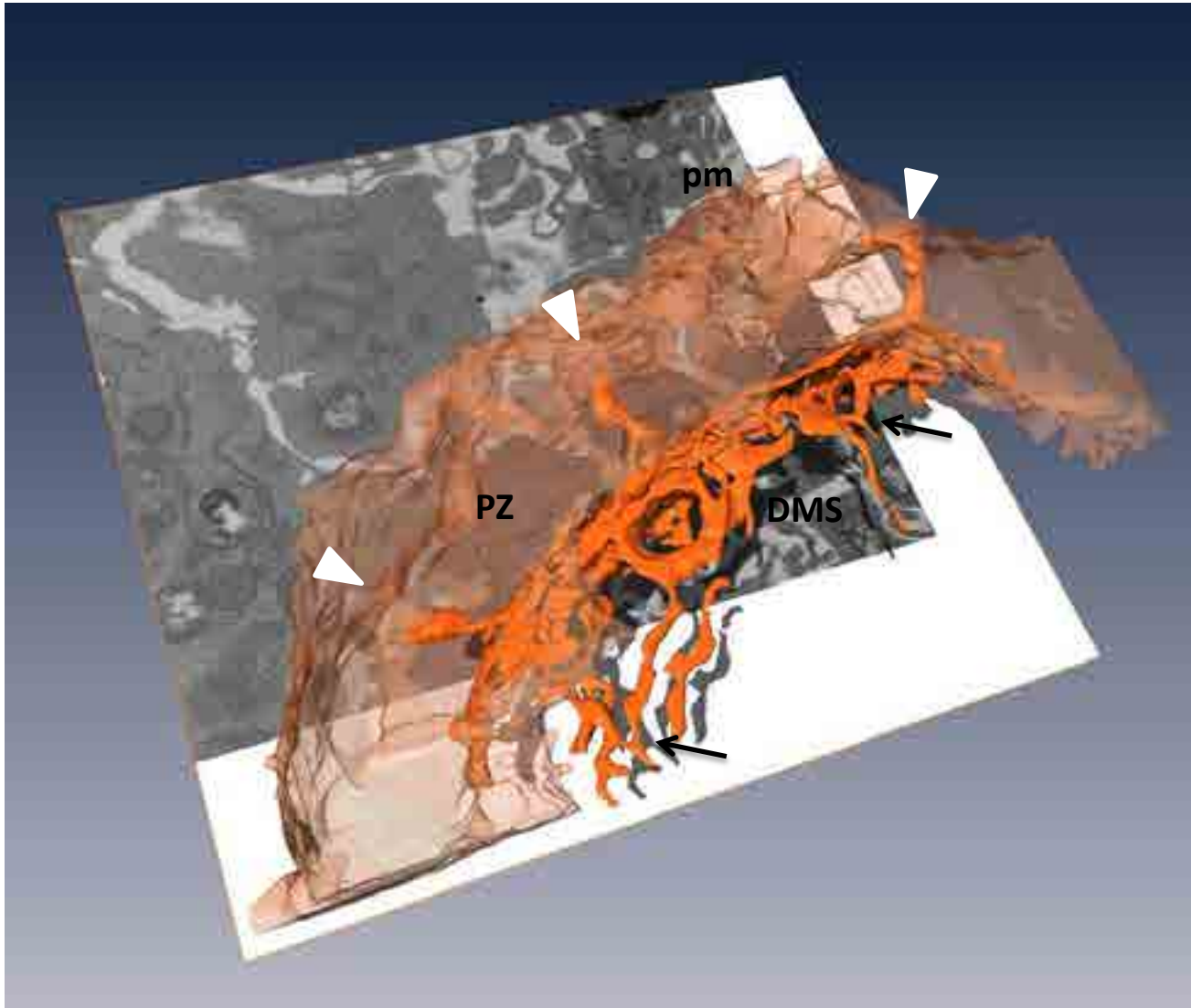
Supplemental Figure S3







Supplemental Figure S6



Bibliographie

A

Abmayr, S.M., and Pavlath, G.K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139, 641–656.

Addison, W. (1842). On the Colourless Corpuscles and on the Molecules and Cytoblasts in the Blood. *London Med. Gaz.* 30, 144–148.

Adlard, N.J., Yeo, L., Hardie, D.L., Adams, H., Juarez, M., Buckley, C.D., Raza, K., Filer, A., and Scheel-Toellner, D. (2014). 1.66 CXCL4 and CXCL7 expression on macrophages: a potential predictor of disease outcome in patients presenting with early synovitis? *Ann. Rheum. Dis.* 73 *Suppl* 1, A28–9.

Alexander, W.S., Roberts, a W., Nicola, N. a, Li, R., and Metcalf, D. (1996). Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* 87, 2162–2170.

Althaus, K., and Greinacher, A. (2009). MYH9-related platelet disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 35, 189–203.

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

Apaja-Sarkkinen, M., Autio-Harmainen, H., Alavaikko, M., Risteli, J., and Risteli, L. (1986). Immunohistochemical study of basement membrane proteins and type III procollagen in myelofibrosis. *Br. J. Haematol.* 63, 571–580.

Apostolidis, P. a, Woulfe, D.S., Chavez, M., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2011). Role of Tumor Suppressor P53 in Megakaryopoiesis and Platelet Function. *Exp. Hematol.* 40, 131–42.e4.

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.

B

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.

Balduini, A., Di Buduo, C.A., Malara, A., Lecchi, A., Rebuzzini, P., Currao, M., Pallotta, I., Jakubowski, J.A., and Cattaneo, M. (2012). Constitutively released adenosine diphosphate regulates proplatelet formation by human megakaryocytes. *Haematologica* 97, 1657–1665.

Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.-S., Lu, H.S., Martin, F., Chang, M.-S., Samal, B., Nichol, J.L., Swift, S., et al. (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 77, 1117–1124.

Bateman, J.F., Boot-Handford, R.P., and Lamandé, S.R. (2009). Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nat. Rev. Genet.* 10, 173–183.

Becker, R.P., and De Bruyn, P.P. (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.

Behnke, O. (1969). An electron microscope study of the rat megakaryocyte. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 111–129.

Behnke, O., and Forer, a (1998). From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur. J. Haematol. Suppl.* 61, 3–23.

Behnke, O., and Zelander, T. (1966). Substructure in negatively stained microtubules of mammalian blood platelets. *Exp. Cell Res.* 43, 236–239.

Bentfeld-Barker, M.E., and Bainton, D.F. (1982). Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood* 59, 472–481.

Bentley, S.A. (1982). Collagen synthesis by bone marrow stromal cells: a quantitative study. *Br. J. Haematol.* 50, 491–497.

Berthier, R., Jacquier-Sarlin, M., Schweitzer, a, Block, M.R., and Molla, a (1998). Adhesion of mature polyploid megakaryocytes to fibronectin is mediated by beta 1 integrins and leads to cell damage. *Exp. Cell Res.* 242, 315–327.

Bertozzi, C.C., Schmaier, A. a, Mericko, P., Hess, P.R., Zou, Z., Chen, M., Chen, C.-Y., Xu, B., Lu, M., Zhou, D., et al. (2010). Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood* 116, 661–670.

Bi, Y., Stuelten, C.H., Kilts, T., Wadhwa, S., Iozzo, R. V, Robey, P.G., Chen, X.-D., and Young, M.F. (2005). Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* 280, 30481–30489.

Bizzozzero, J. (1882). Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Arch. Für Pathol. Anat. Und Physiol. Und Für Klin. Med.* 90, 261–332.

Bluteau, O., Langlois, T., Rivera-Munoz, P., Favale, F., Rameau, P., Meurice, G., Dessen, P., Solary, E., Raslova, H., Mercher, T., et al. (2013). Developmental changes in human megakaryopoiesis. *J. Thromb. Haemost.* *11*, 1730–1741.

Van Bon, L., Affandi, A.J., Broen, J., Christmann, R.B., Marijnissen, R.J., Stawski, L., Farina, G. a, Stifano, G., Mathes, A.L., Cossu, M., et al. (2014). Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *370*, 433–443.

Le Bousse-Kerdilès, M.-C. (2012). Primary myelofibrosis and the “bad seeds in bad soil” concept. *Fibrogenesis Tissue Repair* *5 Suppl 1*, S20.

