

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

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

THÈSE

Présentée par

Rémi STAHL

Soutenue le **12 décembre 2024**

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

Discipline/S spécialité : Hématologie et physiopathologie vasculaire

Etude du rôle du facteur de transcription HELIOS dans la mégacaryopoïèse

THÈSE dirigée par :

Mme Catherine STRASSEL

DR, EFS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Marjorie POGGI

MCU, Aix-Marseille Université

M. Fabrice COGNASSE

DR, EFS, Université de Saint-Etienne

EXAMINATEUR :

M. Philippe KASTNER

MCU, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S1255

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

Directeur : Docteur Pierre H. MANGIN

Établissement Français du Sang (EFS) Grand Est

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

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

Directeur de thèse :

Docteur Catherine STRASSEL

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

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à **Pierre Mangin** pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire et m'avoir accueilli dans un environnement de recherche stimulant et dynamique.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à **Catherine Strassel**, ma directrice de thèse, qui a été bien plus qu'une encadrante : un véritable mentor. Ton soutien indéfectible, tes conseils avisés et ta capacité à me challenger m'ont permis de me perfectionner tout au long de ce parcours. Merci également pour m'avoir initié à la pratique de la vulgarisation scientifique et merci pour tes recommandations d'opéras. Je te remercie pour ta confiance, ta patience ainsi que pour la richesse de nos échanges, tant sur le plan scientifique que personnel.

Je tiens également à remercier l'Université de Strasbourg et l'INSERM pour leur soutien financier.

Un grand merci à **Philippe Kastner**, **Marjorie Poggi** et **Fabrice Cognasse** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Je suis aussi reconnaissant envers **Blandine Maître** pour sa présence au sein de mon comité de suivi de thèse, pour ses conseils scientifiques avisés et pour nos discussions constructives.

Je n'oublie pas d'adresser toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres, passés et présents, de notre équipe de recherche. Je remercie **Anaïs P.** pour m'avoir accompagné lors de mes débuts au laboratoire. Merci énormément à **Léa M. et Sylvie M.**, dont l'accompagnement et l'expertise scientifique ont été essentiels pour l'obtention des résultats présentés dans ce manuscrit de thèse. Vous m'avez chacune aidé dans vos domaines de prédilection et je vous en suis très reconnaissant.

Merci à mes collègues de bureau **Axelle**, **Kim**, **Andrei** et **Florian** pour nos échanges scientifiques, leur soutien constant et les nombreux moments de partage qui ont marqué ces années de thèse. Une reconnaissance particulière va à **Florian** qui m'a supporté depuis le Master.

Merci également à mes stagiaires **Lila** et **Anna** pour leur contribution à mon projet de thèse.

Un grand merci à l'équipe de microscopie électronique : **Anita**, **Jean-Yves**, **Fabienne** et **Claire** pour votre aide, vos conseils et votre disponibilité. Merci à l'équipe de l'animalerie, et particulièrement **Ketty**, **Emily** et **Nolwenn** pour votre soutien et vos conseils quand j'ai débuté dans l'*in vivo*. Un grand merci aussi au laboratoire plaquettes, et tout particulièrement à **Véro**. Je garde un excellent souvenir de ta formation sur le lavage des plaquettes.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer, de près ou de loin, lors de mon passage à l'EFS Grand-Est. Que ce soit pour une discussion informelle, un échange de connaissances, un sourire bienveillant au quotidien ou même quelques chocolats partagés à la cafétéria, votre présence et votre soutien ont toujours été précieux.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes rencontrées au cours de mes études universitaires et qui ont partagé avec moi ces moments de découverte et d'apprentissage : **Claire, Ophélie, Raphaël, Sidonie, Christian, Allan** ainsi que les **Léa**.

Un grand merci également à **Aline, Cécile** et **Chiara** pour les moments partagés durant mon master. Sans votre soutien et votre motivation contagieuse, je n'aurais probablement pas eu autant de réussite et ni poursuivi cette aventure jusqu'à la thèse.

Je souhaite adresser un immense merci à mes anciens collègues du CRBS **Benji, Rana** et **Céleste**. Que ce soit au laboratoire, autour d'un délicieux plat libanais ou d'un verre de vin argentin, votre présence a toujours été source de plaisir et de réconfort. Je vous suis également profondément reconnaissant pour votre soutien indéfectible durant tous les moments de cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon ami **Fabien**. Nos pauses café et nos dégustations de tout genre ont été des moments appréciés et j'espère qu'il y en aura encore beaucoup d'autres.

Merci également à vous, **Tancrède, Hugo** et **Ophélie**, pour ces moments de détente à Obernai et Klingenthal. Merci pour ces initiations à l'apiculture, au vélo et au couscous.

Merci également à **Chloé** et **Libert**. Vos passages en Alsace et les moments passés ensemble dans les Pyrénées et les Alpes ont été des parenthèses fort sympathiques.

Je tiens à remercier également mes amis de longue date **Pierre, Geoffroy, Jeremy, Améline, Mathieu, Xavier, Nicolas, Micka** et **Valentin**, pour tous ces moments partagés, ainsi que pour nos soirées mémorables à base de tarot, de barbecue et de babyfoot.

Je remercie chaleureusement ma famille pour leur soutien tout au long de cette thèse. Merci à mes parents, pour leurs encouragements constants, leur bienveillance et leur gastronomie. Merci à mes frères et sœurs, pour leur écoute attentive et nos moments de complicité. Un merci tout particulier à **Clément** pour les instants partagés à Pescara, et à **Benoît**, avec lequel j'ai passé beaucoup trop de temps ces trois dernières années à Strasbourg. Merci également à **Odile** pour ses conseils avisés et ton accueil à Nantes, et à **Thérèse** pour ta présence discrète et son aide aux moments opportuns.

« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements »

Charles Darwin (1809-1882)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
SOMMAIRE	VII
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XV
PREAMBULE.....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	5
I. LA MEGACARYOPOÏÈSE	7
A. <i>De la cellule souche hématopoïétique aux plaquettes sanguines</i>	8
1. Les cellules souches hématopoïétiques.....	8
a. Définition et terminologie.....	8
b. Propriétés des cellules souches hématopoïétiques.....	8
c. Phénotypes des cellules souches hématopoïétiques	9
2. Les progéniteurs hématopoïétiques	12
a. La mégacaryopoïèse « classique »	12
b. Les voies alternatives de la mégacaryopoïèse	14
3. Les précurseurs de mégacaryocytes	15
a. La polyploïdisation	15
b. Formation du système de membranes de démarcation	17
c. Caractérisation des précurseurs de mégacaryocytes	19
4. La thrombopoïèse	20
5. Les plaquettes sanguines	22
B. <i>La mégacaryopoïèse, un processus finement régulé</i>	24
1. Les niches hématopoïétiques	24
a. Niche ostéoblastique	24
b. Niche vasculaire	25

c. La niche mégacaryocytaire	25
2. Les cytokines promotrices de la mégacaryopoïèse	27
3. Les facteurs de transcriptions régulant la mégacaryopoïèse	29
II. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE IKAROS.....	33
A. Généralités.....	33
1. Découverte et origine phylogénétique	33
2. Structures protéiques des IKZFs.....	37
B. Mécanismes de régulation transcriptionnelle par les IKZFs.....	40
C. Fonctions des IKZFs dans la mégacaryopoïèse	42
1. IKAROS (IKZF1)	43
2. PEGASUS (IKZF5)	44
3. HELIOS (IKZF2)	45
OBJECTIFS DE THESE.....	47
RESULTATS.....	51
EXPERIMENTAUX	51
INTRODUCTION	53
MATERIELS ET METHODS	55
RESULTATS	63
DISCUSSION.....	92
DISCUSSION GENERALE	98
ANNEXES.....	105
BIBLIOGRAPHIE	109

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Evolution de la notion de cellule souche hématopoïétique	10
Figure 2 : Représentation schématique de la vision classique de l'hématopoïèse.....	13
Figure 3 : Représentation schématique des voies alternatives de la mégacaryopoïèse.....	15
Figure 4 : Principe de l'endomitose.	16
Figure 5 : Formation du système de membrane de démarcation.....	18
Figure 6 : Représentation des différents stades de maturation du mégacaryocyte in situ.	20
Figure 7 : La libération des plaquettes.....	21
Figure 8 : Les plaquettes sanguines.	23
Figure 9 : Les niches hématopoïétiques	26
Figure 10 : Régulation de la mégacaryopoïèse par les cytokines.	28
Figure 11 : Régulation de la mégacaryopoïèse par ses principaux facteurs de transcription.....	32
Figure 12 : Représentation des transcrits et des protéines IKZF1-5 humaines.....	34
Figure 13 : Représentation schématique des protéines IKZF1-5 humaines avec leurs motifs.....	36
Figure 14 : Mécanismes d'action des protéines IKZF1-5 humaines.	38
Figure 15 : Représentation schématique des différents isoformes d'HELIOS.....	39
Figure 16 : Représentation schématique de la répression génique par l'intermédiaire du NuRD. ..	40
Figure 17 : Figure 16 : Représentation schématique de l'activation génique par le SWI/SNF.....	41
Figure 18 : Représentation de l'expression des IKZF1-5 humaines pendant la mégacaryopoïèse. ..	42
Figure 19 : Conséquences de l'absence d'HELIOS sur l'engagement dans la voie érythro-mégacaryocytaires.....	66
Figure 20 : Effets de la dégradation d'HELIOS les progéniteurs hématopoïétiques.....	69
Figure 21 : Conséquences de la dégradation d'HELIOS sur l'engagement dans la lignée mégacaryocytaires et la maturation des mégacaryocytes.	73

Figure 22 : Effets de la dégradation d'HELIOS sur la maturation des mégacaryocytes et sa régulation transcriptionnelle.....	76
Figure 23 : Effets de l'absence d'HELIOS sur la maturation des mégacaryocytes murins <i>in vitro</i>	79
Figure 24 : Analyse des paramètres sanguins des souris <i>ikzf2</i> KO.	82
Figure 25 : Conséquences de l'absence d'HELIOS sur la maturation des mégacaryocytes dans la moelle osseuse des souris.....	87
Figure 26 : Effets de l'absence d'HELIOS sur la physiologie plaquettaire.....	90

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gènes et protéines IKZF1-5 humaines.	33
Tableau 2 : Différents isoformes des IKZF1-5 mis en évidence expérimentalement et prédits.....	39
Tableau 3 : Anticorps utilisés en cytométrie en flux.....	57
Tableau 4 : Anticorps utilisés en immunofluorescence.....	58
Tableau 5 : Couples d'amorces utilisées en RT-qPCR.	59

LISTE DES ABREVIATIONS

7-AAD	7-Aminoactinomycine D
ACD	<i>Acid citrate dextrose</i>
ADP	Adénosine diphosphate
AGM	Région aorte-gonades-mésonephros
AHR	<i>Aryl-Hydrocarbon Receptor</i>
AML	<i>Acute Myeloid Leukemia</i>
ATAC-seq	<i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing</i>
BFU-MK	<i>Burst-Forming Unit-Megakaryocyte</i>
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>
CD	Cluster de différenciation
CFU-MK	<i>Colony-Forming Unit-Megakaryocyte</i>
ChIP-seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>
c-Kit	Tyrosine-protein kinase Kit
CLP	Progéniteurs lymphoïdes communs
CMP	Progéniteurs myéloïdes communs
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSPH	Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DBD	Domaines de liaison à l'ADN
DD	Domaine de dimérisation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMS	Système de membranes de démarcation
DMSO	diméthylsulfoxyde
DN	Dominant négatif
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
EPO	Erythropoïétine

FF	Foie foetal
FLI-1	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>
FlnA	Filamine A
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FOG1	<i>Friend of GATA-1</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FT	Facteurs de transcription
GMP	Progéniteurs granulomacrophagiques
GP	Glycoprotéines
Hb	Hunchback
HDAC	Histone désacétylase
HIF-1α	<i>Hypoxia Inducible Factor-1α</i>
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen – DR isotype</i>
HPCA-1	<i>Human progenitor cell antigen-1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IKZFs	Facteurs de transcription de la famille IKAROS
IL	Interleukine
IMID	Médicament immuno-modulateur
INO80	INOsitol requiring 80
ISWI	Imitation SWItch
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
Lin-	Linéage négatif
MAPK/ERK	<i>Mitogen-activated protein kinases/Extracellular signal-regulated kinases</i>
MEP	Progéniteurs mégacaryocytaires-érythroïdes
miRNA	Micro ARN
MK	Mégacaryocytes
MKP	Mégacaryopoïèse
MLP	<i>Multi-lymphoid progenitor</i>
MPP	Progéniteurs multipotents
NF-E2	<i>Nuclear factor erythroid 2</i>
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK	<i>Natural killer</i>

NuRD	Complexe de remodelage des nucléosomes et de désacétylation des histones
PACSN2	<i>Protein kinase C and casein kinase II substrate 2</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PF4	Facteur 4 des plaquettes
PFA	Paraformaldéhyde
PGK	Phosphoglycérate kinase-néomycine
PH	Progéniteur hématopoïétique
PI3K/AKT	Phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway
PI-4,5-P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PRP	Plasma riche en plaquettes
PSG	Pénicilline-streptomycine-glutamine
PZ	Zone périphérique
RhoA	<i>Ras hommolog family member</i>
RNAseq	RNA Sequencing
RPB	RNA Polymerase B
RT-qPCR	PCR quantitative après transcription inverse
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
Sp-Pa	Splanchnopleure para-aortique
SR1	Stemregenin
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
SWI/SNF	SWItch/Sucrose non-fermentable
TBP	<i>TATA binding protein</i>
Tdt	désoxynucléotidyltransférase terminale
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factors</i>
TPO	Thrombopoïétine
Treg	T régulateurs
TUBB1	Tubuline β1
TUBBA	Tubuline α

TUBtyr	Tubuline α tyrosiné
TxA2	Thromboxane A2
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF	Facteur de von Willebrand
WASP	<i>Wiskott–Aldrich syndrome protein</i>
WAVE	<i>Verprolin-homologous protein</i>
ZF	Doigts de zinc

PREAMBULE

L'hématopoïèse :

L'hématopoïèse est le processus physiologique assurant le renouvellement de l'ensemble des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de manière continue et finement régulée par une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Chez l'adulte, l'hématopoïèse se déroule exclusivement dans la moelle osseuse. Il est aujourd'hui établi que les CSH donnent naissance à toutes les lignées sanguines au cours d'un processus de différenciation qui s'accompagne d'une perte graduelle de leur multipotentialité et de leur capacité d'auto-renouvellement. Les CSH se différencient d'abord en progéniteurs multipotents (MPP) qui se divisent ensuite en deux lignées principales : les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et les progéniteurs myéloïdes communs (CMP). Les CLP se différencient en lymphocytes B, lymphocytes T et cellules NK (*Natural Killer*), chacun jouant un rôle clé dans l'immunité. Les CMP, quant à eux, donnent naissance aux progéniteurs granulomacrophagiques (GMP) et mégacaryocytaires-érythroïdes (MEP). Alors que les GMP donnent naissance aux granulocytes et monocytes, les MEP produisent les érythroblastes, précurseurs médullaires des globules rouges, et les mégacaryocytes, précurseurs médullaires des plaquettes (Seita and Weissman, 2010).

Mégacaryopoïèse et maturation des mégacaryocytes :

Les plaquettes sont des fragments de cellules anucléés, issus de la mégacaryopoïèse (MKP) de leurs précurseurs médullaires, les mégacaryocytes, provenant des CSH. Les CSH sortent tout d'abord de leur état quiescent pour produire des progéniteurs hématopoïétiques (PH) hautement prolifératifs. Ces cellules s'engagent alors dans la voie mégacaryocytaire et entrent dans une phase de maturation. Cette phase passe par des processus d'endoréplifications, aboutissant à la formation de cellules polyploïdes (le noyau pouvant atteindre $128N$) et à la formation d'un réseau intracellulaire membranaire complexe appelé système de membranes de démarcation (DMS) (van der Meijden and Heemskerk, 2019). Cette maturation s'accompagne de la formation des granules plaquettaires, les granules alpha (α) qui contiennent essentiellement des protéines (facteurs de coagulation, facteurs de croissance et protéines adhésives) et les granules denses (δ) qui renferment des molécules essentielles à la fonction plaquettaire (Ca^{2+} , ADP, sérotonine) (Cazenave, 2013). Durant

cette phase de différenciation, des glycoprotéines (GP) spécifiques des plaquettes (intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, complexe GPIb-V-IX) et nécessaires à leurs fonctions, sont également exprimées. Aux derniers stades de maturation, le mégacaryocyte entre en contact avec les vaisseaux sinusoides de la moelle osseuse et projette des portions cytoplasmiques dans la lumière vasculaire, qui sont alors fragmentées dans la circulation sous la contrainte des forces hémodynamiques et résultant en plaquettes sanguines. Il est à noter qu'un mégacaryocyte semble pourvoir libérer 2000 à 10 000 plaquettes *in vivo* (Kaushansky, 2008).

Les plaquettes :

Les plaquettes sanguines sont de petits fragments cellulaires anucléés, de 2 à 3 μm de diamètre pour 1 μm d'épaisseur. Sous forme discoïde au repos, elles circulent dans le sang pendant 7 à 10 jours, à une concentration physiologique de 150 à 400 $\times 10^3$ plaquettes/ μL (Boscher et al., 2020). Les plaquettes jouent un rôle clé dans l'hémostase, c'est-à-dire l'arrêt des saignements à la suite d'une lésion vasculaire, afin de maintenir l'intégrité vasculaire. L'hémostase a lieu en plusieurs étapes successives. Tout d'abord, lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes adhèrent aux protéines du sous-endothélium exposé. Les plaquettes sont ensuite activées, ce qui entraîne le relargage d'agonistes solubles comme l'ADP ou le thromboxane A2 (TxA2), permettant l'amplification de l'activation et le recrutement des plaquettes environnantes. Ceci permet alors l'agrégation des plaquettes entre elles par la liaison du fibrinogène à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ces étapes permettent de former un clou hémostatique pour colmater la brèche vasculaire et stopper les saignements (van der Meijden and Heemskerk, 2019). Les plaquettes possèdent également d'autres fonctions dites non-hémostatiques physiologiques ou pathologiques. Elles contribuent par exemple à l'immunité innée et adaptative par le relargage de cytokines pro-inflammatoires et par leur capacité à interagir fonctionnellement avec l'endothélium activé et les leucocytes via le complexe GPIb-V-IX, le cluster de différenciation (CD)40L et la P-sélectine (Scherlinger et al., 2023). En outre, elles participent à la dispersion des métastase cancéreuses, à l'apparition d'un œdème pulmonaire post-transfusionnel et au développement embryonnaire (El Mdawar et al., 2021; Garcia-Leon et al., 2024; Sato et al., 2005).

HELIOS, un régulateur de la mégacaryopoïèse :

La MKP est régulée par des facteurs extrinsèques (cytokines, environnement cellulaires) et des facteurs intrinsèques comprenant des protéines appelées facteurs de transcription (FT) qui en se

liant à des séquences régulatrices (promoters, enhancers) de gènes, contrôlent leurs expressions. L'engagement de la CSH dans la voie mégacaryocytaire est régulée par les FT RUNX1, FLI-1 et GATA2, tandis que la maturation des mégacaryocytes est favorisée par l'interaction de GATA1 avec FOG1, et la libération des plaquettes contrôlée par NFE-2 (Lentaigne et al., 2016). Une nouvelle famille de FT a été récemment impliquée dans la MKP, la famille IKAROS. Il s'agit d'une famille de protéine composée de cinq membres : IKAROS, HELIOS, AIOLOS, EOS et PEGASUS. Plusieurs études ont montré que l'absence du gène *IKAROS* favorise l'engagement des CSH dans la lignée mégacaryocytaire (Dumortier et al., 2003; Yoshida et al., 2006). L'absence d'un autre membre de la famille de FT d'IKAROS, PEGASUS, a été mis en évidence dernièrement comme étant responsable d'une thrombopénie constitutionnelle se traduisant par une numération plaquettaire réduite ($50-100 \times 10^3$ plaquettes/ μL) et des saignements spontanés (Lentaigne et al., 2019). Enfin, une étude a récemment révélé qu'HELIOS réprime l'entrée des CSH dans la MKP. En effet, l'absence d'HELIOS se traduit par une augmentation significative d'une population de PH classiquement décrite comme donnant naissance aux mégacaryocytes, les progéniteurs multipotents de type 2 (appelés MPP2). D'un point de vue fonctionnel, des analyses de génomique ont montré qu'HELIOS empêche l'accès de GATA2 et RUNX1, deux FT clés pour l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire en occupant les promoteurs des gènes cibles qu'ils reconnaissent (Cova et al., 2021).

Contexte de la thèse :

Le but de cette thèse a été de décrypter les fonctions d'HELIOS dans la MKP humaine. Nous avons analysé les fonctions d'HELIOS sur la différenciation des CSH, ainsi que son rôle dans la maturation des mégacaryocytes et son impact sur la production de plaquettes. Pour cela, nous avons caractérisé l'effet de la dégradation d'HELIOS sur chacune des étapes de la MKP dans les CSH humaines, en analysant les changements phénotypiques, transcriptionnels et fonctionnels associés à la perte de ce FT. Enfin, nous avons eu accès en fin de thèse aux souris déficientes pour le gène *ikzf2* utilisées par Cova et ses collaborateurs. Nous avons initié l'étude de la MKP sur ces souris et avons commencé à déterminer l'impact de l'absence d'HELIOS sur le nombre et la fonction des progéniteurs mégacaryocytaires. Ces études ont inclus l'évaluation de la différenciation, et de la maturation des mégacaryocytes, ainsi que l'analyse des altérations potentielles du microenvironnement de la moelle osseuse.

INTRODUCTION GENERALE

I. La mégacaryopoïèse

La MKP débute dans le compartiment des CSH et se poursuit à travers les compartiments des progéniteurs et des précurseurs mégacaryocytaires. Selon le modèle classique de différenciation hématopoïétique par étapes, la division asymétrique des CSH génère des progéniteurs multipotents (MPP) qui, au fur et à mesure qu'ils perdent leur capacité d'auto-renouvellement et leur multipotence, évoluent en progéniteurs mégacaryocytaires/érythroïdes (MEP) bipotents. Ces MEP se différencient ensuite en progéniteurs mégacaryocytaires unipotents, puis en précurseurs mégacaryocytaires. Ce processus de MKP est régulé par des facteurs extrinsèques, tels que les cytokines (IL-3, IL-6, IL-10, TPO, TGF- β), des microparticules et l'environnement cellulaire (cellules stromales, rigidité de la matrice, ostéoclastes), mais aussi par des facteurs intrinsèques, notamment des FT comme RUNX1, FLI-1, et IKAROS et des micro-RNA (miRNA) (Boscher et al., 2020; Calvanese and Mikkola, 2023).

Dans ce chapitre, je présente de façon approfondie la MKP. Je débute par une description en détail la MKP chez l'adulte puis des mécanismes moléculaires et cellulaires qui orchestrent la différenciation des CSH en mégacaryocytes.

A. De la cellule souche hématopoïétique aux plaquettes sanguines

Il est possible de subdiviser le processus aboutissant à la formation des plaquettes en trois compartiments cellulaires distincts. Le premier compartiment est celui des **CSH**, qui possèdent des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation. Puis, en réponse à des signaux intrinsèques et extrinsèques, les CSH s'engagent dans le compartiment des **PH** et commencent à se spécialiser vers la lignée mégacaryocytaire. Enfin, au fil des divisions cellulaires, la potentialité des progéniteurs mégacaryocytaires diminue et ils mûrissent pour donner naissance aux précurseurs des plaquettes, les **mégacaryocytes**.

1. Les cellules souches hématopoïétiques

a. Définition et terminologie

Le concept de cellules souches a été établi à la fin du XVIII^{ème} siècle pour décrire un organisme unicellulaire à partir duquel des organismes multicellulaires se développent (Haeckel, 1877) (**Figure 1A**). L'existence de la CSH est démontrée pour la première fois par les expériences de Till et McCulloch (1961). Les CSH ont été mises en évidence après injection de cellules de moelle osseuse syngénique à des souris létalement irradiées. La survie de ces souris greffées et l'observation de masses de cellules myélo-érythrocytaires nouvellement formées dans la rate des souris ont permis de mettre en évidence la présence d'une cellule capable de reconstituer la moelle osseuse, la CSH. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Nature* en 1963 introduisant les propriétés majeures de la CSH : l'auto-renouvellement et la différenciation en l'ensemble des cellules sanguines (Becker et al., 1963) (**Figure 1B**).

b. Propriétés des cellules souches hématopoïétiques

Les CSH possèdent plusieurs propriétés fondamentales qui les distinguent des autres cellules (progéniteurs, précurseurs et cellules matures). Elles sont tout d'abord douées d'auto-renouvellement. En effet, les CSH ont la capacité de se diviser et de se reproduire de manière infinie pour maintenir une réserve constante de cellules souches tout au long de la vie de l'individu. Elles sont également dites multipotentes car elles peuvent se différencier en tous les types de cellules sanguines matures : globules rouges, leucocytes (lymphocytes, granulocytes et monocytes) et plaquettes. Les CSH ne représentent qu'un nombre très faible des cellules mononuclées de la moelle osseuse, compris entre 1 et 4×10^5 cellules chez l'Homme. Il est estimé qu'environ 150 CSH sont

mobilisées quotidiennement pour assurer de manière régulière et continue le renouvellement des cellules sanguines (Abkowitz et al., 2002). Enfin, les CSH sont également capables de sortir du cycle cellulaire et d'entrer dans un état de quiescence, ce qui leur permet de survivre sur le long terme (**Figure 1B**) (Lendahl, 2022). Deux sous-types de CSH peuvent être distingués selon leur capacité d'auto-renouvellement et de multipotence : les CSH dites *long term* (CSH-LT) et *short term* (CSH-ST). Ces notions ont été mises en évidence par des expériences de transplantations successives d'un animal à un hôte préalablement irradié, ce qui a permis de déterminer que la CSH-LT est capable de régénérer le système hématopoïétique d'un individu à long terme (>3 mois) lors de transplantations successives, tandis que les CSH-ST ne sont capables de ne le régénérer que de façon transitoire (<3 mois) lors d'une transplantation unique (Benveniste et al., 2010; Szilvassy et al., 1990).

c. *Phénotypes des cellules souches hématopoïétiques*

Chez la souris, les CSH peuvent être identifiées grâce à l'absence de plusieurs marqueurs de surface spécifiques : CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD11b, Ter119 et CD41, un profil connu sous le nom de "Lineage négatif" (Lin-). Cet ensemble de marqueurs permet de différencier les CSH des cellules déjà engagées dans une des lignées hématopoïétiques. Leur caractérisation s'est ensuite enrichie grâce à l'utilisation de marqueurs identifiés lors d'expériences de reconstitution de l'hématopoïèse dans des souris irradiées, comme l'antigène thymocytaire CD90, un marqueur clé des cellules souches pluripotentes, l'antigène-1 des cellules souches murines Sca1, et c-kit/CD117, un marqueur impliqué dans la prolifération cellulaire (Gao et al., 2023). Bien que les CSH définies comme Lin- Sca1+ CD90+/- cKit+ représentent une population hétérogène, la distinction entre les CSH-LT, les CSH-ST et les MPP est possible grâce à l'expression de CD150, également appelé SLAMf1 (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule Family Member 1*) (Kiel et al., 2005; Oguro et al., 2013). Ainsi, la cellule souche murine est aujourd'hui définie par le phénotype Lin- Thy1.1^{low} cKit+ Sca1+ flk2- CD34- SLAMf1+ (Bryder et al., 2006)."

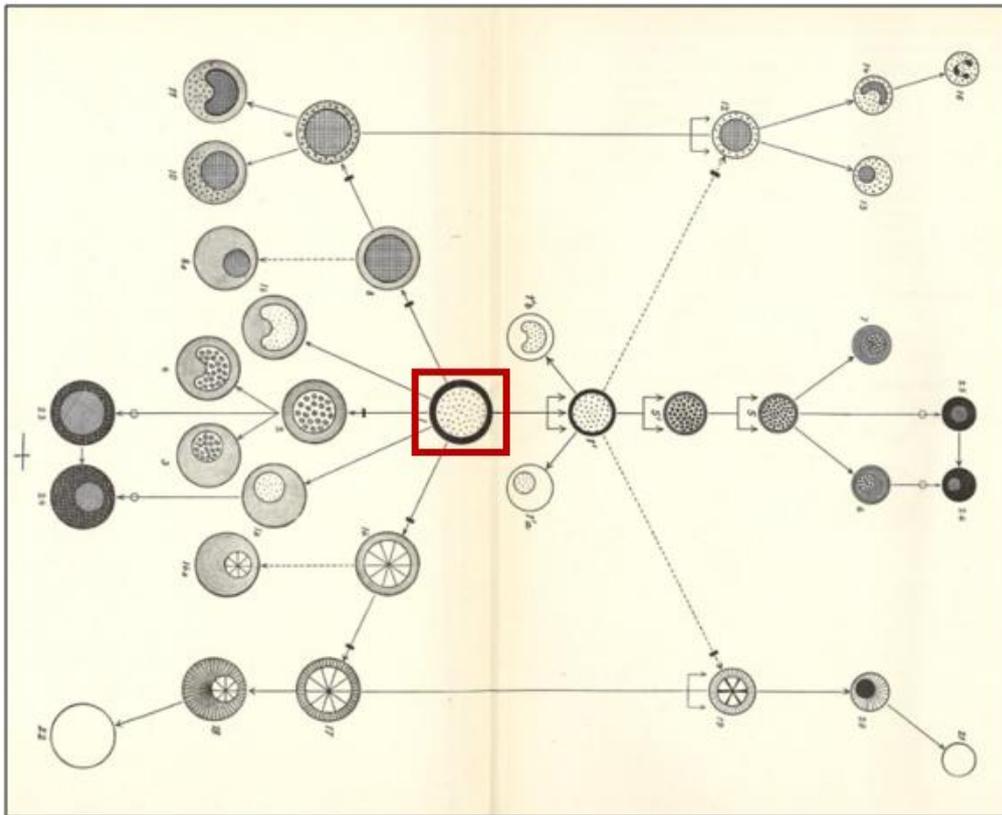
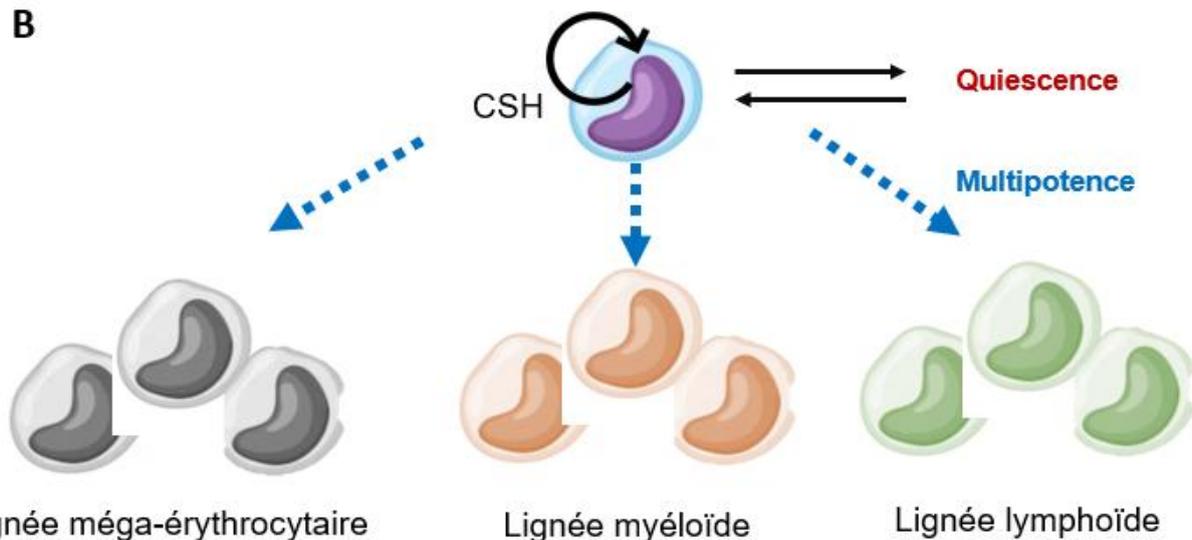
A**B**

Figure 1 : Evolution de la notion de cellule souche hématopoïétique

(A) Premier schéma, élaboré par *Pappenheim (1905)* de la hiérarchie entre les différents éléments du sang. La CSH au centre donne naissance à l'ensemble des différentes lignées hématopoïétiques connues à son époque. **(B)** Représentation schématique de la vision moderne de l'hématopoïèse. La CSH donne naissance aux trois grandes lignées hématopoïétiques : myéloïde, lymphoïde et méga-érythrocytaire. CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques.

Chez l'Homme, l'identification des CSH est moins précise, principalement en raison du manque de marqueurs phénotypiques suffisamment spécifiques. Les CSH humaines sont phénotypiquement définies par le profil Lin⁻ CD34⁺ CD38⁻ CD90^{low} CD45RA^{low} (Notta et al., 2016). Les CSH sont largement caractérisées par la présence du marqueur CD34, une glycophosphoprotéine exprimée par tous les PH (Civin et al., 1984). Le CD34 joue un rôle dans l'adhésion cellule-cellule au sein de la niche ostéoblastique via son interaction avec la L-sélectine. Bien que la fonction exacte du CD34 reste peu documentée, il est supposé être impliqué dans le *homing* des CSH, un processus où les CSH transplantées migrent et s'installent dans la moelle osseuse du receveur. Les CSH se caractérisent également par l'absence de CD38, une exoenzyme impliquée dans la formation et l'hydrolyse de l'ADP-ribose cyclique (cADPR), un messenger régulant la mobilisation des ions Ca²⁺ intracellulaires. En effet, l'absence de CD38 est corrélée à une capacité proliférative prolongée des cellules CD34⁺. Ainsi, les cellules CD34⁺ CD38⁻ prolifèrent jusqu'à 60 jours *in vitro*, contre seulement 40 jours pour les cellules CD34⁺ CD38⁺ (Hao et al., 1995). Enfin, une identification plus fine des CSH est obtenue en combinant le marqueur CD34 avec d'autres marqueurs comme CD133⁺ (la prominine-1, un autre marqueur des cellules souches) et une expression faible des CD45RA (CD45RA^{low}), CD90 (CD90^{low}) et CD117 (CD117^{low}) (Gao et al., 2023).

Les CSH sous l'influence de facteurs intrinsèques et extrinsèques restreignent en plusieurs étapes successives leur potentiel hématopoïétique jusqu'à une cellule au potentiel uniquement mégacaryocytaire : le progéniteur de mégacaryocytes. Au cours de ce processus, les CSH passent par différents stades de PH distincts.

2. Les progéniteurs hématopoïétiques

a. La mégacaryopoïèse « classique »

Dans la hiérarchie hématopoïétique, directement en aval des CSH se trouvent les MPP. Chez la souris, il en existe quatre sous-populations : MPP1 à MPP4. Les MPP2 (Lin- Sca-1+ c-Kit+ Flt3- CD48+ CD150+) ont été décrites comme étant plus orientées vers la lignée érythro-mégacaryocytaire et être les seules MPP capables de produire des plaquettes dans un modèle de transplantation (Pietras et al., 2015). Quant aux MPP3 (Lin- Sca-1+ c-Kit+ Flt3- CD48+ CD150-), elles produisent principalement des cellules de la lignée myéloïde, tandis que les MPP4 (Lin- Sca-1+ c-Kit+ Flt3+ CD48+ CD150-) sont biaisées vers la lignée lymphoïde (Challen et al., 2021). Chez l'Homme, cette distinction n'est pas encore possible, puisqu'aucune sous-population de MPP n'a été identifiée (Lin- CD34+ CD38- CD45RA- CD49f+ CD90+) (Laurenti and Göttgens, 2018).

Les MPP sont dotées d'un fort potentiel prolifératif et donnent naissance soit à la lignée myéloïde (CMP : Lin- cKit+ Sca1-/low CD34+ FcgRlow), soit à la lignée lymphoïdes (CLP ; Lin- Flk2+ IL7Ra+ CD27+) à l'origine des cellules dendritiques, lymphocytes T et B, ainsi qu'aux cellules lymphoïdes innées (ILC). Les CMP se différencient ensuite en progéniteurs granulocytes-macrophages (GMP ; Lin- cKit+ Sca1- CD34+ FcgR+) et en progéniteurs mégacaryocytaires-érythroïdes (MEP ; Lin- cKit+ Sca1- CD34- FcgR-) qui peut avoir un destin érythrocytaire ou mégacaryocytaire (Seita and Weissman, 2010) (**Figure 2**). Une signature du MEP a été proposée chez l'Homme : Lin- CD34+ CD38^{mid} CD45RA- FLT3- MPL+ CD36- CD41- par Sanada et al., 2016.

Lorsque le MEP s'engage dans la voie mégacaryocytaire, il produit deux types de progéniteurs spécialisés : les BFU-MK (*Burst-Forming Unit-Megakaryocyte*) et les CFU-MK (*Colony-Forming Unit-Megakaryocyte*). Les BFU-MK sont des cellules diploïdes formant *in vitro* des colonies de forme irrégulière apparaissant après 21 jours de culture clonogénique. Les CFU-MK forment de petites colonies visibles après 12 jours de culture. Outre leur identification morphologique lors des tests clonogéniques, ces progéniteurs se distinguent également par leur phénotype : les deux types sont positifs pour le marqueur CD3, tandis que le CFU-MK exprime également l'antigène HPCA-1 (*human progenitor cell antigen-1*) des cellules progénitrices humaines et le locus HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen – DR isotype*) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Briddell et al., 1989; Nakorn et al., 2003).

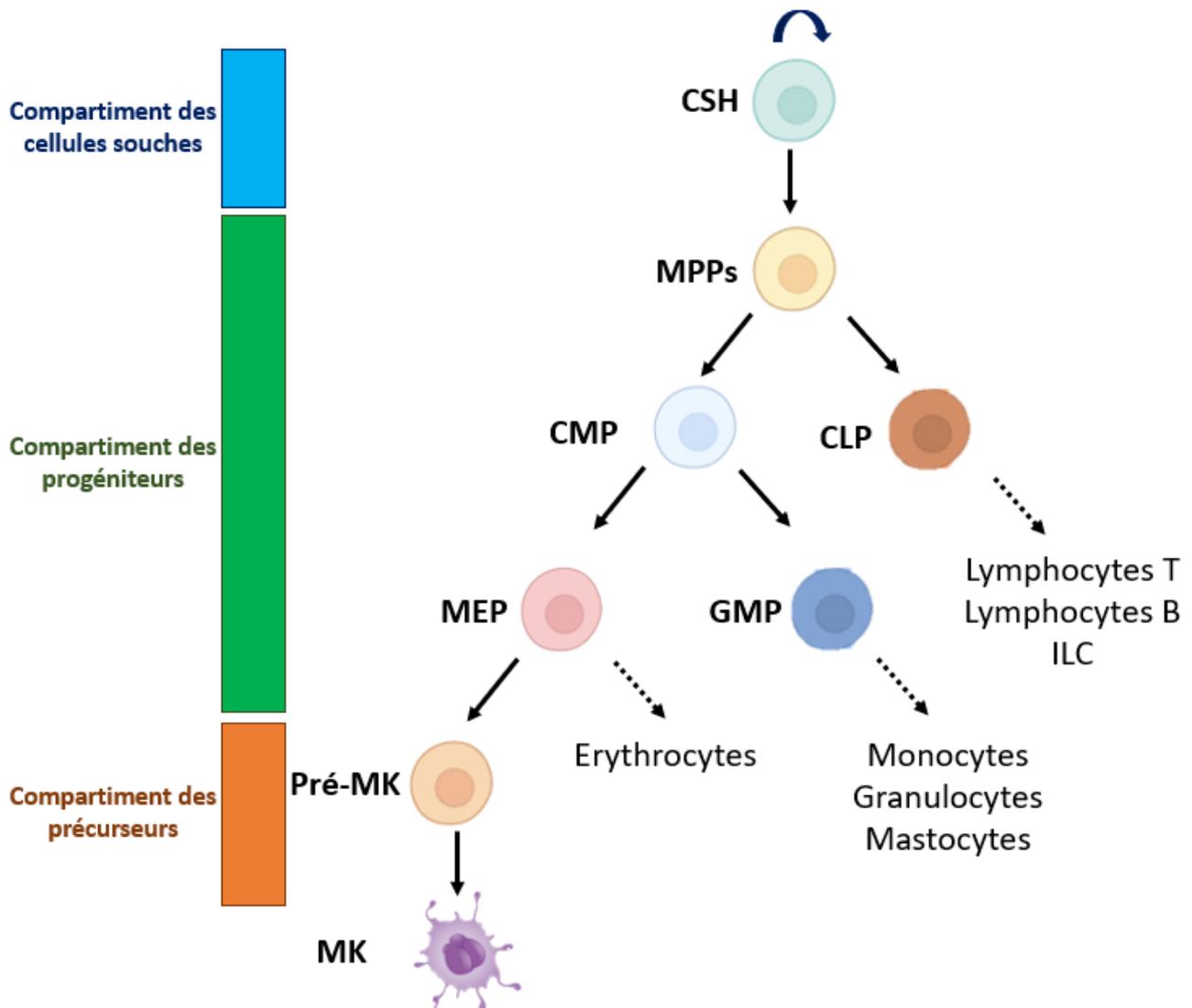


Figure 2 : Représentation schématique de la vision classique de l'hématopoïèse.

Chez l'adulte, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse où les CSH donnent naissance aux MPP, qui se différencient ensuite en CMP, progéniteurs de la lignée myéloïde et CLP, progéniteurs de la lignée lymphoïde. Les CMP donnent naissance GMP et MEP. Les MEP produisent les érythroblastes, précurseurs médullaires des érythrocytes, et les pré-MK responsables des mégacaryocytes et des plaquettes. CLP Progéniteurs Lymphoïdes Communs, CMP: Progéniteurs Myéloïdes Communs, CSH : Cellules souches Hématopoïétiques, GMP : Progéniteurs Granulomacrophagiques, ILC : Cellules Lymphoïdes Innées, MEP Progéniteurs Mégacaryocytaires-Erythroïdes, MPP : Progéniteurs Multipotents, pré-MK : précurseurs de mégacaryocytes.

b. Les voies alternatives de la mégacaryopoïèse

Ces dernières années, des recherches sur des modèles murins et humains ont remis en question le modèle classique de différenciation des mégacaryocytes. En utilisant des approches de séquençage des transcrits à l'échelle de la cellule unique (*single cell*), associées à des analyses phénotypiques, des tests clonogéniques et des greffes dans des modèles murins, ces études ont révélé l'existence de voies alternatives de la MKP (Gao et al., 2023) **(Figure 3)**.

En effet, des populations de CSH et de MPP avec un biais de différenciation vers la voie mégacaryocytaire ont été identifiées chez la souris. Ces cellules sont capables de produire directement des mégacaryocytes sans passer par les stades CMP et MEP (Nishikii et al., 2015; Nishikii et al., 2017). Il a été démontré qu'une population de cellules regroupant les CSH et les MPP produit un progéniteur unipotent permettant la production d'un grand nombre de mégacaryocytes (Pietras et al., 2015; Rodriguez-Fraticelli et al., 2018). Une autre équipe a mis en évidence l'existence d'une sous population de CSH (Lin- c-kit + CD150+ CD48- CD41+) capable de sortir de quiescence en cas d'inflammation pour produire directement des mégacaryocytes. Il s'agirait d'un moyen pour l'organisme de permettre une production de plaquettes plus rapide dans un contexte pathologique (Haas et al., 2015). Enfin, des CSH biaisées vers la voie mégacaryocytaire dans un contexte non-inflammatoire ont été décrites. Ces cellules peuvent être distinguées par l'expression du vWF ainsi que par des niveaux élevés de c-kit et dépendent de la signalisation médiée par la thrombopoïétine (TPO) (Nakamura-Ishizu et al., 2018; Shin et al., 2014; Tsutsumi et al., 2023).

Les progéniteurs de mégacaryocytes prolifèrent sous l'action de facteurs de croissance comme l'interleukine (IL)-3, la TPO et le *stem cell factor* (SCF) **(détaillé en I. B. 1.)**. Ils perdent de façon progressive leur potentiel de prolifération au profit de leur capacité de maturation, ce qui leur permet d'entrer de façon définitive dans le compartiment des précurseurs de mégacaryocytes.

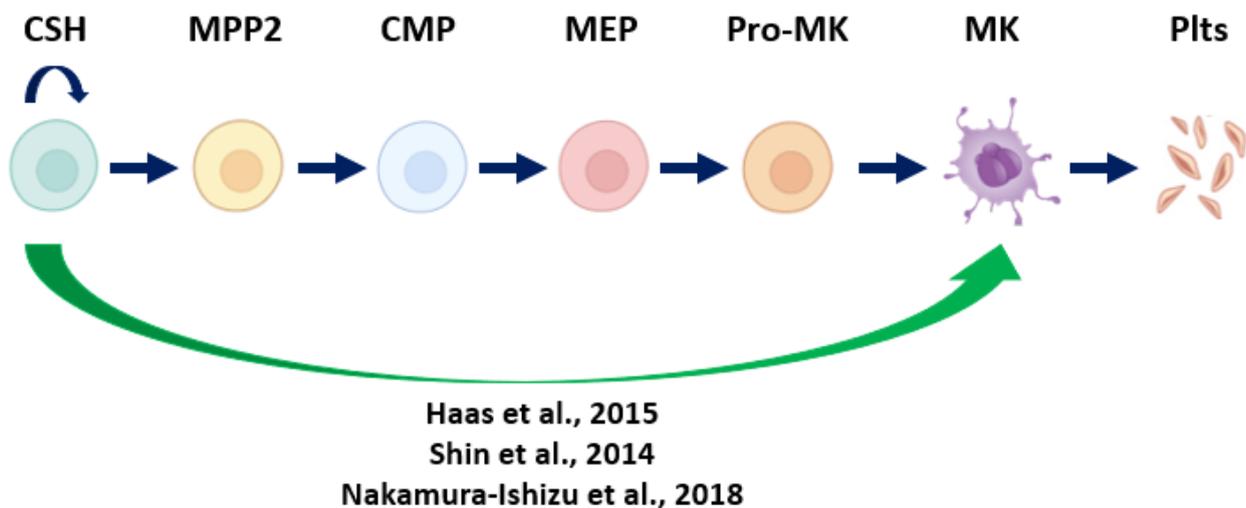


Figure 3 : Représentation schématique des voies alternatives de la mégacaryopoïèse.

CMP: Progéniteurs Myéloïdes Communs, CSH : Cellules souches Hématopoïétiques, Pro-MK : Progéniteurs Mégacaryocytaires, MEP : Progéniteurs Mégacaryocytaires-Erythroïdes, MK : Mégacaryocytes, MPP2: Progéniteurs Multipotents de type 2, Plts : Plaquettes.

3. Les précurseurs de mégacaryocytes

La maturation des précurseurs de mégacaryocytes en mégacaryocytes comprend deux processus majeurs : la polyploïdisation et la formation du DMS.

a. La polyploïdisation

La polyploïdisation est une augmentation du nombre de jeux de chromosomes homologues contenus par les mégacaryocytes. Il a été proposé que la polyploïdisation des mégacaryocytes permettrait, à production d'ADN égale, d'obtenir un volume cytoplasmique plus important que lors de la mitose. Ce volume accru favoriserait ensuite une production plus efficace de plaquettes. (Mazzi et al., 2018).

La ploïdie peut varier de 2 à 64N, voire atteindre 128N. Ce processus unique n'est cependant pas exclusif aux mégacaryocytes, il se retrouve également dans d'autres types cellulaires, comme les cellules musculaires lisses et les embryons de drosophile (Vitrat et al., 1998; Zimmet et al., 1997). L'endomitose se caractérise par l'absence d'anaphase B, de télophase et de cytokinèse (**Figure 4**) (Lordier et al., 2008; Mazzi et al., 2018; Raslova et al., 2007). Ce processus se déroule en deux phases principales : la première implique l'augmentation du matériel génétique, tandis que la seconde inhibe la contraction de l'anneau contractile d'acto-myosine, empêchant ainsi la séparation des cellules filles.

L'échec de la cytokinèse est également lié à la réduction de l'expression de la myosine IIB (MYH10) dans l'anneau contractile. Les mégacaryocytes immatures expriment deux isoformes de myosine II non musculaires : la myosine IIA (MYH9) et la myosine IIB (MYH10) (Lordier et al., 2012; Vainchenker et al., 2021). Ce phénomène est régulé par le FT RUNX1 qui inhibe l'activation de la voie RhoA (*Ras Hommolog family member*), une GTPase associée à la régulation du cytosquelette au niveau du sillon de clivage. Dans cette zone, RhoA, présente à un faible niveau, n'est pas suffisamment activée pour induire l'accumulation de F-actine essentielle au recrutement de la myosine IIB. Par conséquent l'anneau contractile ne se forme pas, ce qui aboutit à un échec de la scission entre les cellules filles (Mazzi et al., 2018; Roy et al., 2016).

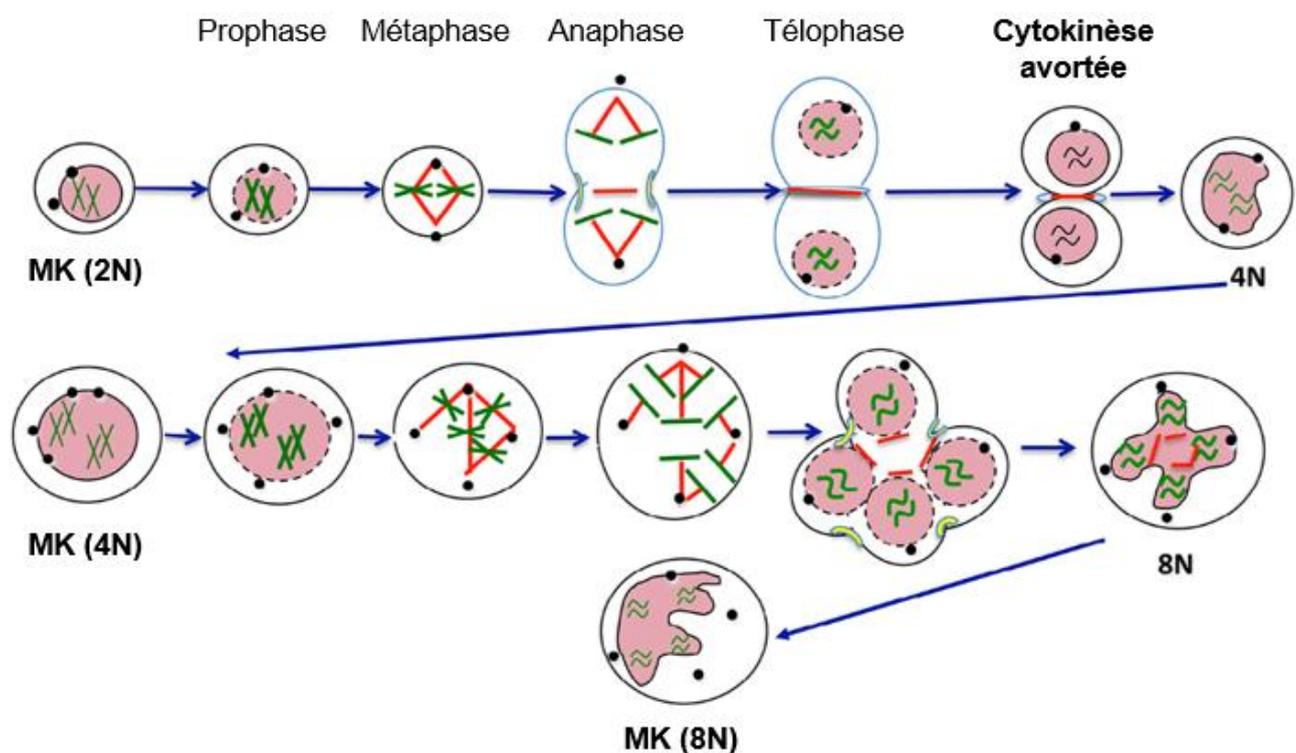


Figure 4 : Principe de l'endomitose.

L'endomitose, ou endoréplication, correspond à la multiplication du matériel génétique en l'absence de division cellulaire. Elle permet l'augmentation de la ploïdie des mégacaryocytes grâce à une suite de mitoses interrompues au moment de la séparation entre cellules mères et cellules filles. Adapté d'après Mazzi et al., 2018. MK : Mégacaryocytes, N : jeu complet de chromosome.

b. Formation du système de membranes de démarcation

Lorsque le mégacaryocyte mature, sa taille augmente parallèlement à un accroissement rapide de sa quantité de membrane plasmique, estimée à 26 fois en 72h chez le rat (Ebbe and Stohlman, 1965). Cette abondance de membrane cytoplasmique constitue le DMS, ainsi nommé car il divise le cytoplasme en petits territoires distincts. Des études de microscopie électronique ont révélé que ces membranes, en continuité avec l'extérieur et organisées en invaginations, forment un réseau hautement interconnecté, délimitant des îlots cytoplasmiques qui donnent naissance aux futures plaquettes (Behnke, 1968; Eckly et al., 2014). Le DMS se forme par des invaginations successives de la membrane plasmique et se développe grâce à l'apport de membranes provenant de l'appareil de Golgi et de lipides synthétisés par le réticulum endoplasmique (Schulze et al., 2006; Vainchenker et al., 2021). La régulation de la formation du DMS est encore peu étudiée, mais les protéines de la famille F-BAR semblent jouer un rôle clé, notamment en interagissant fortement avec le PI-4,5-P2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) (Frost et al., 2009). Ces mouvements membranaires seraient également dépendant de la polymérisation et dépolymérisation de la F-actine, régulées par la voie RhoA, en particulier le complexe protéique WASP-WAVE (*Wiskott-Aldrich syndrome protein - WASP-family verprolin-homologous protein*) (Schulze et al., 2006). De plus, l'invagination de la membrane plasmique serait en partie initiée par le complexe protéique PACSIN2 (*protein kinase C and casein kinase II substrate 2*) - Filamine A, une protéine liant l'actine, qui stabilise la structure tridimensionnelle des filaments d'actine et les ancre à la membrane plasmique par interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41/CD61) (Begonja et al., 2015; Donada et al., 2019). **(Figure 5)**.

L'importance du système DMS est mise en évidence dans certaines pathologies. Par exemple, la dilatation du DMS observée dans des maladies liées à la myosine, en particulier la chaîne lourde de myosine non musculaire IIA (MYH9), entraîne une thrombopénie et des plaquettes présentant une distribution anormale du nombre d'organites (Eckly et al., 2009). Le DMS est également anormalement structuré dans le syndrome de Bernard-Soulier, qui résulte d'un déficit d'expression du complexe GPIb-V-IX. Dans ce cas, les territoires cytoplasmiques sont plus étendus et le DMS apparaît dilaté, ce qui provoque une thrombopénie et la production de plaquettes de grande taille (Lentaigne et al., 2016; Strassel et al., 2009).

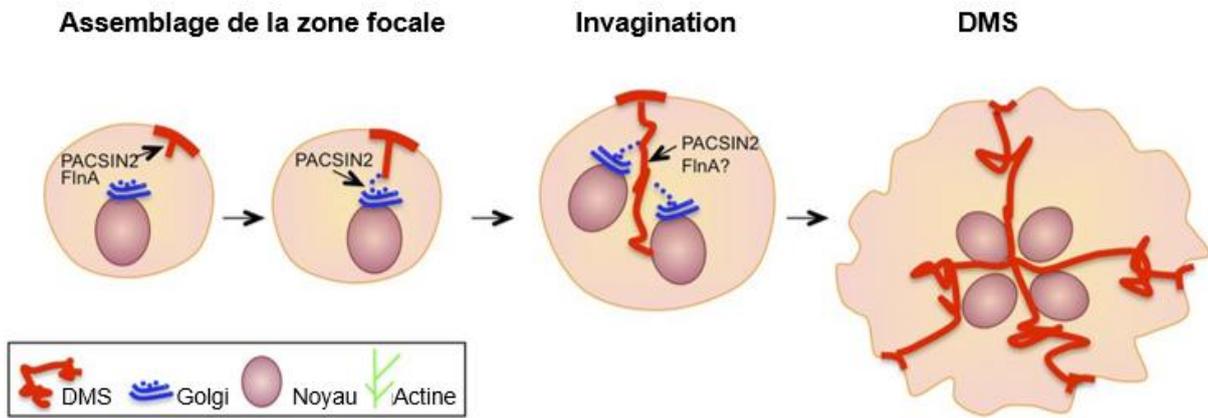


Figure 5 : Formation du système de membrane de démarcation.

La formation du DMS commence à la surface des cellules dans des zones focales. Elle se forme par le moyen d'un processus d'invagination de la membrane dans la région périnucléaire. Son expansion nécessite ensuite l'acheminement de vésicules originaires de l'appareil de Golgi en même temps que la ploïdie du mégacaryocyte augmente. Adapté d'après Chitu and Stanley, 2015. DMS : système de membrane de démarcation, FlnA : Filamine A, PACSIN2 : protein kinase C and casein kinase II substrate 2.

c. Caractérisation des précurseurs de mégacaryocytes

Les deux étapes de maturation importante des précurseurs de mégacaryocytes (polypléidisation et formation du DMS) permettent, entre autres, de classer les mégacaryocytes en trois stades distincts sur la base de critères morphologiques tels que la taille, l'aspect du noyau et du cytoplasme (**Figure 6**).

Au stade I, le précurseur de mégacaryocytes présente un diamètre de 10 à 15 μm et un cytoplasme relativement restreint, contenant les premiers éléments du DMS. Sa faible granularité indique une activité cellulaire encore limitée. Le noyau, généralement bilobé, occupe une proportion plus importante de la cellule par rapport au cytoplasme, visible en microscopie électronique à transmission (Eckly et al., 2012). À ce stade, le précurseur de mégacaryocyte commence à exprimer de manière accrue les marqueurs de surface CD41/CD61 (également appelés GPIIb-IIIa ou $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) et CD42 (GPIb-V-IX).

Au stade II, les mégacaryocytes atteignent un diamètre de 15 à 30 μm , avec une expansion notable du cytoplasme, qui devient densément granuleux. L'activité cellulaire s'accélère, entraînant la production des granules α et denses δ , ainsi que de protéines plaquettaires clés telles que le facteur 4 des plaquettes (PF4) et le vWF. À ce stade, le DMS se développe et devient distinctement visible, tandis que le noyau commence à apparaître polylobé (Tilburg et al., 2022).

Au stade III, les mégacaryocytes sont dits matures et mesurent 20-50 μm . Ils se caractérisent par un noyau volumineux et polylobé, ainsi qu'un cytoplasme bien développé contenant un DMS pleinement formé, des granules α et δ et une zone dite périphérique (PZ). Cette dernière, localisée à la jonction du cytoplasme et de la membrane plasmique contient de l'actine filamenteuse et est essentielle pour l'élongation des proplaquettes à travers les sinusoides (Eckly et al., 2014). A ce stade de maturation, le mégacaryocyte dit mature n'exprime plus le marqueur CD34 (Noetzli et al., 2019).

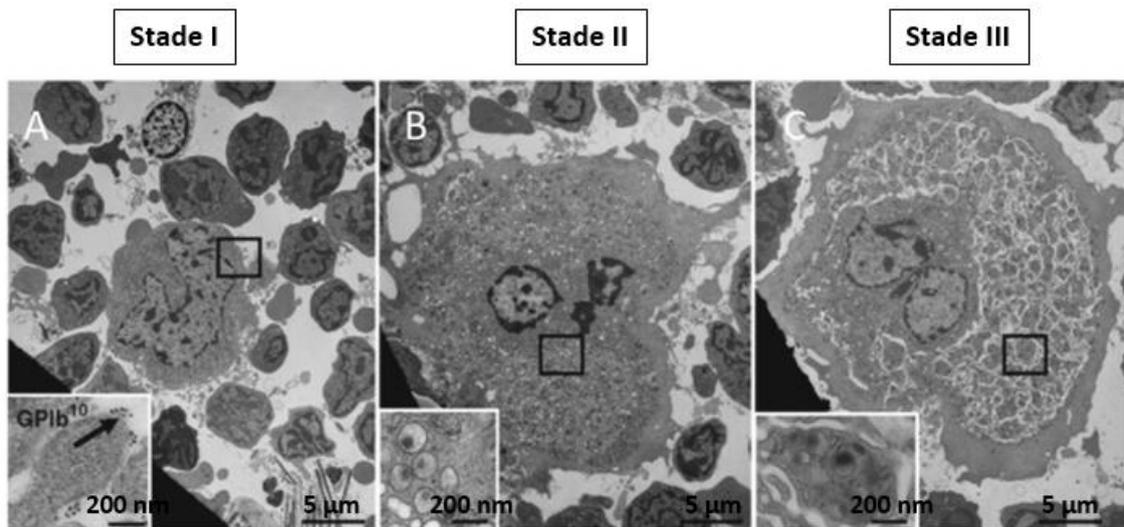


Figure 6 : Représentation des différents stades de maturation du mégacaryocyte in situ.

Ces images de microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées dans des moelles osseuses de souris. On observe **(A)** un mégacaryoblaste, mesurant entre 10 et 15 μm de diamètre et affichant un noyau polylobé prenant une place importante dans le cytoplasme. **(B)** Un promégacaryocyte, mesurant entre 15 et 30 μm de diamètre avec un noyau diminué par rapport à la surface cytoplasmique. **(C)** Un mégacaryocyte mature, mesurant entre 20 et 50 μm avec un noyau diminué (anormal) et une surface cytoplasmique importante, comportant un riche réseau de DMS et des granules. Chaque encart montre un territoire cytoplasmique. Adapté de *Eckly et al., 2012*.

4. La thrombopoïèse

La thrombopoïèse est le processus de production des plaquettes à partir des mégacaryocytes matures. Cette étape finale a longtemps été sujette à controverse, et deux modèles différents de formation des plaquettes à partir des mégacaryocytes ont été proposés. Le premier modèle dit des territoires plaquettaires prône un modèle statique. Il suggère que les plaquettes sont préformées à l'intérieur des mégacaryocytes et repose sur des observations par microscopie électronique à transmission montrant que le cytoplasme des mégacaryocytes matures est fragmenté en zones, ou « territoires », de la taille d'une plaquette, contenant des organites similaires à ceux présents dans les plaquettes. La plaquette serait alors le résultat de la fragmentation des territoires cytoplasmiques du mégacaryocyte (Trowbridge and Harley, 1984). Le second modèle, également basé sur des observations par microscopie électronique à transmission, propose que les mégacaryocytes émettent des fragments cytoplasmiques appelés proplaquettes dans la circulation via les sinusoides médullaires (Scurfield and Radley, 1981) (**Figure 7**).

Les études *in vitro* révèlent que la formation des proplaquettes repose sur une réorganisation majeure des microtubules, ce qui permet de démarrer et de maintenir leur élongation via un mécanisme de glissement entre eux. À l'extrémité des proplaquettes, les microtubules s'enroulent pour former des boutons plaquettaires, annonçant la formation des futures plaquettes (Bornert et al., 2020; Patel et al., 2005). En parallèle, le cytosquelette d'acto-myosine est principalement requis pour la ramification des proplaquettes et l'augmentation de leur nombre (French et al., 2020; Italiano et al., 1999).

Si l'existence des proplaquettes a été validée *in situ* par l'utilisation de microscopes biphotoniques, les mécanismes responsables de leur émission, élongation et fragmentation ne sont encore que partiellement déterminés (Boscher et al., 2020; Junt et al., 2007).

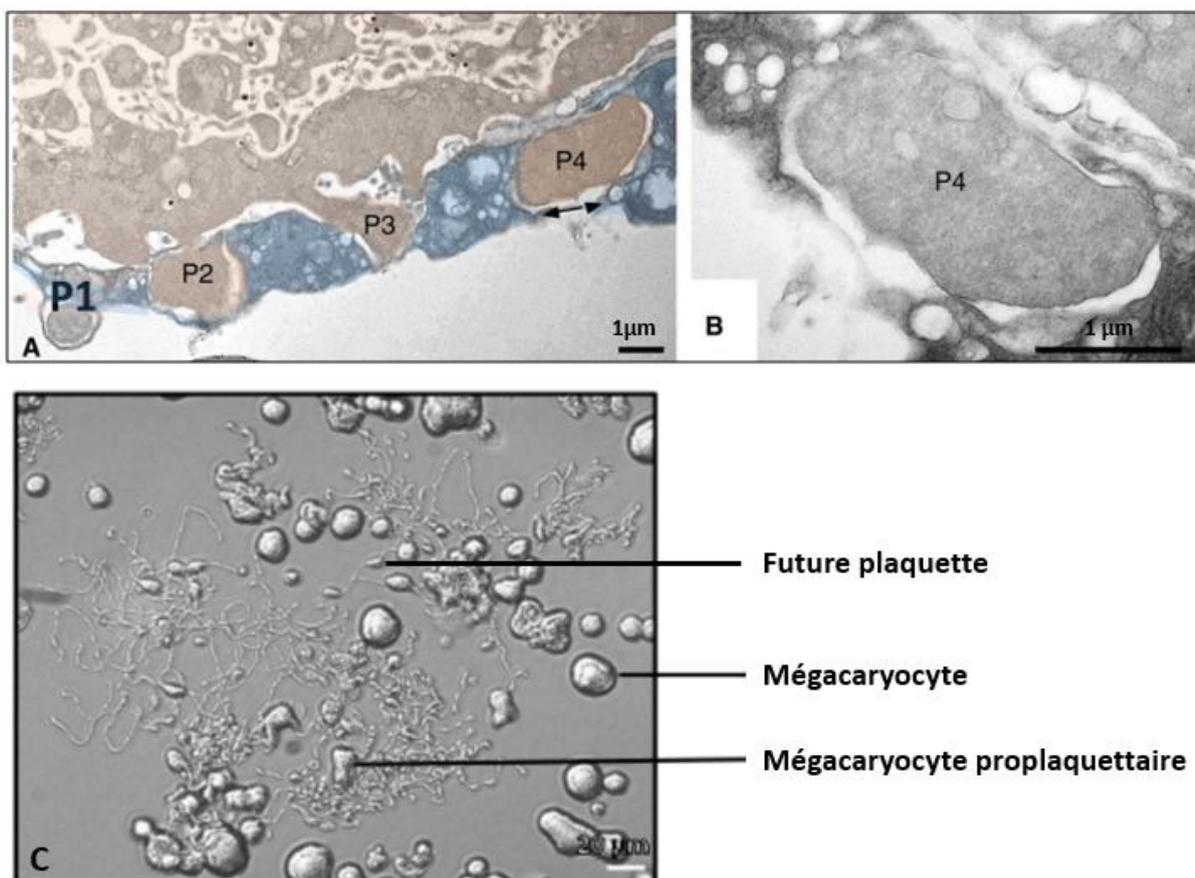


Figure 7 : La libération des plaquettes.

(A) Image de microscopie électronique à transmission d'un mégacaryocyte avec quatre protrusions plaquettaires (P1-4) formant des pores transendothéliaux. (B) Vue élargie d'une protrusion amincissant l'endothélium au point de contact avant passage dans la circulation sanguine. (C) Image de microscopie photonique de mégacaryocytes humains en culture émettant des proplaquettes. (A-B) adapté de Eckly et al., 2020. (C) adapté de Pongerard et al., 2021.

5. Les plaquettes sanguines

Les plaquettes sont des fragments cellulaires anucléés dérivés des mégacaryocytes mesurant 2-3 μm de diamètre et 1 μm d'épaisseur. Les plaquettes sont constituées d'une membrane plasmique, d'un cytosquelette, d'un cytoplasme et d'organites. Après leur libération, elles circulent sous forme discoïde dans le sang pendant 7 à 10 jours, à une concentration physiologique comprise entre 150 et 400×10^3 plaquettes/ μL (Cazenave, 2013).

La membrane plasmique des plaquettes est composée de phospholipides, de cholestérol, de glycoprotéines et de protéoglycanes. Il s'agit d'une bicouche de phospholipides asymétrique. Les plaquettes présentent des invaginations formant le système canaliculaire ouvert, qui augmente la surface d'échange avec le milieu extracellulaire et fournit une réserve de membrane pour les changements morphologiques lors de l'activation plaquettaire (van der Meijden and Heemskerk, 2019) (**Figure 8**).

Le cytosquelette des plaquettes est composé d'un anneau de microtubules et de filaments d'actomyosine. Il possède une structure particulière appelée bande marginale, un anneau de microtubules situé juste sous la membrane plasmique, qui stabilise la forme discoïde de la plaquette au repos. Lors de l'activation plaquettaire, les filaments d'actine-myosine se réorganisent par des cycles rapides de dépolymérisation et de repolymérisation des filaments d'actine, permettant à la plaquette de changer de forme et d'émettre des filopodes (Kimmerlin et al., 2023).

Leur cytoplasme contient également différents organites essentiels à leur fonction, notamment des mitochondries, un réticulum endoplasmique, des grains de glycogène et granules α , des granules denses (δ) et des lysosomes (granules λ). Ces éléments jouent un rôle crucial dans la fonction plaquettaire, notamment en favorisant l'activation et l'agrégation plaquettaire. En réponse à une brèche vasculaire, les plaquettes adhèrent au site de lésion, s'activent, agrègent entre elles et forment un clou plaquettaire, ce qui stoppe le saignement et contribue à la réparation tissulaire. (Repsold and Joubert, 2021).

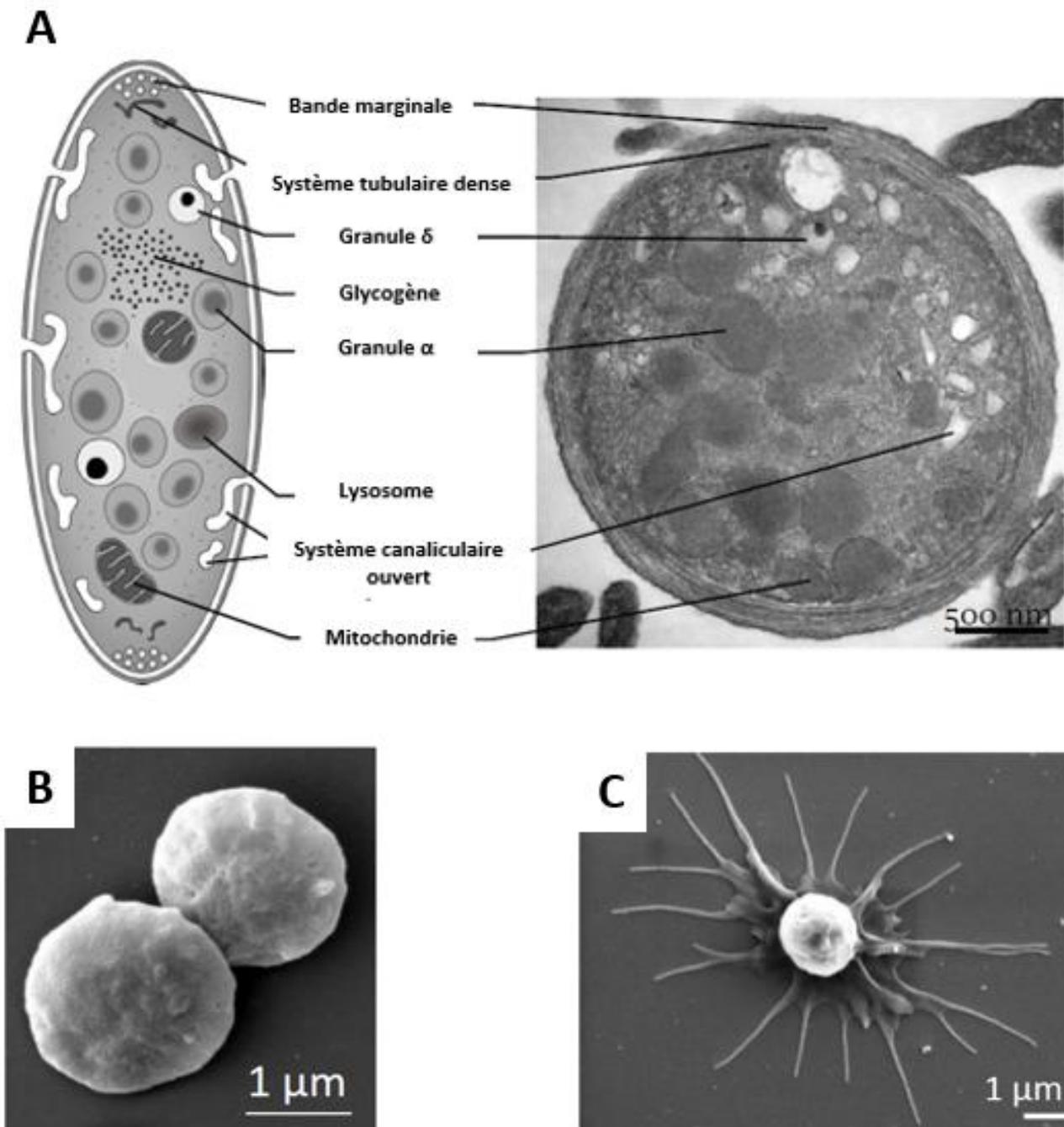


Figure 8 : Les plaquettes sanguines.

(A) Ultrastructure des plaquettes : (Gauche) Représentation schématique en coupe transversal. (Droite) Image de microscopie électronique à transmission en coupe équatoriale d'une plaquette
(B) Visualisation au microscope électronique à balayage de plaquettes discoïdes au repos et **(C)** d'une plaquette activée émettant des filopodes. (A) Adapté de Boneu and Cazenave, 1997. (B-C) Images réalisées par A. Eckly UMR_S1255©.

B. La mégacaryopoïèse, un processus finement régulé

La MKP, le processus par lequel les CSH se différencient en mégacaryocytes, est régulée par des facteurs extrinsèques et intrinsèques. Les facteurs extrinsèques comprennent les éléments du microenvironnement, tels que les niches cellulaires, des microparticules et les cytokines, qui influencent la différenciation. Les facteurs intrinsèques incluent des FT spécifiques, des miRNA et des voies de signalisation, qui orchestrent la maturation et la fonction des mégacaryocytes. La façon dont ces facteurs affectent la MKP est détaillée ci-dessous.

1. Les niches hématopoïétiques

R. Schofield (1978) a observé après des transplantations successives de CSH dans des souris irradiées que les CSH issues de la rate reconstituent moins efficacement le système hématopoïétique que celles issues de la moelle osseuse. Il a alors proposé le concept de niche hématopoïétique, actuellement définie comme un microenvironnement dynamique composé de plusieurs sous-types de cellules responsables de la sécrétion, du transport et de la régulation des facteurs extrinsèques nécessaires au contrôle des propriétés des CSH (survie, quiescence, prolifération, localisation et différenciation) (Pinho and Zhao, 2023). Ce concept suppose une structure physique et une forte proximité entre les cellules ce qui mène à la définition de deux types de niches hématopoïétiques : la niche ostéoblastique et la niche vasculaire. Enfin, des études récentes ont mis en évidence l'influence du mégacaryocyte sur le devenir de la CSH menant à l'établissement du concept de niche mégacaryocytaire (**Figure 9**).

a. Niche ostéoblastique

La niche ostéoblastique est au contact direct de l'os. Elle est composée en majorité de progéniteurs des cellules souches mésenchymateuses, d'ostéoblastes, d'ostéoclastes (impliqués dans le remodelage osseux) ainsi que de fibroblastes et d'adipocytes (Zhao et al., 2019). Les CSH sont localisées majoritairement à proximité de l'endoste dans les régions hypoxiques à distance des capillaires. La faible concentration en oxygène promeut la quiescence des CSH puisque cet état permet de limiter leur consommation en oxygène. La quiescence des CSH est régulée par les médiateurs clés de l'hypoxie et de l'angiogenèse : l'*Hypoxia Inductible Factor-1 α* (HIF-1 α) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). Dans des conditions optimales d'oxygénation, HIF-1 α présente une faible activité transcriptionnelle. En revanche, lorsque la concentration en oxygène diminue, il active et régule la transcription de gènes favorisant l'état de quiescence des

CSH. En effet, les CSH de souris déficientes pour HIF-1 α perdent leur état de quiescence et leur nombre est réduit, tandis qu'une augmentation de l'expression de HIF-1 α favorise la quiescence des CSH et facilite leur transplantation (Takubo et al., 2010).

b. Niche vasculaire

La niche vasculaire est au contact des vaisseaux sanguins formés par les cellules endothéliales. Si la niche ostéoblastique est en condition d'hypoxie, la proximité avec les vaisseaux sanguins de la niche vasculaire permet la normoxie et par conséquent favorise l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des CSH. La forte vascularisation de la moelle osseuse permet aux cellules hématopoïétiques d'entrer ou de sortir de la circulation sanguine. Bien que la grande majorité des CSH résident dans la moelle osseuse, elles font preuve d'une étonnante mobilité. En réponse à des facteurs spécifiques, elles peuvent sortir de la niche ostéoblastique de la moelle osseuse et y revenir, processus connus sous le nom de mobilisation et de *homing*, respectivement (Wilson and Trumpp, 2006). Dans la niche vasculaire, les interactions des CSH se centrent sur les cellules endothéliales et les CSM. Les cellules endothéliales de la moelle osseuse bordent tous les vaisseaux sanguins et génèrent divers facteurs qui régulent l'activité des CSH comme le C-X-C motif ligand 12 (CXCL12), le SCF et la E-sélectine. (Winkler et al., 2012).

c. La niche mégacaryocytaire

Les mégacaryocytes représentent une proportion faible des cellules hématopoïétiques, mais leur grande taille et leur distribution homogène dans la moelle osseuse laisse supposer qu'ils ont le potentiel d'interagir avec de nombreuses cellules. Ainsi, des études d'imagerie 3D dans la moelle osseuse de souris ont montré que des mégacaryocytes se trouvent à proximité immédiate (>5 μ m) de 30% des CSH (Bruns et al., 2014). Cette sous-population de cellules souches est fortement enrichie en CSH exprimant le vWF et sont biaisées vers les voies myéloïdes et mégacaryocytaires. De façon intéressante, la capacité d'auto-renouvellement des CSH vWF+ sont réduites suite à la déplétion *in vivo* des mégacaryocytes et le potentiel hématopoïétique de ces cellules est rétabli après transplantation (Pinho et al., 2018). De plus, il a été observé qu'une déplétion sélective *in vivo* des mégacaryocytes entraîne une augmentation significative du nombre de CSH, ce qui suggère que les mégacaryocytes régulent leur quiescence (Zhao et al., 2014). Cette fonction est médiée par la sécrétion de C-X-C motif ligand 4 (CXCL4 aussi appelé Facteur Plaquettaire 4 ; PF4), une cytokine régulant l'entrée dans le cycle cellulaire par les mégacaryocytes dans la MO. En effet, une réduction dose dépendante de la prolifération des CSH est observée après l'injection à des souris de CXCL4

tandis qu'une augmentation du nombre de CSH est constatée chez des souris déficientes pour CXCL4 (Bruns et al., 2014). Ensemble, ces résultats démontrent que les mégacaryocytes favorisent la quiescence des CSH.

Enfin, bien que la littérature soit relativement pauvre, il est également possible des microparticules, vésicules extracellulaires de petite taille (0,1 à 1µm) participent à la régulation fine de la différenciation et de la maturation des mégacaryocytes. Libérées par les cellules de la MO, elles transportent des protéines, lipides et miRNA qui modulent les voies impliquées dans la maturation des mégacaryocytes comme PI3K/AKT et NF-κB (Escobar et al., 2020; Pinho and Frenette, 2019).

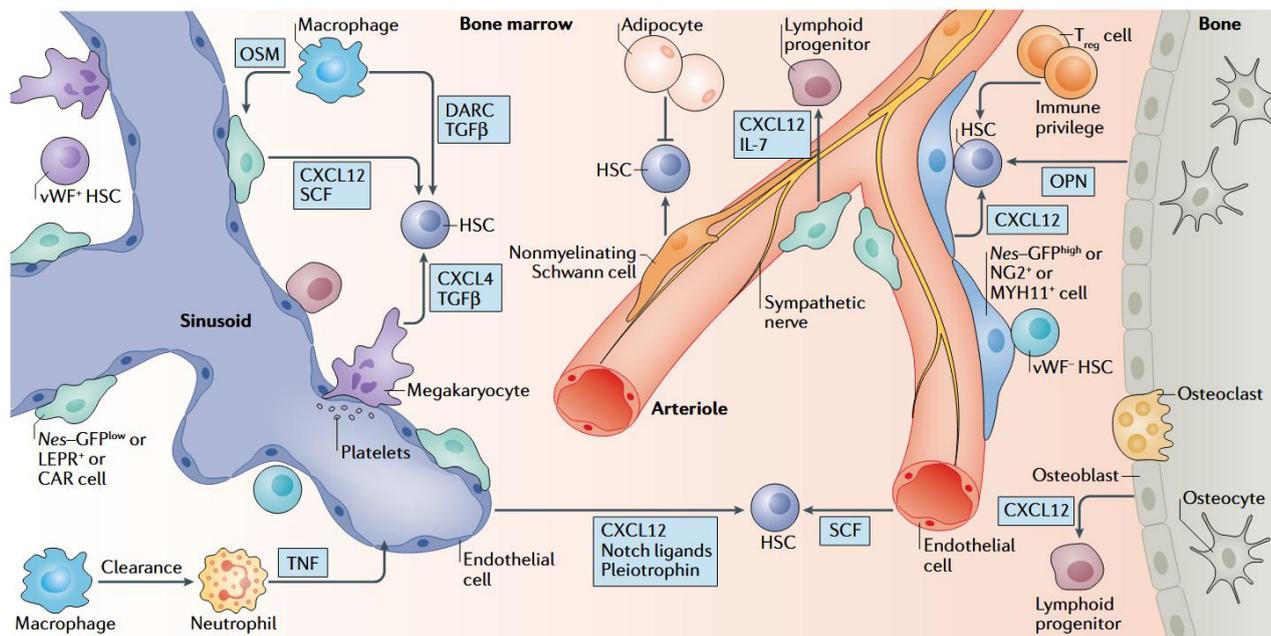


Figure 9 : Les niches hématopoïétiques

Représentation schématique de la niche des CSH. Le diagramme montre les différents types de cellules et les facteurs de niche qui régulent directement ou indirectement l'activité des CSH. Parmi les exemples de progénitures dérivées des CSH qui peuvent répondre et contribuer à l'entretien ou à la mobilisation des CSH, on peut citer les cellules hématopoïétiques telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules T régulatrices (Treg) et les mégacaryocytes. La localisation régionale des sous-ensembles de CSH a montré que les CSH positives et négatives au facteur Willebrand sont situées dans des niches distinctes de la MO contenant des mégacaryocytes et des artérioles, et qu'elles sont régulées par ces niches. Adapté de Pinho and Frenette, 2019. SCF : facteur de cellules souches ; CXCL4 : ligand 4 de la chimiokine C-X-C ; CXCL12 : ligand 12 de la chimiokine CXC ; DARC : récepteur d'antigène de Duffy pour les chimiokines ; IL-7 : interleukine-7 ; LEPR : récepteur de la leptine ; MYH11 : chaîne lourde de la myosine 11 ; NG2 : antigène neuronal/gliale 2 ; OPN : ostéopontine ; OSM : oncostatine M ; TGFβ : facteur de croissance transformant-β ; TNF : facteur de nécrose tumorale ; vWF : facteur de von Willebrand.