Broudy, V.C., Lin, N.L., and Kaushansky, K. (1995). Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* *85*, 1719–1726.

Brown, W. (1913). The histogenesis of blood platelets. *J. Exp. Med.* *18*, 278–286.

Broxmeyer, H.E. (2001). Regulation of hematopoiesis by chemokine family members. *Int. J. Hematol.* *74*, 9–17.

Di Buduo, C.A., Moccia, F., Battiston, M., De Marco, L., Mazzucato, M., Moratti, R., Tanzi, F., and Balduini, A. (2014). The importance of calcium in the regulation of megakaryocyte function. *Haematologica*.

Bunting, C. (1909). Blood-platelet and megalokaryocyte reactions in the rabbit. *J. Exp. Med.* *11*, 541–552.

Bunting, S., Widmer, R., Lipari, T., Rangell, L., Steinmetz, H., Carver-Moore, K., Moore, M.W., Keller, G. a, and de Sauvage, F.J. (1997). Normal platelets and megakaryocytes are produced in vivo in the absence of thrombopoietin. *Blood* *90*, 3423–3429.

Burkhardt, J.M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2012). The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* *120*, e73–82.

Burstein, S.A., Mei, R.L., Henthorn, J., Friese, P., and Turner, K. (1992). Leukemia inhibitory factor and interleukin-11 promote maturation of murine and human megakaryocytes in vitro. *J. Cell. Physiol.* *153*, 305–312.

Bury, L., Malara, A., Gresele, P., and Balduini, A. (2012). Outside-In Signalling Generated by a Constitutively Activated Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Impairs Proplatelet Formation in Human Megakaryocytes. *PLoS One* *7*, e34449.

C

Cai, Y., Biais, N., Giannone, G., Tanase, M., Jiang, G., Hofman, J.M., Wiggins, C.H., Silberzan, P., Buguin, A., Ladoux, B., et al. (2006). Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys. J.* *91*, 3907–3920.

- Calaminus, S.D.J., Guitart, A. V, Sinclair, A., Schachtner, H., Watson, S.P., Holyoake, T.L., Kranc, K.R., and Machesky, L.M. (2012). Lineage tracing of pf4-cre marks hematopoietic stem cells and their progeny. *PLoS One* 7, e51361.
- Carmichael, C.L., and Alexander, W.S. (2011). Mouse models of diseases of megakaryocyte and platelet homeostasis. *Mamm. Genome*.
- Cazenave, J.P., Hemmendinger, S., Beretz, A., Sutter-Bay, A., and Launay, J. (1983). [Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 41, 167–179.
- Lo Celso, C., and Scadden, D.T. (2011). The haematopoietic stem cell niche at a glance. *J. Cell Sci.* 124, 3529–3535.
- Lo Celso, C., Fleming, H.E., Wu, J.W., Zhao, C.X., Miake-Lye, S., Fujisaki, J., Côté, D., Rowe, D.W., Lin, C.P., and Scadden, D.T. (2009). Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 457, 92–96.
- Chachisvilis, M., Zhang, Y.-L., and Frangos, J. a (2006). G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15463–15468.
- Chagraoui, H., Kassouf, M., Banerjee, S., Goardon, N., Clark, K., Atzberger, A., Pearce, A.C., Skoda, R.C., Ferguson, D.J.P., Watson, S.P., et al. (2011). SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis. *Blood* 118, 723–735.
- Charbord, P., Tavian, M., Humeau, L., and Péault, B. (1996). Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* 87, 4109–4119.
- Charonis, a S., Tsilibary, E.C., Yurchenco, P.D., and Furthmayr, H. (1985). Binding of laminin to type IV collagen: a morphological study. *J. Cell Biol.* 100, 1848–1853.
- Chen, C.S. (2008). Mechanotransduction - a field pulling together? *J. Cell Sci.* 121, 3285–3292.
- Chen, Y., Boukour, S., Milloud, R., Favier, R., Saposnik, B., Schlegel, N., Nurden, A.T., Raslova, H., Vainchenker, W., Balland, M., et al. (2013). The abnormal proplatelet formation in MYH9-related macrothrombocytopenia results from an increased actomyosin contractility and is rescued by myosin IIA inhibition. *J. Thromb. Haemost.* 2163–2175.
- Chichester, C.O., Fernández, M., and Minguell, J.J. (1993). Extracellular Matrix Gene Expression by Human Bone Marrow Stroma and by Marrow Fibroblasts. *Cell Commun. Adhes.* 1, 93–99.
- Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, a C., and Hunt, P. (1995). Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 85, 402–413.
- Conti, M.A., Even-Ram, S., Liu, C., Yamada, K.M., and Adelstein, R.S. (2004). Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J. Biol. Chem.* 279, 41263–41266.

Cortin, V., Garnier, A., Pineault, N., Lemieux, R., Boyer, L., and Proulx, C. (2005). Efficient in vitro megakaryocyte maturation using cytokine cocktails optimized by statistical experimental design. *Exp. Hematol.* 33, 1182–1191.

CSERHATI, I., and KELEMEN, E. (1958). Acute prolonged thrombocytosis in mice induced by thrombocythaemic sera; a possible human thrombopoietin; a preliminary communication. *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* 11, 473–475.

Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., and Yamada, K.M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294, 1708–1712.

D

Danchakoff, V. (1916). Origin of the blood cells. Development of the haematopoetic organs and regeneration of the blood cells from the standpoint of the monophyletic school. *Anat. Rec.* 10, 397–416.

David, L., Dulong, V., Le Cerf, D., Chauzy, C., Norris, V., Delpech, B., Lamacz, M., and Vannier, J.-P. (2004). Reticulated hyaluronan hydrogels: a model for examining cancer cell invasion in 3D. *Matrix Biol.* 23, 183–193.

Davies, P.S., Powell, A.E., Swain, J.R., and Wong, M.H. (2009). Inflammation and proliferation act together to mediate intestinal cell fusion. *PLoS One* 4, e6530.

Davis, G.E., and Senger, D.R. (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ. Res.* 97, 1093–1107.

Dechantsreiter, M.A., Planker, E., Mathä, B., Lohof, E., Hölzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S.L., and Kessler, H. (1999). N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha(V)\beta(3)$ integrin antagonists. *J. Med. Chem.* 42, 3033–3040.

Delmas, P., and Coste, B. (2013). Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell* 155, 278–284.

Demange, E., Kassim, Y., Petit, C., Buquet, C., Dulong, V., Cerf, D. Le, Buchonnet, G., and Vannier, J. (2012). Survival of cord blood haematopoietic stem cells in a hyaluronan hydrogel for ex vivo biomimicry. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 901–910.

Donné, A. (1842). De l'origine des globules du sang, de leur mode de formation et de leur fin. *Comptes Rendus Hebd. Des Séances L' Académie Des Sci.* 14, 366–368.

Du, J., Chen, X., Liang, X., Zhang, G., Xu, J., He, L., Zhan, Q., Feng, X.-Q., Chien, S., and Yang, C. (2011). Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9466–9471.

Le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J. Cell Biol.* 189, 1107–1115.

Duluc, I., Freund, J.N., Leberquier, C., and Kedinger, M. (1994). Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. *J. Cell Biol.* 126, 211–221.

E

Ebbe, S., and Stohlman, F. (1965). MEGAKARYOCYTOPOIESIS IN THE RAT. *Blood* 26, 20–35.

Eckly, A., Strassel, C., Freund, M., Cazenave, J., Lanza, F., Gachet, C., and Léon, C. (2009). Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood* 113, 3182–3189.

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.

Eckly, A., Strassel, C., Cazenave, J., Lanza, F., Léon, C., and Gachet, C. (2012). Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol. Biol.* 788, 175–192.

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.

Eliades, A., Papadantonakis, N., and Ravid, K. (2010). New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization. *J. Biol. Chem.* 285, 18909–18917.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689.

Escolar, G., and White, J.G. (1991). The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells* 17, 467–85; discussion 486–95.

Escolar, G., Leistikow, E., and White, J.G. (1989). The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets. *Blood* 74, 1983–1988.

F

Falcão, L. (1974). Étude Ultrastructurale des Mégacaryocytes dans la Thrombasthénie de Glanzmann. *Blut Zeitschrift Für Die Gesamte Blutforsch.* 28, 337–350.

Fedorko, M.E. (1977a). The functional capacity of guinea pig megakaryocytes. I. Uptake of 3H-serotonin by megakaryocytes and their physiologic and morphologic response to stimuli for the platelet release reaction. *Lab. Invest.* 36, 310–320.

Fedorko, M.E. (1977b). The functional capacity of guinea pig megakaryocytes. II. The uptake of particles and macromolecules and the effect of rabbit antiginea pig platelet antiserum. *Lab. Invest.* 36, 321–328.

Fedorko, M.E., and Levine, R.F. (1976). Tannic acid effect on membrane of cell surface origin in guinea pig megakaryocytes and platelets. *J. Histochem. Cytochem.* 24, 601–605.

Feinendegen, L.E., Odartchenko, N., Cottier, H., and Bond, V.P. (1962). Kinetics of megakaryocyte proliferation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 177–182.

Fox, N.E., and Kaushansky, K. (2005). Engagement of integrin $\alpha 4 \beta 1$ enhances thrombopoietin-induced megakaryopoiesis. *Exp. Hematol.* 33, 94–99.

Fricain, J.C., Schlaubitz, S., Le Visage, C., Arnault, I., Derkaoui, S.M., Siadous, R., Catros, S., Lalande, C., Bareille, R., Renard, M., et al. (2013). A nano-hydroxyapatite – Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* 34, 2947–2959.

Frojmovic, M.M., and Milton, J.G. (1982). Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol. Rev.* 62, 185–261.

Fuentes, R., Wang, Y., Hirsch, J., Wang, C., Rauova, L., Worthen, G.S., Kowalska, M.A., and Poncz, M. (2010). Infusion of mature megakaryocytes into mice yields functional platelets. *J. Clin. Invest.* 120, 3917–3922.

Fukami, M.H. (1997). *Platelets and Their Factors* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Furuya, M., Tanaka, R., Miyagi, E., Kami, D., Nagahama, K., Miyagi, Y., Nagashima, Y., Hirahara, F., Inayama, Y., and Aoki, I. (2012). Impaired CXCL4 expression in tumor-associated macrophages (TAMs) of ovarian cancers arising in endometriosis. *Cancer Biol. Ther.* 13, 671–680.

G

Gandhi, N.S., and Mancera, R.L. (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 72, 455–482.

Gao, P., and Fagerness, P.E. (1995). Diffusion in HPMC gels. I. Determination of drug and water diffusivity by pulsed-field-gradient spin-echo NMR. *Pharm. Res.* 12, 955–964.

Gao, Y., Smith, E., Ker, E., Campbell, P., Cheng, E., 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.

Gebb, C., Hayman, E.G., Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1986). Interaction of vitronectin with collagen. *J. Biol. Chem.* 261, 16698–16703.

Geddis, A.E., and Kaushansky, K. (2004). Megakaryocytes express functional Aurora-B kinase in endomitosis. *Blood* 104, 1017–1024.

Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 21–33.

Gekas, C., and Graf, T. (2013). CD41 expression marks myeloid biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* 122, 4463–4472.

Gerber, F., and Gulliver, G. (1842). *Elements of the General and Minute Anatomy of Man and the Mammalia* (Bailliere, Hippolyte).

Gerrard, J.M., Rao, G.H., and White, J.G. (1977). The influence of reserpine and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on serotonin storage organelles of blood platelets. *Am. J. Pathol.* *87*, 633–646.

Gordon, S., Hamann, J., Lin, H.-H., and Stacey, M. (2011). F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2472–2476.

De Graaf, C.A., and Metcalf, D. (2011). Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* *10*, 0–1.

Gresele, P., Falcinelli, E., Giannini, S., D'Adamo, P., D'Eustacchio, A., Corazzi, T., Mezzasoma, A.M., Di Bari, F., Guglielmini, G., Cecchetti, L., et al. (2009). Dominant inheritance of a novel integrin beta3 mutation associated with a hereditary macrothrombocytopenia and platelet dysfunction in two Italian families. *Haematologica* *94*, 663–669.

Gurkan, U.A., and Akkus, O. (2008). The mechanical environment of bone marrow: a review. *Ann. Biomed. Eng.* *36*, 1978–1991.

Gurney, a L., Carver-Moore, K., de Sauvage, F.J., and Moore, M.W. (1994). Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* *265*, 1445–1447.

H

Habart, D., Cheli, Y., Nugent, D.J., Ruggeri, Z.M., and Kunicki, T.J. (2013). Conditional knockout of integrin $\alpha 2\beta 1$ in murine megakaryocytes leads to reduced mean platelet volume. *PLoS One* *8*, e55094.

Hagiwara, T., Nagasawa, T., Nagahisa, H., Takizawa, M., Osada, M., and Abe, T. (1996). Expression of adhesion molecules on cytoplasmic processes of human megakaryocytes. *Exp. Hematol.* *24*, 690–695.

Hamilton, R., and Campbell, F.R. (1991). Immunochemical localization of extracellular materials in bone marrow of rats. *Anat. Rec.* *231*, 218–224.

Hancock, V., Martin, J.F., and Lechuk, R. (1993). The relationship between human megakaryocyte nuclear DNA content and gene expression. *Br. J. Haematol.* *85*, 692–697.

Handagama, P., Rappolee, D.A., Werb, Z., Levin, J., and Bainton, D.F. (1990). Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* *86*, 1364–1368.

Handagama, P., Bainton, D.F., Jacques, Y., Conn, M.T., Lazarus, R.A., and Shuman, M.A. (1993). Kistrin, an integrin antagonist, blocks endocytosis of fibrinogen into guinea pig megakaryocyte and platelet alpha-granules. *J. Clin. Invest.* *91*, 193–200.

Handagama, P.J., Shuman, M. a, and Bainton, D.F. (1989). Incorporation of intravenously injected albumin, immunoglobulin G, and fibrinogen in guinea pig megakaryocyte granules. *J. Clin. Invest.* *84*, 73–82.

Hara, H., and Ogawa, M. (1978). Murine hemopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages, and megakaryocytes. *Am. J. Hematol.* *4*, 23–34.

Harburger, D.S., and Calderwood, D. a. (2009). Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 1472–1472.

Harburger, D.S., Bouaouina, M., and Calderwood, D. a (2009). Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *J. Biol. Chem.* *284*, 11485–11497.

Harrison, D. a (2012). The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, 1–3.

Harrison, P., and Cramer, E.M. (1993). Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* *7*, 52–62.

Heijnen, H.F., Debili, N., Vainchencker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1998). Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood* *91*, 2313–2325.

Heijnen, H.F.G., Schiel, a E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* *94*, 3791–3799.

Helming, L., and Gordon, S. (2009). Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol.* *19*, 514–522.

Heynen, M.J., Blockmans, D., Verwilghen, R.L., and Vermynen, J. (1988). Congenital macrothrombocytopenia, leucocyte inclusions, deafness and proteinuria: functional and electron microscopic observations on platelets and megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* *70*, 441–448.

Hitchcock, I.S., Fox, N.E., Prévost, N., Sear, K., Shattil, S.J., and Kaushansky, K. (2008). Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage specific FAK knockout. *Blood* *111*, 596–604.

Höckner, J. (2011). Megakaryocyte-restricted expression of the Cre recombinase. *Thromb. Haemost.* *106*, 554; author reply 554–5.

Hoffman, R.M. (1993). To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question. *Stem Cells* *11*, 105–111.

Holbrook, M. (1895). Haematoblasts and Blood Platelets. *Proc. Am. Microsc. Soc.* *16*, 181–190.

Howell, W. (1890). Observations upon the occurrence, structure, and function of giant cells of the marrow. *J. Morphol.* *4*, 117–130.

Howell, W., and Donahue, D. (1937). The production of blood platelets in the lungs. *J. Exp. Med.* *6*, 177–204.

Humphrey, J. (1955). Origin of Blood Platelets. *Nature* *176*, 38.

Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* *119*, 3901–3903.

Hunt, P., Hokom, M.M., Wiemann, B., Leven, R.M., and Arakawa, T. (1993). Megakaryocyte proplatelet-like process formation in vitro is inhibited by serum prothrombin, a process which is blocked by matrix-bound glycosaminoglycans. *Exp. Hematol.* *21*, 372–381.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.