2. Les cytokines promotrices de la mégacaryopoïèse

Les cytokines sont des protéines de signalisation sécrétées dans la matrice extracellulaire. Ces médiateurs chimiques modulent les interactions entre cellules. Ainsi, dans la moelle osseuse certaines favorisent la prolifération et l'auto-renouvellement des CSH (TPO, SCF) et d'autres l'engagement dans la voie mégacaryocytaire et la maturation (TPO, EPO, IL-3-6-9-11) (Noetzli et al., 2019) (**Figure 10**).

TPO. La thrombopoïétine (TPO) est une cytokine cruciale pour la MKP et la thrombopoïèse. Son rôle dans la MKP a été démontré chez des souris déficientes soit en TPO, soit pour son récepteur c-mpl, et qui présentent toutes deux une thrombopénie sévère (>90%) par rapport aux souris témoins. Cette thrombopénie est liée à une diminution du nombre de progéniteurs mégacaryocytaires et à un défaut de maturation des mégacaryocytes, notamment une réduction de leur ploïdie (Huang and Cantor, 2009; Murone et al., 1998). Cependant, la présence résiduelle de plaquettes indique que la TPO n'est pas la seule cytokine impliquée dans la MKP. En effet, la TPO agit en synergie avec d'autres cytokines, telles que le SCF, l'IL-11 et l'EPO, pour favoriser la différenciation des progéniteurs mégacaryocytaires (Aihara et al., 2017; van der Meijden and Heemskerk, 2019). La TPO contrôle également la production de plaquettes via un mécanisme de rétrocontrôle : une diminution du nombre de plaquettes stimule la sécrétion de TPO, favorisant ainsi la production de nouvelles plaquettes, tandis qu'un nombre élevé de plaquettes réduit la production de TPO, limitant leur biogénèse (Folman et al., 2000; Hitchcock et Kaushansky, 2014).

SCF. Le *Stem Cell Factor* (SCF), produit par les cellules stromales se lie à son récepteur, le CD117, également connu sous le nom de c-kit. Ce récepteur agit comme un facteur de transcription, médiant les signaux de prolifération et de croissance dans les CSH (Adolfsson et al., 2005). En activant c-kit, le SCF favorise l'expansion et la survie des CSH, ce qui est crucial pour le renouvellement et la maintenance de leur pool. Ce mécanisme est comparable à l'action des facteurs de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc), qui sont utilisés pour reprogrammer les cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (iPSC) (Takahashi and Yamanaka, 2006).

EPO. L'érythropoïétine (EPO) est le régulateur principal de l'érythropoïèse, essentiel à la production des globules rouges. De façon inattendue, l'EPO collabore également avec la TPO pour promouvoir la prolifération et la différenciation des progéniteurs de mégacaryocytes (Hacein-Bey-Abina et al., 2020). En effet, les mégacaryocytes possèdent à leur surface le récepteur de l'EPO. Or, il a été

montré *in vivo* comme *in vitro* que de faibles doses d'EPO permettent de stimuler la production de plaquettes (Stohlawetz et al., 2000; Yonemura et al., 1992).

Les interleukines. L'IL-3 est impliquée dans la prolifération et la différenciation des CSH en progéniteurs hématopoïétique. A la suite de la liaison avec son récepteur (IL-3R), elle a la capacité de promouvoir la différenciation des mégacaryocytes et la production de plaquettes en activant les voies de signalisation JAK/STAT, MAPK/ERK et PI3K/AKT. L'IL-3 stimule la prolifération des CSH et, lorsqu'elle est administrée seule chez la souris, entraîne une augmentation de 20% de la production de plaquettes après 120 heures de traitement. Cette augmentation atteint 61% lorsqu'elle est co-administrée avec l'IL-6 (Huang et al., 2024; Mazur et al., 1988). L'IL-6 renforce l'effet de la TPO sur les mégacaryocytes et favorise ainsi leur maturation tardive en favorisant l'augmentation de la taille et de la ploïdie des mégacaryocytes (Tajika et al., 2000; Wu et al., 2015). D'autres interleukines, telles que l'IL-9 et l'IL-11, sont sécrétées dans la matrice extracellulaire respectivement par les lymphocytes T et les ostéoclastes, où elles jouent un rôle significatif dans la maturation des mégacaryocytes et favorisent la thrombopoïèse. En effet, l'administration d'IL-9 permet *in vivo* d'accélérer la remontée de la numération plaquettaire dans des thrombopénies induites par chimiothérapies (Feng et al., 2018; Turner et al., 1996; Xiao et al., 2017).

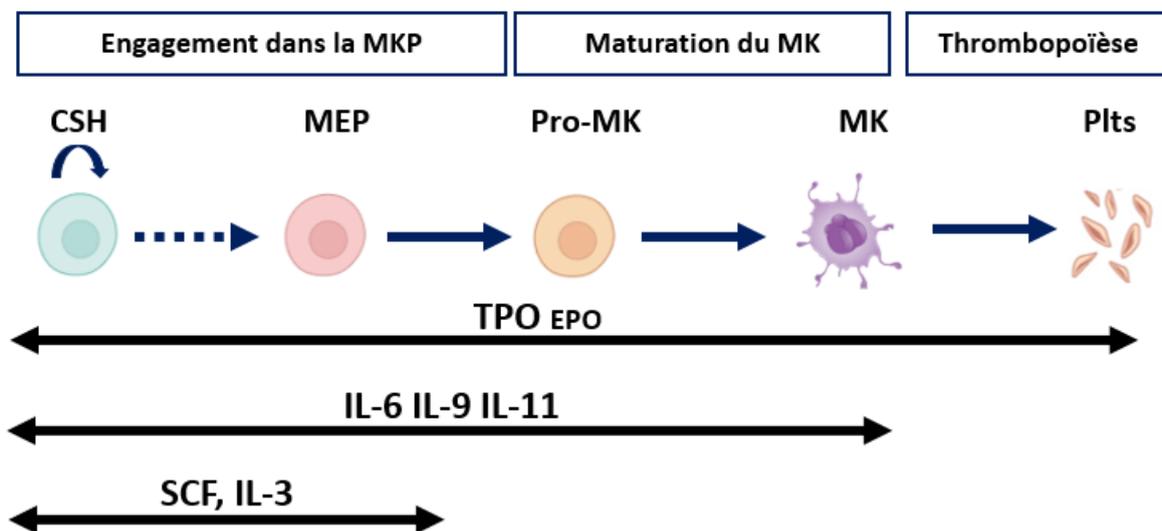


Figure 10 : Régulation de la mégacaryopoïèse par les cytokines.

Dans la moelle osseuse les cytokines favorisent la prolifération et l'auto-renouvellement des CSH (TPO, SCF, IL-3) et d'autres l'engagement dans la voie mégacaryocytaire et la maturation (TPO, EPO, IL-6-9-11) CMP: Progéniteurs Myéloïdes Communs, CSH : Cellules souches Hématopoïétiques, plts : plaquettes, pro-MK : Progéniteurs Mégacaryocytaires, MEP : Progéniteurs Mégacaryocytaires-Erythroïdes, MK : Mégacaryocytes.

3. Les facteurs de transcriptions régulant la mégacaryopoïèse

Un FT est une protéine qui régule l'expression génique en se liant à des séquences spécifiques de l'ADN, généralement au niveau des promoteurs ou des enhanceurs des gènes cibles. Dans le contexte de la MKP, ils sont essentiels pour réguler l'engagement des CSH en mégacaryocytes (RUNX1, ETV-6, GATA2) et la prolifération puis la maturation des mégacaryocytes (RUNX1, GATA1, FOG-1, NFE-2, FLI-1...) ainsi que la libération des plaquettes (RUNX1, NFE-2, FLI-1) (**Figure 11**).

RUNX1. *Runt-related transcription factor 1* (RUNX1) joue un rôle essentiel dans la régulation de plusieurs étapes de la MKP puisqu'il régule l'expression de gènes spécifiques qui dirigent les CSH vers la différenciation en mégacaryocytes comme *MPL*, *GATA1* et *FLI-1* (Wang et al., 2023). Il régule l'engagement des CSH en MEP, en favorisant leur différenciation tout en maintenant un certain niveau de prolifération (Ichikawa et al., 2004). RUNX1 participe également à la régulation du cycle cellulaire en coopération avec d'autres facteurs comme GATA1, maintenant un équilibre entre prolifération et différenciation pour éviter une différenciation prématurée en mégacaryocytes (Behrens et al., 2016). RUNX1 est crucial pour la maturation terminale des mégacaryocytes, en régulant des gènes du cytosquelette impliqués dans l'endomitose et dans la formation des proplaquettes (Sood et al., 2017). En effet, dans des souris déficiente pour *RUNX1* les mégacaryocytes présentent des noyaux hypolobulés, un cytoplasme sous-développé et une faible ploïdie, tandis que les CSH perdent leur quiescence et prolifèrent (Elagib et al., 2003; Satoh et al., 2008). Il s'agit de l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans diverses hémopathies malignes. Ainsi, des mutations germinales de *RUNX1* sont à l'origine de thrombopénies souvent associées à des leucémies myéloïdes ou lymphoïdes (Sood et al., 2017).

ETV-6. Ets variant 6 (ETV-6) est un FT répressif essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse. Ce FT possède un domaine PNT (*N-terminal pointed*) qui permet sa dimérisation avec diverses protéines de la famille Ets, dont FLI1 (Di Paola and Porter, 2019). Les modèles murins déficients pour le gène *ETV-6* ont mis en évidence son rôle indispensable dans la maintenance et la survie des CSH, ainsi que dans la maturation des mégacaryocytes (Hock et al., 2004). Dans les pathologies humaines, des mutations héréditaires d'*ETV-6* sont associées avec l'émergence de leucémies myéloïdes et lymphoïdes souvent accompagnées de thrombopénies et d'anémies. (Lentaigne et al., 2016).

Les FT de la famille GATA. Les facteurs de cette famille possèdent un domaine caractéristique à double doigt de zinc (ZF) qui est hautement conservé parmi ses six membres chez le mammifère

(GATA1-6) et un domaine de transactivation en N-terminal. Ils tirent leur nom de la séquence d'ADN qu'ils reconnaissent (*GATA*).

GATA2 est exprimé dans les CSH et MEP où il participe à la différenciation de la CSH en MEP en favorisant l'expression d'un certain nombre de gènes de la phase précoce de la MKP (*RUNX1*, *ETV-6*, *MPL*), y compris *GATA2* lui-même. Il initie également l'expression de *GATA1* dans les MEP et les mégacaryocytes au cours d'un phénomène appelé « GATA switch » (Shimizu and Yamamoto, 2016). Il s'agit de la transition de l'expression de *GATA2* à *GATA1* au cours de la différenciation des mégacaryocytes. *GATA2* est fortement exprimé dans les MEP et maintient leur prolifération. À mesure que les cellules se différencient en mégacaryocytes matures, *GATA1* remplace progressivement *GATA2*, réprimant les gènes prolifératifs et activant ceux liés à la maturation des mégacaryocytes (Grass et al., 2006).

GATA1 est essentiel à la MKP, puisque, par son interaction avec *GATA2* et *FOG-1* (*friend of GATA-1*), il participe à l'engagement des CSH dans la voie mégacaryocytaire ou dans les stades de maturation tardifs en réprimant l'expression de gènes comme par exemple *GP1BA*, *NFE-2* et *MPL* (Songdej and Rao, 2017). Des mutations constitutionnelles de *GATA1* ont été mises en évidence chez des individus souffrants de thrombopénies et d'anémies avec notamment chez certains patients (variant p.L268M et p.N206I) un défaut de polyploïdisation causée par une dérégulation de l'expression de *MYH10* (Saultier et al., 2021). Il est également à noter que l'interaction de *GATA1* avec son cofacteur *FOG-1* favorise la transcription du gène codant pour CD41 (*ITGA2B*) (Amigo et al., 2009).

NFE-2. *NFE-2* (*Nuclear Factor, Erythroid 2*) joue un rôle crucial dans la différenciation terminale des mégacaryocytes et la production de plaquettes. C'est un FT hétérodimérique, composé de la sous-unité p45 et d'une petite protéine Maf, essentielle pour la maturation des mégacaryocytes et la formation des proplaquettes. En l'absence de *NFE-2*, les mégacaryocytes montrent un arrêt de maturation et un défaut sévère dans la production de plaquettes, entraînant une thrombopénie sévère (Lecine et al., 1998; Shivdasani et al., 1995). Le rôle de *NFE-2* dans les étapes finales de maturation des mégacaryocytes a été associé à l'expression de certains gènes cibles notamment celle de la tubuline $\beta 1$, un isotype de tubuline spécifiquement mégacaryocytaire impliqué dans la formation de la bande marginale des plaquettes (Shivdasani 2001). La surexpression de *NFE-2* dans des modèles murins favorise la maturation, la formation des proplaquettes et la libération des plaquettes par les mégacaryocytes alors que des mutations héréditaires de *NFE-2* chez l'Homme entraînent des thrombopénies (Fock et al., 2008; Luk et al., 2020).

FLI-1. *Friend leukemia virus integration 1* (FLI1), un membre de la famille des facteurs de transcription ETS, est principalement exprimé dans les cellules endothéliales et hématopoïétiques, où il joue un rôle crucial dans la régulation du développement vasculaire et la MKP (Lentaigne et al., 2016). Les études sur des modèles murins déficients en *FLI-1* montrent qu'il est indispensable pour la maturation des mégacaryocytes, en régulant l'expression de gènes clés tels que *Itga2b*, *GP9*, *MPL*, *GP6* et *GATA1* (Hart et al., 2000; Vo et al., 2017). De plus, des délétions ou des mutations faux sens de *FLI-1* sont associées au syndrome de Paris-Trousseau, une macrothrombopénie associant des troubles hémorragiques et des plaquettes de grande taille contenant des granules α géantes (Stevenson et al., 2015).

Enfin, des miRNA agissent également comme des régulateurs de la différenciation des mégacaryocytes en modulant l'expression de gènes clés, de voies de signalisation et de processus cellulaires nécessaires à la maturation des mégacaryocytes. En effet, certains miRNA comme miR-155 inhibe la différenciation des mégacaryocytes en régulant des voies pro-apoptotiques ou de prolifération (Norfo et al., 2014). D'autres comme miR-10a et miR-34a régulent la différenciation des CSH en modulant les réponses des mégacaryocytes à la TPO (Navarro et al., 2009; Zarif et al., 2013). Certains miRNA, comme miR-150 peuvent favoriser la différenciation des mégacaryocytes agissant sur des FT comme MYB, un facteur limitant de la MKP (Lu et al., 2008).

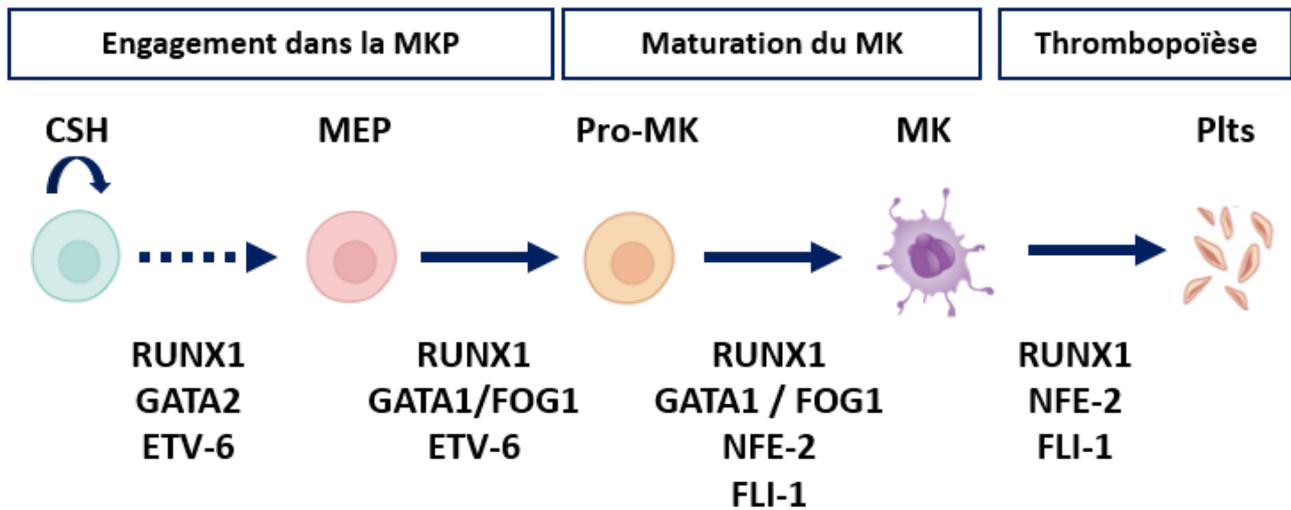


Figure 11 : Régulation de la mégacaryopoïèse par ses principaux facteurs de transcription.

Les FT jouent un rôle central dans MKP, régulant les différentes étapes de ce processus. GATA2, ETV-6 et RUNX1 agissent pour engager la CSH vers la lignée mégacaryocytaire, tandis que FLI-1 et GATA1 prennent le relais pour la maturation des mégacaryocytes favorisant la ploïdie et l'apparition de granules. NFE-2 et FLI-1 interviennent ensuite dans la phase terminale de la maturation, facilitant la formation de proplaquettes et la libération des plaquettes dans la circulation. CMP: Progéniteurs Myéloïdes Communs, CSH : Cellules souches Hématopoïétiques, plts : plaquettes, pro-MK : Progéniteurs Mégacaryocytaires, MEP : Progéniteurs Mégacaryocytaires-Erythroïdes, MK : Mégacaryocytes.

En supplément de ces FT, la recherche de nouveaux acteurs par des techniques sans a priori a permis d'impliquer dans les premières étapes de la MKP le FT IKAROS. Ce FT possède des domaines ZF et est essentiellement décrit pour son rôle dans l'orientation lymphocytaire. En 2013, il a été décrit pour inhiber la différenciation ainsi que la maturation des mégacaryocytes. IKAROS est capable de lier les FT NOTCH et GATA en régulant négativement la MKP comme l'atteste la diminution de l'expression de transcrits spécifiques de la lignée mégacaryocytaire *NFE-2*, *PF4* ou *RUNX1* (Liu et al., 2018; Malinge et al., 2013). Je développe la structure, les fonctions et l'implication dans la MKP des FT de la famille IKAROS dans le chapitre suivant.

II. Les facteurs de transcription de la famille IKAROS

Les facteurs de transcription de la famille IKAROS (IKZFs) sont au nombre de cinq : IKAROS (IKZF1), HELIOS (IKZF2), AIOLOS (IKZF3), EOS (IKZF4) et PEGASUS (IKZF5). Ces protéines ont un rôle crucial dans la différenciation et la maturation des cellules hématopoïétiques. Dans ce chapitre, je présente ces FT. Je décris tout d'abord les fonctions des protéines IKZFs de manière générale, puis plus spécifiquement dans l'hématopoïèse. Enfin, je centre mon propos sur les fonctions connues de d'IKAROS, HELIOS et PEGASUS dans la MKP.

A. Généralités

1. Découverte et origine phylogénétique

La découverte de la protéine IKAROS (IKZF1), initialement connue sous le nom de LyF1 et membre fondatrice des IKZFs, a eu lieu de façon concomitante par Lo et al., 1991 et Georgopoulos et al., 1992 chez la souris. Ces études pionnières ont identifié IKAROS comme un FT régulant l'expression de deux gènes impliqués dans le développement et la maturation des lymphocytes T, respectivement la désoxynucléotidyltransférase terminale (Tdt) et la chaîne delta du cluster de différenciation 3 (CD3δ) (Ernst et al., 1993). De nouvelles protéines avec des séquences d'acides aminés hautement similaires à celle d'IKAROS ont ensuite été découvertes et nommées suivant la mythologie grecque : HELIOS (IKZF2), AIOLOS (IKZF3), EOS (IKZF4) et PEGASUS (IKZF5). HELIOS et AIOLOS ont été décrits comme de nouveaux partenaires d'IKAROS à la suite à d'expériences de co-immunoprécipitation à partir de lymphocytes murins (Hahm et al., 1998; Kelley et al., 1998; Morgan et al., 1997). Quant à EOS, il a été identifié au cours d'un criblage génétique dans une lignée de cellules neuronales (Honma et al., 1999). Enfin, PEGASUS est le membre dont la découverte est la plus récente. Il a été identifié par la méthode des doubles hybrides dans la levure (Perdomo et al., 2000) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Gènes et protéines IKZF1-5 humaines.

Gène	Localisation	Exons	Protéine	Acides aminés	ZF	Motifs protéiques
IKZF1	Chrm7: 50,304,068-50,405,101 +	8	IKAROS	477	6	SDEE, LTNH, KRK, QAI
IKZF2	Chrm2: 212,999,691-213,152,427 -	9	HELIOS	526	6	SDEE, KRK, QAI
IKZF3	Chrm17: 39,757,718-39,864,312 -	8	AIOLOS	509	6	KRK, QAI
IKZF4	Chrm12: 56,007,659-56,038,435 +	8	EOS	585	6	SDEE, KRK
IKZF5	Chrm10: 122,990,807-123,008,812 -	5	PEGASUS	419	5	

Les protéines IKZFs sont issues d'un gène primitif apparu il y a environ 670 millions d'années chez un ancêtre commun appartenant au clade des deutérostomes. Ce gène primitif aurait donné naissance aux cinq membres de la famille IKAROS par duplications successives. Ce gène est homologue au gène *Hunchback (Hb)*, initialement décrit dans la drosophile comme régulant la segmentation au cours du développement embryonnaire puisque, comme ce dernier, les IKZF1-4 possèdent quatre domaines à ZF d'interaction à l'ADN (*DNA Binding Domains* : DBD) N-terminale et deux domaines à ZF de dimérisation (DD) centrales (John et al., 2009; McCarty et al., 2003) (**Figure 12**). Toutefois, l'importance de cette homologie est à nuancer. Effectivement, les DBD des IKZFs et de *Hb* ne sont apparentés que parce qu'ils ont une structure générique de ZF et leur DD ont une identité relativement faible (43%) ce qui explique que IKZFs et *Hb* ne partagent qu'une partie de leurs fonctions (Morgan et al., 1997).

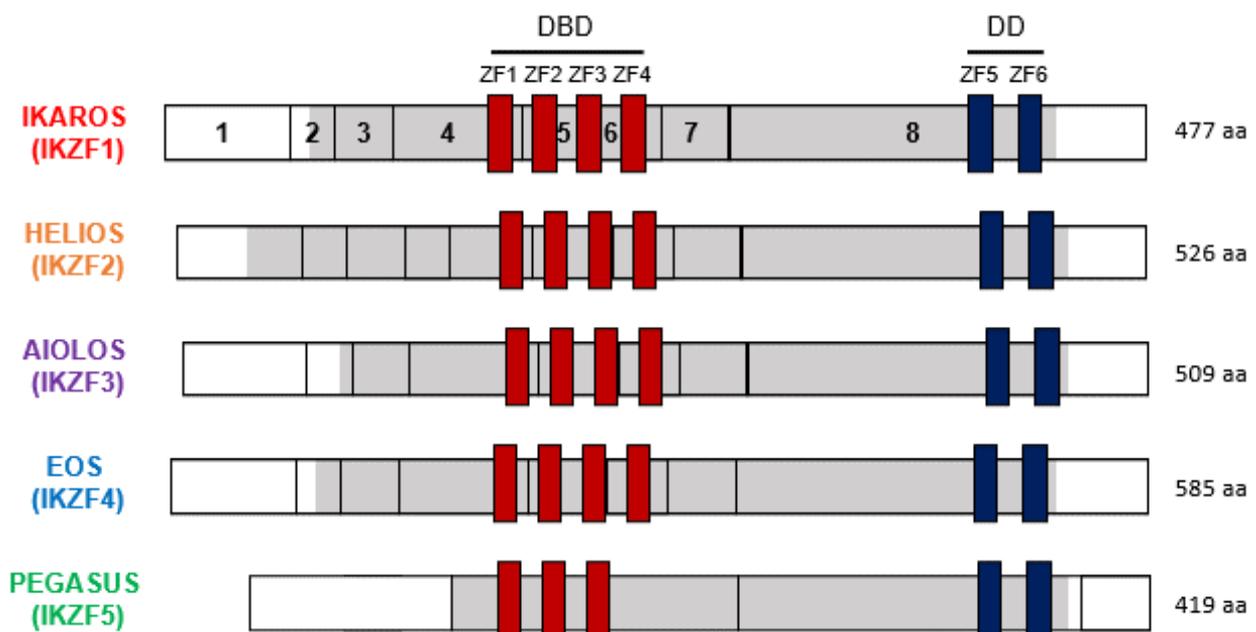


Figure 12 : Représentation des transcrits et des protéines IKZF1-5 humaines.

Les exons de chaque gène sont numérotés de 1 à 8. Les régions codantes sont en gris, les régions non codantes en blanc. Les ZF DBD sont en rouge ; les ZF appartenant au DD sont en bleu. DBD : domaines de liaison à l'ADN, DD : domaines de dimérisation, ZF : domaines à doigt de zinc.

Les IKZFs ont conservé une façon similaire de lier l'ADN au cours de leur évolution. En effet, les acides aminés des hélices α centrales des ZF2-4 qui sont impliquées dans les contacts protéine-ADN ont un haut degré de similarité. Au contraire, le ZF1 est le ZF dont la séquence est la plus variable ce qui suggère qu'il n'est pas essentiel pour la liaison du FT à l'ADN (Large and Mathies, 2010).

De plus, les régions N-terminale et inter-ZF contiennent différents motifs protéiques moins conservés au cours de leur évolution. Comme le motif $\psi K\psi EQSDEExR$ (motif SDEE) présent dans la partie N-terminale d'IKAROS, HELIOS et EOS ainsi que le motif $LIYLTNHxxxxRNG$ (motif LTNH) localisé au niveau de la partie C-terminale d'IKAROS (où x est un acide aminé et ψ un acide aminé valine, leucine, isoleucine ou méthionine) (**Tableau 1 et Figure 13**). Ces motifs apparaissent chez les Gnathostomes et sont conservés chez les mammifères. La présence d'un tel motif SDEE chez IKAROS, HELIOS et EOS permettrait à ces IKZFs de moduler leurs rôles puisqu'une sumoylation de la lysine (K) contenue dans ce motif est possible. En effet, il a été démontré que la forme sumoylée d'IKAROS est moins efficace que les formes non sumoylées pour inhiber l'expansion des cellules leucémiques murines (Apostolov et al., 2016). Par ailleurs, AIOLOS, dont le motif SDEE est absent, a pour unique rôle décrit la régulation de l'immunité adaptative, alors que les autres IKZFs ont également des fonctions dans le développement cérébral et du système hématopoïétique (Ballasch et al., 2023). D'autre part, si le rôle du motif LTNH n'est pas documenté, il possède une importance fonctionnelle puisque des mutations dans ce motif ont été mises en évidence chez des patients atteints de l'anémie de Diamond-Blackfan (p.R423C) et d'un myélome multiple résistant à la thérapie (p.Y413C) (Barrio et al., 2020; Brodie et al., 2021).

En outre, deux nouveaux motifs conservés dans tous les Deutérostomes ont récemment été décrits : $KRKxxxPxK/R$ (motif KRK) et $E\psi\psi xxx\psi M(D/E)QAxxxxYLGA(D/E)xL$ (motif QAI) (**Tableau 1 et Figure 13**). Le motif KRK est localisé cinquante acides aminés en amont du DBD, présent chez tous les vertébrés et dans chacun des IKZF1-4. L'absence de ce motif augmente la proportion d'IKAROS lié à l'ADN comme montré lors d'un EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) avec une protéine IKAROS ne comportant pas le motif KRK. Cela suggère que cette suite d'acides aminés inhiberait la liaison à l'ADN des IKZF1-4 et participerait à la régulation de leurs interactions avec leurs séquences cibles comportant la séquence consensus GGGAA (Kastner et al., 2024). Le second motif, le motif QAI, est conservé parmi IKAROS, AIOLOS et HELIOS mais absent dans EOS. L'intégrité du motif QAI serait cruciale pour la fonction d'HELIOS, car il a récemment été montré qu'une mutation homozygote dans ce motif (p.I325V) entraîne des déficits immunitaires sévères (leucopénie et hypogammaglobulinémie), ainsi qu'une altération de ses interactions avec les autres IKZFs et leurs

partenaires, des complexes de remodelage de la chromatine (Kastner et al., 2024; Shahin et al., 2021).

PEGASUS est un membre à part de la famille IKAROS. En effet, il apparaît plus tardivement au cours de l'évolution, à partir des Gnathostomes et ne possède que trois ZF dans son DBD. De manière intéressante, la séquence de PEGASUS est nettement plus conservée chez les vertébrés comparés aux autres IKZFs (**Tableau 1 et Figure 13**). Cette pression sélective pourrait être liée à l'importance de sa fonction dans le développement des mégacaryocytes et notamment leur polyploïdisation. En effet, contrairement aux mammifères, les oiseaux et les reptiles ne possèdent que des mégacaryocytes diploïdes produisant des plaquettes avec noyaux, appelées thrombocytes (Kastner et al., 2024; Martin and Paolo D'Avino, 2022).

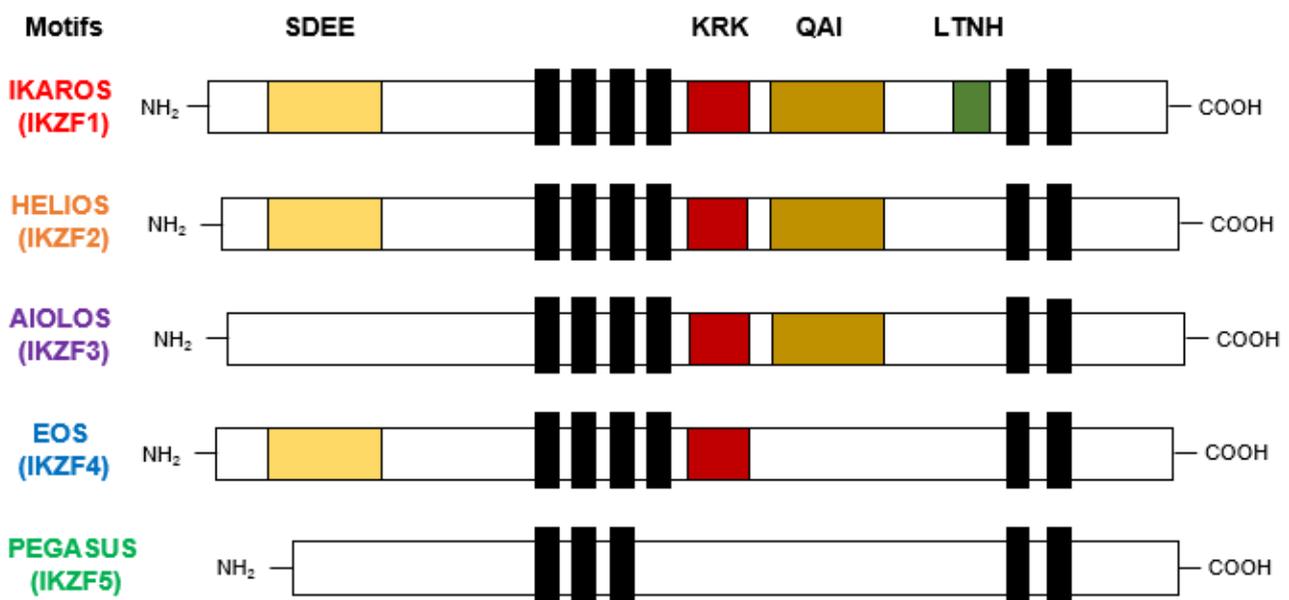


Figure 13 : Représentation schématique des protéines IKZF1-5 humaines avec leurs motifs.

Le motif SDEE est indiqué en jaune, le motif KRK en rouge, le motif QAI en brun et le motif LTNH en vert. Adapté de Kastner et al., 2024. LTNH : LIYLTNHxxxxxRNG, KRK : KRKxxxPxK/R, QAI : EψψxxxψM(D/E)QAIxxxYLGA(D/E)xL, SDEE : ψKψEQSDEExxR avec x = n'importe quel acides aminés et ψ = valine, leucine, isoleucine ou méthionine.

2. Structures protéiques des IKZFs

Les IKZFs possèdent des ZF de type C2H2 (deux cystéines et deux histidines) dont la séquence est hautement conservée. Cette famille se distingue par la présence de six ZF regroupés en deux domaines fonctionnels. Un premier domaine nécessaire à l'interaction avec l'ADN (DBD) se situe en N-terminal et regroupe quatre ZF (ZF1-ZF4). Il a été montré que seuls les ZF2 et 3 sont responsables de l'interaction directe avec l'ADN, tandis que les ZF1 et 4 participent à la spécificité du site de liaison du gène cible (John and Ward, 2011). De façon intéressante, PEGASUS, le membre atypique de la famille IKAROS, ne possède lui que trois ZF dans le DBD et interagirait par conséquent avec des séquences d'acides nucléiques différentes (Heizmann et al., 2018; Perdomo et al., 2000) (**Figure 13**).

En effet, le DBD d'IKAROS, HELIOS, AIOLOS et EOS reconnaît la séquence consensus GGGAA, alors que PEGASUS identifie une séquence différente (GnnTGTnG) (McCarty et al., 2003; Molnár and Georgopoulos, 1994; Perdomo et al., 2000; Sun et al., 1996). Le second domaine, le DD, est composé de deux ZF en C-terminal. Ce domaine est essentiel pour l'interaction protéine-protéine, soit sous forme homodimère, avec des membres de la famille IKAROS, soit sous forme d'hétérodimère, avec d'autres régulateurs de la transcription comme le complexes NuRD (complexe de remodelage des nucléosomes et de désacétylation des histones). Ceci a pour conséquence des modifications de la régulation épigénétique de l'expression de différents gènes, notamment de *Cd4*, *Cd8a* et *RUNX1* (Georgopoulos, 2017; Sridharan and Smale, 2007; Zhang et al., 2011) (**Figure 14**).

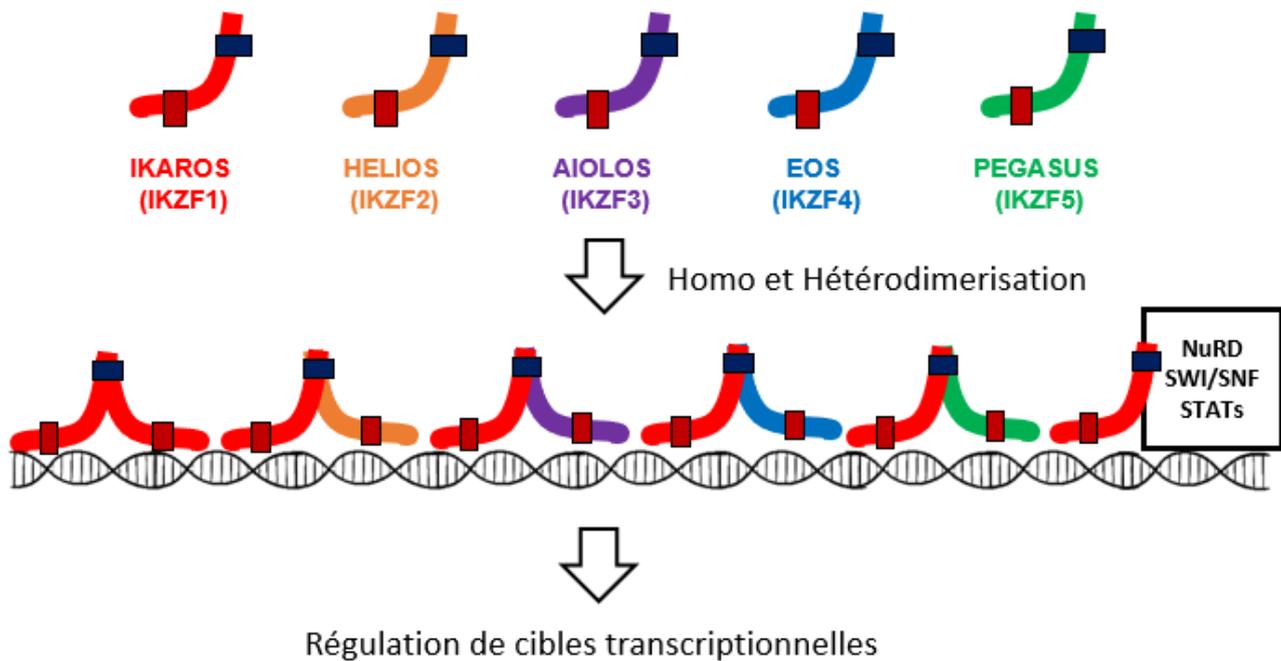


Figure 14 : Mécanismes d'action des protéines IKZF1-5 humaines.

Représentation schématique de la régulation de la transcription par homodimérisation (Ikaros-Ikaros), hétérodimérisation entre IKZFs (Ikaros-IKZF2-5) ou d'autres protéines (NuRD, SWI/SNF, facteurs STATs). NuRD : complexe de remodelage des nucléosomes et de désacétylation des histones, STATs : *Signal Transducers and Activators of Transcription*, SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable.

Il existe en complément de la forme canonique des IKZFs, des isoformes identifiés pour chacun d'entre eux, à l'exception de PEGASUS (Boast et al., 2021; Molnár and Georgopoulos, 1994; Nakase et al., 2002). Ainsi, IKAROS et HELIOS possèdent respectivement huit et cinq isoformes dans le modèle murin, alors qu'ils en possèdent cinq et quatre chez l'Homme (**Tableau 2**). Ces isoformes résultent de l'épissage alternatif entre les exons 2 et 7 induisant des variations dans le DBD alors que le DD demeure intact (Boast et al., 2021). Deux groupes d'isoformes peuvent être distingués : un groupe dans lequel un ou plusieurs ZF sont modifiés, et un groupe dit dominant négatif (DN), où les ZF1-4 sont absents, ce qui empêche l'interaction avec les gènes cibles (**Figure 15**). Les fonctions de ces isoformes, ainsi que leur interaction entre elles, sont particulièrement complexes et permettent une régulation fine des fonctions des IKZFs. Il est intéressant de noter que Dijon et al., 2008 a mis en évidence que la surexpression d'un isoforme d'IKAROS DN permet de bloquer l'action canonique d'IKAROS et de faciliter le passage entre l'expression de la globine foétales (γ) et des globines adultes

(β et δ) au cours de l'érythropoïèse. D'autre part, une forte expression de l'isoforme DN d'HELIOS a été décrite dans des leucémies. En empêchant l'action de la forme canonique d'HELIOS, cet isoforme favorise l'apparition de leucémies aiguës lymphoblastiques (Fujii et al., 2003; Nakase et al., 2002). Dans la MKP, la dynamique d'expression des isoformes d'IKAROS et HELIOS et leur importance fonctionnelle est inconnue.

Tableau 2 : Différents isoformes des IKZF1-5 mis en évidence expérimentalement et prédits.

Entre parenthèse les isoformes dits dominants négatifs. Co-IP : Co-immunoprécipitation, RT-PCR : Reverse transcriptase PCR.

	Humains	Souris	Methode	Références
IKZF1	4 (1)	8 (3)	Co-IP et RT-PCR	Sun et al., 1996 ; Dijon et al., 2008
IKZF2	5 (2)	5 (2)	RT-PCR	Zhao et al., 2016 ; Seng et al., 2020
IKZF3	17 (3)	4 (0)	Bio-informatique	https://www.ensembl.org/index.html
IKZF4	10 (3)	5 (0)	Bio-informatique	https://www.ensembl.org/index.html
IKZF5	5 (1)	6 (0)	Bio-informatique	https://www.ensembl.org/index.html

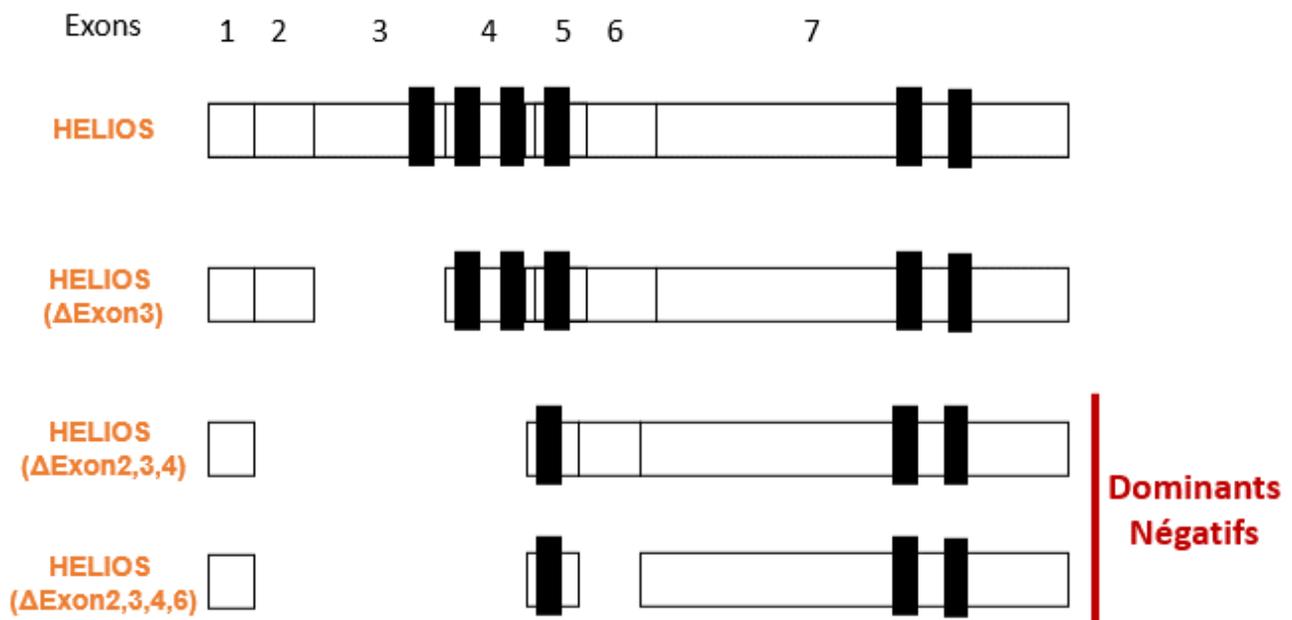


Figure 15 : Représentation schématique des différents isoformes d'HELIOS.