Hynes, R.O. (2004). The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol.* *23*, 333–340.

Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* *326*, 1216–1219.

I

Imai, T., and Nakahata, T. (1994). Stem cell factor promotes proliferation of human primitive megakaryocytic progenitors, but not megakaryocytic maturation. *Int. J. Hematol.* *59*, 91–98.

Iruela-Arispe, M.L., Liska, D.J., Sage, E.H., and Bornstein, P. (1993). Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev. Dyn.* *197*, 40–56.

Italiano, J.E., 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.

Italiano, J.E., Bergmeier, W., Tiwari, S., Falet, H., Hartwig, J.H., Hoffmeister, K.M., André, P., Wagner, D.D., and Shivdasani, R. a (2003). Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood* *101*, 4789–4796.

J

Jedlicka, P., Sui, X., Sussel, L., and Gutierrez-Hartmann, A. (2009). Ets transcription factors control epithelial maturation and transit and crypt-villus morphogenesis in the mammalian intestine. *Am. J. Pathol.* *174*, 1280–1290.

Jordan, H. (1940). The origin and significance of the megakaryocytes of the lungs. *Anat. Rec.* *77*, 91–101.

Jordan, H.E. (1916). The microscopic structure of the yolk-sac of the pig embryo, with special reference to the origin of the erythrocytes. *Am. J. Anat.* *19*, 277–303.

Josefsson, E.C., James, C., Henley, K.J., Debrincat, M. a, Rogers, K.L., Dowling, M.R., White, M.J., Kruse, E. a, Lane, R.M., Ellis, S., et al. (2011). Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J. Exp. Med.*

Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Shivdasani, R.A., et al. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* *317*, 1767–1770.

K

- Kashiwagi, H., Kunishima, S., Kiyomizu, K., Amano, Y., Shimada, H., Morishita, M., Kanakura, Y., and Tomiyama, Y. (2013). Demonstration of novel gain-of-function mutations of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: association with macrothrombocytopenia and glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Mol. Genet. Genomic Med.* *1*, 77–86.
- Kaufman, R.M., Airo, R., Pollack, S., Crosby, W.H., and Doberneck, R. (1965a). Origin of Pulmonary Megakaryocytes. *Blood* *25*, 767–775.
- Kaufman, R.M., Airo, R., Pollack, S., and Crosby, W.H. (1965b). Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. *Blood* *26*, 720–731.
- Kaushansky, K. (2006). Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* *354*, 2034–2045.
- Kim, S.-H., Turnbull, J., and Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* *209*, 139–151.
- King, S.M., and Reed, G.L. (2002). Development of platelet secretory granules. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 293–302.
- Kisucka, J., Butterfield, C.E., Duda, D.G., Eichenberger, S.C., Saffaripour, S., Ware, J., Ruggeri, Z.M., Jain, R.K., Folkman, J., and Wagner, D.D. (2006). Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 855–860.
- Klein, G. (1995). The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* *51*, 914–926.
- Klein, G., Beck, S., and Müller, C.A. (1993). Tenascin is a cytoadhesive extracellular matrix component of the human hematopoietic microenvironment. *J. Cell Biol.* *123*, 1027–1035.
- Klein, G., Müller, C. a, Tillet, E., Chu, M.L., and Timpl, R. (1995). Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood* *86*, 1740–1748.
- Kobayashi, M., Honma, T., Matsuda, Y., Suzuki, Y., Narisawa, R., Ajioka, Y., and Asakura, H. (2000). Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* *82*, 1689–1693.
- Kosaki, G., and Kambayashi, J. (2011). Thrombocytogenesis by megakaryocyte; Interpretation by protoplatelet hypothesis. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* *87*, 254–273.
- Krumsiek, J., Marr, C., Schroeder, T., and Theis, F.J. (2011). Hierarchical Differentiation of Myeloid Progenitors Is Encoded in the Transcription Factor Network. *PLoS One* *6*, e22649.
- 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 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* *117*, 5479–5484.

Kyriakides, T.R., Rojnuckarin, P., Reidy, M. a, Hankenson, K.D., Papayannopoulou, T., Kaushansky, K., and Bornstein, P. (2003). Megakaryocytes require thrombospondin-2 for normal platelet formation and function. *Blood* *101*, 3915–3923.

L

Labelle, M., Begum, S., and Hynes, R.O. (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* *20*, 576–590.

Laiosa, C. V, Stadtfeld, M., and Graf, T. (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 705–738.

Lam, Y.C., Joshi, S.C., and Tan, B.K. (2006). Thermodynamic characteristics of gelation for methyl-cellulose hydrogels. *J. Therm. Anal. Calorim.* *87*, 475–482.

Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Söldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Förster, R., Critchley, D.R., Fässler, R., et al. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* *453*, 51–55.

De Larouzière, V., Brouland, J.P., Souni, F., Drouet, L., and Cramer, E. (1998). Inverse immunostaining pattern for synthesized versus endocytosed alpha-granule proteins in human bone marrow megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* *101*, 618–625.

Larson, M.K., and Watson, S.P. (2006). Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. *Blood* *108*, 1509–1514.

Lasagni, L., Grepin, R., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Meini, C., Sagrinati, C., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Alain-Courtois, N., et al. (2007). PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood* *109*, 4127–4134.

Lecine, P., Villeval, J.L., Vyas, P., Swencki, B., Xu, Y., and Shivdasani, R.A. (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*, 1608–1616.

Léon, C., Eckly, A., Hechler, B., Aleil, B., Freund, M., Ravanat, C., Jourdain, M., Nonne, C., Weber, J., Tiedt, R., et al. (2007). Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* *110*, 3183–3191.

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.

Leven, R.M. (1995). Differential regulation of integrin-mediated proplatelet formation and megakaryocyte spreading. *J. Cell. Physiol.* *163*, 597–607.

Leven, R.M., and Tablin, F. (1992). Extracellular matrix stimulation of guinea pig megakaryocyte proplatelet formation in vitro is mediated through the vitronectin receptor. *Exp. Hematol.* *20*, 1316–1322.

- Leven, R.M., and Yee, M.K. (1987). Megakaryocyte morphogenesis stimulated in vitro by whole and partially fractionated thrombocytopenic plasma: a model system for the study of platelet formation. *Blood* 69, 1046–1052.
- Levine, R.F. (1980). Isolation and characterization of normal human megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* 45, 487–497.
- Levine, R.F., Hazzard, K.C., and Lamberg, J.D. (1982). The significance of megakaryocyte size. *Blood* 60, 1122–1131.
- 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.
- Leysi-Derilou, Y., Robert, A., Duchesne, C., Garnier, A., Boyer, L., and Pineault, N. (2010). Polyploid megakaryocytes can complete cytokinesis. *Cell Cycle* 9, 76–75.
- Li, X., and Slayton, W.B. (2013). Molecular mechanisms of platelet and stem cell rebound after 5-fluorouracil treatment. *Exp. Hematol.* 41, 635–645.e3.
- Lichtman, M.A., Chamberlain, J.K., Simon, W., and Santillo, P.A. (1978). Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release. *Am. J. Hematol.* 4, 303–312.
- Liu, Z.-J., and Sola-Visner, M.C. (2011). Neonatal and adult megakaryopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 18, 330–337.
- Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., and Kramer, J.M. (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 369, 565–568.
- Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., and Chang, Y. (2008). Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* 112, 3164–3174.
- Lordier, L., Pan, J., Naim, V., Jalil, A., Badirou, I., Rameau, P., Larghero, J., Debili, N., Rosselli, F., Vainchenker, W., et al. (2012a). Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis. *Cell Cycle* 11, 4385–4389.
- Lordier, L., Bluteau, D., Jalil, A., Legrand, C., Pan, J., Rameau, P., Jouni, D., Bluteau, O., Mercher, T., Léon, C., et al. (2012b). RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun.* 3, 717.
- Louache, F., Debili, N., Cramer, E., Breton-Gorius, J., and Vainchenker, W. (1991). Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. *Blood* 77, 311–316.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196, 395–406.

M

- Mackie, E.J., Thesleff, I., and Chiquet-Ehrismann, R. (1987). Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J. Cell Biol.* *105*, 2569–2579.
- MacPherson, G.G. (1972a). Origin and development of the demarcation system in megakaryocytes of rat bone marrow. *J. Ultrastruct. Res.* *40*, 167–177.
- MacPherson, G.G. (1972b). Synthesis and localization of sulphated mucopolysaccharide in megakaryocytes and platelets of the rat, an analysis by electron-microscope autoradiography. *J. Cell Sci.* *10*, 705–717.
- Mahaut-Smith, M.P., Thomas, D., Higham, A.B., Usher-Smith, J. a, Hussain, J.F., Martinez-Pinna, J., Skepper, J.N., and Mason, M.J. (2003). Properties of the demarcation membrane system in living rat megakaryocytes. *Biophys. J.* *84*, 2646–2654.
- Maier, M., Wutzler, S., Bauer, M., Trendafilov, P., Henrich, D., and Marzi, I. (2008). Altered gene expression patterns in dendritic cells after severe trauma: implications for systemic inflammation and organ injury. *Shock* *30*, 344–351.
- Maier, M., Geiger, E. V, Henrich, D., Bendt, C., Wutzler, S., Lehnert, M., and Marzi, I. (2009). Platelet factor 4 is highly upregulated in dendritic cells after severe trauma. *Mol. Med.* *15*, 384–391.
- Malara, A., Gruppi, C., Rebuzzini, P., Visai, L., Perotti, C., Moratti, R., Balduini, C., Tira, M.E., and Balduini, A. (2010). Megakaryocyte-matrix interaction within bone marrow: new roles for fibronectin and factor XIII-A. *Blood* *117*, 2476–2483.
- 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.
- Malara, A., Currao, M., Gruppi, C., Celesti, G., Viarengo, G., Buracchi, C., Laghi, L., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2013). Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen and laminin. *Stem Cells*.
- Mas-Moruno, C., Rechenmacher, F., and Kessler, H. (2010). Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer. Agents Med. Chem.* *10*, 753–768.
- Matsumura, G., and Sasaki, K. (1988). The ultrastructure of megakaryopoietic cells of the yolk sac and liver in mouse embryo. *Anat. Rec.* *222*, 164–169.
- Matsumura, G., and Sasaki, K. (1989). Megakaryocytes in the yolk sac, liver and bone marrow of the mouse: a cytometrical analysis by semithin light microscopy. *J. Anat.* *167*, 181–187.
- Matsushita, T., Hayashi, H., Kunishima, S., Hayashi, M., Ikejiri, M., Takeshita, K., Yuzawa, Y., Adachi, T., Hirashima, K., Sone, M., et al. (2004). Targeted disruption of mouse ortholog of the human MYH9 responsible for macrothrombocytopenia with different organ involvement: hematological, nephrological, and otological studies of heterozygous KO mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *325*, 1163–1171.

Mazharian, A., Ghevaert, C., Zhang, L., Massberg, S., and Watson, S.P. (2011). Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood* 117, 5198–5206.

Mazur, E.M., Lindquist, D.L., de Alarcon, P.A., and Cohen, J.L. (1988). Evaluation of bone marrow megakaryocyte ploidy distributions in persons with normal and abnormal platelet counts. *J. Lab. Clin. Med.* 111, 194–202.

McCarty, J.H., Lacy-Hulbert, A., Charest, A., Bronson, R.T., Crowley, D., Housman, D., Savill, J., Roes, J., and Hynes, R.O. (2005). Selective ablation of alphav integrins in the central nervous system leads to cerebral hemorrhage, seizures, axonal degeneration and premature death. *Development* 132, 165–176.

McNicol, A., and Israels, S.J. (1999). Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* 95, 1–18.

Mercier, F.E., Ragu, C., and Scadden, D.T. (2012). The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 49–60.

Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485–491.

Metcalf, D., MacDonald, H.R., Odartchenko, N., and Sordat, B. (1975). Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1744–1748.

Mignotte, V., Vigon, I., de Crèvecoeur, E.B., Roméo, P.-H., Lemarchandel, V., and Chrétien, S. (1994). Structure and Transcription of the Human c-mpl Gene (MPL). *Genomics* 20, 5–12.

Mitsios, J. V, Prévost, N., Kasirer-Friede, A., Gutierrez, E., Groisman, A., Abrams, C.S., Wang, Y., Litvinov, R.I., Zemljic-Harpf, A., Ross, R.S., et al. (2010). What is vinculin needed for in platelets? *J. Thromb. Haemost.*

Morgan, E. a, Schneider, J.G., Baroni, T.E., Uluçkan, O., Heller, E., Hurchla, M. a, Deng, H., Floyd, D., Berdy, A., Prior, J.L., et al. (2010). Dissection of platelet and myeloid cell defects by conditional targeting of the beta3-integrin subunit. *FASEB J.* 24, 1117–1127.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593–605.

N

Nagata, Y., Muro, Y., and Todokoro, K. (1997). Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J. Cell Biol.* 139, 449–457.

Nakajima, H. (2011). Role of transcription factors in differentiation and reprogramming of hematopoietic cells. *Keio J. Med.* 60, 47–55.

Nakashima, K., and Taga, T. (1998). gp130 and the IL-6 family of cytokines: signaling mechanisms and thrombopoietic activities. *Semin. Hematol.* 35, 210–221.

Neve, A., Corrado, A., and Cantatore, F.P. (2011). Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* 343, 289–302.

Nguyen, H.G., Yu, G., Makitalo, M., Yang, D., Xie, H.-X., Jones, M.R., and Ravid, K. (2005). Conditional overexpression of transgenes in megakaryocytes and platelets in vivo. *Blood* 106, 1559–1564.

Nilsson, S.K., Debatis, M.E., Dooner, M.S., Madri, J.A., Quesenberry, P.J., and Becker, P.S. (1998). Immunofluorescence Characterization of Key Extracellular Matrix Proteins in Murine Bone Marrow In Situ. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 371–378.

Van Nispen tot Pannerden, H., de Haas, F., Geerts, W., Posthuma, G., van Dijk, S., and Heijnen, H.F.G. (2010). The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood* 116, 1147–1156.

Noordegraaf, E.M., and Ploemacher, R.E. (1979). Studies of the haemopoietic microenvironment. II. Content of glycosaminoglycans in murine bone marrow and spleen under anaemic and polycythaemic conditions. *Scand. J. Haematol.* 22, 327–332.

Noris, P., Guidetti, G.F., Conti, V., Ceresa, I.F., Di Pumpo, M., Pecci, A., Torti, M., Savoia, A., and Balduini, C.L. (2006). Autosomal dominant thrombocytopenias with reduced expression of glycoprotein Ia. *Thromb. Haemost.* 95, 483–489.

Noris, P., Klersy, C., Gresele, P., Giona, F., Giordano, P., Minuz, P., Loffredo, G., Pecci, A., Melazzini, F., Civaschi, E., et al. (2013). Platelet size for distinguishing between inherited thrombocytopenias and immune thrombocytopenia: a multicentric, real life study. *Br. J. Haematol.* 162, 112–119.

Nowakowski, A., Alonso-Martín, S., Arias-Salgado, E.G., Fernández, D., Vilar, M., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2011). Megakaryocyte gene targeting mediated by restricted expression of recombinase Cre. *Thromb. Haemost.* 105, 138–144.

Nurden, A.T. (2005). Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1773–1782.

Nurden, A.T. (2006). Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J. Rare Dis.* 1, 10.

O

Oguri, K., Okayama, E., Caterson, B., and Okayama, M. (1987). Isolation, characterization, and localization of glycosaminoglycans in rabbit bone marrow. *Blood* 70, 501–510.

Okada, Y., Nobori, H., Shimizu, M., Watanabe, M., Yonekura, M., Nakai, T., Kamikawa, Y., Wakimura, A., Funahashi, N., Naruse, H., et al. (2011). Multiple ETS Family Proteins Regulate PF4 Gene Expression by Binding to the Same ETS Binding Site. *PLoS One* 6, e24837.

Okada, Y., Watanabe, M., Nakai, T., Kamikawa, Y., Shimizu, M., Fukuhara, Y., Yonekura, M., Matsuura, E., Hoshika, Y., Nagai, R., et al. (2013). RUNX1, but not its familial platelet disorder mutants, synergistically activates PF4 gene expression in combination with ETS family proteins. *J. Thromb. Haemost.* 11, 1742–1750.