L'absence des ZF1-4 dans les isoforme dit dominants négatifs empêche l'interaction d'HELIOS avec d'autres protéines affectant négativement sa capacité à réguler l'expression génique. Adapté d'après Asanuma et al., 2013. DBD : domaines de liaison à l'ADN, DD : domaines de dimérisation, DN : dominants négatifs, ZF : domaines à doigt de zinc.

B. Mécanismes de régulation transcriptionnelle par les IKZFs

Bien que les IKZFs aient des profils d'expression et des fonctions distinctes au sein des cellules hématopoïétiques, ils présentent un certain nombre de mécanismes transcriptionnels communs pour exercer leur contrôle sur la transcription de leurs gènes cibles. En effet, tous les membres de la famille Ikaros interagissent directement avec l'ADN et s'associent aux régions régulatrices des gènes cibles (*promoters, enhancers, et insulators*). Cette association permet un contrôle spécifique de l'expression génique directement, en prévenant l'association de régulateurs transcriptionnels concurrents, et indirectement, par le biais du recrutement de cofacteurs comme le complexe de remodelage des nucléosomes et de désacétylation des histones (NuRD) (Read et al., 2021). Le complexe NuRD est l'un des quatre principaux complexes ATP-dépendant responsables de modifications épigénétiques de la chromatine chez l'eucaryote avec le SWItch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF), Imitation SWItch (ISWI), et l'*INO*sitol requiring 80 (INO80). Le complexe NuRD combine une activité histone-désacétylase par l'intermédiaire des protéines histones désacétylases (HDAC) 1 et 2 et une activité de remodelage des nucléosomes médiée par la protéine Mi-2 (**Figure 16**). Il fonctionne principalement comme un répresseur transcriptionnel en augmentant la densité des nucléosomes et inhibant le recrutement des FT (Bornelöv et al., 2018).

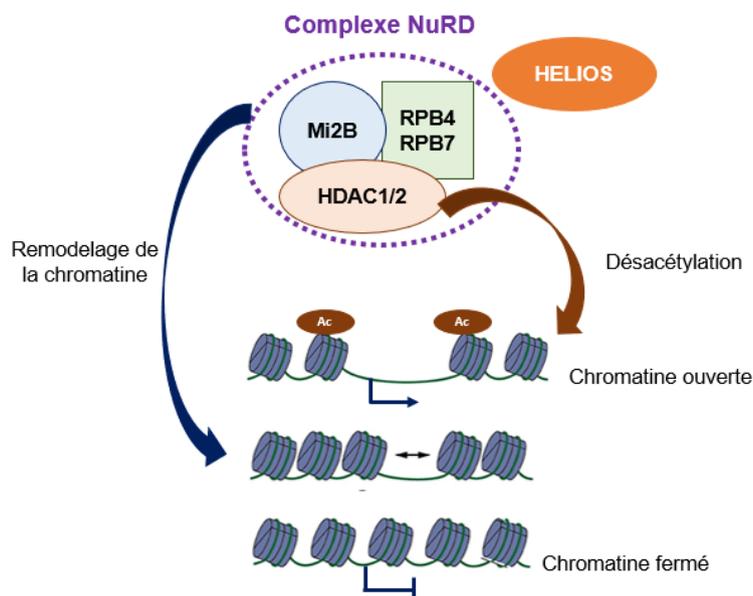


Figure 16 : Représentation schématique de la répression génique par l'intermédiaire du NuRD.

Le complexe NuRD composé des protéines Mi2B, RPB4/7 HDAC1/2 et d'autres protéines interagissent avec HELIOS (IKZF2) pour permettre une régulation négative de l'expression génique.

Ac : acétylation, HDAC : histone désacétylase, NuRD : Complexe de remodelage des nucléosomes et de désacétylation des histones, RPB : RNA Polymerase B.

Une seconde famille de complexes responsables de modifications épigénétiques interagit avec les IKZFs, il s'agit des complexes SWI/SNF. Ils ont été mis en évidence comme des régulateurs positifs de la transcription par remodelage des nucléosomes dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Stern et al., 1984). Via leur interaction avec le complexe SWI/SNF, les IKZFs activent la transcription de gènes cibles. Cependant, cette action est à relativiser, puisque ces protéines interagissent environ cinq fois plus fréquemment avec le complexe répresseur NuRD que le complexe activateur SWI/SNF (Kim et al., 1999; Read et al., 2021) (**Figure 17**). Une autre façon dont les IKZFs agissent sur la régulation génique est par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT. Cette voie de signalisation implique une tyrosine kinase (JAK) et une protéine qui permet la transduction du signal (STAT). En réponse à la liaison de cytokines avec leurs récepteurs, JAK phosphoryle STAT qui se dimérise puis est importé dans le noyau, où il active des gènes régulant la réponse immunitaire, la croissance et la survie cellulaire (O'Shea et al., 2015).

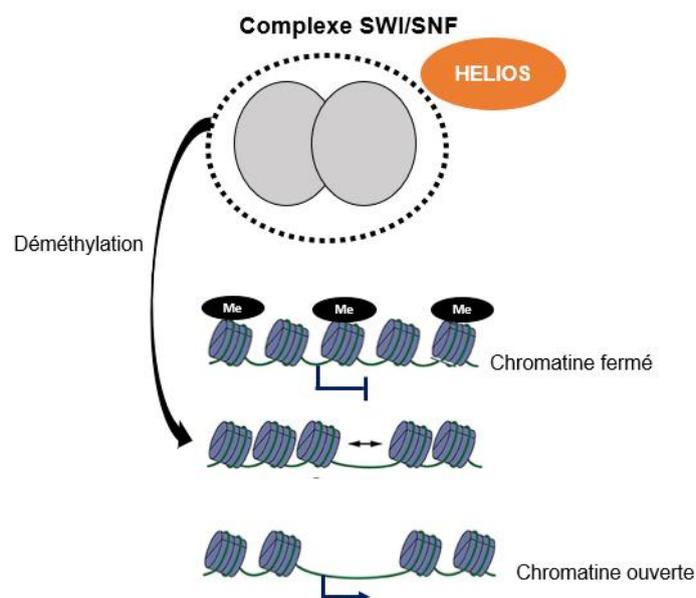


Figure 17 : Figure 16 : Représentation schématique de l'activation génique par le SWI/SNF.

Le complexe SWI/SNF lorsqu'il interagit avec HELIOS permet une déméthylation de la chromatine afin d'activer l'expression génique. Me : méthylation, SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable.

Si les fonctions des IKZFs ont été principalement étudiées dans la lymphogénèse, leur rôle dans la MKP est moins documenté et fait l'objet de cette thèse. Dans la prochaine partie, je me focalise leurs différents rôles dans ce processus.

C. Fonctions des IKZFs dans la mégacaryopoïèse

Les IKZFs sont détectées tout au long de l'hématopoïèse, depuis les CSH jusqu'aux cellules matures des lignées érythro-mégacaryocytaires, lymphoïdes et myéloïdes. Au cours de la MKP, IKAROS, HELIOS et PEGASUS ont des dynamiques d'expression particulières, comme l'a montré une cartographie de l'évolution de leurs quantité d'ARN respectives dans les cellules souches et PH (**Figure 18**) (Chen et al., 2014).

Nos connaissances sur l'évolution de la quantité de protéines humaines sont plus parcellaires. La quantité d'IKAROS et d'HELIOS décroît au cours de la différenciation des mégacaryocytes (Cova et al., 2021). Quant à PEGASUS, il est présent au cours de l'hématopoïèse embryonnaire et adulte, où il semblerait plus fortement présent dans les cellules myéloïdes. Cependant, une cartographie plus précise de son expression protéique reste encore à réaliser (Uhlén et al., 2015).

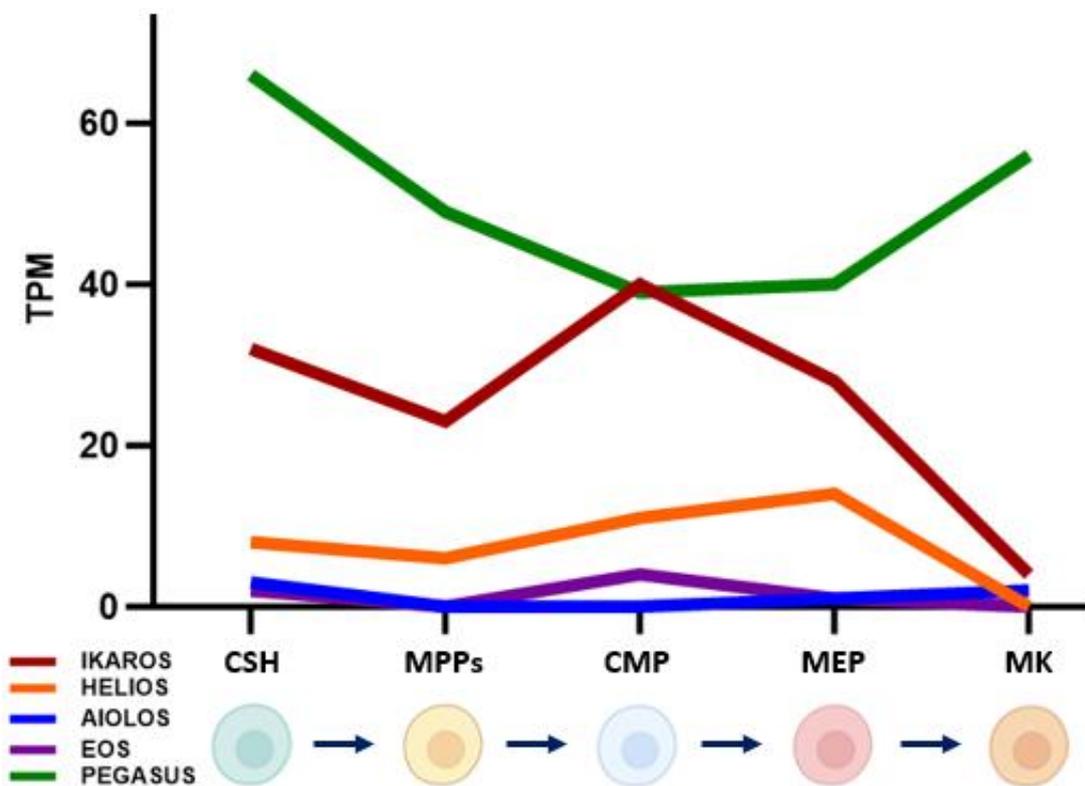


Figure 18 : Représentation de l'expression des IKZF1-5 humaines pendant la mégacaryopoïèse.

Les données représentées sont issues du Projet européen Blueprint. La quantité des ARNm est indiquée en TPM (*Transcript Per Million* ; n=4). (Chen et al., 2014). CMP: Progéniteurs Myéloïdes Communs, CSH : Cellules souches Hématopoïétiques, MEP : Progéniteurs Mégacaryocytaires-Erythroïdes, MK : Mégacaryocytes, MPP : Progéniteurs Multipotents.

1. IKAROS (IKZF1)

IKAROS est le membre de la famille des IKZFs dont les fonctions dans la MKP sont les mieux documentées. Une première étude réalisée dans un modèle de souris déficientes pour *ikzf1* a décrit une hausse de la numération plaquettaire (1500×10^3 plaquettes/ μL) et du nombre de mégacaryocytes localisés dans la rate (Lopez et al., 2002). Une étude postérieure utilisant un modèle murin complémentaire exprimant la GFP sous contrôle d'un promoteur d'*ikzf1* a permis de mettre en évidence *in vitro* que l'absence d'IKAROS dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH ; Lin- Sca1+ cKit+ GFPneg-) favorise leur engagement dans la lignée mégacaryocytaire. Au contraire, la présence d'IKAROS (HSCP ; Lin- Sca1+ cKit+ GFPneg+) entraîne un destin cellulaire orienté vers la lignée myéloïde (Yoshida et al., 2006). Enfin, une dernière étude a montré par quels mécanismes moléculaires IKAROS régule négativement la MKP dans la souris. En effet, il semblerait qu'IKAROS agisse en inhibant la différenciation induite par la voie NOTCH des CSH en mégacaryocytes, comme démontré par des expériences de surexpression d'un ligand de cette voie dans un modèle *in vitro* d'induction de la MKP par l'intermédiaire de la voie NOTCH. De plus, IKAROS réprime l'expression de gènes importants pour le développement des mégacaryocytes, comme *GATA1*. Inversement, l'abondance des transcrits d'IKAROS est également directement réduite par l'expression de *GATA1* et la liaison directe de *GATA1* au locus *Ikzf1* a été identifiée par des techniques de CHIP-seq (Malinge et al., 2013). Ces résultats suggèrent qu'IKAROS est un élément fondamental dans le déclenchement du GATA switch. De manière intéressante, ce mécanisme est spécifique à la lignée mégacaryocytaire et n'existe pas dans la lignée érythroblastique, où IKAROS coopère avec *GATA1*. Ces observations suggèrent l'existence d'effets d'IKAROS spécifiques à chaque lignée hématopoïétique (Maillard, 2013)

Chez l'Homme, IKAROS a également une fonction primordiale dans la MKP puisque sa dégradation par un médicament immuno-modulateur (IMiD) utilisé pour le traitement de leucémies a pour conséquence l'apparition de thrombopénies induites (190×10^3 plaquettes/ μL avant le traitement ; 98×10^3 plaquettes/ μL pendant le traitement) (Tochigi et al., 2020). Ce médicament, le lénalidomide, un dérivé de la thalidomide, en se liant par son cycle glutarimide à IKAROS entraîne son ubiquitination par le Cereblon puis sa dégradation par la voie du protéasome (Krönke et al., 2014). Cette molécule, utilisée pour étudier les fonctions d'IKAROS chez l'humain, a montré qu'IKAROS favorise la prolifération et maturation des mégacaryocytes ainsi que la formation de pro-plaquettes en promouvant l'expression de *GATA1*. A l'inverse, il a été établi que la perte de l'expression de *GATA1* induit une inhibition de la MKP au profit de l'érythropoïèse (Liu et al., 2018).

Enfin, notre équipe a mis en évidence une implication d'IKAROS dans l'apparition d'une population à fort pouvoir proplaquettaire CD34+ CD41+ CD42+ CD9- (Mallo et al., 2021).

2. PEGASUS (IKZF5)

PEGASUS, le membre atypique de la famille IKAROS, a été récemment mis en évidence comme un nouveau FT responsable de thrombopénies constitutionnelles. En effet, le séquençage de génome complet de plus de 13 000 individus, dont 233 atteints de thrombopénies, a permis aux auteurs d'identifier cinq familles portantes de mutations faux sens dans ou à proximité des motifs ZF du gène *IKZF5*. Ces mutations ont pour conséquence une perturbation de la liaison de PEGASUS à la chromatine, la réduction de la formation de proplaquettes par les mégacaryocytes et une quantité réduite de granules α contenue par les plaquettes (Lentaigne et al., 2019). Une étude postérieure a permis d'identifier deux autres mutations faux sens qui se traduisent par une numération plaquettaire réduite ($50-100 \times 10^3$ plaquettes/ μL) et des saignements spontanés. Elle met aussi en évidence un changement de l'expression de la myosine non musculaire IIA (MYH9) et des isoformes α - et β -tubuline menant à des perturbation de l'organisation du cytosquelette et *in fine* à la perturbation des fonctions plaquettaires (Leinoe et al., 2021). Il est intéressant de noter que ces mutations du gène *IKZF5* n'ont aucun retentissement sur les autres lignées hématopoïétiques faisant de PEGASUS un FT hautement spécifique de la MKP (Lentaigne et al., 2019).

Parmi les variants d'*IKZF5*, les mutations faux-sens de résidus hautement conservés dans les ZF N-terminaux ont montré une forte réduction de la liaison à la chromatine et ont inhibé la translocation nucléaire, ce qui suggère que le mécanisme sous-tend l'activation transcriptionnelle d'*IKZF5* pour la formation des plaquettes (Warren and Di Paola, 2022).

3. HELIOS (IKZF2)

Bien que peu étudié dans la MKP, HELIOS a été récemment mis en lumière comme un répresseur de l'engagement des progéniteurs murins dans la MKP. En effet, dans une étude réalisée par Cova et al., 2021, il a été observé dans des souris déficientes pour *ikzf2* une augmentation CSH CD41+ et de progéniteurs CD41+ biaisés vers la voie mégacaryocytaire, les MPP2. Cette accumulation des progéniteurs MPP2/CD41+ se traduit ensuite par une augmentation du nombre de précurseurs de mégacaryocytes CD41+ dans la moelle osseuse de ces souris. Cependant, aucune donnée sur les répercussions en termes de maturation des mégacaryocytes, de production de plaquettes et de leurs fonctions n'a été rapporté chez les souris déficientes pour *ikzf2*. Cette étude, qui utilise des analyses de RNAseq, ChIP-seq et ATAC-seq, a également démontré qu'HELIOS empêche l'accès de GATA2 et RUNX1, deux FT clés de l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire à leurs gènes cibles en occupant les promoteurs reconnus par ces FT (Cova et al., 2021). On peut alors se poser la question de la répercussion sur la MKP de l'absence d'HELIOS, d'autant plus que l'absence d'un facteur de la même famille, IKAROS, favorise la production de plaquettes (Malinge et al., 2013).

De plus, chez plusieurs patients atteints de déficits immunitaires (lupus systémique, anémie et thrombopénie immune, hypogammaglobulinémie) et d'anomalies au niveau du développement cérébral, des mutations faux-sens et non-sens d'*IKZF2* ont été récemment identifiées (Hetemäki et al., 2021; Mohajeri et al., 2023; Shahin et al., 2021; Shahin et al., 2022). Les altérations de l'hématopoïèse constatées sont probablement dues à l'absence de liaison d'HELIOS à la chromatine ainsi que d'interaction entre HELIOS-IKAROS et AIOLOS montrée par co-immunoprécipitation. De plus, l'interaction d'HELIOS avec les composant du complexe NuRD est également altéré comme l'a mis en évidence une technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse après marquage de proximité par la biotine (BioID) (Shahin et al., 2022).

OBJECTIFS DE THESE

L'équipe que j'ai intégrée pour réaliser ma thèse se concentre sur l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires régulant les différentes étapes de la MKP. À mon arrivée au laboratoire, l'équipe venait de démontrer que le Stemregenin-1 (SR1), un antagoniste du récepteur AHR (*Aryl-Hydrocarbon Receptor*), favorise l'augmentation de la production de plaquettes par son interaction avec le FT IKAROS (IKZF1). En effet, en inhibant l'activité canonique de l'AHR, le SR1 promeut son interaction avec IKAROS, facilitant ainsi l'émergence d'une population de progéniteurs mégacaryocytaires hautement compétents (CD34+ CD9- CD41+ CD42+), ce qui conduit à une production accrue de plaquettes.

Un second membre de la famille IKAROS, HELIOS (IKZF2) a été récemment identifié dans une lignée de souris déficientes pour le gène *ikzf2* comme réprimant le destin mégacaryocytaire des CSH. En effet, l'absence d'HELIOS a pour conséquence une augmentation de la proportion de CSH CD41+, de MPP2 CD41+ et de progéniteurs de mégacaryocytes dans la moelle de ces souris. L'absence d'HELIOS entraîne un accès plus facile aux régions régulatrices de gènes favorisant la MKP comme *GATA2* et *RUNX1* ce qui permet un engagement accru des CSH dans la lignée mégacaryocytaires (Cova et al., 2021). Cependant, les répercussions de l'absence d'HELIOS sur la maturation des mégacaryocytes, la production de plaquettes et les fonctions plaquettaires chez la souris n'ont pas encore fait l'objet d'études approfondies. De plus, les fonctions d'HELIOS dans la MKP humaine n'ont jamais été étudiées.

Le but de cette thèse a donc été de mieux comprendre les fonctions d'HELIOS dans l'engagement des CSH humaines dans la lignée mégacaryocytaire, ainsi que de déterminer son rôle dans la maturation des mégacaryocytes et son impact sur la production de plaquettes. Pour cela, j'ai caractérisé les conséquences de la dégradation d'HELIOS sur chacune des étapes de la MKP dans les CSH humaines, en analysant les changements phénotypiques, transcriptionnels et fonctionnels associés à la perte de ce FT.

Enfin, j'ai eu accès à des souris déficientes pour *ikzf2*. Dans ce modèle, j'ai commencé à évaluer l'impact de l'absence d'HELIOS sur le nombre et la fonction des progéniteurs mégacaryocytaires, ainsi que sur la production de plaquettes et leurs fonctions.

RESULTATS

EXPERIMENTAUX

INTRODUCTION

Dans la hiérarchie classique, les CSH se différencient en mégacaryocytes au cours d'un processus hiérarchique et progressif où elles perdent leur multipotence et leur capacité d'auto-renouvellement. Tout d'abord, les CSH donnent naissance à des MPP, marquant le début de la première divergence de lignée en LMP et CMP. Par la suite, les CMP se différencient en GMP et MEP, qui permettent l'apparition de la lignée érythro-mégacaryocytaire. Ces progéniteurs MEP oligopotents se différencient en progéniteurs unipotents, aboutissant à la formation d'érythrocytes et de mégacaryocytes (Gao et al., 2023; Laurenti and Göttgens, 2018).

La MKP est le processus par lequel les mégacaryocytes sont produits à partir des CSH dans la moelle osseuse. Lors de la première étape, les CSH sortent de leur état quiescent pour produire des PH hautement prolifératifs (Noetzli et al., 2019). Ces cellules peuvent alors s'engager dans la voie mégacaryocytaire et entrer dans une phase de maturation qui passe par des processus d'endoréplifications, aboutissant à la formation de cellules polyploïdes et la formation d'un réseau intracellulaire membranaire complexe appelé DMS (Vainchenker et al., 2021). Aux derniers stades de maturation, le mégacaryocyte entre en contact avec les vaisseaux sinusoides et projette des portions cytoplasmiques, les pro-plaquettes dans la lumière vasculaire, qui seront fragmentées sous la contrainte des forces hémodynamiques libérant ainsi les plaquettes sanguines dans la circulation. (Patel et al., 2005; Serre et al., 2011).

Au cours de la MKP, un réseau complexe de FT orchestre le devenir des CSH et leur maturation en modulant l'accessibilité à la chromatine et la transcription des gènes. Au cours des premières étapes de l'engagement des CSH, des FT tels que ETV-6, GATA1, FOG-1 et TAL-1 jouent un rôle crucial dans leur orientation vers le MEP. ETV-6 et TAL-1 sont particulièrement importants pour la spécification initiale de la lignée, tandis que GATA1 et FOG-1 agissent de concert pour renforcer l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire. Au fur et à mesure que ces progéniteurs s'engagent dans la lignée mégacaryocytaire, des FT tels que RUNX1, NF-E2 et FLI-1 jouent un rôle plus important. RUNX1 est indispensable à l'initiation du programme mégacaryocytaire, tandis que NF-E2 et FLI1 régulent les processus essentiels de la maturation des mégacaryocytes (Nurden and Nurden, 2020; Tijssen et al., 2016).

Dans ce réseau de régulation complexe, la famille de FT IKAROS apparaît comme un contributeur essentiel à la MKP. Cette famille de FT comprend cinq membres : IKAROS (IKZF1), HELIOS (IKZF2),

AIOLOS (IKZF3), EOS (IKZF4) et PEGASUS (IKZF5). Si les membres de la famille IKAROS ont principalement des fonctions dans la lymphogénèse (Heizmann et al., 2018), IKAROS, PEGASUS et HELIOS sont impliqués dans la régulation de la MKP. Le rôle d'IKAROS dans la régulation du développement précoce des mégacaryocytes a été démontré par des études utilisant des modèles de souris déficientes en *ikzf1* et des dégradeurs spécifiques d'IKAROS. L'absence d'IKAROS dans les CSPH murines entraîne une formation accrue de cellules de la lignée érythro-mégacaryocytaire. En outre, il a été démontré qu'IKAROS réprime l'expression de plusieurs gènes mégacaryocytaires dont *GATA1* et module l'activité de la voie de signalisation NOTCH, qui joue un rôle essentiel dans l'engagement au sein de la lignée mégacaryocytaire (Malinge et al., 2013; Yoshida et al., 2006). Chez l'humain, la dégradation d'IKAROS par un médicament IMiD, le lénalidomide réduit la prolifération, la maturation des mégacaryocytes et la formation de pro-plaquettes ce qui a pour conséquence des thrombopénies induites (Liu et al., 2018; Tochigi et al., 2020). Notre groupe de recherche a également identifié une interaction entre IKAROS et l'AHR, un récepteur de xénobiotiques, importante pour favoriser la maturation des mégacaryocytes et une libération efficace des plaquettes (Mallo et al., 2021). Des études ont montré qu'au-delà du rôle d'IKAROS, des mutations faux-sens dans le gène *IKZF5* sont associées à des défauts dans la production de plaquettes causée par une maturation des mégacaryocytes et une biogénèse des granules déficiente (Leino et al., 2021; Lentaigne et al., 2019). Enfin, une étude récente a démontré qu'HELIOS est fortement exprimé dans les CSPH murines, où il joue un rôle crucial dans le maintien de la quiescence en réprimant directement le programme d'expression génique des mégacaryocytes au stade des cellules souches. Cette répression est obtenue par la compaction de la chromatine dans les régions régulatrices des gènes spécifiques des mégacaryocytes, qui sont typiquement reconnues par des FT favorisant la MKP comme *GATA2* et *RUNX1*. Ces résultats suggèrent qu'HELIOS joue un rôle dans le maintien de la pluripotence dans les CSH en réprimant continuellement le destin mégacaryocytaire (Cova et al., 2021).

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer la répercussion de l'absence d'HELIOS sur la MKP humaine et murine. Nous avons étudié l'impact de l'absence d'HELIOS sur l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire, la maturation des mégacaryocytes ainsi que sur la production de plaquettes et leurs fonctions.

MATERIELS ET METHODS

Extraction des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ humains. Les PH CD34+ sont extraits à partir de filtres de leucodéplétion (TACSI, Terumo BCT) utilisés pour la préparation des produits sanguins labiles. Les cellules contenues dans le filtre sont éluées et enrichies en cellules CD34+ selon une méthode précédemment publiée par Pongerard et al., 2021.

Les études sur l'Homme ont été réalisées conformément à la déclaration d'Helsinki. Toutes les procédures ont été enregistrées et autorisées par le ministère français de la recherche et de l'enseignement universitaire pour le transfert à des fins de recherche (AC_2020_3991). Les échantillons humains ont été prélevés sur des donneurs de sang volontaires sains qui ont donné leur consentement éclairé par écrit. Ils ont été recrutés par le centre de transfusion sanguine où la recherche a été effectuée (Etablissement Français du Sang-Grand Est).

Dégradation d'HELIOS. Les cultures sont traitées aux jours 0 et 3 avec 10 μ M d'ALV2 (MedChemExpress #HY-137206), un dégradeur sélectif d'HELIOS décrit par Wang et al., 2021, ou du DMSO (véhicule). La dégradation sélective d'HELIOS a été vérifiée par cytométrie en flux pendant la culture (**Figure Suppl. 1**).

Test clonogénique MethoCult. Les test clonogéniques MethoCult ont été réalisés à l'aide d'un kit MethoCult™-C avec cytokines H4434 (StemCell Technologies #04434) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 5 000 cellules CD34+ ont été cultivées dans 750 μ L de milieu à base de méthylcellulose contenant de la TPO, de l'EPO, du GM-CSF et de l'IL-3 et, dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ pendant dix jours. Les colonies sont comptées à l'aide d'un microscope Leica DMLB et trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicat.

Test clonogénique DualCult. Les test clonogéniques DualCult ont été réalisés à l'aide d'un kit complet MegaCult™-C avec cytokines (StemCell Technologies #04971) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 2 500 cellules CD34+ ont été cultivées dans 750 μ L de milieu à base de collagène contenant de la TPO (50 ng/mL), de l'EPO (3 U/mL), du LDL (40 μ g/mL), du SCF (25 ng/mL), de l'IL-3 (10 ng/mL) et de l'IL-6 (10 ng/mL), dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ pendant dix jours (les cytokines proviennent de Stemcell Technologies). Après fixation au méthanol/acétone, les mégacaryocytes ont été marqué avec des anticorps CD41-488 (Biolegend #303724) et CD235a-647 (BioLegend #349129). Les noyaux ont été colorés avec du DAPI (Invitrogen #62248). Les colonies colorées ont été comptées sous un microscope à épifluorescence Leica DMI8 et trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicat.

Différenciation en mégacaryocytes et cellules érythroïdes humaines en culture. 25 000 cellules CD34+ ont été cultivées dans 500 µL de milieu Stemsan SFEM (Stemcell technologies #09650), contenant 25 000 cellules CD34+ ont été cultivées dans 500µL de milieu Stemsan SFEM (Stemcell technologies #09650), contenant de la TPO (50 ng/mL), de l'EPO (3 U/mL), du LDL (40 µg/mL), du SCF (25 ng/mL), de l'IL-3 (10ng/mL) et de l'IL-6 (20 ng/mL) et de la PSG 1X (Thermofisher, les cytokines proviennent de Stemcell Technologies) dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ pendant sept jours.

Différenciation en mégacaryocytes humains en culture. 40 000 cellules CD34+ ont été cultivées dans 1mL de milieu de Stemsan SFEM (Stemcell technologies #09650) contenant du StemSpan Expansion Supplement 1X (CC220), du LDL (40 µg/mL) et du PSG 1X (Thermofisher), dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ pendant sept jours. Les cellules sont ré-ensemencé pendant sept jours dans un milieu de Stemsan SFEM (Stemcell technologies #09650) contenant du SR1 (1 µM), du LDL (40 µg/mL) de la TPO (50 ng/mL) et du PSG 1X (Thermofisher, les cytokines proviennent de Stemcell Technologies), selon le protocole précédemment publié par Pongerard et al., 2021 afin d'obtenir des mégacaryocytes matures émettant des proplaquettes.

Cytométrie en flux. A différents jours de culture, les cellules ont été marquées avec les anticorps détaillés dans le **Tableau 3**. Les cellules lavées ont été remises en suspension dans du PBS contenant du DAPI (Invitrogen #62248) et analysées avec le cytomètre en flux BD LSR Fortessa. Pour les protéines intracellulaires, une fixation et une perméabilisation avec le kit *eBioscience™ FOXP3/Transcription factor staining buffer Set* (Thermofisher #00-5523-00) en suivant les consignes du fabricant.

Tableau 3 : Anticorps utilisés en cytométrie en flux.

Anticorps	Référence	Fournisseur
anti- CD34-PE-Cy7	#343615	Biolegend
anti-CD36-APC Cy7	#336214	Biolegend
anti-CD38-PE	#303537	Biolegend
anti-CD41-488	#303724	Biolegend
anti-CD42d-647	#559919	Biolegend
anti-CD45RA-647	#304154	Biolegend
anti-CD49f-APC-Cy7	#313627	Biolegend
anti-CD71-PerCP CY55	#334114	Biolegend
anti-CD90-700	#328119	Biolegend
anti-CD135-APC	#135309	Biolegend
anti-HELIOS-PE	#293605	OZYME
anti-CD9-PE	#312106	Biolegend
anti-GPVI-647	#564701	BD Bioscience
anti-CD62P-FITC	#550866	BD Bioscience
Contrôle isotypique IgG- FITC	##5117-F100T	Biocytex
anti-GPIb α -568		UMR_S 1255
anti- GPIb β -647		UMR_S 1255
anti- GPIIb-IIIa -488		UMR_S 1255
anti GPV-647		UMR_S 1255

Analyse de la ploïdie. Au jour 10 de la culture, les cellules ont été incubées pendant 2 h à 37°C avec du Hoechst 33342 (Thermofisher #62249) puis marquées avec un anticorps anti -CD41-488 (Biolegend #303724). Les cellules lavées ont été remises en suspension dans du PBS contenant du 7-AAD (Thermofischer #A1310) et analysées avec le cytomètre en flux BD LSR Fortessa X20 (BD BioSciences).

Tri cellulaire. Après dix jours de culture dans le milieu permettant la différenciation en mégacaryocytes, les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD34-PE-Cy7 (Biolegend #343615), anti-CD41-488 (Biolegend #303724) et trié avec un trieur BD FACSAria puis remis en culture sept jours dans un milieu contenant 50 ng/mL de TPO (Stemcell technologies #02822), 1 μ M de SR1 (Stemcell technologies #72344) et PSG 1X (Thermofisher # 10378016). Le tri des MEP et CMP a été réalisé de manière similaire au troisième jour de culture dans le milieu permettant la différenciation en mégacaryocytes et cellules érythroïdes.

Immunofluorescence. Après fixation au PFA 4% (paraformaldéhyde, Electron Microscopy Sciences #15700), les mégacaryocytes sont cytopspinés sur des lames de poly-L-lysine (VWR international #MFLX75955-45), perméabilisés avec 0,1% de Triton X-100 (Merck # 108643) et incubées avec un anticorps primaire puis secondaire, dilués dans du PBS contenant 1% de BSA (Bovin Serum Albumin, Euromedex #04-100-812). Entre chaque étape d'incubation, trois lavages avec du PBS sont effectués. Les noyaux des cellules sont ensuite marqués au DAPI (Invitrogen #62248), dilué à 1/36 000, pendant 5 minutes dans l'obscurité. Les cellules sont ensuite incorporées dans du ProLong™ Gold (Invitrogen # P36987) et examinées au microscope confocal (TCS SP8, Leica Microsystems) équipé d'un objectif à huile. Les données sont acquises avec le logiciel LASAF, version 1.62 (Leica Microsystems). Des images de dix champs larges différents ont été acquis et les mégacaryocytes émettant des proplaquettes ont été comptés. Les anticorps utilisés en immunofluorescence sont détaillés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Anticorps utilisés en immunofluorescence.

Anticorps	Origine	Référence	Fournisseur
anti-Tubuline α (TUBBA) -488	Souris	#53-4502-82	Invitrogen
anti-Tubuline β 1 (TUBB1)	Lapin	#5274	Eurogentec
anti-Tubuline tyrosiné (TUBtyr)	Souris	#T9028	Sigma-Aldrich
anti-vWF-488	Lapin		UMR_S 1255
anti-CD41-647	Souris		UMR_S 1255
anti-GpIb β -647	Souris		UMR_S 1255
anti IgG lapin AF 555	Chèvre	A21430	Invitrogen
anti IgG souris AF 647	Chèvre	A32728	Invitrogen

Libération des plaquettes de culture. Après 13 jours de culture, les mégacaryocytes présentent des proplaquettes. Les plaquettes sont libérées par pipetage manuel, marquées avec les anticorps anti-CD41-488 (Biolegend #303724) et CD42d-647 (BD Bioscience #559919) et analysées par cytométrie en flux. Le nombre de plaquettes libérées est estimé grâce à des tubes contenant des billes de calibration (BD Trucount™, BD Biosciences #663028). La numération plaquettaire est exprimée pour le passage de 10 000 billes puis ramené au nombre de plaquettes par mégacaryocytes.

Western Blot. Les cellules humaines sont récupérées aux jours 0, 4, 7, 10 et 12 puis lavés une fois dans une solution de PBS. Les cellules sont ensuite culotées par centrifugation à 400g pendant 5 minutes à température ambiante puis reprises dans du tampon de lyse Laemmli 1X (Biorad #1610737). Le dosage est réalisé en duplicat dans des plaques 96 puits avec une gamme étalon puis

la quantification est faite à 595 nm avec le lecteur FlexstationIII ROM v2.1.28 14Jul08 et le logiciel SoftMax Pro 5.4.4. Les échantillons (2µg/puits) sont déposés sur gel d'électrophorèse SDS avec un gradient d'acrylamide 4-15%. La migration est faite à 200V dans une solution de Tris-Glycine-SDS (Euromedex) pendant 45 minutes à 200V. Le transfert est réalisé à l'aide d'un Trans-blot Turbo (Biorad) sur une membrane de nitrocellulose en 7 minutes. La membrane est ensuite incubée 1h à température ambiante sous agitation faible dans du tampon de blocage (Sigma-Aldrich). La membrane est incubée successivement avec l'anticorps primaire anti-HELIOS (Cell Signaling # 42427S) puis secondaire anti-lapin-HRP (Jackson ImmunoResearch #111-035-144) dilués en TBS-Tween (0,1%) + BSA (0,1%) pendant 1h à température ambiante sous agitation faible. Trois lavages au TBS-Tween (0,1%) sont réalisés sous agitation forte à température ambiante entre chaque incubation. Enfin, la membrane est incubée pendant 3 minutes dans une solution de Clarity ECL (Biorad #1705060) puis révélée avec la machine ChemiDOC XRS (Biorad) et le logiciel ImageLab. Les résultats ont été normalisés par rapport à la protéine de référence GAPDH (Cell Signaling ##2118).

RT-qPCR. Les cellules humaines sont récupérées aux jours 0, 4, 7, 10 et 12 puis lavées une fois dans une solution de PBS à 4°C. Les cellules sont ensuite culotées par centrifugation à 400g pendant 5 minutes à 4°C. L'ARN total a été extrait des progéniteurs CD34+ fraîchement isolés à l'aide d'un kit RNeasy® Mini (Qiagen #74104). 250 ng d'ARN ont été transcrits en sens inverse avec la transcriptase inverse SuperScript III (Invitrogen #18080044) dans un volume de réaction final de 30 µL. La qPCR a été réalisée à l'aide du RT2 SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen # 330513) dans un thermocycleur CFX96 Touch (Biorad). Les niveaux de transcription relatifs ont été calculés par la méthode du $\Delta\Delta Ct$ avec la TBP comme gène de référence. Les amorces utilisées pour les gènes *TBP*, *IKZF1*, *AHR*, *C-MYB* ont été achetées chez Genecopoeia et les autres décrites dans le **Tableau 5** ont été commandées chez Eurofins.

Tableau 5 : Couples d'amorces utilisées en RT-qPCR.

Gènes	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
<i>IKZF2</i>	ACACTCTGGAGAGAAGCCGTTTC	CCAGTGAAGTGCCTGCTTGTA
<i>GATA2</i>	CAGCAAGGCTCGTTCCTGTTCA	ATGAGTGGTCGGTTCTGCCCAT
<i>RUNX1</i>	CCACCTACCACAGAGCCATCAA	TTCACTGAGCCGCTCGGAAAAG
<i>KLF1</i>	TTGCGGCAAGAGCTACACCAAG	GTAGTGGCGGGTCAGCTCGTC
<i>NFE-2</i>	GGAGAGATGGAAGTACTTGGC	GAATCTGGGTGGATTGAGCAGG

Souris utilisées. Nous avons utilisé des souris C57BL/6 (Charles-River, Grenoble, France) et *ikzf2* KO mâles comme femelles âgées de 9 à 20 semaines. Les souris *ikzf2* KO ont été générées comme décrit dans Cai et al., 2009 et données par P. Kastner (IGBMC, Strasbourg, France). L'exon 7 du gène *ikzf2* a été remplacé par une cassette PGK-néo (phosphoglycérate kinase-néomycine) flanquée de site LoxP de 1,8 kb. Les souris ont été génotypées par PCR avec le kit HotStarTaq Master Mix #203445 de Qiagen (Hilden, Allemagne) après prélèvement de poils et extraction d'ADN avec le Kit QIAamp DNA micro (Qiagen #56034) et les oligonucléotides suivants : Oligo ACB 286 (5'-CATTAGCAGGGAAACATCTGATAG-3') ; Oligo AHE 49 (5'-ATCTGCACGAGACTAGTGAGACG-3') ; Oligo AHF 12 (5'-AGCATCCAAAGCCTTGACATC-3') commandés chez Eurofins. Les souris sont hébergées à l'animalerie de l'UMR_S1255 (agrément n°67-482-10). Les expériences ont été approuvées par le Comité régional d'éthique de l'expérimentation animale de Strasbourg (CREMEAS, CEEA-35) et autorisées par le Ministère français de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, conformément à la réglementation de la Communauté européenne.

Obtention et mise en culture des progéniteurs hématopoïétiques Lin⁻. Les PH Lin⁻ des souris sont obtenus puis mis en culture selon la méthode décrite par Kimmerlin et al., 2021. Brièvement, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les fémurs et tibias sont prélevés, les épiphyses des os sont retirées puis la moelle osseuse est éjectée des os par un flux de DMEM/PSG 1% à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille 21G. Pour obtenir une suspension cellulaire homogène, la suspension passe successivement à travers des aiguilles de calibre 21G, 23G, puis 25G. La suspension est ensuite enrichie en cellules souches et PH Lin⁻ par tri sur billes magnétiques à l'aide du kit de tri Lin⁻ *EasySep Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Isolation* (Stemcell technologies #19856) en suivant les recommandations du fournisseur. Les cellules sont comptées et la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL dans un milieu de culture contenant du DMEM (Invitrogen #10564011), 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 1% de PSG (Thermofischer), 50 ng/mL de rhTPO (Euromedex), et 100 U/mL d'hirudine (Euromedex). Les cellules sont ensuite réparties dans une plaque de culture à 12 puits et placées en incubation à 37°C avec 5% de CO₂ et en atmosphère saturée en humidité pendant quatre jours. Au troisième et au quatrième jour de culture, des images de dix champs larges différents ont été acquies avec un microscope Leica DMLB et la taille des mégacaryocytes a été mesurée et la proportion de mégacaryocytes émettant des proplaquettes a été comptée.

Numérations formule sanguine. Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane 4% et maintenu avec de l'isoflurane 2%. Une fine section de l'extrémité de la queue est réalisée afin de prélever du sang, en

utilisant un rapport de 1:1 avec de l'EDTA 12 mM (Euromedex) comme anticoagulant. Le sang mélangé est ensuite analysé à l'aide d'un compteur automatique Element HT5 (scil animal care company).