P

- Pallotta, I., Lovett, M., Rice, W., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2009). Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis. *PLoS One* 4, e8359.
- Parrilla, R. (2011). Rebuttal to the letter by J. Höckner: "Megakaryocyte gene targeting mediated by restricted expression of recombinase Cre." *Thromb. Haemost.* 106, 554–555.
- Patel-Hett, S., Wang, H., Begonja, A.J., Thon, J.N., Alden, E.C., Wandersee, N.J., An, X., Mohandas, N., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2011). The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation. *Blood* 118, 1641–1652.
- Paulus, J. (1967). Multiple differentiation in megakaryocytes and platelets. *Blood* 29, 407–416.
- Pecci, A., Canobbio, I., Balduini, A., Stefanini, L., Cisterna, B., Marseglia, C., Noris, P., Savoia, A., Balduini, C.L., and Torti, M. (2005). Pathogenetic mechanisms of hematological abnormalities of patients with MYH9 mutations. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3169–3178.
- Pecci, A., Panza, E., Pujol-Moix, N., Klersy, C., Di Bari, F., Bozzi, V., Gresele, P., Lethagen, S., Fabris, F., Dufour, C., et al. (2008). Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum. Mutat.* 29, 409–417.
- Pecci, A., Malara, A., Badalucco, S., Bozzi, V., Torti, M., Balduini, C.L., and Balduini, A. (2009). Megakaryocytes of patients with MYH9-related thrombocytopenia present an altered proplatelet formation. *Thromb. Haemost.* 102, 90–96.
- Pecci, A., Klersy, C., Gresele, P., Lee, K.J.D., 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, 236–247.
- 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.
- Peng, H.-Y., and Liao, H.-F. (2011). Staurosporine induces megakaryocytic differentiation through the upregulation of JAK/Stat3 signaling pathway. *Ann. Hematol.* 90, 1017–1029.
- Penington, D.G., Streatfield, K., and Roxburgh, a E. (1976). Megakaryocytes and the heterogeneity of circulating platelets. *Br. J. Haematol.* 34, 639–653.
- Perrault, C., Moog, S., Rubinstein, E., Santer, M., Baas, M.J., de la Salle, C., Ravanat, C., Dambach, J., Freund, M., Santoso, S., et al. (2001). A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb beta modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb. Haemost.* 86, 1238–1248.
- Pinedo, H.M., Verheul, H.M., D'Amato, R.J., and Folkman, J. (1998). Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 352, 1775–1777.

Pisciotta, a V, Stefanini, M., and Dameshek, W. (1953). Studies on platelets. X. Morphologic characteristics of megakaryocytes by phase contrast microscopy in normals and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 8, 703–723.

Pitsilos, S., Hunt, J., Mohler, E.R., Prabhakar, A.M., Poncz, M., Dawicki, J., Khalapyan, T.Z., Wolfe, M.L., Fairman, R., Mitchell, M., et al. (2003). Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb. Haemost.* 04245, 1112–1120.

Poncz, M., Surrey, S., LaRocco, P., Weiss, M.J., Rappaport, E.F., Conway, T.M., and Schwartz, E. (1987). Cloning and characterization of platelet factor 4 cDNA derived from a human erythroleukemic cell line. *Blood* 69, 219–223.

Potter, J., and Ward, E. (1940). The development of the megakaryocyte in adult mice. *Anat. Rec.*

Poujol, C., Ware, J., Nieswandt, B., Nurden, A.T., and Nurden, P. (2002). Absence of GPIIb/IIIa is responsible for aberrant membrane development during megakaryocyte maturation: ultrastructural study using a transgenic model. *Exp. Hematol.* 30, 352–360.

Powell, A.E., Anderson, E.C., Davies, P.S., Silk, A.D., Pelz, C., Impey, S., and Wong, M.H. (2011). Fusion between Intestinal epithelial cells and macrophages in a cancer context results in nuclear reprogramming. *Cancer Res.* 71, 1497–1505.

Q

Qian, Z., Chen, L., Fernald, A.A., Williams, B.O., and Le Beau, M.M. (2008). A critical role for Apc in hematopoietic stem and progenitor cell survival. *J. Exp. Med.* 205, 2163–2175.

R

Raab, M., Swift, J., P Dingal, P.C.D., Shah, P., Shin, J.-W., and Discher, D.E. (2012). Crawling from soft to stiff matrix polarizes the cytoskeleton and phosphoregulates myosin-II heavy chain. *J. Cell Biol.* 199.

Radley, J.M., and Haller, C.J. (1982). The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* 60, 213–219.

Radley, J.M., and Haller, C.J. (1983). Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br. J. Haematol.* 53, 277–287.

Raslova, H., Baccini, V., Loussaief, L., Comba, B., Larghero, J., Debili, N., and Vainchenker, W. (2006). Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates both proliferation of megakaryocyte progenitors and late stages of megakaryocyte differentiation. *Blood* 107, 2303–2310.

Ravid, K., Beeler, D.L., Rabin, M.S., Ruley, H.E., and Rosenberg, R.D. (1991). Selective targeting of gene products with the megakaryocyte platelet factor 4 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1521–1525.

Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J.M., and Jones, M.R. (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell. Physiol.* 190, 7–20.

Reilly, G.C., and Engler, A.J. (2010). Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J. Biomech.* *43*, 55–62.

Reilly, J.T., and Nash, J.R. (1988). Vitronectin (serum spreading factor): its localisation in normal and fibrotic tissue. *J. Clin. Pathol.* *41*, 1269–1272.

Van der Rest, M., and Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* *5*, 2814–2823.

Richardson, J.L., Shivdasani, R. a, Boers, C., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005). Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* *106*, 4066–4075.

Ricke, R.M., and van Deursen, J.M. (2013). Aneuploidy in health, disease, and aging. *J. Cell Biol.* *201*, 11–21.

Rizvi, A.Z., Swain, J.R., Davies, P.S., Bailey, A.S., Decker, A.D., Willenbring, H., Grompe, M., Fleming, W.H., and Wong, M.H. (2006). Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6321–6325.

Robin, C. (1849). Sur l'existence de deux espèces nouvelles d'éléments anatomiques qui se trouvent dans le canal médullaire des os. *Gaz. Médicale Paris série 3*, 992–993.

De Rocco, D., Zieger, B., Platokouki, H., Heller, P.G., Pastore, A., Bottega, R., Noris, P., Barozzi, S., Glembotsky, A.C., Pergantou, H., et al. (2013). MYH9-related disease: five novel mutations expanding the spectrum of causative mutations and confirming genotype/phenotype correlations. *Eur. J. Med. Genet.* *56*, 7–12.

Rochlin, M.W., Itoh, K., Adelstein, R.S., and Bridgman, P.C. (1995). Localization of myosin II A and B isoforms in cultured neurons. *J. Cell Sci.* *108 (Pt 1)*, 3661–3670.

Rondina, M.T., Weyrich, A.S., and Zimmerman, G. a (2013). Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ. Res.* *112*, 1506–1519.

Rönstrand, L. (2004). Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 2535–2548.

S

Sabri, S., Jandrot-Perrus, M., Bertoglio, J., Farndale, R.W., Mas, V.M.-D., Debili, N., and Vainchenker, W. (2004). Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by alpha2beta1 integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood* *104*, 3117–3125.

Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 5166–5170.

Saulle, E., Guerriero, R., Petronelli, A., Coppotelli, E., Gabbianelli, M., Morsilli, O., Spinello, I., Pelosi, E., Castelli, G., Testa, U., et al. (2012). Autocrine Role of Angiopoietins during Megakaryocytic Differentiation. *PLoS One* *7*, e39796.

De Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., and Kuang, W.J. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369, 533–538.

De Sauvage, F.J., Carver-Moore, K., Luoh, S.M., Ryan, A., Dowd, M., Eaton, D.L., and Moore, M.W. (1996). Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J. Exp. Med.* 183, 651–656.

Scarborough, R.M., Naughton, M.A., Teng, W., Rose, J.W., Phillips, D.R., Nannizzi, L., Arfsten, A., Campbell, A.M., and Charo, I.F. (1993). Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J. Biol. Chem.* 268, 1066–1073.