Microscopie électronique à transmission. Les échantillons sont préparés par la plateforme de microscopie électronique de l'UMR_S1255 en suivant le protocole établi par Eckly et al, 2012. En résumé, les moelles osseuses après éjection des fémurs ont été fixées dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1 M (Merck) contenant 2,5% de glutaraldéhyde (Electron Microscopy Sciences), puis post-fixées avec du tétroxyde d'osmium à 1% (Merck). Ensuite, les moelles osseuses sont déshydratées dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante, puis incluses dans de la résine Epon (Ladd Research Industries) avant d'être coupées en sections ultrafines de 100 nm à l'aide d'un ultramicrotome UltraCut UCT (Microsystems). Les coupes sont ensuite contrastées avec du citrate de plomb (Merck) et de l'acétate d'uranyle (Ladd Research Industries), puis examinées au microscope électronique CM 120 BioTwin (Philips).

Dosage des cytokines sériques. La concentration de TPO et de TNF α dans les sérums des souris a été dosée par ELISA à l'aide des kits *Mouse thombopoietin quantikine ELISA kit* (R&D Systems #MTP00) et *Mouse TNF alpha ELISA kit – quantikine* (R&D Systems #MTA00B) en suivant les consignes du fournisseur.

Temps de saignement à la queue. Les queues des souris anesthésiées ont été amputées de 3 mm dans leur partie distale et immédiatement immergées dans une solution saline à 0,9% à 37°C. Le temps de saignement comptabilisé correspond au temps du premier saignement et des reprises du saignement s'il y en a eu.

Agrégation plaquettaire. Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de kétamine 1% + xylazine 0,2% à raison de 10 mg/kg. Le sang est prélevé par ponction aortique avec une aiguille 25G montée sur une seringue contenant 1 volume d'ACD (anticoagulant) pour 6 volumes de sang. Le sang total est centrifugé pendant 50 secondes à 2300g afin de séparer le plasma riche en plaquettes (PRP) du reste des cellules sanguines. Le PRP est ensuite centrifugé pendant 2,5 minutes à 2200g pour culoter les plaquettes sanguines. Elles sont re-suspendues dans une solution de lavage (tampon Tyrode-Aroninlbumine 0,35% + 10 U héparine/mL + 0,5 μ M PGI₂) puis centrifugées pendant 2,5 minutes à 1900g après addition de PGI₂. Les plaquettes subissent un deuxième cycle de lavage-centrifugation puis sont reprises dans une solution finale de Tyrode-Albumine 0,35% + 0.02 U/mL apyrase à une concentration de $1,5 \cdot 10^5$ plaquettes/mL après comptage sur analyseur automatique Element HT5 (scil animal care company). Après chaque centrifugation, la suspension

plaquettaire est maintenue pendant 10 minutes au bain marie à 37°C. L'agrégation plaquettaire est mesurée par turbidimétrie dans un agrégomètre APACT 4004 (Labitec). Pour chaque condition, 270 µL de plaquettes lavées sont placés sous agitation puis incubés soit avec de l'ADP (0,5 µM) ou du collagène (0,625 µg/mL) en présence de fibrinogène (0,05 mg/mL) soit avec de la thrombine seule (0,05 U/mL) dans un volume final de 300 µL. Le pourcentage d'agrégation est évalué en temps réel par le logiciel APACT LPC Soft.

Statistiques. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± SEM. La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test t de Student non apparié et bilatéral ou d'une ANOVA à sens unique suivie du test post-hoc de Bonferoni (Prism, Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Les valeurs P inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

RESULTATS

L'absence d'HELIOS joue un rôle clé dans la régulation de l'équilibre entre l'engagement dans les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires en favorisant la mégacaryopoïèse

Pour analyser la fonction d'HELIOS, nous avons commencé par déterminer sa localisation dans les différentes populations de PH CD34+ humains avant la culture. Nous avons identifié les CSH/MPP comme CD34+ CD38- CD45RA- CD49f+/- CD90+/-, les MLP comme CD34+ CD38+ CD45RA+, les CMP comme CD34+ CD38+ CD45RA+ CD135+, les GMP comme CD34+ CD38+ CD45RA- CD135+ et les MEP comme CD34+ CD38+ CD45RA- CD135-. Une analyse intracellulaire par cytométrie en flux de ces cellules avant la culture a révélé une proportion de 91,5% de CMP HELIOS+ et de 92,1% de MEP HELIOS+. Dans les CMP et MEP l'intensité de fluorescence pour HELIOS était respectivement de 2,07 fois et 2,18 fois supérieur à celle dans les CSH/MPP (**Figure 19A**). Nous avons ensuite étudié la fonction d'HELIOS dans les PH CD34+ humains après sa dégradation chimique à l'aide d'ALV2 (10 µM), un dégradeur sélectif d'HELIOS (**Figure Suppl. 1**). Nous avons étudié le potentiel hématopoïétique des PH CD34+ humains par des tests clonogéniques MethoCult permettant d'explorer leur potentiel myéloïde. En l'absence d'HELIOS, nous avons observé une multiplication par 1,20 des CFU granulocytes-monocytes (CFU-GM), une multiplication par 1,36 des CFU granulocytes-érythrocytes-monocytes-mégacaryocytes (CFU-GEMM), une multiplication par 4,45 de CFU-mégacaryocytes (CFU-MK), une multiplication par 2,61 de CFU mixtes érythroïdes-mégacaryocytes (CFU-E/MK) et une multiplication par 0,56 des progéniteurs précoces d'érythrocytes, les BFU érythroïdes (BFU-E) (**Figure 19B**). Pour mieux comprendre l'influence de l'absence d'HELIOS sur la voie érythro-mégacaryocytaire, nous avons étudié l'effet de l'absence d'HELIOS sur la formation de colonies érythroïdes et mégacaryocytaires dans un tests clonogénique DualCult, permettant uniquement l'apparition des cellules de ces deux lignées. En l'absence d'HELIOS, une diminution de la proportion de colonies CFU-E a été observée, accompagnée d'une augmentation de la proportion de colonies CFU-E/MK et CFU-MK, respectivement, avec une proportion de 29,4% et 36,7%. Une tendance comparable a été observée pour le nombre de colonies (**Figure 19C**). Ensemble, ces résultats indiquent que l'absence d'HELIOS augmente la proportion des CFU-MK et E/MK au détriment des BFU CFU-E.

Pour déterminer si l'augmentation de la proportion et du nombre de colonies mégacaryocytaires observées dans les tests clonogéniques reflètent des différences fonctionnelles dans le potentiel de différenciation des PH CD34+ humains, nous avons cultivé les cellules CD34+ dans un milieu

supplémenté en cytokines nécessaires à l'engagement dans les lignées érythrocytaires et mégacaryocytaires (LDL, EPO, TPO, IL-3, IL-6, SCF) avec ou sans ALV2 à J0 et J3. La double culture a montré que dans les conditions ALV2, l'apparition des mégacaryocytes (CD41+ CD42+) était plus importante dès le cinquième jour de culture ($12,9 \pm 3,10\%$ vs $4,32 \pm 2,62\%$ cellules CD41+ CD42+, n=4, ** p<0,01) par rapport au contrôle. En revanche, les PH CD34+ humains dans les conditions ALV2 présentait un potentiel d'engagement dans la lignée érythrocytaire (CD36+ CD71+) plus faible dès le troisième jour de culture ($10,6 \pm 7,94\%$ vs $18,36 \pm 6,78\%$ cellules CD36+ CD71+, n=4, ** p<0,01) par rapport au véhicule (**Figure 19D**). Ces résultats suggèrent qu'HELIOS joue un rôle clé dans la régulation de l'équilibre entre l'engagement dans les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires et que sa perte conduit à une augmentation marquée des mégacaryocytes au détriment des cellules érythroïdes.

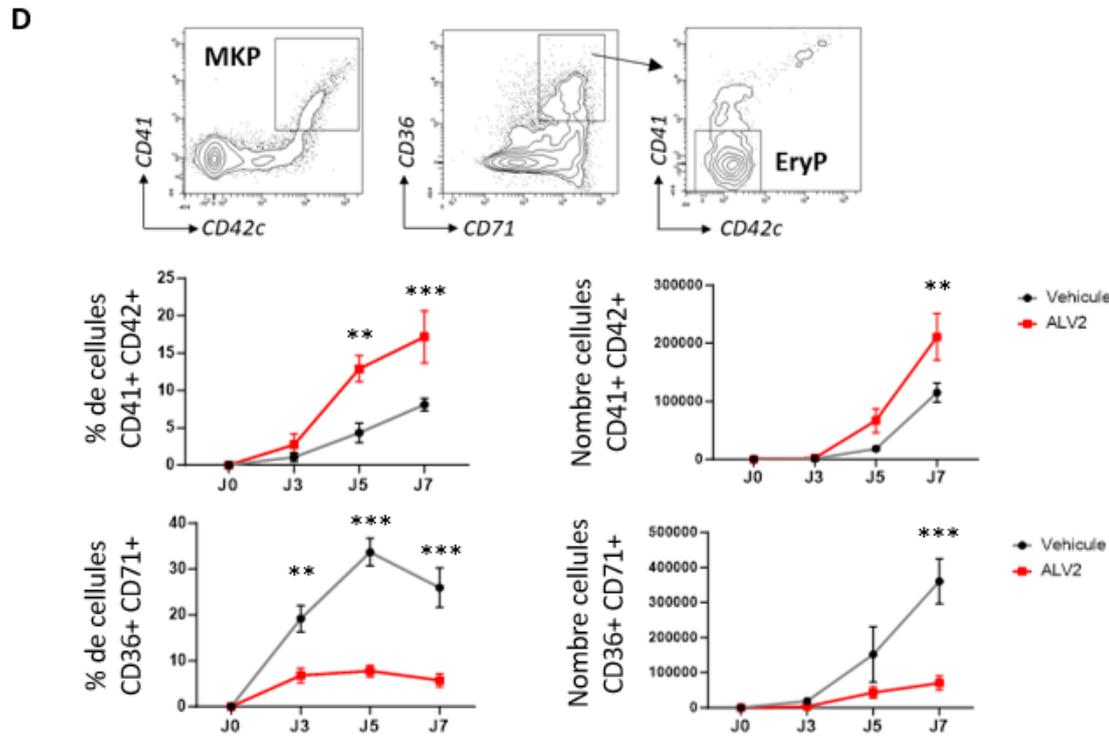
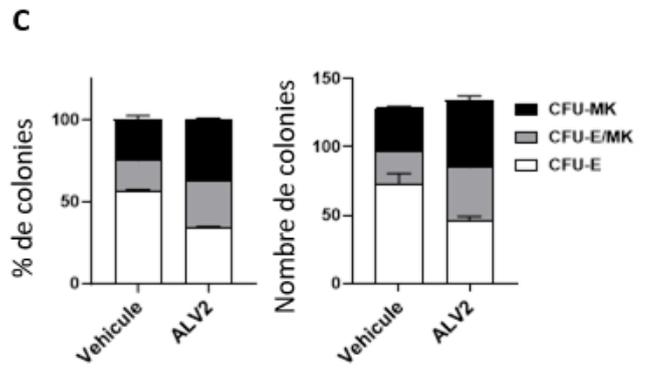
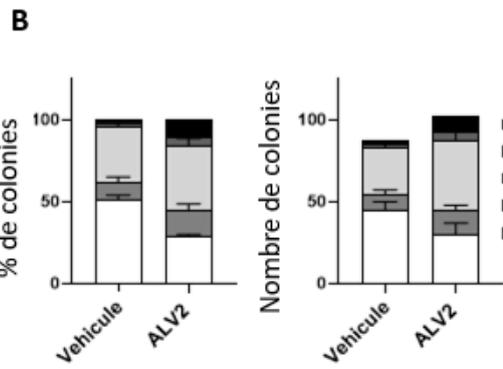
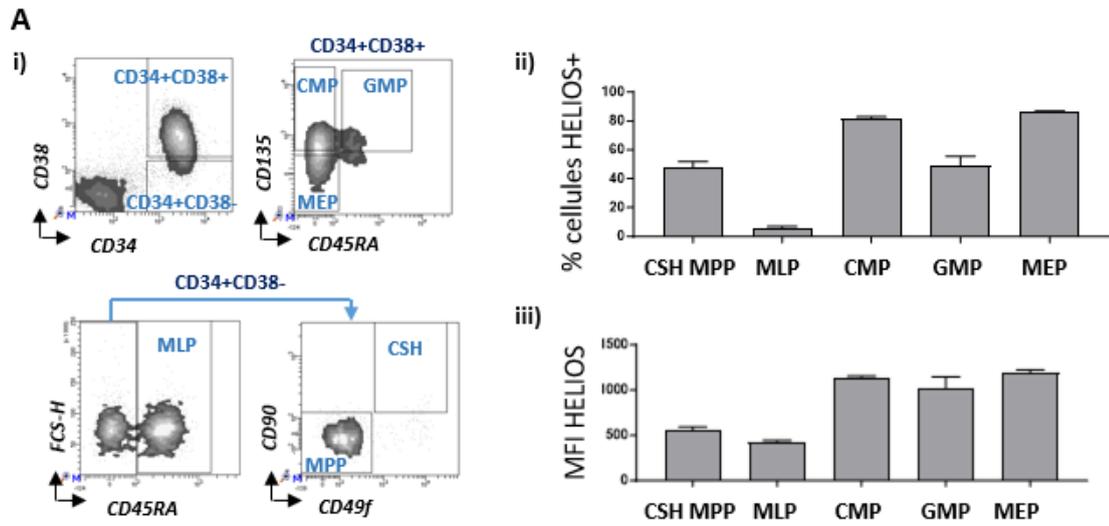


Figure 19 : Conséquences de l'absence d'HELIOS sur l'engagement dans la voie érythro-mégacaryocytaires.

(A) Analyse de la présence d'HELIOS dans les différentes populations de PH CD34+ humains avant culture par cytométrie en flux **i)** méthode d'analyse par cytométrie en flux des CSH/MPP (CD34+ CD38- CD45RA- CD49f+/- CD90+/-), des MLP (CD34+ CD38+ CD45RA+), des CMP (CD34+ CD38+ CD45RA+ CD135+), des GMP (CD34+ CD38+ CD45RA- CD135+) et des MEP (CD34+ CD38+ CD45RA- CD135-). **ii)** proportion de cellules HELIOS+ **iii)** quantité (représentée par la MFI) d'HELIOS dans les cellules (n=3). **(B)** Analyse du potentiel hématopoïétique des PH CD34+ humains par test clonogénique MethoCult (n=4). **(C)** Analyse du potentiel érythro-mégacaryocytaire des PH CD34+ humains par test clonogénique DualCult (n=3). **(D)** Cinétique d'apparition des mégacaryocytes (CD41+ CD42+) et cellules érythroïdes précoces (CD36+ CD71+) au cours de sept jours de culture de PH CD34+ humains CD34+ dans un milieu supplémenté en cytokines nécessaires à la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire (n=4, Test ANOVA, ** p<0.01, *** p<0,001).

L'absence d'HELIOS favorise l'engagement des MEP et CMP dans la voie mégacaryocytaire par d'autres mécanismes que la régulation directe par les facteurs de transcriptions étudiés

Pour déterminer comment l'absence d'HELIOS modifie la balance érythro-mégacaryocytaire au profit de la MKP, le retentissement de l'absence d'HELIOS sur la proportion des différents PH aux jours précoces de culture dans un milieu favorisant l'apparition des mégacaryocytes (CC220, LDL, SR1) a été analysée par cytométrie en flux. Nous nous sommes concentrés sur la période entre J1 et J3 où les premiers mégacaryocytes émergent passant de $5,70 \pm 1,30\%$ à J1 à $14,13 \pm 3,76\%$ à J3 dans la condition véhicule et les autres PH s'engagent dans la lignée mégacaryocytaire. La proportion des PH entre J1 et J3 est similaire dans les conditions ALV2 et véhicule (**Figure 20A**). Ces résultats suggèrent que la modification de la balance érythro-mégacaryocytaire observée en l'absence d'HELIOS n'est pas causée par un changement dans la proportion des différentes populations de PH. Cependant, il est possible que certains de ces PH même si leur proportion demeure inchangée soient « biaisés » vers la voie mégacaryocytaire en se différenciant plus facilement en mégacaryocytes. Pour le déterminer, nous nous sommes concentrés sur les progéniteurs immédiats des mégacaryocytes, les MEP ainsi que les CMP, ces deux PH ayant nativement la quantité la plus forte d'HELIOS (**Figure 19A**). Nous avons analysé après trois jours de culture en milieu favorisant l'entrée dans la voie érythro-mégacaryocytaire (LDL, EPO, TPO, IL-3, IL-6, SCF) puis tri par cytométrie en flux des populations de MEP et CMP les transcrits de FT favorisant l'entrée dans la lignée mégacaryocytaire (GATA1, GATA2, AHR, RUNX1) et érythrocytaire (IKAROS, KLF1, C-MYB) au troisième jour de culture lors de l'engagement précoce des PH CD34+ humains dans la lignée érythro-mégacaryocytaire. Dans les MEP, la quantité de transcrits des gènes *GATA1*, *GATA2*, *AHR*, *RUNX1*, *IKAROS*, *KLF1* et *C-MYB* n'est pas affectée par l'absence d'HELIOS (**Figure 20B**). Nous obtenons des résultats similaires dans les CMP où l'expression de ces FT n'est pas significativement modifiée entre la condition ALV2 et véhicule (**Figure 20C**). Ces résultats suggèrent qu'HELIOS réprimerait l'entrée dans la voie mégacaryocytaire des MEP et CMP par d'autres mécanismes que la régulation directe de ces FT.

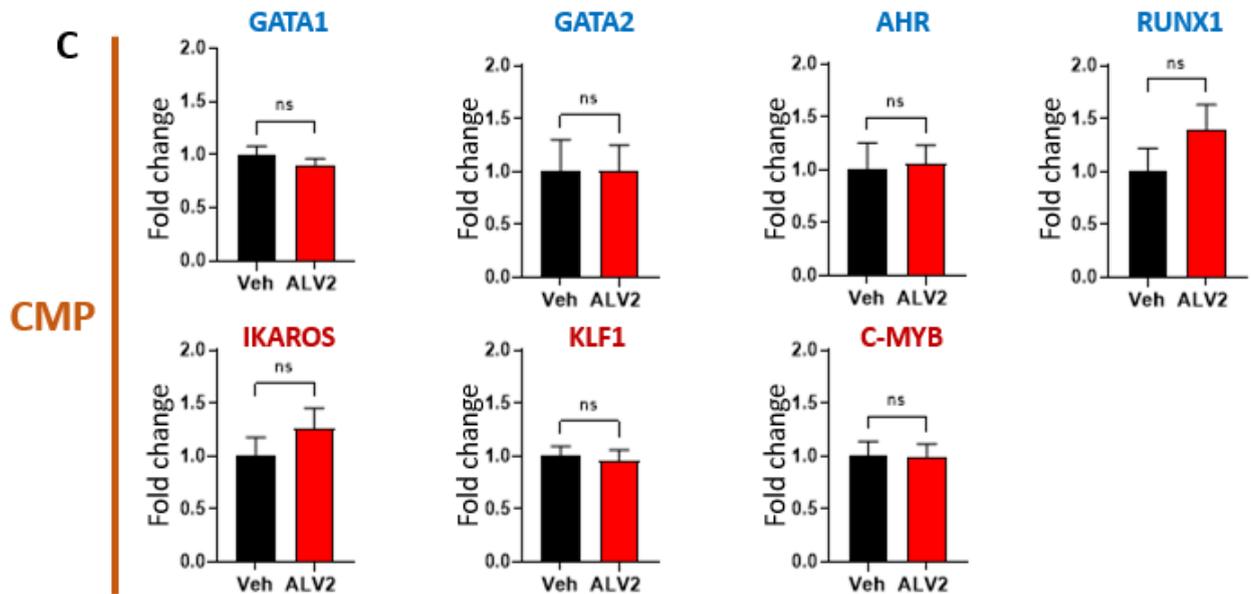
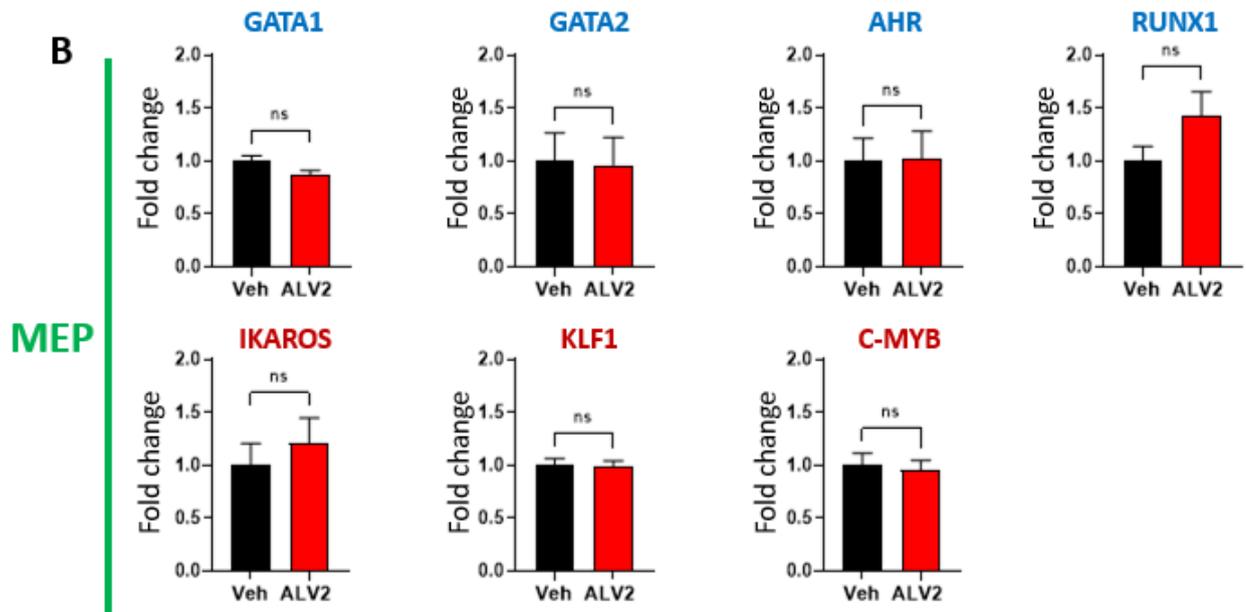
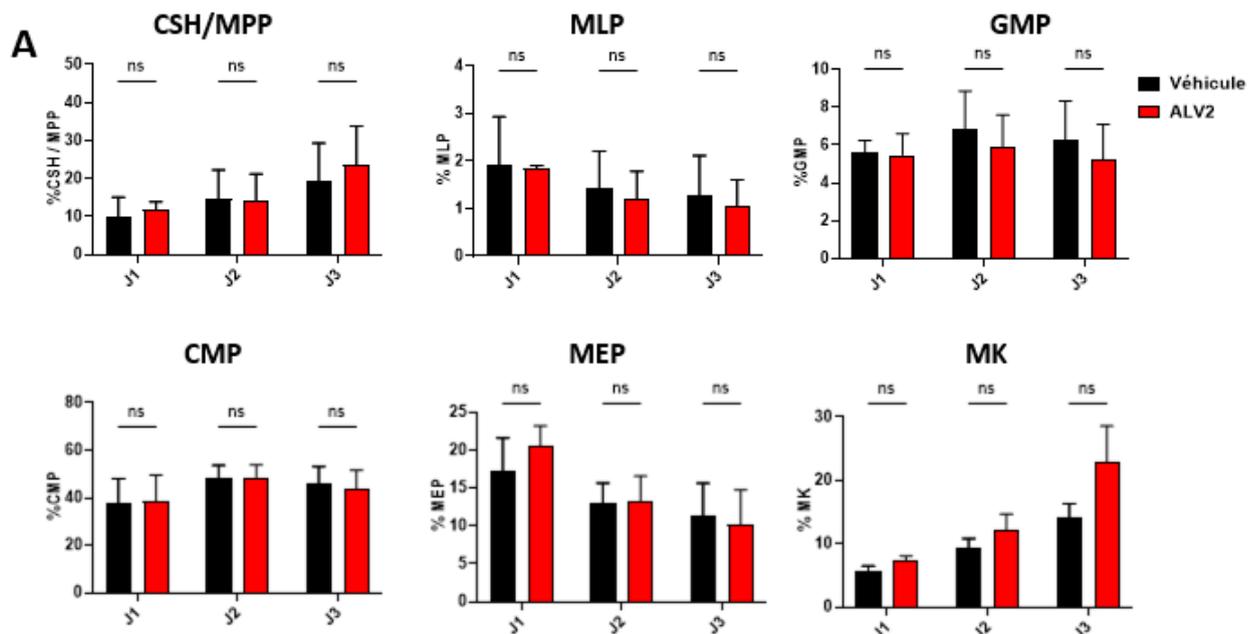


Figure 20 : Effets de la dégradation d'HELIOS les progéniteurs hématopoïétiques.

(A) Analyse de la proportion de CSH/MPP (CD34+ CD38- CD45RA- CD49f+/- CD90+/-), MLP (CD34+ CD38+ CD45RA+), CMP (CD34+ CD38+ CD45RA+ CD135+), GMP (CD34+ CD38+ CD45RA- CD135+) MEP (CD34+ CD38+ CD45RA- CD135-) et mégacaryocytes (CD41+ CD42+) par cytométrie en flux au cours des trois premiers jours de culture dans un milieu permettant la différenciation mégacaryocytaire (n=3, ANOVA, ns). **(B)** Expression des transcrits de FT régulant l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire (bleu) et érythrocytaire (rouge) mesuré par RT-qPCR dans les MEP au troisième jour de culture dans un milieu permettant la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire (n=3, Test de Student, ns). **(C)** Expression des transcrits de FT régulant l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire (bleu) et érythrocytaire (rouge) mesuré par RT-qPCR dans les CMP au troisième jour de culture dans un milieu permettant la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire (n=3, Test de Student, ns).

L'absence d'HELIOS accélère l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ humains vers la lignée mégacaryocytaire, mais altère la formation des proplaquettes aux stades tardifs de différenciation

Nous avons récapitulé *in vitro* à partir de PH CD34+ humain la MKP pour étudier plus finement les conséquences de l'absence d'HELIOS sur ce mécanisme. Tout d'abord, la première phase favorise l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire dans un milieu composé de TPO, de SR1, de SCF, d'IL-6 et d'IL-9. Ensuite, sept jours supplémentaires avec uniquement de la TPO et du SR1 sont nécessaires pour la maturation des mégacaryocytes et la formation des proplaquettes. Pour étudier le rôle d'HELIOS dans la MKP, nous avons d'abord examiné son expression au niveau transcriptionnel et protéique dans les mégacaryocytes dérivés de PH CD34+ humains à différents moments de la culture (J0, J4, J7 et J10) (**Figure 21Ai**). La détection des transcrits d'*IKZF2* a été principalement observée par RT-qPCR au cours des phases initiales de la période de culture, en particulier à J0 et J4, suivies d'une diminution marquée de son expression à J7 et à J10 (**Figure 21Aii**). Une tendance comparable a été observée au niveau protéique par Western Blot où HELIOS n'est présent que sous la forme de trace à J10 et J12 (**Figure 21Aiii**).

Par la suite, nous avons étudié les fonctions d'HELIOS dans la MKP en le dégradant en traitant les cultures de PH CD34+ humains avec de l'ALV2 au J0 ainsi qu'au J3 pour éviter sa réapparition avant J7 à partir de quand HELIOS n'est présent que sous forme de traces. L'absence d'HELIOS n'a pas eu d'impact sur le nombre absolu de mégacaryocytes (CD41+ et CD42+) dans l'ensemble de la culture mesuré en cytométrie en flux à J0, J3, J5, J7, J10 et J12 (**Figure 21Bi**). Cependant, elle a affecté le processus d'engagement dans la lignée mégacaryocytaire. En effet, l'absence d'HELIOS a entraîné une augmentation de la proportion de cellules exprimant le marqueur CD41 à au troisième jour (1,82x) et au cinquième jours (1,54x) de culture par rapport au véhicule (n=3-9, ns) (**Figure 21Bii**). Il faut cependant noter qu'à partir de J7 et jusqu'à la fin de la maturation, le pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD41 redevient similaire dans les deux conditions de maturation des mégacaryocytes. De plus, la présence de grandes cellules avec des structures nucléaires polyploïdes a été observée, sans différence perceptible dans le niveau de ploïdie mesuré en cytométrie en flux (**Figure 21C**). Cependant, il y a eu une réduction significative de la proportion de mégacaryocytes produisant des proplaquettes au dixième jour de culture, avec $20,5 \pm 1,57\%$ dans la condition ALV2 et $36,6 \pm 1,58\%$ de mégacaryocytes proplaquettaires dans la condition véhicule (n=3, ** p<0,01). De plus, les proplaquettes présentaient une organisation moins complexe, ce qui allié à une proportion inférieure de mégacaryocytes proplaquettaires a pour conséquence une diminution de la

production de plaquettes mesuré au treizième jour de culture par cytométrie en flux, avec une moyenne de $28,1 \pm 7,51$ plaquettes par mégacaryocyte dans la condition ALV2 et de $48,3 \pm 5,34$ plaquettes par mégacaryocyte dans la condition véhicule ($n=3$, * $p<0,05$) (**Figure 21D**). Globalement, ces résultats indiquent que si l'absence d'HELIOS favorise la lignée mégacaryocytaire, elle a des effets délétères sur les derniers stades de la maturation des mégacaryocytes.

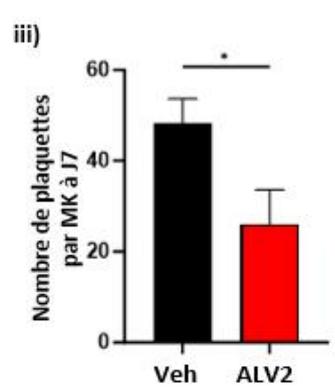
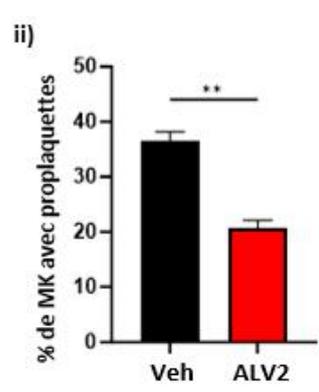
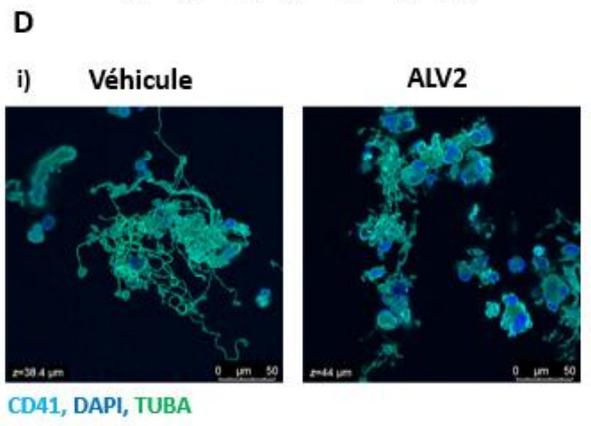
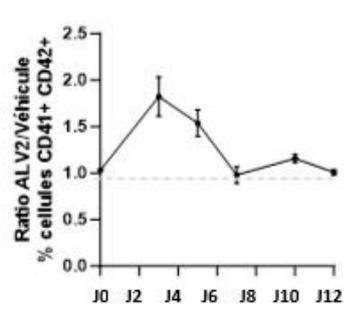
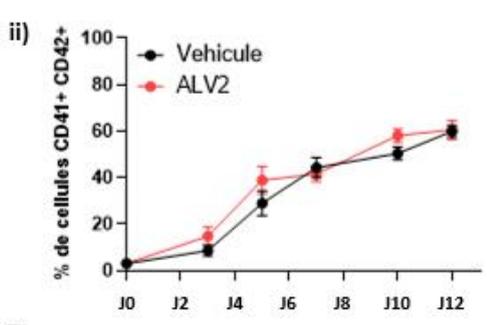
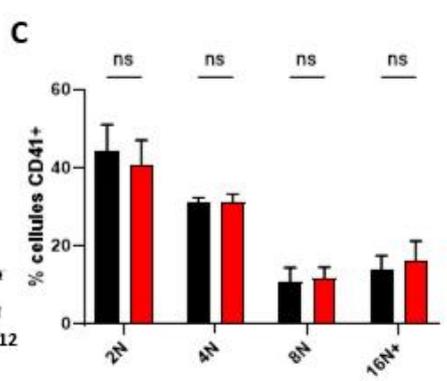
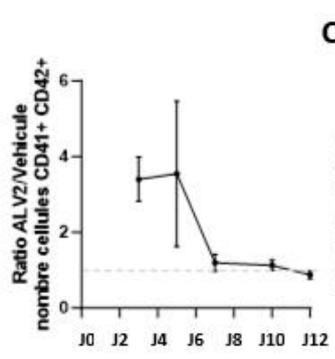
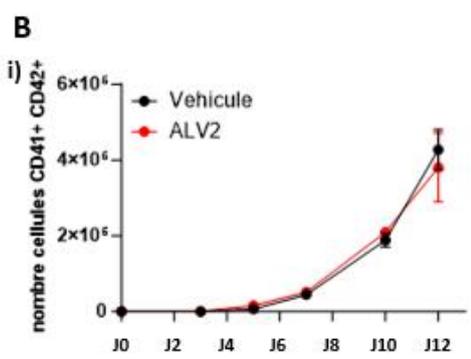
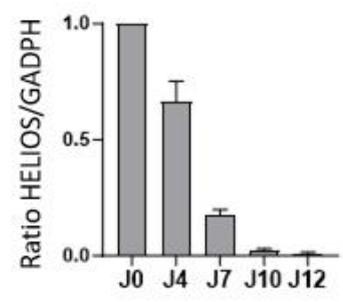
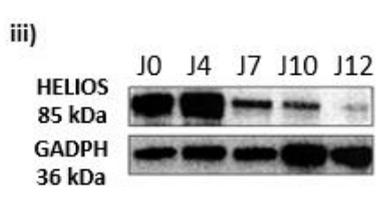
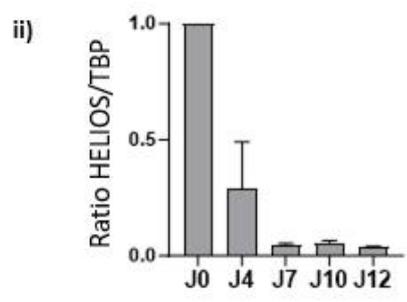
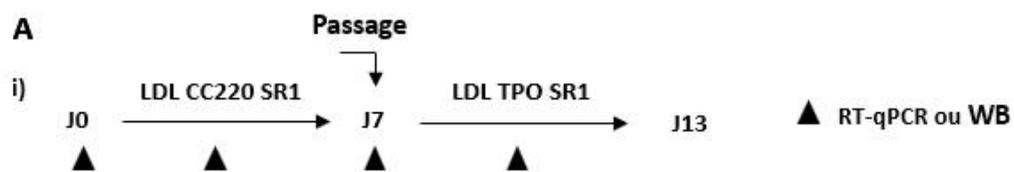


Figure 21 : Conséquences de la dégradation d'HELIOS sur l'engagement dans la lignée mégacaryocytaires et la maturation des mégacaryocytes.

(A) i) Modèle de culture en deux temps récapitulant la MKP, les PH CD34+ humains sont engagés dans la lignée mégacaryocytaire pendant sept jours à l'aide de CC220 puis les mégacaryocytes matures et formes des proplaquettes pendant sept jours supplémentaires dans un milieu enrichi en TPO. **ii)** Cinétique de l'expression du gène *IKZF2* au cours de la MKP étudiée par RT-qPCR (n=5). **iii)** Cinétique de la quantité de protéine HELIOS au cours de la MKP étudiée par Western-Blot (n=3). **(B)** Etude du **i)** nombre et de la **ii)** proportion de cellules CD41+ CD42+ dans nos conditions de culture par cytométrie en flux (n=3-9). **(C)** Analyse de la ploïdie des cellules CD41+ au jour 10 de culture par cytométrie en flux (n=3). **(D)** Analyse de la formation de proplaquettes et de plaquettes par mégacaryocytes. **i)** Observation au microscope confocal après fixation des cultures de mégacaryocytes au treizième jour de différenciation des proplaquettes émises par les mégacaryocytes. Les cellules ont été marquées pour le CD41 (cyan) et la tubuline alpha (TUBA, vert) et avec du DAPI (bleu). **ii)** Analyse de la proportion de mégacaryocytes proplaquettaires comptée au microscope confocale au jour 10 de culture. **iii)** Analyse du nombre de plaquettes produites par mégacaryocytes au jour 7 de culture (n=4, Test de Student, * p<0.05, ** p<0,01).

L'absence d'HELIOS altère la production de plaquettes en réduisant l'expression de CD34

Des travaux précédents de notre équipe avaient montré que l'ajout de SR1 dans le milieu de culture des PH CD34+ humains maintient de l'expression de CD34 par les mégacaryocyte au dixième jour de culture et augmente l'apparition de proplaquettes et la production de plaquettes (Strassel et al., 2016). C'est pourquoi, pour déterminer la cause des effets délétères de la dégradation d'HELIOS sur les derniers stades de la maturation mégacaryocytaire, nous nous sommes intéressés à l'expression de ce marqueur au dixième jour de culture par cytométrie en flux. Nous avons observé une diminution de la proportion de mégacaryocytes à fort pouvoir proplaquettaire CD34+ CD41+ ($25,5 \pm 3,56\%$ vs $38,26 \pm 5,83\%$ n=3, * p<0,05) dans la condition ALV2 par rapport à la condition véhicule (**Figure 22A**). Par ailleurs, en analysant l'apparition des cellules érythroïdes (CD36+ CD71+), nous avons de façon inattendue constaté une tendance à la réduction de la proportion des cellules CD36+ CD41+ au cours de la culture des PH CD34+ humains. Le CD36 est une glycoprotéine membranaires impliquée dans l'importation d'acides gras nécessaire à la synthèse de la membrane plasmique et au bon développement des proplaquettes. De façon intéressante, nous avons mis en évidence par cytométrie en flux une tendance à la réduction de la proportion de cellules CD36+ tout au long de la culture dans la condition ALV2 par rapport à la condition véhicule ce qui suggère que l'absence de CD36 participe à la diminution de la production de proplaquettes et de plaquettes (**Figure 22B**). De plus, pour déterminer par quels mécanismes l'absence d'HELIOS altère la maturation des mégacaryocytes, l'expression de FT régulant ce mécanisme a été quantifiée. Au septième jour de culture, la quantité de transcrite des gènes *GATA1*, *GATA2*, *RUNX1* et *NFE-2* n'est pas affectée par l'absence d'HELIOS (**Figure 22C**). Nous obtenons des résultats similaires au dixième jours de culture où l'expression de *GATA1*, *GATA2* et *RUNX1* est identique dans les conditions ALV2 et véhicule. Il est intéressant de noter une tendance à l'augmentation de *NFE-2* de 2,4 fois dans la condition ALV2 par rapport à la condition véhicule (n=3, ns) (**Figure 22D**). Ces résultats donnent de premières pistes pour expliquer par quels mécanismes moléculaires par lesquels l'absence d'HELIOS réduit l'apparition de mégacaryocytes proplaquettaires et la production de plaquettes.

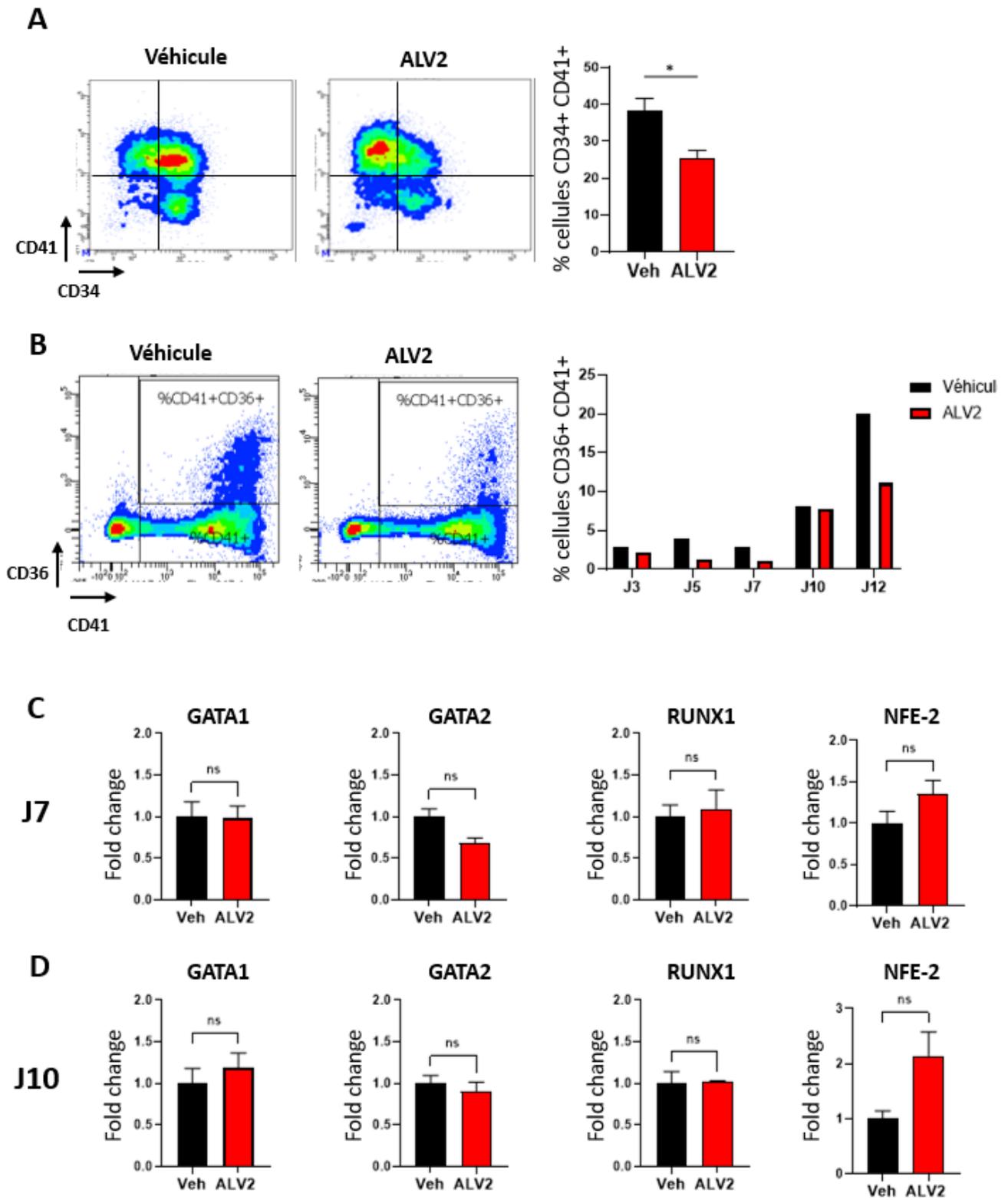


Figure 22 : Effets de la dégradation d'HELIOS sur la maturation des mégacaryocytes et sa régulation transcriptionnelle.