Schaffner, A., Rhyu, P., Schoedon, G., and Schaer, D.J. (2005). Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes--role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J. Leukoc. Biol.* 78, 202–209.

Schick, P.K., Wojenski, C.M., He, X., Walker, J., Marcinkiewicz, C., and Niewiarowski, S. (1998). Integrins Involved in the Adhesion of Megakaryocytes to Fibronectin and Fibrinogen. *Blood* 92, 2650–2656.

Schultze, M. (1865). Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Arch. Für Mikroskopische Anat.* 1, 1–42.

Schulze, H., Korpál, 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.

Schwartz, H., Köster, S., Kahr, W.H. a, Michetti, N., Kraemer, B.F., Weitz, D. a, Blaylock, R.C., Kraiss, L.W., Greinacher, A., Zimmerman, G. a, et al. (2010). Anucleate platelets generate progeny. *Blood* 3801–3809.

Seiffert, D. (1996). Detection of vitronectin in mineralized bone matrix. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 275–280.

Shen, Y., and Nilsson, S.K. (2012). Bone, microenvironment and hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 19, 250–255.

Sheng, H., Shao, J., Williams, C.S., Pereira, M. a, Taketo, M.M., Oshima, M., Reynolds, a B., Washington, M.K., DuBois, R.N., and Beauchamp, R.D. (1998). Nuclear translocation of beta-catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. *Carcinogenesis* 19, 543–549.

Shi, G., Field, D.J., Ko, K., Ture, S., Srivastava, K., Levy, S., Kowalska, M.A., Poncz, M., Fowell, D.J., and Morrell, C.N. (2014). Platelet factor 4 limits Th17 differentiation and cardiac allograft rejection. *J. Clin. Invest.*

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. U. S. A.*

- 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. (2013). Contractile Forces Sustain and Polarize Hematopoiesis from Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 1–13.
- Shivdasani, R. a, Fujiwara, Y., McDevitt, M. a, and Orkin, S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 16, 3965–3973.
- Siler, U., Seiffert, M., Puch, S., Richards, A., Torok-Storb, B., Muller, C.A., Sorokin, L., and Klein, G. (2000). Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood* 96, 4194–4203.
- Silk, A.D., Gast, C.E., Davies, P.S., Fakhari, F.D., Vanderbeek, G.E., Mori, M., and Wong, M.H. (2013). Fusion between hematopoietic and epithelial cells in adult human intestine. *PLoS One* 8, e55572.
- Slayton, W.B., Wainman, D.A., Li, X.M., Hu, Z., Jotwani, A., Cogle, C.R., Walker, D., Fisher, R.C., Wingard, J.R., Scott, E.W., et al. (2005). Developmental differences in megakaryocyte maturation are determined by the microenvironment. *Stem Cells* 23, 1400–1408.
- Smith, E.C., Thon, J.N., Devine, M.T., Lin, S., Schulz, V.P., Guo, Y., Massaro, S. a, Halene, S., Gallagher, P., Italiano, J.E., et al. (2012). MKL1 and MKL2 play redundant and crucial roles in megakaryocyte maturation and platelet formation. *Blood* 120, 2317–2329.
- Sohma, Y., Akahori, H., Seki, N., Hori, T., Ogami, K., Kato, T., Shimada, Y., Kawamura, K., and Miyazaki, H. (1994). Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett.* 353, 57–61.
- Song, S.H. (1978). Studies on Splenic Megakaryocytes. *Vox Sang.* 35, 117–125.
- Stefanini, M., Chatterjea, J.B., Dameshek, W., Zannos, L., and Santiago, E.P. (1952). Studies on platelets. II. The effect of transfusion of platelet-rich polycythemic blood on the platelets and hemostatic function in “idiopathic” and “secondary” thrombocytopenic purpura. *Blood* 7, 53–76.
- Stenberg, P.E., McDonald, T.P., and Jackson, C.W. (1995). Disruption of microtubules in vivo by vincristine induces large membrane complexes and other cytoplasmic abnormalities in megakaryocytes and platelets of normal rats like those in human and Wistar Furth rat hereditary macrothrombocytopenias. *J. Cell. Physiol.* 162, 86–102.
- Straneva, J.E., Goheen, M.P., Hui, S.L., Bruno, E., and Hoffman, R. (1986). Terminal cytoplasmic maturation of human megakaryocytes in vitro. *Exp. Hematol.* 14, 919–929.
- Strassel, C., Eckly, A., Léon, C., Petitjean, C., Freund, M., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2009). Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 94, 800–810.
- Strassel, C., Eckly, A., Léon, C., Moog, S., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2012). Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp. Cell Res.* 318, 25–32.

Sundström, G., Löfvenberg, E., Hassan, I., and Engström-Laurent, A. (2002). Localisation and distribution of hyaluronan in normal bone marrow matrix: a novel method to evaluate impending fibrosis? *Eur. J. Haematol.* 68, 194–202.

Suzuki, N., Kunishima, S., Ikejiri, M., Maruyama, S., Sone, M., Takagi, A., Ikawa, M., Okabe, M., Kojima, T., Saito, H., et al. (2013). Establishment of mouse model of MYH9 disorders: heterozygous R702C mutation provokes macrothrombocytopenia with leukocyte inclusion bodies, renal glomerulosclerosis and hearing disability. *PLoS One* 8, e71187.

Szalai, G., LaRue, a C., and Watson, D.K. (2006). Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2460–2476.

T

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 (Pt 1), 59–70.

Tajika, K., Ikebuchi, K., Dan, K., and Asano, S. (1996). A role of GAGs in ECM on morphogenesis of megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* 94, 34–39.

Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., and Springer, T. a (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599–11.

Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, a F., and Hynes, R.O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46, 271–282.

Tavassoli, M. (1979). Fusion-fission reorganization of membrane: a developing membrane model for thrombocytogenesis in megakaryocytes. *Blood Cells* 5, 89–99.

Tavassoli, M. (1980). Megakaryocyte--platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood* 55, 537–545.

Tavassoli, M., and Aoki, M. (1981). Migration of Entire Megakaryocytes through the Marrow-Blood Barrier. *Br. J. Haematol.* 48, 25–29.

Theveneau, E., and Mayor, R. (2012). Neural crest migration: interplay between chemorepellents, chemoattractants, contact inhibition, epithelial-mesenchymal transition, and collective cell migration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 435–445.

Thiele, J., Braeckel, C., Wagner, S., Falini, B., Dienemann, D., Stein, H., and Fischer, R. (1992). Macrophages in normal human bone marrow and in chronic myeloproliferative disorders: an immunohistochemical and morphometric study by a new monoclonal antibody (PG-M1) on trephine biopsies. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 421, 33–39.

Thiery, J.P., and Bessis, M. (1956). Mécanisme de la plaquetogénèse - Etude "in vitro" par la microcinématographie. *Rev. Hematol.* 11, 162–174.

Thon, J.N., Montalvo, A., Patel-Hett, S., Devine, M.T., Richardson, J.L., Ehrlicher, A., Larson, M.K., Hoffmeister, K., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2010). Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol.* 191, 861–874.

Tibbitt, M.W., and Anseth, K.S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* *103*, 655–663.

Tiedt, R., Schomber, T., Hao-Shen, H., and Skoda, R.C. (2007). Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood* *109*, 1503–1506.

Tijssen, M.R., and Ghevaert, C. (2013). Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J. Thromb. Haemost.* *11*, 593–604.

Tijssen, M.R., Cvejic, A., Joshi, A., Hannah, R.L., Ferreira, R., Forrai, A., Bellissimo, D.C., Oram, S.H., Smethurst, P.A., Wilson, N.K., et al. (2011). Genome-wide Analysis of Simultaneous GATA1/2, RUNX1, FLI1, and SCL Binding in Megakaryocytes Identifies Hematopoietic Regulators. *Dev. Cell* *20*, 597–609.

Tober, J., Koniski, A., McGrath, K.E., Vemishetti, R., Emerson, R., de Mesy-Bentley, K.K.L., Waugh, R., and Palis, J. (2007). The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* *109*, 1433–1441.

Tomer, A. (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*, 2722–2727.