(A) Proportion de cellules à fort pouvoir proplaquettaire CD34⁺ CD41⁺ et à faible pouvoir proplaquettaire CD34⁻ CD41⁺ analysée en cytométrie en flux au dixième jour de culture dans un milieu permettant de récapituler la MKP *in vitro* (n=3, Test de Student, * p<0.05). **(B)** Proportion de cellules CD36⁺ CD41⁺ analysée en cytométrie en flux au cours de la culture dans un milieu permettant de récapituler la MKP *in vitro* (n=1). **(C)** Quantification par RT-qPCR de l'expression des transcrits de *GATA1*, *GATA2*, *RUNX1* et *NFE-2* au septième jour de culture dans un milieu permettant de récapituler la MKP *in vitro*. **(D)** Quantification par RT-qPCR de l'expression des transcrits de *GATA1*, *GATA2*, *RUNX1* et *NFE-2* au dixième jour de culture dans un milieu permettant de récapituler la MKP *in vitro* (n=3, Test de Student, ns).

En parallèle de ce travail sur les fonctions d'HELIOS dans la MKP humaines, nous avons caractérisé les conséquences de l'absence d'HELIOS sur le processus de maturation des mégacaryocytes, dans le modèle souris *ikzf2* KO.

*La maturation des mégacaryocytes issues des souris *ikzf2* KO est accélérée*

Nous avons tout d'abord cherché à voir si l'absence d'HELIOS menait chez la souris de manière comparable à chez l'humain des défauts de maturation des mégacaryocytes *in vitro*. Dans ce but, un tri magnétique des cellules PH Lin⁻ issues des moelles osseuses des souris a été effectué, puis celles-ci ont été mises en culture pendant quatre jours avec des cytokines favorisant l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire et leur différenciation. Il a été observé une augmentation de la taille des mégacaryocytes *ikzf2* KO au quatrième jour de culture ($122,67 \pm 1,26$ vs $115,51 \pm 1,87$ pixels, $n=29-47$, **** $p<0,001$) comparée à celle des mégacaryocytes WT, ce qui suggère un potentiel à étendre des proplaquettes augmenté (**Figure 23A**). La proportion de mégacaryocytes proplaquettaires n'est pas augmentée au troisième jour de différenciation dans la condition *ikzf2* KO comparée à la condition WT ($41,30 \pm 7,23\%$ vs $28,40 \pm 1,43\%$, $n=3-5$, ns), et au quatrième jour de différenciation, cette proportion a été constatée comme équivalente ($72,70 \pm 5,42\%$ vs $70,30 \pm 11,42\%$, $n=3-5$, ns) (**Figure 23B**). De plus, les proplaquettes émises par les mégacaryocytes *ikzf2* KO semblent plus longues et plus ramifiées que celles émises par les mégacaryocytes WT, bien que cela reste à quantifier. (**Figure 23C**).

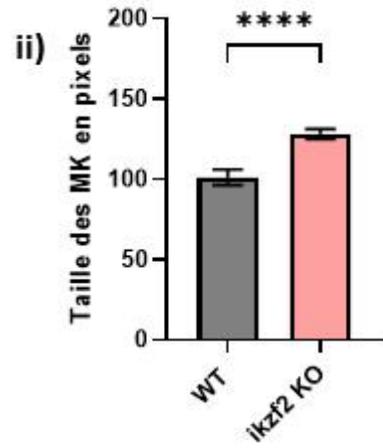
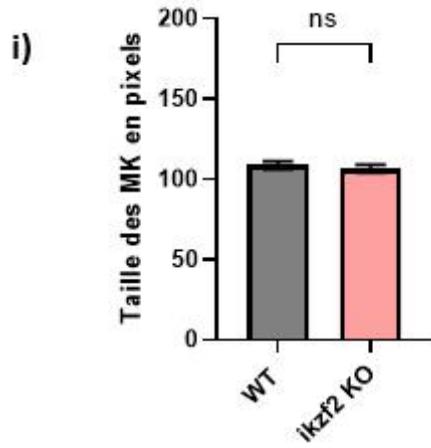
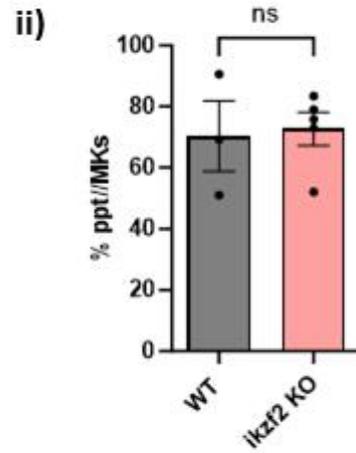
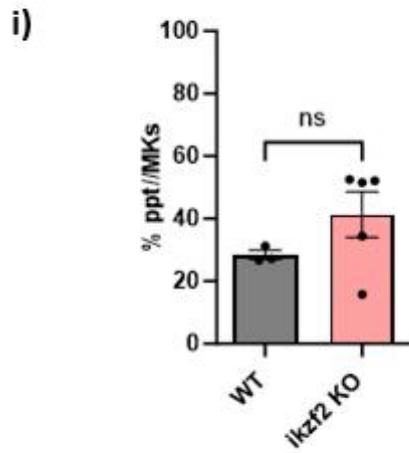
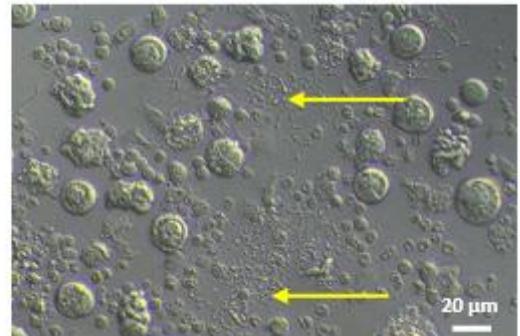
A**B****J3****J4****C****WT****ikzf2 KO**

Figure 23 : Effets de l'absence d'HELIOS sur la maturation des mégacaryocytes murins *in vitro*.

(A) Taille des mégacaryocytes dans les cultures Lin- **i)** au jour 3 et **ii)** au jour 4 (n=3, Test de Student, $p > 0,001$). **(B)** Proportion de mégacaryocytes proplaquettaire dans les cultures Lin- **i)** au jour 3 et **ii)** au jour 4 (n=29-47, Test de Student, ns). **(C)** Observation au microscope optique des mégacaryocytes proplaquettaire au troisième et quatrième jour de culture Lin-. Les mégacaryocytes émettant des proplaquettes sont indiqués par une flèche jaune .

Nous avons procédé à l'étude *in vivo* de la MKP et de la physiologie plaquettaire des souris *ikzf2* KO pour déterminer les conséquences de l'absence d'HELIOS sur ces mécanismes dans un modèle plus complet puisque qu'en plus des facteurs intrinsèques, des extrinsèques (cytokines, environnement cellulaires) peuvent influencer ces mécanismes.

Les souris ikzf2 KO ont une numération des leucocytes élevé et une numération plaquettaire fortement hétérogène

Pour déterminer si l'augmentation de la proportion dans la moelle osseuse des souris *ikzf2* KO de CSH CD41+ et de MPP2 CD41+ et de progéniteurs de mégacaryocytes ont un impact sur la production des cellules sanguines, la numération formule sanguine (NFS) de ces souris est analysée par comptage automatique après prélèvement de sang à la queue. Parmi les cellules sanguines analysées, la numération des leucocytes ($20,8 \pm 0,85$ vs $13,5 \pm 1,18 \times 10^3$ leucocytes/ μL , $n=20-55$, $p<0,0001$) est augmentée 1,54 fois chez les souris *ikzf2* KO comparées aux souris *wild type* (WT). Au sein des leucocytes, la numération des lymphocytes ($13,0 \pm 0,57$ vs $10,5 \pm 0,77 \times 10^3$ lymphocytes/ μL , $n=20-55$, * $p<0,05$), monocytes ($1,85 \pm 0,14$ vs $0,49 \pm 0,08 \times 10^3$ monocytes/ μL , $n=20-55$, **** $p<0,0001$), polynucléaires neutrophiles ($5,30 \pm 0,28$ vs $2,56 \pm 1,98 \times 10^3$ neutrophiles/ μL , $n=20-55$, **** $p<0,0001$) et éosinophiles ($0,61 \pm 0,05$ vs $0,28 \pm 0,05 \times 10^3$ éosinophiles/ μL , $n=20-55$, **** $p<0,0001$) sont augmentées chez les souris *ikzf2* KO comparé aux souris WT alors que la numération des polynucléaires basophiles ($0,014 \pm 0,0029$ vs $0,0070 \pm 0,0033 \times 10^3$ basophiles/ μL , $n=20-55$, ns) est identique. Par ailleurs, les numérations d'érythrocytes, d'hémoglobine et d'hématocrite ne sont pas significativement différentes dans les souris *ikzf2* KO et les souris WT. Il est à noter que si la moyenne des numérations plaquettaires ($1301 \pm 50,85$ vs $1141 \pm 49,83 \times 10^3$ plaquettes/ μL , 20-55, ns) et le volume plaquettaire ($4,79 \pm 0,11$ vs $4,65 \pm 0,046$ fL, 20-55, ns) des souris *ikzf2* KO est identique à celle des souris WT, les numérations plaquettaires dans la condition *ikzf2* KO sont fortement hétérogènes. En effet, la numération plaquettaire est élevée ($>1600 \times 10^3$ plaquettes/ μL) dans 16,1% des souris *ikzf2* KO et peut aller jusqu'à 2390×10^3 plaquettes/ μL et la numération plaquettaire est faible ($<800 \times 10^3$ plaquettes/ μL) dans 9,1% des souris *ikzf2* KO allant jusqu'à 86×10^3 plaquettes/ μL . **(Figure 24)**. Pour résumer, nos analyses indiquent que la numération des leucocytes est augmentée dans les souris *ikzf2* KO suggérant un état inflammatoire et nous observons une forte hétérogénéité de la numération plaquettaire.

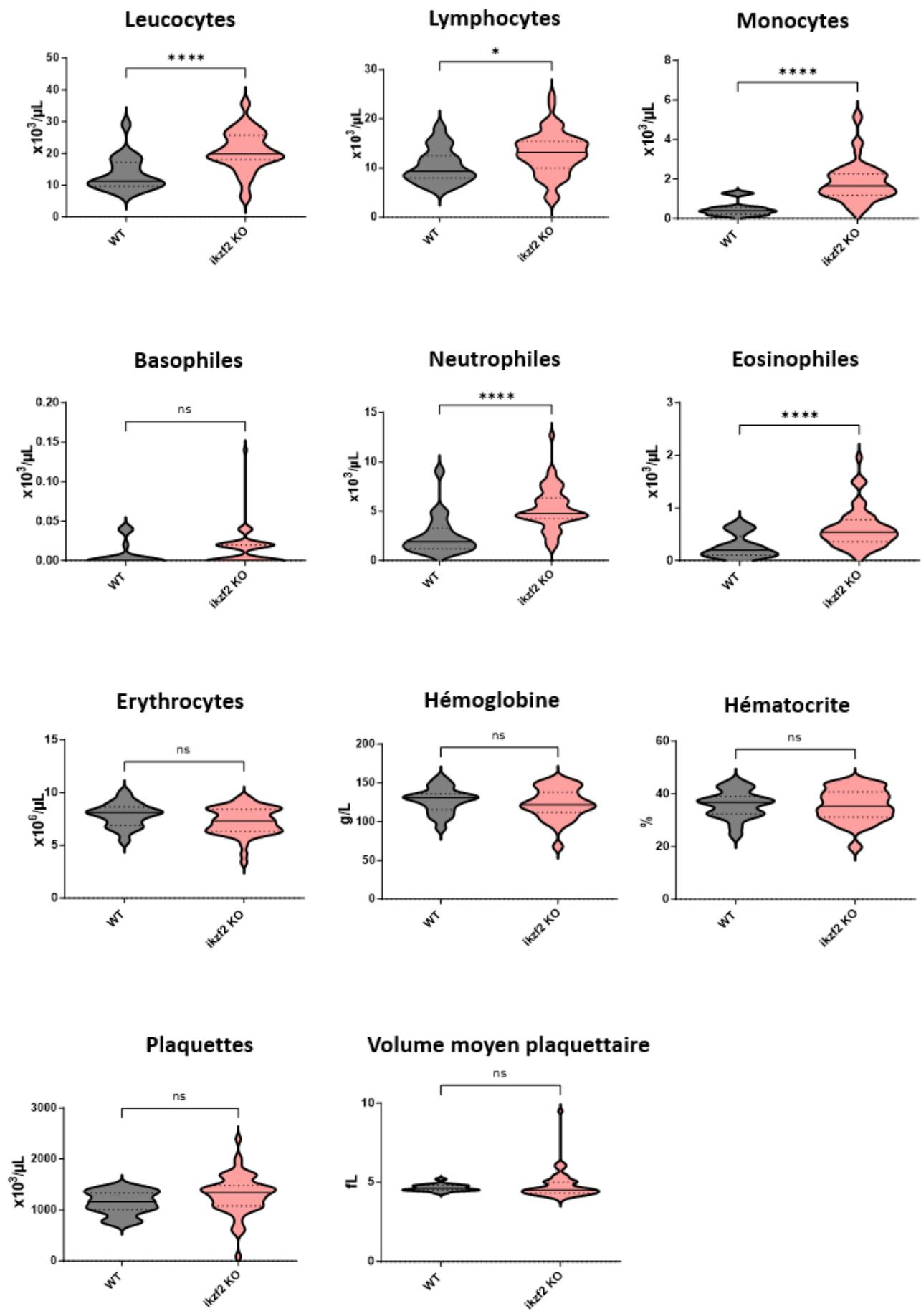


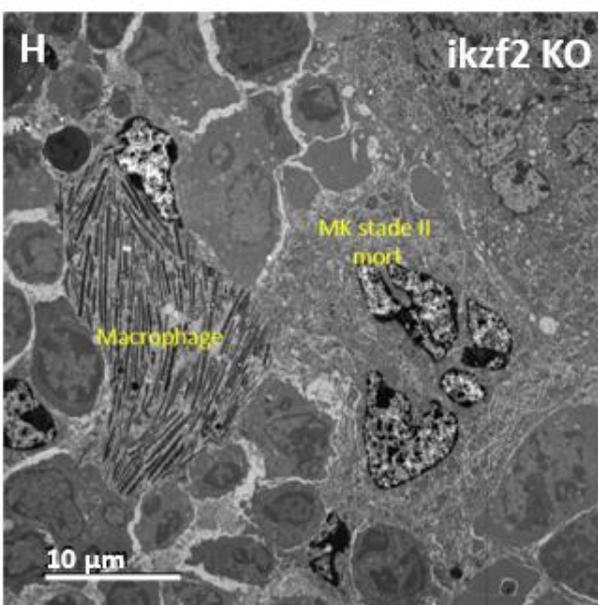
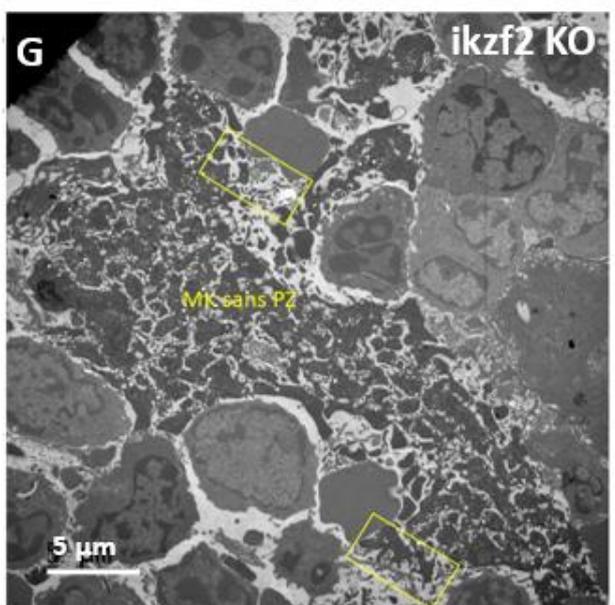
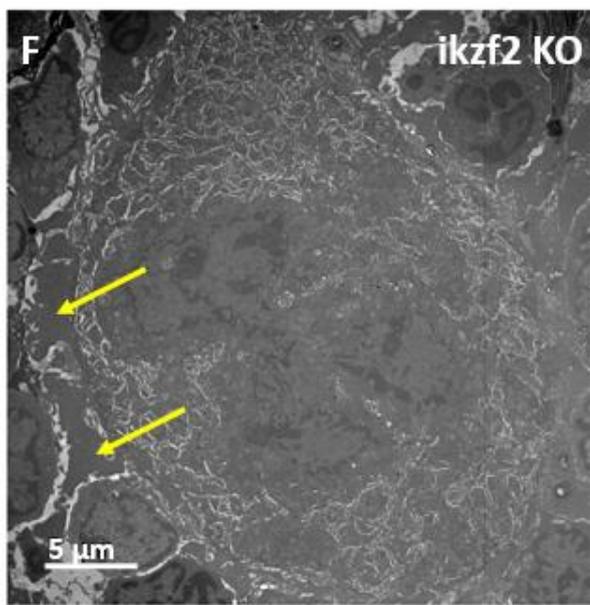
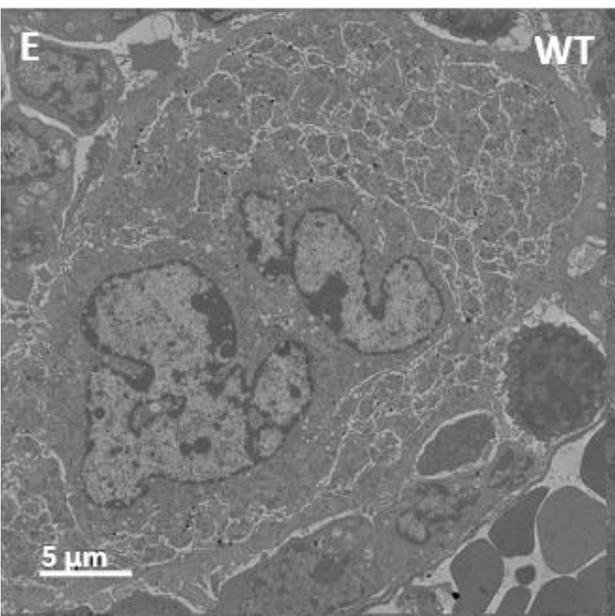
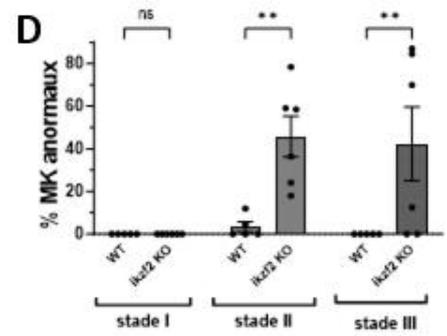
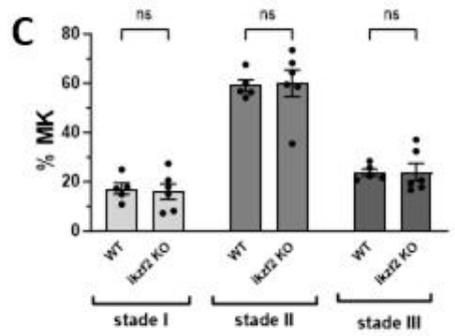
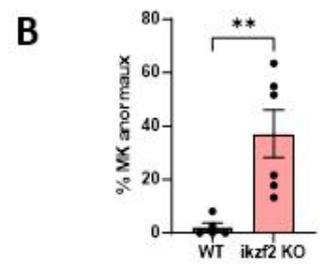
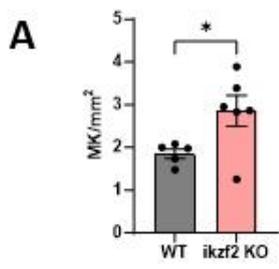
Figure 24 : Analyse des paramètres sanguins des souris *ikzf2* KO.

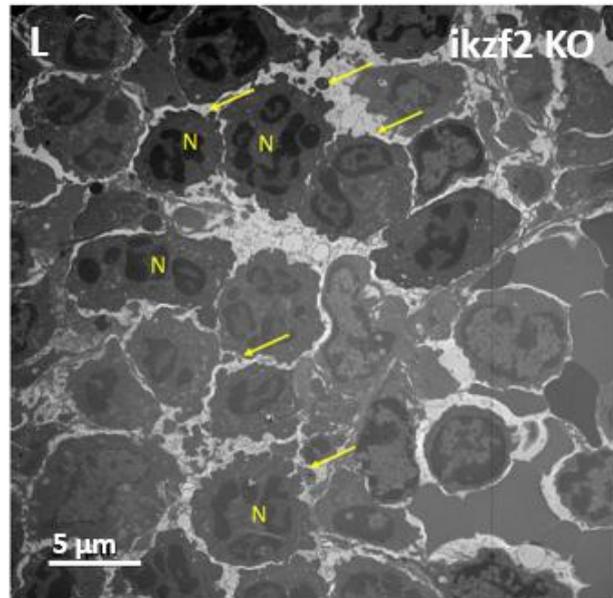
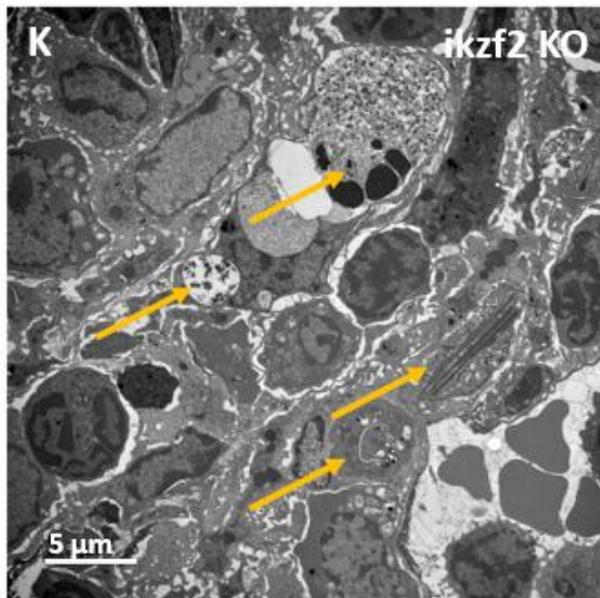
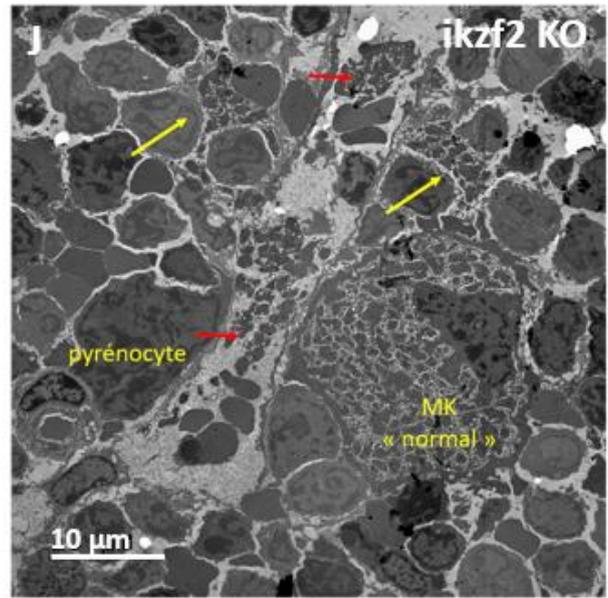
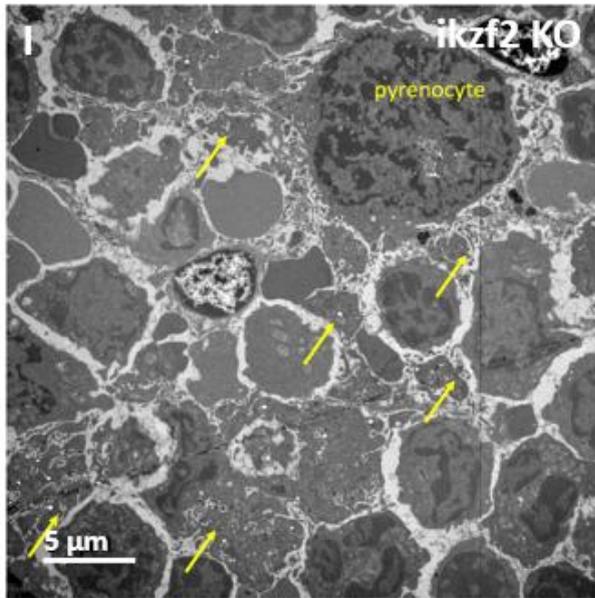
Comptage de la concentration sanguine en leucocytes, lymphocytes, monocytes, des polynucléaires basophiles, polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, érythrocytes, hémoglobine, hématocrite et plaquettes ainsi que du volume moyen plaquettaire. Résultats de 5 expériences indépendantes (n=20-55, Test de Student et de Mann-Whitney selon la distribution, * p<0.05, **** p<0,0001).

*Les moelles osseuses des souris *ikzf2* KO présentent des mégacaryocytes médullaires avec une ultrastructure perturbée*

Pour mieux comprendre comment l'absence d'HELIOS influence la MKP, nous nous sommes intéressés au site principal de l'hématopoïèse adulte, la moelle osseuse. Ainsi, des images de microscopie électronique à transmission ont été générées. On peut observer que la densité de mégacaryocytes est augmentée de 1,55 fois ($2,86 \pm 0,22$ mégacaryocytes/mm² vs $1,85 \pm 0,08$ mégacaryocytes/mm², n=5-6, * p<0,05) dans la moelle osseuse des souris *ikzf2* KO comparé à celle des souris WT (**Figure 25A**). Il est intéressant de noter que la présence de mégacaryocytes à l'ultrastructure perturbée a été observée, avec une fréquence augmentée de 17 fois ($37,17 \pm 7,98\%$ vs $2,14 \pm 1,14\%$, n=5-6, ** p>0,01) parmi l'ensemble des mégacaryocytes localisés dans la moelle osseuse des souris *ikzf2* KO, comparés à celle des souris WT (**Figure 25B**). Les mégacaryocytes peuvent être classés en trois stades de maturation distincts selon des critères morphologiques tels que la taille, l'aspect du noyau et du cytoplasme. Le stade I où le mégacaryocyte est immature, le stade II représentant un stade de maturation intermédiaire et le stade III le stade où le mégacaryocyte est mature (**partie I. A. 3. c.**). Si la proportion de mégacaryocytes aux différents stades de maturation est similaire entre les conditions *ikzf2* KO et WT. (**Figure 25C**), on peut constater que l'ultrastructure des mégacaryocytes des stades II ($42,35 \pm 17,34\%$ vs 0%, n=5-6, ** p>0,01) et III ($45,75 \pm 9,54\%$ vs $3,35 \pm 1,21\%$, n=5-6, ** p>0,01) est affectée, tandis que celle au stade I ne montre pas de perturbation notable dans les moelles osseuses des souris *ikzf2* KO comparé aux WT (**Figure 25D**). Parmi les principaux défauts retrouvés, on note la présence de mégacaryocytes présentant une zone périphérique absente ou irrégulière, ainsi qu'un DMS très fin (**Figure 25E-F**). De plus, une fragmentation des mégacaryocytes a été notée dans le parenchyme de la moelle osseuse, accompagnée d'une libération ectopique de fragments cytoplasmiques dans le stroma et la circulation médullaire (**Figure 25G-J**). Par ailleurs, une infiltration de cellules immunitaires, notamment des phagocytes et des polynucléaires neutrophiles (**Figure 25K-L**). Etant donnée le nombre élevé de leucocytes dans les moelles osseuses, nous avons quantifié par test ELISA la concentration de TNF α dans le sérum des souris afin de déterminer si nous étions en présence d'un état inflammatoire et la concentration de TPO pour mesurer son retentissement sur la MKP. Une augmentation de la concentration sérique de TNF α ($61,25 \pm 14,57\%$ vs $8,00 \pm 4,89\%$, n=5-9, * p>0,05) et a été mise en évidence dans la moelle des souris *ikzf2* KO comparé aux souris WT, suggérant un contexte inflammatoire. La concentration en TPO n'était-elle pas significativement augmentée ($4594 \pm 730,5$ vs $2438 \pm 448,5$ pg/mL, n=5-9, ns) (**Figure 25M**).

Pour conclure, les moelles osseuses des souris *ikzf2* KO montrent une infiltration de leucocytes au phénotype inflammatoire, accompagnée d'une perturbation de l'ultrastructure des mégacaryocytes. Cependant, si chacune des moelles analysées présentait des anomalies, ces anomalies de maturation sont différentes d'une moelle à l'autre, il est donc difficile de conclure de façon générale sur la manière dont l'absence d'HELIOS aboutit à ces phénotypes.





M

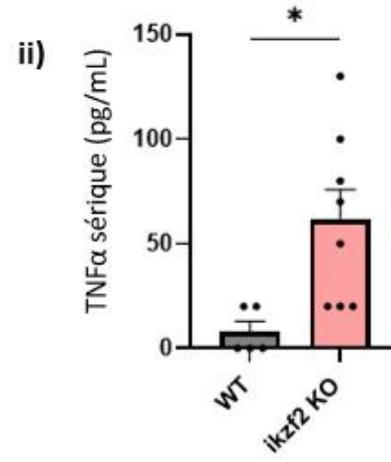
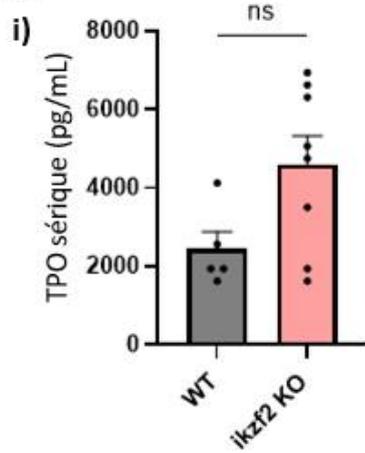


Figure 25 : Conséquences de l'absence d'HELIOS sur la maturation des mégacaryocytes dans la moelle osseuse des souris.

(A) Graphique représentant la densité des mégacaryocytes sur les coupes de moelles osseuses de souris *ikzf2* KO et WT (n=5-6, Test de Student, * p<0,05). **(B)** Graphique représentant la proportion de mégacaryocytes anormaux chez les souris *ikzf2* KO et WT (n=5-6, Test de Student, ** p<0,01). **(C)** Graphique représentant la proportion de mégacaryocytes aux différents stades de maturation dans les conditions *ikzf2* KO et WT (n=5-6). **(D)** Graphique représentant la proportion de mégacaryocytes anormaux selon leurs stades de maturation dans les conditions *ikzf2* KO et WT (n=5-6, Test de Student, ** p<0,01). **(E)** Image obtenue en microscopie électronique à transmission d'un mégacaryocyte « normal ». **(F)** Image de microscopie électronique à transmission d'un mégacaryocyte « anormal » avec un zone périphérique (PZ) irrégulière (flèche jaune) et un système de membrane de démarcation dentelé. **(G)** Observation au microscope électronique à transmission d'un mégacaryocyte « anormal » avec une absence PZ et un délitement médullaire (rectangles jaunes). **(H)** Observation au microscope électronique à transmission d'un mégacaryocyte de stade II apoptotique. **(I)** Observation au microscope électronique à transmission de la moelle osseuse avec une libération ectopique de fragments cytoplasmiques dans le stroma médullaire (flèches jaunes). **(J)** Observation au microscope électronique à transmission de la moelle osseuse avec une libération atypique du cytoplasme délité du mégacaryocyte dans la moelle (flèches jaunes) et dans la circulation sanguine (flèches rouges). **(K)** Observation au microscope électronique à transmission de la moelle osseuse avec une forte activité phagocytaire (flèches jaunes). **(L)** Observation au microscope électronique à transmission de la moelle osseuse avec des neutrophiles **(N)** dont la membrane bourgeonne dans le stroma médullaire (flèches jaunes). **(M)** Quantification de la concentration de **i)** TPO et **ii)** TNF α dans le sérum des souris (n=5-9, Test de Student, * p<0,05).

L'hémostase est accélérée chez les souris ikzf2 KO

Nous avons étudié la conséquence de l'absence d'HELIOS sur la physiologie plaquettaire. Dans un premier temps pour déterminer la fonctionnalité des plaquettes *ikzf2* KO *in vivo*, nous avons mesuré la présence des principales glycoprotéines plaquettaires à la surface des plaquettes par cytométrie en flux après prélèvement du sang et lavage des plaquettes. Le pourcentage de plaquettes positives pour GPIB α , GPIB β , GPIIb/IIIa, GPV, GPVI, GPIX et CD9 n'était pas modifiée dans les souris *ikzf2* KO par rapport aux souris WT. De la même façon, la quantité de ces protéines représentée par la MFI est identique entre les conditions *ikzf2* KO et WT (**Figure 26A**). Ensuite, nous avons mesuré le temps de saignement à la queue des souris pour mesurer leur capacité à arrêter les saignements. Le temps de saignement était réduit de 2,33 fois ($53,80 \pm 10,39$ vs $125,70 \pm 29,44$ secondes, $n=3$, ns) chez les souris *ikzf2* KO comparée aux souris WT (**Figure 26B**). Etant donné l'état inflammatoire des souris *ikzf2* KO qui peut entraîner une pré-activation plaquettaire et donc une hémostase accélérée, nous avons quantifier par cytométrie en flux la P-sélectine, une protéine contenue dans les granules plaquettaire et exposée à leur surface lors de l'activation plaquettaire. La proportion de plaquettes exposant la P-sélectine n'était pas significativement différentes entre la condition *ikzf2* KO et la condition WT (**Figure 26C**). Si les plaquettes *ikzf2* KO ne sont pas pré-activées, il est possible que leur agrégation soit plus efficace car le temps de saignement à la queue des souris *ikzf2* était réduit. C'est pourquoi, nous avons mesuré l'agrégation en réponses à différents agonistes, la thrombine le collagène et un agoniste faible l'ADP. Nous avons étudié l'activation plaquettaire par agrégométrie en plaquettes lavées, Si les plaquettes lavées des souris *ikzf2* KO avaient une agrégation à la thrombine (0,05 U/mL) et au collagène (1,25 μ g/mL) identique à celles des souris WT, le maximum d'agrégation à l'ADP (0,5 μ M ; $46,23 \pm 3,42\%$ vs $34,40 \pm 5,77\%$, $n=3-8$, * $p>0,05$) est augmenté dans la condition *ikzf2* KO (**Figure 26D**).

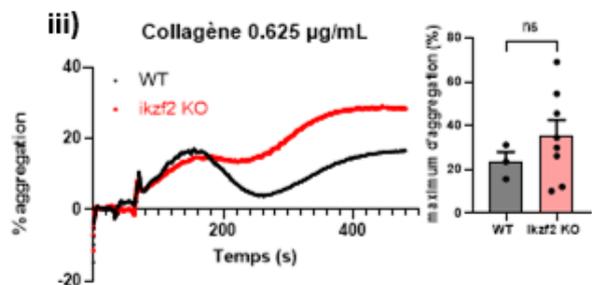
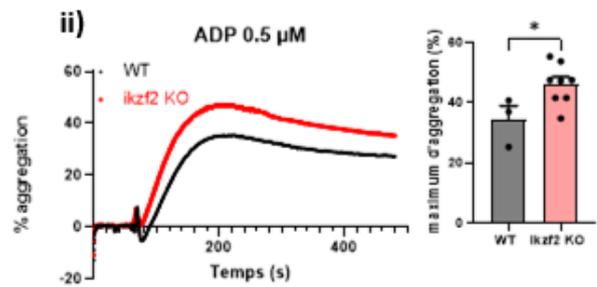
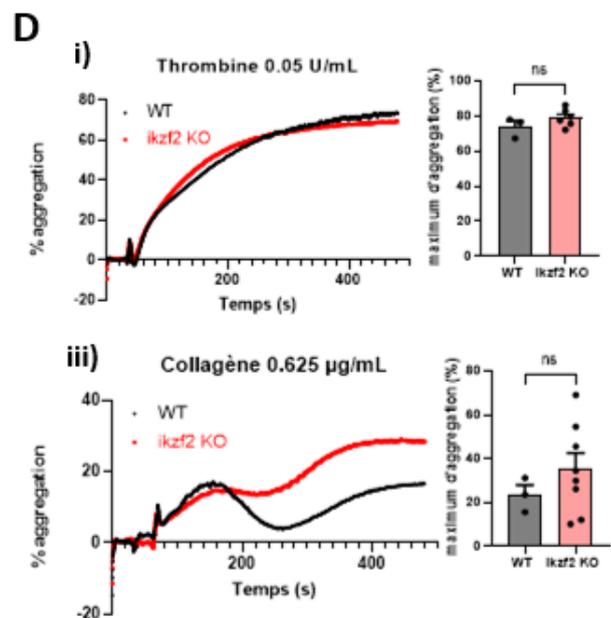
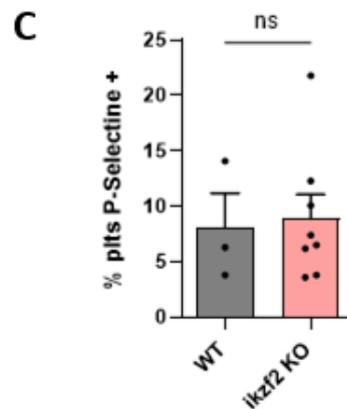
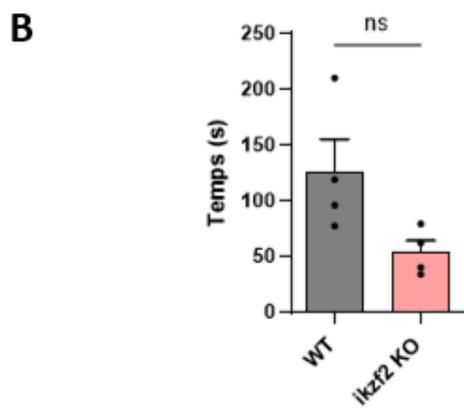
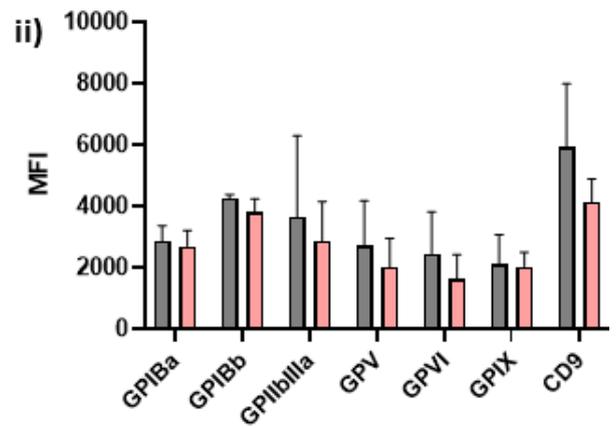
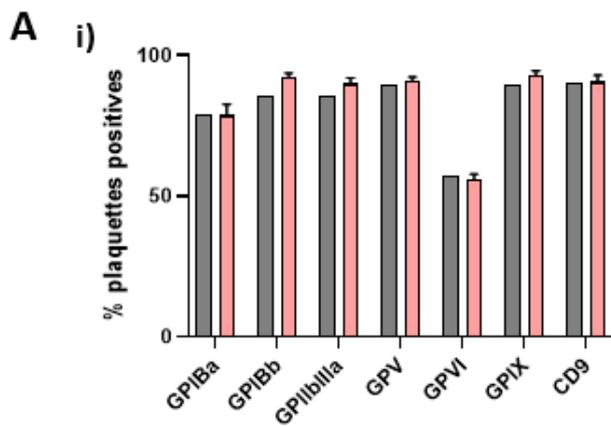


Figure 26 : Effets de l'absence d'HELIOS sur la physiologie plaquettaire.

(A) Représentation graphique de la **i)** proportion de plaquettes positives pour les principales glycoprotéines plaquettaires et de la **ii)** quantité (représenté par la MFI) de glycoprotéine plaquettaire mesuré en cytométrie en flux (n=6, ANOVA, ns). **(B)** Graphique représentant le temps de saignement à la queue des souris *ikzf2* KO comparée aux souris WT (n=4, Test de Student, p=0,0610). **(C)** Représentation graphique de la proportion de plaquettes positives pour la P-sélectine mesuré en cytométrie en flux (n=3-8, test de Student, ns). **(D)** Profils d'agrégation et maximum d'agrégation des plaquettes lavées des souris *ikzf2* KO et WT en réponses à la stimulation par **i)** la thrombine, **ii)** l'ADP et **iii)** le collagène (n=3-8, test de Student, * p<0,05).

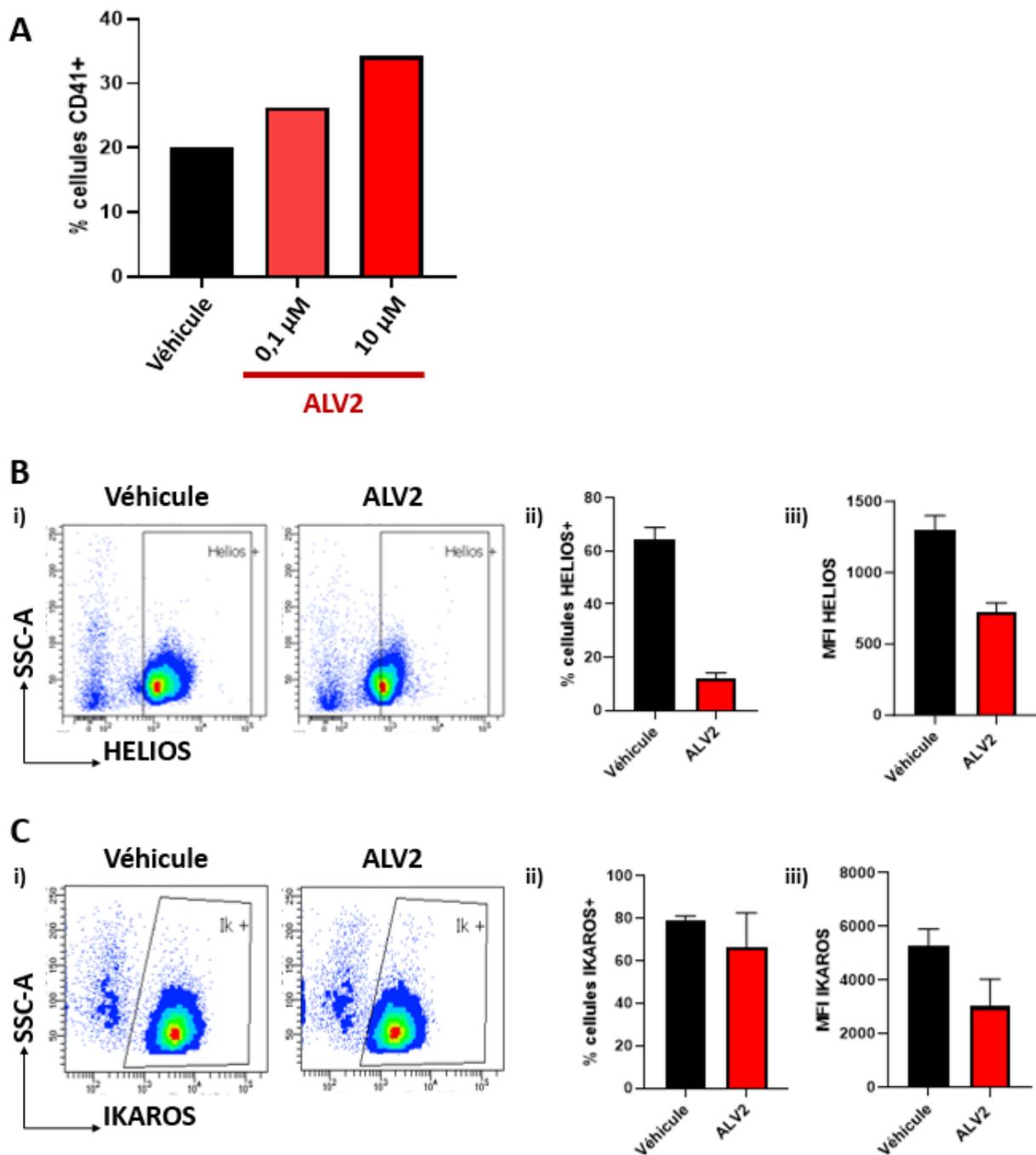


Figure supplémentaire 1 : Analyse de la dégradation d'HELIOS par cytométrie en flux.

(A) Graphique représentant la proportion de cellules CD41+ selon la concentration en ALV2 au troisième jour de culture dans le milieu permettant l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire mesuré par cytométrie en flux (n=1). (B) i) Stratégie d'analyse de la présence d'HELIOS en cytométrie en flux. ii) Proportion de cellules CD34+ HELIOS+ 4h après traitement avec ALV2. iii) Quantité (représenté par la MFI) d'HELIOS dans les cellules CD34+ 4h après traitement (n=3). (C) i) Stratégie d'analyse de la présence d'IKAROS en cytométrie en flux. ii) Proportion de cellules IKAROS+ 4h après de traitement avec ALV2. iii) Quantité (représenté par la MFI) IKAROS dans les cellules 4h après traitement (n=2).

DISCUSSION

Les résultats obtenus durant cette thèse mettent en lumière le rôle du FT HELIOS dans l'engagement dans la voie érythro-mégacaryocytaire et la régulation de la MKP que ce soit chez l'Homme ou la souris.

Chez l'humain, nos observations révèlent que l'absence d'HELIOS dans les PH CD34+ entraîne un déséquilibre dans l'engagement érythro-mégacaryocytaire *in vitro*, au profit de la lignée mégacaryocytaire. Ce déséquilibre conduit à une apparition plus précoce des mégacaryocytes, mais perturbe la MKP normale, avec une réduction de la proportion de mégacaryocytes proplaquettaires et une baisse de la production de plaquettes. Aucune des populations de PH hématopoïétiques ne semble impactée aux jours précoces de culture. De façon similaire, aucun des FT de l'engagement (GATA1, GATA2, AHR, RUNX1, IKAROS, KLF1, C-MYB) que nous avons quantifié dans les CMP et MEP ne semble affecté suggérant que l'absence d'HELIOS impacterait l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire des PH par le biais d'autres FT ou bien de modifications épigénétiques.

En supplément d'une augmentation de l'engagement des CSH humaines dans la lignée mégacaryocytaire, nous avons mis en évidence une maturation moins efficace des mégacaryocytes *in vitro* avec une réduction proportion de mégacaryocytes CD34+ CD41+ en absence d'HELIOS. Notre équipe avait préalablement montré que cette population de cellules avait un fort pouvoir proplaquettaire et que l'apparition de cette population est facilitée par l'inhibition de l'activité de l'AHR par SR1 ce qui favorise son interaction avec IKAROS (Mallo et al., 2021). Il est par conséquent possible que l'absence d'HELIOS lors de l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire empêche l'interaction entre IKAROS et l'AHR réduisant *in fine* la proportion de mégacaryocytes CD34+ CD41+ et la production de plaquettes.

Nous avons montré que l'absence d'HELIOS entraîne une réduction marquée de la quantité de CD36 à la surface des cellules érythroïdes humaines. De manière intéressante, une réduction de la quantité de CD36 membranaire est également observée en l'absence d'HELIOS au cours de la MKP. CD36, aussi connu comme la glycoprotéine plaquettaire IV, est impliquée dans le transport des acides gras au cours de la MKP, ainsi que dans l'adhésion cellulaire et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (Pepino et al., 2014). L'expression de CD36 est faible dans les CSH, mais augmente de façon importante dans les mégacaryocytes pour permettre l'importation d'acides gras nécessaire à la synthèse de la membrane plasmique et notamment du DMS ce qui lui

donne une fonction importante dans la MKP (Meng et al., 2023). En effet, il a été montré que l'inhibition de CD36 réduit la ploïdie des mégacaryocytes ainsi que la proportion de mégacaryocytes proplaquettaires *in vitro* (Valet et al., 2020). De plus, la déficience en CD36 mène à des thrombocytopénies chez la souris et chez l'Homme avec des mégacaryocytes de grande taille et une capacité à former des proplaquettes réduite (Barrachina et al., 2023). Par ailleurs, il est démontré qu'HELIOS stabilise l'expression de la protéine FOXP3 (Kim et al., 2015) et les souris déficientes en *Forkhead Box Protein 3* (FOXP3) ont une MKP anormale avec un nombre de mégacaryocytes augmenté dans les moelles osseuses et une numération plaquettaire réduite (Bernard et al., 2009). De plus, il est connu que la présence de CD36 dans les macrophages participe à l'activation de la voie pro-inflammatoire NF- κ B (Chávez-Sánchez et al., 2014) et qu'une sous unité de ce complexe, RelA est crucial pour le maintien de l'expression de FOXP3, un régulateur essentiel des lymphocytes Treg (Ronin et al., 2019). Les monocytes CD36+ ont la capacité d'induire la production des lymphocytes Treg FOXP3+ fonctionnelles à partir des sous-ensembles de cellules T CD4 et CD8, contribuant à la régulation immunitaire (Lee et al., 2021). Ensemble, cela suggère que la combinaison de la réduction de la quantité de CD36 à la surface des mégacaryocytes et la perte de stabilité de FOXP3 résultant de l'absence d'HELIOS pourraient induire la maturation anormale des mégacaryocytes.

Dans les phases finales de la MKP, l'expression des FT régulant la maturation des mégacaryocytes que nous avons quantifiés ne semble pas affectée à l'exception notable de NFE-2 qui est augmenté en l'absence d'HELIOS. NFE-2 est crucial pour les phases tardives de la MKP. Sa surexpression favorise la maturation des mégacaryocytes et la production de plaquettes chez la souris, tandis que des mutations de NFE-2 causent des thrombopénies chez l'Homme (Fock et al., 2008; Luk et al., 2020). De façon inattendue, la formation de proplaquettes et de plaquettes est réduite en l'absence d'HELIOS alors que l'expression de NFE-2 est augmentée. Cela suggère qu'une augmentation seule de l'expression de NFE-2 ne suffit pas à favoriser la maturation des mégacaryocytes, il faut qu'elle soit associée à d'autres paramètres comme une augmentation de la ploïdie, des modifications post-traductionnelles des microtubules corrects et une synthèse normale du DMS.

La proportion de mégacaryocytes proplaquettaires est réduite chez l'humain en l'absence d'HELIOS alors que chez les mégacaryocytes issus des souris *ikzf2* KO cette proportion est inchangé *in vitro*. Une explication serait la différence entre les modèles expérimentaux de modélisation de la MKP humaine et murine *in vitro*. En effet, les PH CD34+ humains utilisés sont circulants et engagé

pendant sept jours dans la lignée mégacaryocytaire puis mûrent ensuite pendant sept jours *in vitro* alors que les PH Lin⁻ murins sont d'origine médullaire et mûrent en quatre jours *in vitro*.

Chez la souris *ikzf2* KO, une augmentation de l'engagement des CSPH vers la lignée mégacaryocytaire *in vitro* a été mise en évidence (Cova et al., 2021) mais les phases finales de la MKP n'avaient pas été étudiées. Nous avons différencié les PH Lin⁻ de ces souris en mégacaryocytes et avons constaté une augmentation de la taille des mégacaryocytes *ikzf2* KO et une émission de proplaquettes plus rapide. Ces proplaquettes sont plus longues mais moins ramifiées. La formation des proplaquettes repose sur une réorganisation des microtubules, ce qui permet de démarrer et de maintenir leur élongation. En parallèle, le cytosquelette d'acto-myosine est nécessaire pour la ramification des proplaquettes et l'augmentation de leur nombre (Bornert et al., 2020). Nous avons mis en évidence une augmentation de la quantité de tubuline β 1 alors que la quantité de tubuline α tyrosinée était réduite. La tubuline β 1 est une tubuline spécifique de la lignée mégacaryocytaire, nécessaire à l'élongation des proplaquettes et à la formation de la bande marginale des plaquettes (Lecine et al., 1998; Palma-Barqueros et al., 2021). Son expression est contrôlée par le FT NFE-2 dont l'expression est augmentée dans les mégacaryocytes humains en l'absence d'HELIOS. La tyrosination de la tubuline α influence l'interaction des microtubules avec des protéines motrices comme les kinésines et les dynéines et est associée avec une instabilité accrue des microtubules (Kimmerlin et al., 2023; Peris et al., 2006). Ensemble, ces modifications dans la quantité de tubulines pourraient expliquer l'augmentation de la longueur des proplaquettes. Par ailleurs, la ramification des proplaquettes est guidée par la myosine IIA, le cytosquelette d'actine F et des protéines comme la tropomyosine-4 ou la formine qui lient les filaments d'actine et le réseau de microtubules (Ghalloussi et al., 2019; Pleines et al., 2017). Ces mécanismes sont particulièrement dépendants de la voie RhoA. Par conséquent l'organisation du cytosquelette d'acto-myosine et le fonctionnement de la voie RhoA pourrait être modifié dans les mégacaryocytes des souris *ikzf2* KO.

In vivo, nous avons observé chez la souris *ikzf2* KO une augmentation significative du nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse, probablement en raison de la dérégulation des mécanismes limitant l'engagement des progéniteurs vers cette lignée. Ce résultat peut être lié à une fonction d'HELIOS dans la régulation de la quiescence des CSH, et à son rôle dans la balance entre les lignées lymphoïdes et myéloïdes, tel que suggéré par des études antérieures montrant que l'absence d'HELIOS favorise l'engagement dans la voie mégacaryocytaire au détriment de la voie lymphoïde (Cova et al., 2021; Park et al., 2019). Nous avons mis en évidence dans les moelles osseuses des souris *ikzf2* KO des défauts d'ultrastructure d'une partie des mégacaryocytes menant

à une incapacité à libérer correctement les plaquettes dans la circulation sanguine. Ces anomalies seraient causées par un environnement médullaire altéré, où nous avons montré un phénotype inflammatoire avec une infiltration de leucocytes et une augmentation de la concentration sérique de TNF α . Ces résultats sont en accord avec la littérature puisqu'il est connu que les souris *ikzf2* KO manifestent un phénotype inflammatoire qui reproduit certaines manifestations du lupus érythémateux systémique (Kim et al., 2015; Sebastian et al., 2016). Nous avons également montré une augmentation de la concentration sérique de TPO qui participerait à l'augmentation du nombre de mégacaryocytes dans les moelles osseuses des souris *ikzf2* KO. Une autre explication à l'augmentation du nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse des souris *ikzf2* KO pourrait être liée à la condition inflammatoire qui permet la sortie de quiescence de certaines sous-populations de CSH pour produire directement des mégacaryocytes afin de permettre une production plus rapide de plaquettes (Pietras et al., 2015; Rodriguez-Fraticelli et al., 2018).

La numération plaquettaire des souris *ikzf2* KO était hétérogène avec dans 16,1% des souris une concentration plaquettaire élevée (>1600 x10³ plaquettes/ μ L) et dans 9,1% des souris une concentration plaquettaire faible (<800 x10³ plaquettes/ μ L). La concentration plus élevée de plaquettes pourrait s'expliquer par le nombre plus important de mégacaryocytes dans la moelle osseuse et l'augmentation des concentrations sérique de TPO. A l'inverse, les causes de la diminution de la concentration plaquettaire sont plus difficiles à déterminer sachant que dans ces souris le nombre de mégacaryocytes et la concentration de TPO est également augmentée. Une hypothèse à tester serait que dans ces souris, les plaquettes soient la cible d'anticorps anti-GPIb α menant à une augmentation de leur clairance par les macrophages de la rate et du foie. Car, il a déjà été observé chez des patients atteints de thrombocytopénies immunes des mutations faux-sens et non-sens d'*IKZF2* (Mohajeri et al., 2023; Shahin et al., 2022).

Nous avons également analysé les fonctions plaquettaires. Il est à noter que les plaquettes *ikzf2* KO agrègent un peu plus fortement en plaquettes lavées à une activation à l'ADP et au collagène. Ces résultats sont cohérents avec l'analyse de la régulation génique dans les CSH des souris *ikzf2* KO par Cova et al., 2021 qui montrait une augmentation de la régulation des gènes impliqués dans l'activation des plaquettes.

De plus, le temps de saignement à la queue des souris *ikzf2* KO est réduit par rapport à celui des souris WT. Le contexte inflammatoire et l'activation plus importante des plaquettes *ikzf2* KO suggère qu'elles pourraient être pré-activées. Cependant, ces plaquettes n'exposent pas la P-sélectine une

pré-activation des plaquettes sur seulement ce critère ne peut être totalement exclu par conséquent, il faudra également quantifier d'autres marqueurs de la pré-activation plaquettaire comme la forme activée de GPIIb/IIIa, les agrégats leuco-plaquettaires ou le CD40L soluble.

Pour conclure, ces travaux ont révélé un rôle clé d'HELIOS dans l'engagement des CSPH vers la lignée mégacaryocytaire ainsi que dans la maturation des mégacaryocytes, chez l'humain et la souris. L'absence d'HELIOS chez l'Homme favorise l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire au détriment de la lignée érythrocytaire, mais réduit la production de plaquettes par les mégacaryocytes. Chez la souris, l'absence d'HELIOS est associée à un phénotype inflammatoire et à des anomalies de maturation et de production de plaquettes par les mégacaryocytes *in vivo*. Ces altérations de la MKP ne sont pas uniquement liées au contexte inflammatoire des moelles osseuses des souris *ikzf2* KO, car des modifications de la MKP sont également mis en évidence *in vitro*. Ensemble, ces données suggèrent un rôle central pour HELIOS dans le maintien de l'équilibre hématopoïétique.

DISCUSSION GENERALE

La MKP est régulée par un réseau complexe de FT qui orchestre l'entrée des CSH dans la lignée mégacaryocytaire et la maturation des mégacaryocytes en modulant l'accessibilité à la chromatine et la transcription des gènes essentiel à ce processus. Les premières étapes de l'engagement des CSH en MEP sont principalement régulées par les FT ETV-6 et TAL-1 puis GATA1 et FOG-1 agissent ensemble pour renforcer l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire. L'initiation du programme mégacaryocytaire se fait via RUNX1 alors que NFE-2 et FLI1 régulent les processus tardifs de la maturation des mégacaryocytes (Tijssen et al., 2016).

Dans ce réseau de régulation complexe, protéines IKAROS, PEGASUS et HELIOS appartenant à la famille de FT IKAROS sont des contributeurs essentiels à la MKP. L'absence d'IKAROS augmente la formation des cellules de la lignée érythro-mégacaryocytaire dans des modèles souris et la dégradation d'IKAROS mène à une thrombocytopenie chez l'humain (Liu et al., 2018; Malinge et al., 2013). De plus, des mutations faux-sens dans le gène *PEGASUS* sont associées à des défauts dans la biogénèse de plaquettes et des granules (Leinoe et al., 2021; Lentaigne et al., 2019). Enfin, une étude récente a démontré qu'HELIOS est fortement exprimé dans les CSPH murines, où il joue un rôle important dans le maintien de la quiescence des CSH en réprimant directement le programme d'expression génique des mégacaryocytes. Cette répression est causée par la compaction de la chromatine dans les régions régulatrices des gènes spécifiques des mégacaryocytes *GATA2* et *RUNX1*. Ces données suggèrent qu'HELIOS joue un rôle dans le maintien de la pluripotence dans les CSH en réprimant de façon continue le destin mégacaryocytaire (Cova et al., 2021).

Cependant, les mécanismes précis par lesquels HELIOS exerce ses effets sur la MKP restent partiellement compris, c'est pourquoi des recherches plus approfondies ont été menées. Les résultats de mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence les fonctions du FT HELIOS dans l'engagement dans la voie érythro-mégacaryocytaire et la régulation de la MKP que ce soit chez l'Homme ou la souris.

Chez l'Homme, l'absence d'HELIOS modifie la balance érythro-mégacaryocytaire au bénéfice de la lignée mégacaryocytaire. La MKP était cependant altérée avec une proportion de mégacaryocytes proplaquettaire et une production de plaquettes réduite en l'absence d'HELIOS. Aucun des FT régulant la MKP testés ne semble expliquer ce phénomène même si de façon paradoxale la quantité de transcrit de NFE-2 est augmentée en l'absence d'HELIOS. Une piste pour expliquer ce phénomène en l'absence d'HELIOS est la réduction de la population de mégacaryocytes CD34⁺ CD41⁺ à fort pouvoir proplaquettaire au profit des mégacaryocytes CD34⁻ CD41⁺ à faible potentiel

proplaquettaire. Une autre piste est la baisse de la quantité de CD36 présente sur les mégacaryocytes qui pourrait diminuer la quantité de FOXP3 et de NF- κ B diminuant *in fine* la quantité de proplaquettes et de plaquettes produites.

Chez la souris, nous avons mis en évidence *in vitro* une apparition des proplaquettes accélérées chez les mégacaryocytes issus des souris *ikzf2* KO qui étaient plus longues mais moins ramifiées. Nous avons montré *in vivo* dans les moelles osseuses des souris *ikzf2* KO un contexte inflammatoire avec une infiltration de leucocytes et une augmentation de la concentration sérique de TNF α . Cette inflammation pourrait être la cause des défauts d'ultrastructure d'une partie des mégacaryocytes de la moelle osseuse menant à une incapacité à libérer correctement les plaquettes dans la circulation sanguine. De plus, nous avons démontré que les plaquettes des souris *ikzf2* KO ont une activation plus forte à l'ADP et au collagène que les plaquettes WT ce qui résulte en un temps de saignement à la queue diminué chez ces souris.

L'ensemble de ces modifications peuvent s'expliquer soit par des modifications cellulaires intrinsèque causées par l'absence d'HELIOS soit par le phénotype pro-inflammatoire résultant de l'absence d'HELIOS.

Hypothèse intrinsèque : l'accélération de l'apparition des mégacaryocytes provoquée par l'absence d'HELIOS entraîne un défaut de maturation des mégacaryocytes humains

HELIOS, bien que fortement exprimé dans les CSH et les progéniteurs précoces, est absent des mégacaryocytes matures. Par conséquent, son absence pourrait perturber les premières étapes de la différenciation, conduisant à une maturation précipitée des mégacaryocytes au détriment de leur maturation optimale. Pour approfondir cette hypothèse, il sera nécessaire d'étudier la cinétique d'apparition des marqueurs mégacaryocytaires (CD41/CD61, CD42c) chez les PH *ikzf2* KO *in vitro* dans un milieu de culture favorisant la MKP. Il faudra également réaliser le pendant transcriptionnel de cette cinétique pour déterminer si l'accélération de la maturation impact l'expression de FT clés de la maturation des mégacaryocytes (NFE-2, FLI-1, PEGASUS) ou de l'entrée dans la MKP (RUNX1, GATA2, GATA1).

Déterminer plus précisément la façon dont l'absence d'HELIOS modifie la régulation de la MKP chez l'humain sera nécessaire. Il est possible de que l'absence d'HELIOS modifie les interactions entre les IKZFs et les membre de leur famille et leurs co-facteurs. Nous pourrions étudier ces interactions par co-immunoprécipitation ou bien par *proximity ligation assay*. Une façon d'avoir une vue ensemble

des conséquences de l'absence d'HELIOS sur la régulation génique serait d'utiliser des techniques de génomique comme un CHIP-seq ou un ATAC-seq. De cette manière nous aurons accès à de nouvelles cibles de régulation d'HELIOS.

L'étude de la MKP dans un microenvironnement différent de la moelle osseuse pourrait également nous donner des informations sur les fonctions d'HELIOS dans ce mécanisme. La MKP lors du développement est différentes de la MKP adultes, les mégacaryocytes matures plus rapidement et ont une ploïdie plus faible. Il sera intéressant de déterminer la façon dont l'absence d'HELIOS impacte la MKP fœtale. Dans ce but, nous mettrons en culture des PH issues de foie fœtales de souris *ikzf2* KO et déterminerons le retentissement de l'absence d'HELIOS sur la prolifération, la cinétique d'apparition des marqueurs mégacaryocytaires (CD41/CD61, CD42), la ploïdie, l'élongation des proplaquettes et la production de plaquettes.

Nous avons montré que l'absence d'HELIOS réduit la quantité de CD36 à la surface des cellules érythroïdes humaines *in vitro*. De manière intéressante, une réduction de la quantité de CD36 membranaire est également observée en l'absence d'HELIOS au cours de la MKP. Il faudra déterminer si la quantité de CD36 est également réduites sur les mégacaryocytes des souris *ikzf2* KO. Si cette réduction se confirme dans ce modèle, l'absence de CD36 serait une bonne piste pour expliquer les défauts de MKP observés en l'absence d'HELIOS.

Nous avons également observé chez les mégacaryocytes issus des souris *ikzf2* KO une augmentation de la quantité de tubuline β 1 et une réduction de la quantité de tubuline α tyrosiné dans les mégacaryocytes suggérant un impact d'HELIOS sur les modifications post traductionnelles de tubulines, nécessaire à l'élongation des proplaquettes et la formations de la bande marginales des plaquettes. Il sera intéressant de mieux caractériser les conséquences de l'absence d'HELIOS sur ces modifications en quantifiant d'autre modification post traductionnelles des tubulines comme l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination et déterminer si une surexpression d'HELIOS, par exemple par électroporation de plasmide inverse ce phénomène.

Hypothèse extrinsèque : la perturbation du microenvironnement médullaire provoquée par l'absence d'HELIOS entraine un défaut de maturation des mégacaryocytes in vivo

L'altération du microenvironnement médullaire chez les souris *ikzf2* KO pourrait également contribuer aux défauts de maturation des mégacaryocytes. Nous avons observé une infiltration de cellules immunitaires autour des mégacaryocytes dans la moelle osseuse de ces souris. Cela pourrait

être en lien avec le phénotype pro-inflammatoire des souris *ikzf2* KO, caractérisé par des réponses auto-immunes dues à la perte de la fonction anti-inflammatoire des lymphocytes T régulateurs (Kim et al., 2015; Sebastian et al., 2016). Si il a été montré que la répression de l'engagement des CSPH par HELIOS est indépendante de l'inflammation chronique dans un modèle de souris déficientes pour HELIOS uniquement dans les lymphocytes T CD4+ (Cova et al., 2021), les conséquences de l'inflammation sur la maturation des mégacaryocytes des souris *ikzf2* KO n'ont pas été déterminées. En effet, il a été démontré que l'inflammation chronique induit un remodelage de la niche hématopoïétique et perturbe la maturation des mégacaryocytes (Salzmann et al., 2016). Ainsi, l'infiltration inflammatoire pourrait exacerber les anomalies de maturation observées. Pour tester cette hypothèse, il sera essentiel d'analyser le phénotype inflammatoire des moelles osseuses des souris *ikzf2* KO mesurant les niveaux de cytokines pro-inflammatoires plasmatique par Luminex. Il faudra également déterminer si l'ajout de sérum provenant de souris *ikzf2* KO ou de cytokines pro-inflammatoires (comme l'IFN α ou l'IL-1 β) dans les cultures de PH *ikzf2* KO ou de PH CD34+ accélère la maturation mégacaryocytaire. De plus, pour déterminer si l'environnement immédiat des PH *ikzf2* KO influence leur devenir nous pourrions faire des cultures d'explants de moelle osseuse pour déterminer les anomalies de MKP dans ces moelles. Puisque nous avons constaté en MET une co-localisation importante des mégacaryocytes avec les neutrophiles, il sera également intéressant de faire une coculture de PH CD34+ traités avec ALV2 en présence de neutrophiles pour déterminer l'impact des cytokines inflammatoires produites par ces cellules sur la MKP.

Les mégacaryocytes ont été récemment décrits comme des cellules immunes. En effet, Les mégacaryocytes expriment des récepteurs immunitaires tels que les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs Fc γ , ce qui leur permet de détecter les agents pathogènes et les signaux inflammatoires. Ils contrôlent la prolifération des CSH et facilitent la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse. (Cunin and Nigrovic, 2019). Une sous population de mégacaryocytes exprimant fortement CXCR4 a été identifiée (Wang et al., 2022). Il sera intéressant, vu le phénotype inflammatoire des souris *ikzf2* KO de déterminer si l'absence d'HELIOS permet d'augmenter la proportion de ces mégacaryocytes *in vivo* et *in vitro*.

Impact de l'absence d'HELIOS sur la remontée de la numération plaquettaire

En conditions inflammatoires, certaines sous-populations de CSH sont capables de sortir de quiescence pour produire directement des mégacaryocytes afin de permettre une production rapide de plaquettes (Pietras et al., 2015; Rodriguez-Fraticelli et al., 2018). Il serait pertinent de

déterminer si un mécanisme similaire est observé chez les souris *ikzf2* KO et d'identifier les populations cellulaires responsables de cette potentielle remontée accélérée de la numération plaquettaire. Pour cela, nous induirons une thrombopénie chez les souris en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre le GPIIb α spécifique des plaquettes murines, puis évaluerons la cinétique de récupération de la numération plaquettaire chez les souris *ikzf2* KO par rapport aux souris WT à différents temps. Nous anticipons une remontée plus rapide de la numération plaquettaire chez les souris *ikzf2* KO en raison de l'augmentation des populations de CSH CD41+, MPP2 CD41+, et de progéniteurs mégacaryocytaires chez ces souris.

Rôle des différentes populations de CSPH dans la MKP en l'absence d'HELIOS

Par ailleurs, nous évaluerons l'impact de l'absence d'HELIOS sur la MKP dans l'ensemble des CSPH en isolant et caractérisant les différentes sous-populations de CSPH présentes dans la moelle osseuse des souris *ikzf2* KO. Ces cellules seront mises en culture pour déterminer leur capacité de prolifération, la cinétique d'apparition des proplaquettes, et la quantité de plaquettes produites par mégacaryocyte. Ces analyses permettront de mieux comprendre comment l'absence d'HELIOS influence le potentiel mégacaryocytaire des différentes populations de progéniteurs et d'identifier la CSPH la plus affectée par cette perturbation.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont révélé un rôle clé d'HELIOS dans l'engagement des CSPH vers la lignée mégacaryocytaire ainsi que dans la régulation de la maturation des mégacaryocytes, chez l'humain et la souris. L'absence d'HELIOS favorise l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire au détriment de la lignée érythrocytaire mais au détriment de l'apparition des proplaquettes et de la production de plaquettes. Elle est également associée à un phénotype inflammatoire *in vivo* et des anomalies de maturation et de production de plaquettes par les mégacaryocytes, suggérant qu'il a un rôle central dans le maintien de l'équilibre hématopoïétique. Si les mécanismes moléculaires et cellulaires spécifiques régulant ces mécanismes restent pour certains encore à déterminer, la suppression d'HELIOS pourrait être une façon d'accélérer la MKP et par conséquent la remontée de plaquettes dans des conditions pathologiques.

ANNEXES

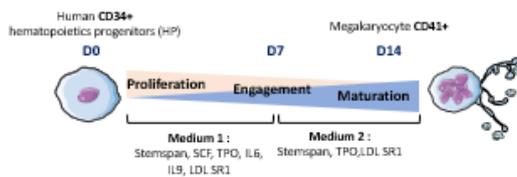
INTRODUCTION

Megakaryopoiesis (MKP) is a physiological process in which hematopoietic cells (HSCs) give rise to the medullary precursor of blood platelets: the megakaryocyte (MK). MKP is finely regulated by cytokines, the microenvironment and transcription factors (TFs). They successively control i) HSCs commitment to the megakaryocyte lineage, ii) MK maturation and iii) platelets release. Recently, Helios and Ikaros, two members of the Ikaros family of TFs, have been implicated in MK lineage commitment and MK maturation, respectively.

However, the precise mechanisms by which Helios and Ikaros regulate MKP remain unclear.

EXPERIMENTAL DESIGN

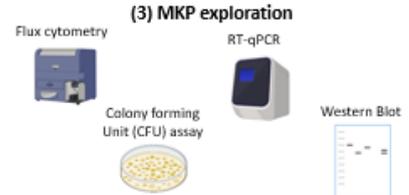
(1) Cellular model recapitulating megakaryopoiesis



(2) Chemical tools

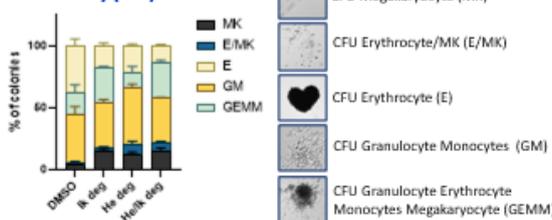
ALV1 : Ikaros and Helios degrader
ALV2 : Helios degrader
Avadomide : Ikaros degrader

10uM treatment at D0, D5 and D7



1. Investigating the involvement of Ikaros and Helios in the hematopoietic potential of CD34+ progenitors

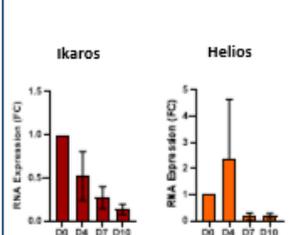
• CFU assay (n=3)



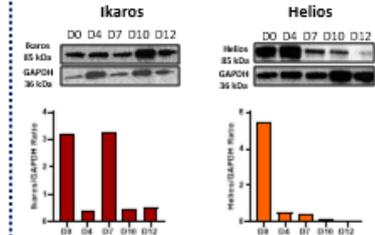
While Helios appears to increase the erythro/megakaryocytic commitment of HP, Ikaros seems to favor the megakaryocytic pathway to the disadvantage of the erythrocyte pathway

2. Expression of Ikaros and Helios during megakaryopoiesis

• RT-qPCR (n=3)



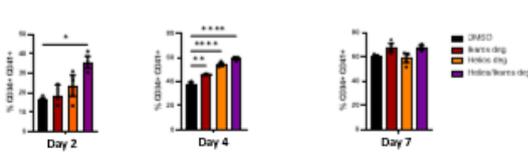
• Western Blot (n=1)



While Helios is expressed during HP commitment to the megakaryocytic pathway, Ikaros is expressed during both MK commitment and maturation phase.

3. Expression analysis of CD41: a megakaryocytic marker

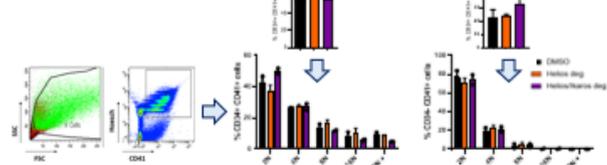
• Flow cytometry (n=3)



Helios and Ikaros cooperate to accelerate MK apparition

4. Analysis of a crucial step of maturation : the endomitosis

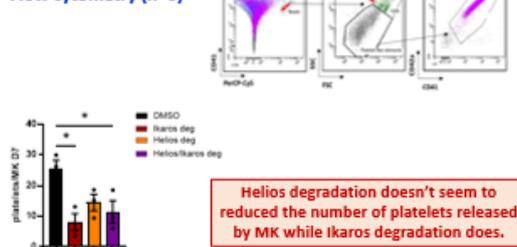
• Flow cytometry (n=2)



Helios and Ikaros seems to decrease MK ploidy but accelerate the apparition of MK mature population (CD34- CD41+)

5. Impact of Ikaros and Helios degradation on platelets release

• Flow cytometry (n=3)



Helios degradation doesn't seem to reduced the number of platelets released by MK while Ikaros degradation does.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

In conclusion, Helios seems to regulate early HP commitment into the MK pathway while Ikaros regulate late commitment. Both of them accelerate MK apparition and maturation at the detriment of the platelets released.

It would be interesting to determine more closely if the two proteins associate homo- or heterodimerally to play their functions in MKP. Another point of interest is to determine their role during hematopoietic stress condition such as inflammation when the demand for platelet production is increased.

CONTACT INFORMATION

Catherine.strassel@efs.sante.fr



INTRODUCTION AND AIM

The differentiation of haematopoietic stem cells (HSC) into megakaryocytes (MK) is controlled by cell-intrinsic transcription factors. While HELIOS is known to be a key regulator of T cell development, recent evidence from a mouse model indicates that it also represses HSC commitment into the MK lineage. However, its functions in MK differentiation and maturation remain to be explored. Consequently, we aimed to investigate the role of HELIOS during megakaryopoiesis and thrombopoiesis.

HELIOS DEFICIENCY ACCELERATES HSC MEGAKARYOCYTIC COMMITMENT BUT IMPAIR LATE-STAGE PROPLATELETS FORMATION

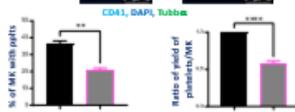
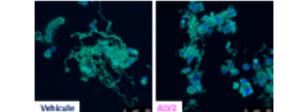
Method: MK differentiation and maturation



The role of HELIOS was investigated using a specific chemical degrader, ALV2. CD34+ HP were cultured in a medium that promoted megakaryopoiesis.

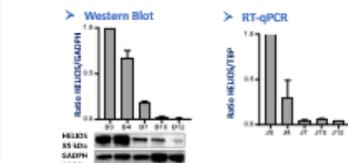
C. Visualization and quantification of MK bearing proplatelets and platelet release

Confocal microscopy



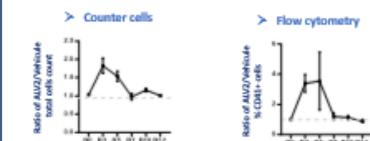
HELIOS deficiency leads to a defective thrombopoiesis

A. HELIOS dynamics during megakaryopoiesis



HELIOS level is reduced during megakaryocytes differentiation

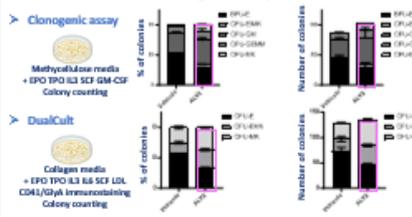
B. Analysis of proliferation and appearance of key MKP markers



HELIOS deficiency increases HP proliferation and their commitment to the megakaryocyte lineage

HELIOS BIASED CD34+ HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS TOWARDS THE MEGAKARYOCYTIC LINEAGE

A. Clonogenic assays

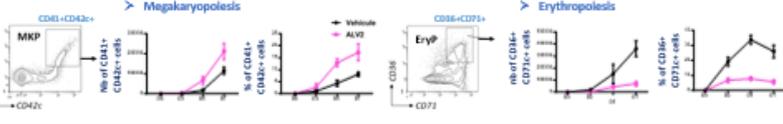


HELIOS deficiency modified the erythro-megakaryocytic balance

Method: Erythro-Megakaryocytic differentiation



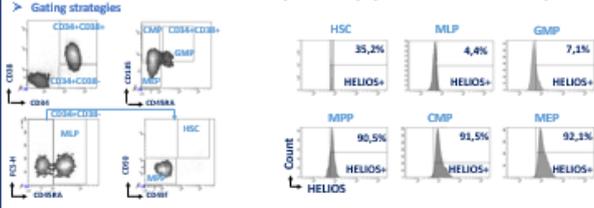
The role of HELIOS was investigated using a specific chemical degrader, ALV2. CD34 HP were cultured in media promoting both erythropoiesis and megakaryopoiesis.



HELIOS deficiency biases hematopoietic progenitors CD34+ towards the megakaryocytic pathway

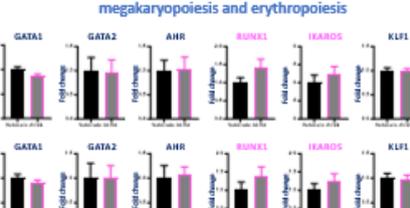
IDENTIFICATION OF HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS BIASED TOWARDS THE MEGAKARYOCYTIC LINEAGE

A. Identification of hematopoietic subpopulations where Helios is present

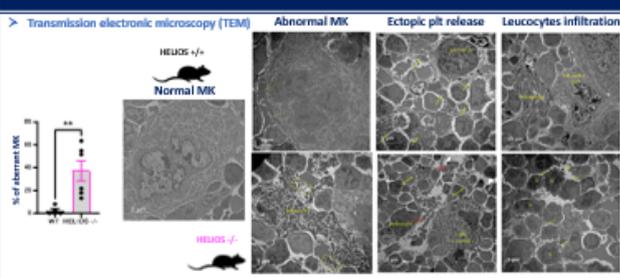


HELIOS is mainly present in MPP, CMP and MEP cells

B. Quantification of key transcription factors involved in megakaryopoiesis and erythropoiesis



CONFIRMATION OF THE DEFECTIVE MEGAKARYOPOIESIS IN MICE



HELIOS deficiency leads to aberrant MK maturation, ectopic platelets release and leukocytes infiltration in mouse bone marrow

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Absence of HELIOS biases CD34+ in megakaryopoiesis:

- Early appearance of MKs => increase in MK number
- Inability of MKs to form proplatelets => defective platelet production

The impact of HELIOS deficiency on the transcriptional network in CMP and MEP remains to be determined => qPCR, RNAseq

Aberrant megakaryopoiesis in HELIOS^{-/-} mouse bone marrow:

- Impaired maturation of MKs => DMS destructure, ectopic platelet release
- Leukocyte infiltration => pro-inflammatory environment

¹ Cova, G., et al. (2021). Helios represses megakaryocyte priming in hematopoietic stem and progenitor cells. *J Exp Med* 218, e20202317.