Topp, K.S., and Tablin, F. (1991). Bovine megakaryocyte integrins: their association with extracellular matrix in vivo. *Comp. Haematol. Int.* *1*, 135–144.

Topp, K.S., Tablin, F., and Levin, J. (1990). Culture of isolated bovine megakaryocytes on reconstituted basement membrane matrix leads to proplatelet process formation. *Blood* *76*, 912–924.

Tranzer, J.P., da Prada, M., and Pletscher, A. (1972). Storage of 5-hydroxytryptamine in megakaryocytes. *J. Cell Biol.* *52*, 191–197.

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.

V

Vicente-Manzanares, M., Koach, M. a, Whitmore, L., Lamers, M.L., and Horwitz, A.F. (2008). Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *J. Cell Biol.* *183*, 543–554.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 778–790.

Vihervaara, A., Sergelius, C., Vasara, J., Blom, M. a H., Elsing, A.N., Roos-Mattjus, P., and Sistonen, L. (2013). Transcriptional response to stress in the dynamic chromatin environment of cycling and mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E3388–97.

Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E., and Qin, J. (2002). A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 110, 587–597.

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.

Vogel, V., and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 265–275.

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

W

Wang, Z. (1996). The Cell Cycle in Polyploid Megakaryocytes Is Associated with Reduced Activity of Cyclin B1-dependent Cdc2 Kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 4266–4272.

Weber, G.F., Bjerke, M. a, and DeSimone, D.W. (2011). Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J. Cell Sci.* 124, 1183–1193.

Wei, W.-C., Lin, H.-H., Shen, M.-R., and Tang, M.-J. (2008). Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C1579–89.

Weiss, P., Fatimi, A., Guicheux, J., and Vinatier, C. (2010). *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* (New York, NY: Springer New York).

Wen, Q., Leung, C., Huang, Z., Small, S., Reddi, A.L., Licht, J.D., and Crispino, J.D. (2009). Survivin is not required for the endomitotic cell cycle of megakaryocytes. *Blood* 114, 153–156.

White, J.G. (1968). The substructure of human platelet microtubules. *Blood* 32, 638–648.

White, J.G. (2008). Electron opaque structures in human platelets: which are or are not dense bodies? *Platelets* 19, 455–466.

White, J.G., and Krivit, W. (1967). An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. *Blood* 30, 625–635.

WRIGHT, J.H. (1906). The Origin and Nature of the Blood Plates. *Bost. Med. Surg. J.* 154, 643–645.

X

Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, a, Goodman, S.L., and Arnaout, M. a (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294, 339–345.

Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296, 151–155.

Xu, M. -j. (2001). Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* 97, 2016–2022.

Y

Yamada, E. (1957). The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)*. 29, 267–290.

Yamada, K.M., Pankov, R., and Cukierman, E. (2003). Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 959–966.

Youssefian, T., and Cramer, E.M. (2000). Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood* 95, 4004–4007.

Z

Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Lyengar, R., and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* 9, 858–867.

Zauli, G., Bassini, a, Vitale, M., Gibellini, D., Celeghini, C., Caramelli, E., Pierpaoli, S., Guidotti, L., and Capitani, S. (1997). Thrombopoietin enhances the alpha IIb beta 3-dependent adhesion of megakaryocytic cells to fibrinogen or fibronectin through PI 3 kinase. *Blood* 89, 883–895.

Zhang, J., Varas, F., Stadtfeld, M., Heck, S., Faust, N., and Graf, T. (2007). CD41-YFP mice allow in vivo labeling of megakaryocytic cells and reveal a subset of platelets hyperreactive to thrombin stimulation. *Exp. Hematol.* 35, 490–499.

Zhang, Y., Conti, M.A., Malide, D., Dong, F., Wang, A., Shmist, Y. a, Liu, C., Zervas, P., Daniels, M.P., Chan, C.-C., et al. (2011). Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood* 119, 238–250.

Zhou, Z., Gushiken, F.C., Bolgiano, D., Salsbery, B.J., Aghakasiri, N., Jing, N., Wu, X., Vijayan, K.V., Rumbaut, R.E., Adachi, R., et al. (2013). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates collagen-induced platelet aggregation independently of its transcription factor activity. *Circulation* 127, 476–485.

Zimmet, J., and Ravid, K. (2000). Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp. Hematol.* 28, 3–16.

Zou, Z., Schmaier, A.A., Cheng, L., Mericko, P., Dickeson, S.K., Stricker, T.P., Santoro, S.A., and Kahn, M.L. (2009). Negative regulation of activated alpha-2 integrins during thrombopoiesis. *Blood* 113, 6428–6439.

Zucker-Franklin, D. (1996). Megakaryocyte and platelet structure in thrombocytopoiesis: the effect of cytokines. *Stem Cells* 14 Suppl 1, 1–17.

Zucker-Franklin, D. (2003). Megakaryocytes and Platelets. In *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology*, D. Zucker-Franklin, and C.E. Grossi, eds. (Milan: Edi. Ermes), pp. 753–864.

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.

Zucker-Franklin, D., Stahl, C., and Hyde, P. (1987). Megakaryocyte ultrastructure. Its relationship to normal and pathologic thrombocytopoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 509, 25–33.

Fabien PERTUY

**Study of the mechanisms of platelet formation:
role for the bone marrow environment**

Summary:

Blood platelets are produced in the bone marrow by the megakaryocytes. Neither megakaryocytes differentiation (megakaryopoiesis) and platelet formation mechanisms are entirely understood, nor the crucial role of the bone marrow environment in these processes. In this thesis, we addressed this issue with the study of i) the role of megakaryocyte integrins, the main extracellular matrix receptors, ii) the study of megakaryocytic differentiation in 3D culture and iii) the study of myosin IIA deficient mice. We show here that integrins seem to be involved in the regulation of megakaryopoiesis and in the process of platelet formation, with a previously underestimated role for $\beta 3$ integrin. We also show that recreating a 3D environment of stiffness in the range of that of bone marrow improves the maturation of *in vitro* differentiated megakaryocytes. The study of *Myh9*^{-/-} mice led us to suggest a formerly unknown role for myosin IIA in the cytoplasmic distribution of organelles within the megakaryocyte. As a side-project, we characterized the expression specificity of the Pf4-cre system to validate its use in our experimental approaches. Altogether, this work enlightens new roles for myosin IIA and integrins in megakaryocytes and indicates that stiffness of the environment influences megakaryopoiesis.

Keywords: Megakaryocyte, environment, stiffness, integrin, myosin IIA, Pf4-cre.

Fabien PERTUY

Étude des mécanismes de formation des plaquettes sanguines : rôle de l'environnement médullaire

Résumé :

Les plaquettes sont produites dans la moelle osseuse, à partir des mégacaryocytes. Les mécanismes de différenciation des mégacaryocytes (mégacaryopoïèse) et de formation des plaquettes ne sont pas totalement compris, de même que l'influence cruciale de l'environnement médullaire dans ces processus. Dans ce travail de thèse, nous avons abordé cette problématique par i) l'étude du rôle des intégrines mégacaryocytaires, principaux récepteurs de la matrice extracellulaire, ii) l'étude de la différenciation mégacaryocytaire dans un modèle de culture 3D et iii) l'étude des souris déficientes pour la myosine IIA. Nous montrons que les intégrines semblent impliquées dans la mégacaryopoïèse et dans le processus de formation des plaquettes, avec un rôle jusqu'à maintenant sous-estimé de l'intégrine $\beta 3$. Nous montrons également que recréer un environnement 3D de rigidité comparable à la moelle osseuse permet d'améliorer la maturation des mégacaryocytes différenciés *in vitro*. L'étude des souris *Myh9^{-/-}* nous a permis de proposer un rôle jusqu'ici inconnu de la myosine IIA dans la distribution des organelles dans les mégacaryocytes. En parallèle, nous avons caractérisé la spécificité d'expression tissulaire du système Pf4-cre pour valider son utilisation dans nos approches expérimentales. Globalement, ce travail apporte un éclairage nouveau sur le rôle de la myosine IIA et des intégrines dans les mégacaryocytes et indique que la rigidité de l'environnement a une influence sur la mégacaryopoïèse.

Mots-clés : Mégacaryocyte, environnement, rigidité, intégrine, myosine IIA, Pf4-cre.