CONTACT INFORMATION

Catherine.strassel@efs.sante.fr



BIBLIOGRAPHIE

- Abkowitz, J. L., Catlin, S. N., McCallie, M. T. and Gutter, P.** (2002). Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* **100**, 2665–2667.
- Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.-J., Thoren, L. A. M., et al.** (2005). Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential. *Cell* **121**, 295–306.
- Aihara, A., Koike, T., Abe, N., Nakamura, S., Sawaguchi, A., Nakamura, T., Sugimoto, N., Nakauchi, H., Nishino, T. and Eto, K.** (2017). Novel TPO receptor agonist TA-316 contributes to platelet biogenesis from human iPS cells. *Blood Adv.* **1**, 468–476.
- Amigo, J. D., Ackermann, G. E., Cope, J. J., Yu, M., Cooney, J. D., Ma, D., Langer, N. B., Shafizadeh, E., Shaw, G. C., Horsely, W., et al.** (2009). The role and regulation of friend of GATA-1 (FOG-1) during blood development in the zebrafish. *Blood* **114**, 4654–4663.
- Apostolov, A., Litim-Mecheri, I., Oravec, A., Goepp, M., Kirstetter, P., Marchal, P., Ittel, A., Mauvieux, L., Chan, S. and Kastner, P.** (2016). Sumoylation Inhibits the Growth Suppressive Properties of Ikaros. *PLOS ONE* **11**, e0157767.
- Asanuma, S., Yamagishi, M., Kawanami, K., Nakano, K., Sato-Otsubo, A., Muto, S., Sanada, M., Yamochi, T., Kobayashi, S., Utsunomiya, A., et al.** (2013). Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. *Cancer Sci.* **104**, 1097–1106.
- Ballasch, I., García-García, E., Vila, C., Pérez-González, A., Sancho-Balsells, A., Fernández, J., Soto, D., Puigdemívol, M., Gasull, X., Alberch, J., et al.** (2023). Izkf1 as a novel regulator of microglial homeostasis in inflammation and neurodegeneration. *Brain. Behav. Immun.* **109**, 144–161.
- Barrachina, M. N., Pernes, G., Becker, I. C., Allaey, I., Hirsch, T. I., Groeneveld, D. J., Khan, A. O., Freire, D., Guo, K., Carminita, E., et al.** (2023). Efficient megakaryopoiesis and platelet production require phospholipid remodeling and PUFA uptake through CD36. *Nat. Cardiovasc. Res.* **2**, 746–763.
- Barrio, S., Munawar, U., Zhu, Y. X., Giesen, N., Shi, C.-X., Viá, M. D., Sanchez, R., Bruins, L., Demler, T., Müller, N., et al.** (2020). IKZF1/3 and CRL4CRBN E3 ubiquitin ligase mutations and resistance to immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Haematologica* **105**, e237–e241.
- Begonja, A. J., Pluthero, F. G., Suphamongmee, W., Giannini, S., Christensen, H., Leung, R., Lo, R. W., Nakamura, F., Lehman, W., Plomann, M., et al.** (2015). FlnA binding to PACSIN2 F-BAR domain regulates membrane tubulation in megakaryocytes and platelets. *Blood* **126**, 80–88.
- Behnke, O.** (1968). An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J. Ultrastruct. Res.* **24**, 412–433.

- Behrens, K., Trivai, I., Schwieger, M., Tekin, N., Alawi, M., Spohn, M., Indenbirken, D., Ziegler, M., Müller, U., Alexander, W. S., et al.** (2016). Runx1 downregulates stem cell and megakaryocytic transcription programs that support niche interactions. *Blood* **127**, 3369–3381.
- Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D. and Iscove, N. N.** (2010). Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* **6**, 48–58.
- Bernard, J. J., Seweryniak, K. E., Koniski, A. D., Spinelli, S. L., Blumberg, N., Francis, C. W., Taubman, M. B., Palis, J. and Phipps, R. P.** (2009). Foxp3 Regulates Megakaryopoiesis and Platelet Function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1874–1882.
- Boast, B., Nunes-Santos, C. de J., Kuehn, H. S. and Rosenzweig, S. D.** (2021). Ikaros-Associated Diseases: From Mice to Humans and Back Again. *Front. Pediatr.* **9**, 705497.
- Boneu, B. and Cazenave, J.-P.** (1997). *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose*. 2e éd. révisée. Reims: Boehringer Ingelheim.
- Bornelöv, S., Reynolds, N., Xenophontos, M., Gharbi, S., Johnstone, E., Floyd, R., Ralser, M., Signolet, J., Loos, R., Dietmann, S., et al.** (2018). The Nucleosome Remodeling and Deacetylation Complex Modulates Chromatin Structure at Sites of Active Transcription to Fine-Tune Gene Expression. *Mol. Cell* **71**, 56-72.e4.
- Bornert, A., Boscher, J., Pertuy, F., Eckly, A., Stegner, D., Strassel, C., Gachet, C., Lanza, F. and Léon, C.** (2020). Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica* **106**, 1368–1380.
- Boscher, J., Guinard, I., Eckly, A., Lanza, F. and Léon, C.** (2020). Blood platelet formation at a glance. *J. Cell Sci.* **133**, jcs244731.
- Bridgell, R. A., Brandt, J. E., Straneva, J. E., Srour, E. F. and Hoffman, R.** (1989). Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* **74**, 145–151.
- Brodie, S. A., Khincha, P. P., Giri, N., Bouk, A. J., Steinberg, M., Dai, J., Jessop, L., Donovan, F. X., Chandrasekharappa, S. C., de Andrade, K. C., et al.** (2021). Pathogenic germline IKZF1 variant alters hematopoietic gene expression profiles. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* **7**, a006015.
- Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M. P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., et al.** (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence via Cxcl4 secretion. *Nat. Med.* **20**, 1315–1320.
- Bryder, D., Rossi, D. J. and Weissman, I. L.** (2006). Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol.* **169**, 338–346.
- Cai, Q., Dierich, A., Oulad-Abdelghani, M., Chan, S. and Kastner, P.** (2009). Helios Deficiency Has Minimal Impact on T Cell Development and Function. *J. Immunol.* **183**, 2303–2311.
- Calvanese, V. and Mikkola, H. K. A.** (2023). The genesis of human hematopoietic stem cells. *Blood* **142**, 519–532.

- Cazenave, J.-P.** (2013). [Blood platelets: conclusion]. *Bull. Acad. Natl. Med.* **197**, 419–423.
- Challen, G. A., Pietras, E. M., Wallscheid, N. C. and Signer, R. A. J.** (2021). Simplified murine multipotent progenitor isolation scheme: Establishing a consensus approach for multipotent progenitor identification. *Exp. Hematol.* **104**, 55–63.
- Chávez-Sánchez, L., Garza-Reyes, M. G., Espinosa-Luna, J. E., Chávez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, M. V. and Blanco-Favela, F.** (2014). The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans. *Hum. Immunol.* **75**, 322–329.
- Chen, L., Kostadima, M., Martens, J. H. A., Canu, G., Garcia, S. P., Turro, E., Downes, K., Macaulay, I. C., Bielczyk-Maczynska, E., Coe, S., et al.** (2014). Transcriptional diversity during lineage commitment of human blood progenitors. *Science* **345**, 1251033.
- Chitu, V. and Stanley, E. R.** (2015). PACSIN2: a BAR-riener forming the megakaryocyte DMS. *Blood* **126**, 5–6.
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F. and Shaper, J. H.** (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* **133**, 157–165.
- Cova, G., Taroni, C., Deau, M.-C., Cai, Q., Mittelheisser, V., Philipps, M., Jung, M., Cerciat, M., Le Gras, S., Thibault-Carpentier, C., et al.** (2021). Helios represses megakaryocyte priming in hematopoietic stem and progenitor cells. *J. Exp. Med.* **218**, e20202317.
- Cunin, P. and Nigrovic, P. A.** (2019). Megakaryocytes as immune cells. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 1111.
- Di Paola, J. and Porter, C. C.** (2019). ETV6-related thrombocytopenia and leukemia predisposition. *Blood* **134**, 663–667.
- Dijon, M., Bardin, F., Murati, A., Batoz, M., Chabannon, C. and Tonnelles, C.** (2008). The role of Ikaros in human erythroid differentiation. *Blood* **111**, 1138–1146.
- Donada, A., Balayn, N., Sliwa, D., Lordier, L., Ceglia, V., Baschieri, F., Goizet, C., Favier, R., Tosca, L., Tachdjian, G., et al.** (2019). Disrupted filamin A/ α IIb β 3 interaction induces macrothrombocytopenia by increasing RhoA activity. *Blood* **133**, 1778–1788.
- Dumortier, A., Kirstetter, P., Kastner, P. and Chan, S.** (2003). Ikaros regulates neutrophil differentiation. *Blood* **101**, 2219–2226.
- Ebbe, S. and Stohlman, F.** (1965). MEGAKARYOCYTOPOIESIS IN THE RAT. *Blood* **26**, 20–35.
- Eckly, A., Strassel, C., Freund, M., Cazenave, J.-P., 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., Strassel, C., Cazenave, J.-P., Lanza, F., Léon, C. and Gachet, C.** (2012). Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **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.
- Eckly, A., Scandola, C., Oprescu, A., Michel, D., Rinckel, J.-Y., Proamer, F., Hoffmann, D., Receveur, N., Léon, C., Bear, J. E., et al. (2020). Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids. *J. Thromb. Haemost. JTH* **18**, 2987–3001.
- El Mdawar, M.-B., Maître, B., Magnenat, S., Tupin, F., Jönsson, F., Gachet, C., de la Salle, H. and Hechler, B. (2021). Platelet FcγRIIA-induced serotonin release exacerbates the severity of transfusion-related acute lung injury in mice. *Blood Adv.* **5**, 4817–4830.
- Elagib, K. E., Racke, F. K., Mogass, M., Khetawat, R., Delehanty, L. L. and Goldfarb, A. N. (2003). RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* **101**, 4333–4341.
- Escobar, C., Kao, C.-Y., Das, S. and Papoutsakis, E. T. (2020). Human megakaryocytic microparticles induce de novo platelet biogenesis in a wild-type murine model. *Blood Adv.* **4**, 804–814.
- Feng, Y., Yu, M., Zhu, F., Zhang, S., Ding, P. and Wang, M. (2018). IL-9 Promotes the Development of Deep Venous Thrombosis by Facilitating Platelet Function. *Thromb. Haemost.* **118**, 1885–1894.
- Fock, E., Yan, F., Pan, S. and Chong, B. H. (2008). NF-E2-mediated enhancement of megakaryocytic differentiation and platelet production in vitro and in vivo. *Exp. Hematol.* **36**, 78–92.
- Folman, C. C., Linthorst, G. E., van Mourik, J., van Willigen, G., de Jonge, E., Levi, M., de Haas, M. and von dem Borne, A. E. (2000). Platelets release thrombopoietin (Tpo) upon activation: another regulatory loop in thrombocytopoiesis? *Thromb. Haemost.* **83**, 923–930.
- French, S. L., Vijey, P., Karhohs, K. W., Wilkie, A. R., Horin, L. J., Ray, A., Posorske, B., Carpenter, A. E., Machlus, K. R. and Italiano, J. E. (2020). High-content, label-free analysis of proplatelet production from megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost. JTH* **18**, 2701–2711.
- Frost, A., Unger, V. M. and De Camilli, P. (2009). The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* **137**, 191–196.
- Fujii, K., Ishimaru, F., Nakase, K., Tabayashi, T., Kozuka, T., Naoki, K., Miyahara, M., Toki, H., Kitajima, K., Harada, M., et al. (2003). Over-expression of short isoforms of Helios in patients with adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J. Haematol.* **120**, 986–989.
- Gao, S., Zhang, Y. and Liu, F. (2023). Revisiting the lineage contribution of hematopoietic stem and progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* **150**, dev201609.
- Garcia-Leon, M. J., Liboni, C., Mittelheisser, V., Bochler, L., Follain, G., Mouriaux, C., Busnelli, I., Larnicol, A., Colin, F., Peralta, M., et al. (2024). Platelets favor the outgrowth of established metastases. *Nat. Commun.* **15**, 3297.
- Georgopoulos, K. (2017). The making of a lymphocyte: the choice among disparate cell fates and the IKAROS enigma. *Genes Dev.* **31**, 439–450.

- Ghalloussi, D., Dhenge, A. and Bergmeier, W.** (2019). New insights into cytoskeletal remodeling during platelet production. *J. Thromb. Haemost.* **17**, 1430–1439.
- Grass, J. A., Jing, H., Kim, S.-I., Martowicz, M. L., Pal, S., Blobel, G. A. and Bresnick, E. H.** (2006). Distinct Functions of Dispersed GATA Factor Complexes at an Endogenous Gene Locus. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7056–7067.
- Haas, S., Hansson, J., Klimmeck, D., Loeffler, D., Velten, L., Uckelmann, H., Wurzer, S., Prendergast, Á. M., Schnell, A., Hexel, K., et al.** (2015). Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell Stem Cell* **17**, 422–434.
- Hacein-Bey-Abina, S., Estienne, M., Bessoles, S., Echchakir, H., Pederzoli-Ribeil, M., Chiron, A., Aldaz-Carroll, L., Leducq, V., Zhang, Y., Souyri, M., et al.** (2020). Erythropoietin is a major regulator of thrombopoiesis in thrombopoietin-dependent and -independent contexts. *Exp. Hematol.* **88**, 15–27.
- Haeckel, E. H. P. A.** (1877). *Anthropogenie*. W. Engelmann.
- Hao, Q.-L., Shah, A. J., Thiemann, F. T., Smogorzewska, E. M. and Crooks, G. M.** (1995). A Functional Comparison of CD34⁺ CD38[–] Cells in Cord Blood and Bone Marrow. *Blood* **86**, 3745–3753.
- Heizmann, B., Kastner, P. and Chan, S.** (2018). The Ikaros family in lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* **51**, 14–23.
- Hetemäki, I., Kaustio, M., Kinnunen, M., Heikkilä, N., Keskitalo, S., Nowlan, K., Miettinen, S., Sarkkinen, J., Glumoff, V., Andersson, N., et al.** (2021). Loss-of-function mutation in IKZF2 leads to immunodeficiency with dysregulated germinal center reactions and reduction of MAIT cells. *Sci. Immunol.* **6**, eabe3454.
- Hitchcock, I. S. and Kaushansky, K.** (2014). Thrombopoietin from beginning to end. *Br. J. Haematol.* **165**, 259–268.
- Hock, H., Meade, E., Medeiros, S., Schindler, J. W., Valk, P. J. M., Fujiwara, Y. and Orkin, S. H.** (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev.* **18**, 2336–2341.
- Huang, H. and Cantor, A. B.** (2009). Common Features of Megakaryocytes and Hematopoietic Stem Cells: What's the Connection? *J. Cell. Biochem.* **107**, 857–864.
- Huang, M., Wang, L., Zhang, Q., Zhou, L., Liao, R., Wu, A., Wang, X., Luo, J., Huang, F., Zou, W., et al.** (2024). Interleukins in Platelet Biology: Unraveling the Complex Regulatory Network. *Pharm. Basel Switz.* **17**, 109.
- Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M., et al.** (2004). AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat. Med.* **10**, 299–304.
- 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.

- John, L. B. and Ward, A. C.** (2011). The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Mol. Immunol.* **48**, 1272–1278.
- John, L. B., Yoong, S. and Ward, A. C.** (2009). Evolution of the Ikaros gene family: implications for the origins of adaptive immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 4792–4799.
- 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.
- Kastner, P., Aukenova, A. and Chan, S.** (2024). Evolution of the Ikaros family transcription factors: From a deuterostome ancestor to humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **694**, 149399.
- Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C. and Morrison, S. J.** (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109–1121.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., et al.** (1999). Ikaros DNA-Binding Proteins Direct Formation of Chromatin Remodeling Complexes in Lymphocytes. *Immunity* **10**, 345–355.
- Kim, H.-J., Barnitz, R. A., Kreslavsky, T., Brown, F. D., Moffett, H., Lemieux, M. E., Kaygusuz, Y., Meissner, T., Holderried, T. A. W., Chan, S., et al.** (2015). Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science* **350**, 334–339.
- Kimmerlin, Q., Tavian, M., Gachet, C., Lanza, F. and Brouard, N.** (2021). Isolation of Mouse Megakaryocyte Progenitors. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Kimmerlin, Q., Strassel, C., Eckly, A. and Lanza, F.** (2023). The tubulin code in platelet biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **137**, 63–73.
- Krönke, J., Udeshi, N. D., Narla, A., Grauman, P., Hurst, S. N., McConkey, M., Svinkina, T., Heckl, D., Comer, E., Li, X., et al.** (2014). Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* **343**, 301–305.
- Large, E. E. and Mathies, L. D.** (2010). hunchback and Ikaros-like zinc finger genes control reproductive system development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **339**, 51–64.
- Laurenti, E. and Göttgens, B.** (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* **553**, 418–426.
- 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.
- Lee, J. G., Jaeger, K. E., Seki, Y., Lim, Y. W., Cunha, C., Vuchkovska, A., Nelson, A. J., Nikolai, A., Kim, D., Nishimura, M., et al.** (2021). Human CD36hi monocytes induce Foxp3+ CD25+ T cells with regulatory functions from CD4 and CD8 subsets. *Immunology* **163**, 293.

- Leinoe, E., Kjaersgaard, M., Zetterberg, E., Ostrowski, S., Greinacher, A. and Rossing, M.** (2021). Highly impaired platelet ultrastructure in two families with novel IKZF5 variants. *Platelets* **32**, 492–497.
- Lendahl, U.** (2022). 100 plus years of stem cell research—20 years of ISSCR. *Stem Cell Rep.* **17**, 1248–1267.
- Lentaigne, C., Freson, K., Laffan, M. A., Turro, E., Ouwehand, W. H., and BRIDGE-BPD Consortium and the ThromboGenomics Consortium** (2016). Inherited platelet disorders: toward DNA-based diagnosis. *Blood* **127**, 2814–2823.
- Lentaigne, C., Greene, D., Sivapalaratnam, S., Favier, R., Seyres, D., Thys, C., Grassi, L., Mangles, S., Sibson, K., Stubbs, M., et al.** (2019a). Germline mutations in the transcription factor IKZF5 cause thrombocytopenia. *Blood* **134**, 2070–2081.
- Lentaigne, C., Greene, D., Sivapalaratnam, S., Favier, R., Seyres, D., Thys, C., Grassi, L., Mangles, S., Sibson, K., Stubbs, M., et al.** (2019b). Germline mutations in the transcription factor IKZF5 cause thrombocytopenia. *Blood* **134**, 2070–2081.
- Liu, A., Li, S., Donnenberg, V., Fu, J., Gollin, S. M., Ma, H., Lu, C., Stolz, D. B., Mapara, M. Y., Monaghan, S. A., et al.** (2018). Immunomodulatory drugs downregulate IKZF1 leading to expansion of hematopoietic progenitors with concomitant block of megakaryocytic maturation. *Haematologica* **103**, 1688–1697.
- Lopez, R. A., Schoetz, S., DeAngelis, K., O'Neill, D. and Bank, A.** (2002). Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 602–607.
- 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., Bluteau, D., Jalil, A., Legrand, C., Pan, J., Rameau, P., Jouni, D., Bluteau, O., Mercher, T., Leon, C., et al.** (2012). RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun.* **3**, 717.
- Lu, J., Guo, S., Ebert, B. L., Zhang, H., Peng, X., Bosco, J., Pretz, J., Schlanger, R., Wang, J. Y., Mak, R. H., et al.** (2008). MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev. Cell* **14**, 843–853.
- Luk, A. D. W., Yang, X., Alcasabas, A. P., Hao, R. C., Chan, K., Lee, P. P., Yang, J., Chan, G. C., So, J. C., Yang, W., et al.** (2020). NF-E2 mutation as a novel cause for inherited thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* **189**, e41–e44.
- Maillard, I.** (2013). Ikaros, Notch, and GATA1 cross paths during megakaryopoiesis. *Blood* **121**, 2376–2377.
- Malinge, S., Thiollier, C., Chlon, T. M., Doré, L. C., Diebold, L., Bluteau, O., Mabialah, V., Vainchenker, W., Dessen, P., Winandy, S., et al.** (2013). Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling. *Blood* **121**, 2440–2451.

- Mallo, L., Do Sacramento, V., Gachet, C., Chan, S., Kastner, P., Lanza, F., de la Salle, H. and Strassel, C.** (2021). AHR:IKAROS Interaction Promotes Platelet Biogenesis in Response to SR1. *Y Rep.* **4**, 7.
- Martin, J. F. and Paolo D'Avino, P.** (2022). A theory of rapid evolutionary change explaining the de novo appearance of megakaryocytes and platelets in mammals. *J. Cell Sci.* **135**, jcs260286.
- Mazur, E. M., Cohen, J. L., Bogart, L., Allan Mufson, R., Gesner, T. G., Yang, Y.-C. and Clark, S. C.** (1988). Recombinant gibbon interleukin-3 stimulates megakaryocyte colony growth in vitro from human peripheral blood progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* **136**, 439–446.
- Mazzi, S., Lordier, L., Debili, N., Raslova, H. and Vainchenker, W.** (2018). Megakaryocyte and polyploidization. *Exp. Hematol.* **57**, 1–13.
- McCarty, A. S., Kleiger, G., Eisenberg, D. and Smale, S. T.** (2003). Selective Dimerization of a C2H2 Zinc Finger Subfamily. *Mol. Cell* **11**, 459–470.
- Meng, Y., Pospiech, M., Ali, A., Chandwani, R., Vergel, M., Onyemaechi, S., Yaghmour, G., Lu, R. and Alachkar, H.** (2023). Deletion of CD36 exhibits limited impact on normal hematopoiesis and the leukemia microenvironment. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **28**, 45.
- Mohajeri, A., Vaseghi-Shanjani, M., Rosenfeld, J. A., Yang, G. X., Lu, H., Sharma, M., Lin, S., Salman, A., Waqas, M., Azamian, M. S., et al.** (2023). Dominant negative variants in IKZF2 cause ICHAD syndrome, a new disorder characterised by immunodysregulation, craniofacial anomalies, hearing impairment, athelia and developmental delay. *J. Med. Genet.* **60**, 1092–1104.
- Molnár, A. and Georgopoulos, K.** (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8292–8303.
- Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S. and Georgopoulos, K.** (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* **16**, 2004–2013.
- Murone, M., Carpenter, D. A. and de Sauvage, F. J.** (1998). Hematopoietic Deficiencies in c-mpl and TPO Knockout Mice. *STEM CELLS* **16**, 1–6.
- Nakamura-Ishizu, A., Matsumura, T., Stumpf, P. S., Umemoto, T., Takizawa, H., Takihara, Y., O'Neil, A., Majeed, A. B. B. A., MacArthur, B. D. and Suda, T.** (2018). Thrombopoietin Metabolically Primes Hematopoietic Stem Cells to Megakaryocyte-Lineage Differentiation. *Cell Rep.* **25**, 1772-1785.e6.
- Nakase, K., Ishimaru, F., Fujii, K., Tabayashi, T., Kozuka, T., Sezaki, N., Matsuo, Y. and Harada, M.** (2002). Overexpression of novel short isoforms of Helios in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.* **30**, 313–317.
- Nakorn, T. N., Miyamoto, T. and Weissman, I. L.** (2003). Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 205–210.
- Navarro, F., Gutman, D., Meire, E., Cáceres, M., Rigoutsos, I., Bentwich, Z. and Lieberman, J.** (2009). miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. *Blood* **114**, 2181–2192.

- Nishikii, H., Kanazawa, Y., Umemoto, T., Goltsev, Y., Matsuzaki, Y., Matsushita, K., Yamato, M., Nolan, G. P., Negrin, R. and Chiba, S.** (2015). Unipotent Megakaryopoietic Pathway Bridging Hematopoietic Stem Cells and Mature Megakaryocytes. *Stem Cells Dayt. Ohio* **33**, 2196–2207.
- Nishikii, H., Kurita, N. and Chiba, S.** (2017). The Road Map for Megakaryopoietic Lineage from Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *STEM CELLS Transl. Med.* **6**, 1661–1665.
- Noetzli, L. J., French, S. L. and Machlus, K. R.** (2019). New Insights into the Differentiation of Megakaryocytes from Hematopoietic Progenitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 1288–1300.
- Norfo, R., Zini, R., Pennucci, V., Bianchi, E., Salati, S., Guglielmelli, P., Bogani, C., Fanelli, T., Mannarelli, C., Rosti, V., et al.** (2014). miRNA-mRNA integrative analysis in primary myelofibrosis CD34+ cells: role of miR-155/JARID2 axis in abnormal megakaryopoiesis. *Blood* **124**, e21-32.
- Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O. I., Wilson, G., Kaufmann, K. B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C. F., et al.** (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*.
- Nurden, A. T. and Nurden, P.** (2020). Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives. *Haematologica* **105**, 2004–2019.
- Oguro, H., Ding, L. and Morrison, S. J.** (2013). SLAM Family Markers Resolve Functionally Distinct Subpopulations of Hematopoietic Stem Cells and Multipotent Progenitors. *Cell Stem Cell* **13**, 102–116.
- O’Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B. and Laurence, A.** (2015). The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu. Rev. Med.* **66**, 311–328.
- Palma-Barqueros, V., Bury, L., Kunishima, S., Lozano, M. L., Rodríguez-Alen, A., Revilla, N., Bohdan, N., Padilla, J., Fernández-Pérez, M. P., Morena-Barrio, M. E. de la, et al.** (2021). Expanding the genetic spectrum of TUBB1-related thrombocytopenia. *Blood Adv.* **5**, 5453.
- Pappenheim, A.** (1905). Atlas der menschlichen Blutzellen (Jena: Gustav Fischer 1905-12), vol. 1, p. 347. Staatsbibliothek zu Berlin, Signatur: 4” Kv 1955.
- Park, S.-M., Cho, H., Thornton, A. M., Barlowe, T. S., Chou, T., Chhangawala, S., Fairchild, L., Taggart, J., Chow, A., Schurer, A., et al.** (2019). IKZF2 Drives Leukemia Stem Cell Self-Renewal and Inhibits Myeloid Differentiation. *Cell Stem Cell* **24**, 153-165.e7.
- Patel, S. R., Hartwig, J. H. and Italiano, J. E.** (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.* **115**, 3348–3354.
- Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D. and Abumrad, N. A.** (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **34**, 281–303.
- Perdomo, J., Holmes, M., Chong, B. and Crossley, M.** (2000). Eos and Pegasus, Two Members of the Ikaros Family of Proteins with Distinct DNA Binding Activities*. *J. Biol. Chem.* **275**, 38347–38354.

- Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J. K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., et al.** (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* **174**, 839–849.
- Pietras, E. M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F. J., Leavitt, A. D., Stuart, J. M., Göttgens, B. and Passegué, E.** (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* **17**, 35–46.
- Pinho, S. and Frenette, P. S.** (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 303–320.
- Pinho, S. and Zhao, M.** (2023). Hematopoietic Stem Cells and Their Bone Marrow Niches. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1442**, 17–28.
- Pinho, S., Marchand, T., Yang, E., Wei, Q., Nerlov, C. and Frenette, P. S.** (2018). Lineage-biased hematopoietic stem cells are regulated by distinct niches. *Dev. Cell* **44**, 634-641.e4.
- Pleines, I., Woods, J., Chappaz, S., Kew, V., Foad, N., Ballester-Beltrán, J., Aurbach, K., Lincetto, C., Lane, R. M., Schevzov, G., et al.** (2017). Mutations in tropomyosin 4 underlie a rare form of human macrothrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* **127**, 814.
- Pongerard, A., Mallo, L., Gachet, C., de La Salle, H., Lanza, F. and Strassel, C.** (2021). Leukodepletion Filters-Derived CD34+ Cells As a Cell Source to Study Megakaryocyte Differentiation and Platelet Formation. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Raslova, H., Kauffmann, A., Sekkaï, D., Ripoche, H., Larbret, F., Robert, T., Tronik Le Roux, D., Kroemer, G., Debili, N., Dessen, P., et al.** (2007). Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood* **109**, 3225–3234.
- Read, K. A., Jones, D. M., Freud, A. G. and Oestreich, K. J.** (2021). Established and emergent roles for Ikaros transcription factors in lymphoid cell development and function. *Immunol. Rev.* **300**, 82–99.
- Repsold, L. and Joubert, A. M.** (2021). Platelet Function, Role in Thrombosis, Inflammation, and Consequences in Chronic Myeloproliferative Disorders. *Cells* **10**, 3034.
- Rodriguez-Fraticelli, A. E., Wolock, S. L., Weinreb, C. S., Panero, R., Patel, S. H., Jankovic, M., Sun, J., Calogero, R. A., Klein, A. M. and Camargo, F. D.** (2018). Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature* **553**, 212–216.
- Ronin, E., Lubrano di Ricco, M., Vallion, R., Divoux, J., Kwon, H.-K., Grégoire, S., Collares, D., Rouers, A., Baud, V., Benoist, C., et al.** (2019). The NF-κB RelA Transcription Factor Is Critical for Regulatory T Cell Activation and Stability. *Front. Immunol.* **10**,.
- Roy, A., Lordier, L., Mazzi, S., Chang, Y., Lapierre, V., Larghero, J., Debili, N., Raslova, H. and Vainchenker, W.** (2016). Activity of nonmuscle myosin II isoforms determines localization at the cleavage furrow of megakaryocytes. *Blood* **128**, 3137–3145.
- Salzmann, M., Haase, M., Arzt, C., Mussbacher, M., Assinger, A. and Schmid, J. A.** (2016). Effects of chronic inflammation on megakaryocyte and platelet function in a conditional mouse model. *Atherosclerosis* **252**, e227.

- Sanada, C., Xavier-Ferruccio, J., Lu, Y.-C., Min, E., Zhang, P.-X., Zou, S., Kang, E., Zhang, M., Zerafati, G., Gallagher, P. G., et al. (2016). Adult human megakaryocyte-erythroid progenitors are in the CD34+CD38mid fraction. *Blood* **128**, 923–933.
- Sato, Y., Fujiwara, H., Zeng, B.-X., Higuchi, T., Yoshioka, S. and Fujii, S. (2005). Platelet-derived soluble factors induce human extravillous trophoblast migration and differentiation: platelets are a possible regulator of trophoblast infiltration into maternal spiral arteries. *Blood* **106**, 428–435.
- Satoh, Y., Matsumura, I., Tanaka, H., Ezoe, S., Fukushima, K., Tokunaga, M., Yasumi, M., Shibayama, H., Mizuki, M., Era, T., et al. (2008). AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 30045–30056.
- Saultier, P., Cabantous, S., Puceat, M., Peiretti, F., Bigot, T., Saut, N., Bordet, J.-C., Canault, M., van Agthoven, J., Loosveld, M., et al. (2021). GATA1 pathogenic variants disrupt MYH10 silencing during megakaryopoiesis. *J. Thromb. Haemost. JTH* **19**, 2287–2301.
- Scherlinger, M., Richez, C., Tsokos, G. C., Boilard, E. and Blanco, P. (2023). The role of platelets in immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 1–16.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25.
- Schulze, H., Korpai, M., Hurov, J., Kim, S.-W., Zhang, J., Cantley, L. C., Graf, T. and Shivdasani, R. A. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* **107**, 3868–3875.
- Scurfield, G. and Radley, J. M. (1981). Aspects of platelet formation and release. *Am. J. Hematol.* **10**, 285–296.
- Sebastian, M., Lopez-Ocasio, M., Metidji, A., Rieder, S. A., Shevach, E. M. and Thornton, A. M. (2016). Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *J. Immunol.* **196**, 144–155.
- Seita, J. and Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *WIREs Syst. Biol. Med.* **2**, 640–653.
- Serre, K., Bénézech, C., Desanti, G., Bobat, S., Toellner, K.-M., Bird, R., Chan, S., Kastner, P., Cunningham, A. F., Maclennan, I. C. M., et al. (2011). Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PLoS One* **6**, e20731.
- Shahin, T., Kuehn, H. S., Shoeb, M. R., Gawriyski, L., Giuliani, S., Repiscak, P., Hoeger, B., Yüce Petronczki, Ö., Bal, S. K., Zoghi, S., et al. (2021). Germline biallelic mutation affecting the transcription factor Helios causes pleiotropic defects of immunity. *Sci. Immunol.* **6**, eabe3981.
- Shahin, T., Mayr, D., Shoeb, M. R., Kuehn, H. S., Hoeger, B., Giuliani, S., Gawriyski, L. M., Petronczki, Ö. Y., Hadjadj, J., Bal, S. K., et al. (2022). Identification of germline monoallelic mutations in IKZF2 in patients with immune dysregulation. *Blood Adv.* **6**, 2444–2451.

- Shimizu, R. and Yamamoto, M.** (2016). GATA-related hematologic disorders. *Exp. Hematol.* **44**, 696–705.
- Shin, J. Y., Hu, W., Naramura, M. and Park, C. Y.** (2014). High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *J. Exp. Med.* **211**, 217–231.
- Shivdasani, R. A., Rosenblatt, M. F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C. W., Hunt, P., Saris, C. J. and Orkin, S. H.** (1995). Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* **81**, 695–704.
- Songdej, N. and Rao, A. K.** (2017). Hematopoietic transcription factor mutations: important players in inherited platelet defects. *Blood* **129**, 2873–2881.
- Sood, R., Kamikubo, Y. and Liu, P.** (2017). Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood* **129**, 2070–2082.
- Sridharan, R. and Smale, S. T.** (2007). Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *J. Biol. Chem.* **282**, 30227–30238.
- Stern, M., Jensen, R. and Herskowitz, I.** (1984). Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J. Mol. Biol.* **178**, 853–868.
- Stohlawetz, P. J., Dzirlo, L., Hergovich, N., Lackner, E., Mensik, C., Eichler, H. G., Kabrna, E., Geissler, K. and Jilma, B.** (2000). Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood* **95**, 2983–2989.
- Strassel, C., Hechler, B., Bull, A., Gachet, C. and Lanza, F.** (2009). Studies of mice lacking the GPIIb-V-IX complex question the role of this receptor in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost. JTH* **7**, 1935–1938.
- Strassel, C., Brouard, N., Mallo, L., Receveur, N., Mangin, P., Eckly, A., Bieche, I., Tarte, K., Gachet, C. and Lanza, F.** (2016). Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood* **127**, 2231.
- Sun, L., Liu, A. and Georgopoulos, K.** (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.* **15**, 5358–5369.
- Szilvassy, S. J., Humphries, R. K., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C. and Eaves, C. J.** (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8736–8740.
- Tajika, K., Nakamura, H., Nakayama, K. and Dan, K.** (2000). Thrombopoietin can influence mature megakaryocytes to undergo further nuclear and cytoplasmic maturation. *Exp. Hematol.* **28**, 203–209.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676.
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S., Hirao, A., Suematsu, M., et al.** (2010). Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 391–402.

- Tijssen, M. R., Moreau, T. and Ghevaert, C.** (2016). Transcriptional Regulation of Platelet Formation: Harnessing the Complexity for Efficient Platelet Production In Vitro. In *Molecular and Cellular Biology of Platelet Formation: Implications in Health and Disease* (ed. Schulze, H.) and Italiano, J.), pp. 23–60. Cham: Springer International Publishing.
- Tilburg, J., Becker, I. C. and Italiano, J. E.** (2022). Don't you forget about me(gakaryocytes). *Blood* **139**, 3245–3254.
- Tochigi, T., Miyamoto, T., Hatakeyama, K., Sakoda, T., Ishihara, D., Irifune, H., Shima, T., Kato, K., Maeda, T., Ito, T., et al.** (2020). Aromatase is a novel neosubstrate of cereblon responsible for immunomodulatory drug-induced thrombocytopenia. *Blood* **135**, 2146–2158.
- Trowbridge, E. A. and Harley, P. J.** (1984). A computer model of the random binary sequential division of megakaryocyte cytoplasm to produce platelets. *Phys. Med. Biol.* **29**, 1477–1487.
- Tsutsumi, N., Masoumi, Z., James, S. C., Tucker, J. A., Winkelmann, H., Grey, W., Picton, L. K., Moss, L., Wilson, S. C., Caveney, N. A., et al.** (2023). Structure of the thrombopoietin-MPL receptor complex is a blueprint for biasing hematopoiesis. *Cell* **186**, 4189-4203.e22.
- Turner, K. J., Neben, S., Weich, N., Schaub, R. G. and Goldman, S. J.** (1996). The Role of Recombinant Interleukin 11 in Megakaryocytopoiesis. *Stem Cells* **14**, 53–61.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., et al.** (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419.
- Vainchenker, W., Arkoun, B., Basso-Valentina, F., Lordier, L., Debili, N. and Raslova, H.** (2021). Role of Rho-GTPases in megakaryopoiesis. *Small GTPases* **12**, 399–415.
- Valet, C., Batut, A., Vauclard, A., Dortignac, A., Bellio, M., Payrastre, B., Valet, P. and Severin, S.** (2020). Adipocyte Fatty Acid Transfer Supports Megakaryocyte Maturation. *Cell Rep.* **32**, 107875.
- van der Meijden, P. E. J. and Heemskerk, J. W. M.** (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 166–179.
- Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Pique, C., LeCouedic, 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.
- Wang, E. S., Verano, A. L., Nowak, R. P., Yuan, J. C., Donovan, K. A., Eleuteri, N. A., Yue, H., Ngo, K. H., Lizotte, P. H., Gokhale, P. C., et al.** (2021). Acute pharmacological degradation of Helios destabilizes regulatory T cells. *Nat. Chem. Biol.* **17**, 711–717.
- Wang, J., Xie, J., Wang, D., Han, X., Chen, M., Shi, G., Jiang, L. and Zhao, M.** (2022). CXCR4^{high} megakaryocytes regulate host-defense immunity against bacterial pathogens. *eLife* **11**, e78662.
- Wang, C., Tu, Z., Cai, X., Wang, W., Davis, A. K., Nattamai, K., Paranjpe, A., Dexheimer, P., Wu, J., Huang, F. L., et al.** (2023). A critical role of RUNX1 in governing megakaryocyte-primed hematopoietic stem cell differentiation. *Blood Adv.* **7**, 2590–2605.

- Warren, J. T. and Di Paola, J.** (2022). Genetics of inherited thrombocytopenias. *Blood* **139**, 3264–3277.
- Wilson, A. and Trumpp, A.** (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 93–106.
- Winkler, I. G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R. N., Forristal, C. E., Patton, J. T., Magnani, J. L. and Lévesque, J.-P.** (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat. Med.* **18**, 1651–1657.
- Wu, D., Xie, J., Wang, X., Zou, B., Yu, Y., Jing, T., Zhang, S. and Zhang, Q.** (2015). Micro-concentration Lipopolysaccharide as a Novel Stimulator of Megakaryocytopoiesis that Synergizes with IL-6 for Platelet Production. *Sci. Rep.* **5**, 13748.
- Xiao, M., Wang, Y., Tao, C., Wang, Z., Yang, J., Chen, Z., Zou, Z., Li, M., Liu, A., Jia, C., et al.** (2017). Osteoblasts support megakaryopoiesis through production of interleukin-9. *Blood* **129**, 3196–3209.
- Yonemura, Y., Kawakita, M., Fujimoto, K., Sakaguchi, M., Kusuyama, T., Hirose, J., Kato, K. and Takatsuki, K.** (1992). Effects of short-term administration of recombinant human erythropoietin on rat megakaryopoiesis. *Int. J. Cell Cloning* **10**, 18–27.
- Yoshida, T., Ng, S. Y.-M., Zuniga-Pflucker, J. C. and Georgopoulos, K.** (2006). Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat. Immunol.* **7**, 382–391.
- Zarif, M. N., Soleimani, M., Abolghasemi, H., Amirizade, N., Arefian, E. and Rahimian, A.** (2013). Megakaryocytic differentiation of CD133+ hematopoietic stem cells by down-regulation of microRNA-10a. *Hematology*.
- Zhang, J., Jackson, A. F., Naito, T., Dose, M., Seavitt, J., Liu, F., Heller, E. J., Kashiwagi, M., Yoshida, T., Gounari, F., et al.** (2011). Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat. Immunol.* **13**, 86–94.
- Zhao, M., Perry, J. M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X. C., Ahamed, J. and Li, L.** (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **20**, 1321–1326.
- Zhao, M., Tao, F., Venkatraman, A., Li, Z., Smith, S. E., Unruh, J., Chen, S., Ward, C., Qian, P., Perry, J. M., et al.** (2019). N-Cadherin-Expressing Bone and Marrow Stromal Progenitor Cells Maintain Reserve Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep.* **26**, 652-669.e6.
- Zimmet, J. M., Ladd, D., Jackson, C. W., Stenberg, P. E. and Ravid, K.** (1997). A role for cyclin D3 in the endomitotic cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 7248–7259.

Etude du rôle du facteur de transcription

HELIOS dans la mégacaryopoïèse

Les mégacaryocytes sont les précurseurs médullaires des plaquettes. Ils sont générés par la différenciation de cellules souches hématopoïétiques au cours d'un processus finement régulé appelé mégacaryopoïèse. Le facteur de transcription HELIOS a été récemment identifié chez la souris comme un régulateur clé de l'engagement des cellules souches hématopoïétiques dans la lignée mégacaryocytaire. Cependant, les fonctions d'HELIOS dans la maturation des mégacaryocytes murins et la mégacaryopoïèse humaine demeuraient inconnues. Nos résultats montrent que l'absence d'HELIOS n'impacte pas la maturation des mégacaryocytes murins en culture. Chez l'Homme, l'absence d'HELIOS modifie l'équilibre érythro-mégacaryocytaire en faveur de la voie mégacaryocytaire des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ en différenciation. Ce changement se traduit par une maturation accélérée des mégacaryocytes en culture, mais au détriment de la production de plaquettes. La poursuite de ces travaux permettra d'élucider plus précisément les mécanismes moléculaires par lesquels HELIOS contrôle la mégacaryopoïèse.

Mots clés : mégacaryopoïèse, HELIOS, IKZF2, mégacaryocyte, plaquettes

Study of the role of the transcription factor HELIOS in megakaryopoiesis

Megakaryocytes are the medullary precursors of platelets. They are generated by the differentiation of haematopoietic stem cells during a finely regulated process called megakaryopoiesis. The HELIOS transcription factor was recently identified in mice as a key regulator of the commitment of haematopoietic stem cells to the megakaryocytic lineage. However, the functions of HELIOS in murine megakaryocyte maturation and human megakaryopoiesis remained unknown. Our results show that the absence of HELIOS does not affect the maturation of murine megakaryocytes in culture. In humans, the absence of HELIOS alters the erythro-megakaryocyte balance in favour of the megakaryocyte pathway of differentiating CD34+ haematopoietic progenitors. This change results in accelerated maturation of megakaryocytes in culture, but at the expense of platelet production. Ongoing work will allow us to elucidate in more detail the molecular mechanisms by which HELIOS is able to regulate megakaryopoiesis.

Key words: megakaryopoiesis, HELIOS, IKZF2, megakaryocyte, platelets