

Le rôle de DIAPH1 dans la mégacaryopoïèse

Résumé

Les mégacaryocytes sont les précurseurs cellulaires hautement spécialisés qui produisent des plaquettes via des extensions cytoplasmiques appelées proplaquettes. La formation des proplaquettes exige de profonds changements dans l'organisation du cytosquelette: microtubules et actine. Les formines sont une famille de protéines hautement conservées chez les eucaryotes composées de plusieurs domaines qui régulent le remodelage et la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules. La plupart des formines sont des effecteurs protéiques des Rho-GTPase. DIAPH1, un membre de la famille des formines, est un homologue chez les mammifères du gène *diaphanous* de la drosophile qui fonctionne comme un effecteur de la petite GTPase Rho et régule le cytosquelette d'actomyosine ainsi que les microtubules. Il contient le domaine de liaison à Rho (Rho-binding domain) dans la partie amino-terminale et deux régions distinctes d'homologie aux formines, FH1 localisée au centre de la protéine et FH2 dans la partie carboxy-terminale. DIAPH1 co-régule le cytosquelette des microtubules et d'actine à travers respectivement ses régions de FH2 et FH1. DIAPH1 est donc un gène candidat idéal dans toutes les fonctions cellulaires qui exigent une coopération entre cytosquelettes d'actine et de microtubules.

L'objectif de ce projet de thèse était d'étudier le rôle de DIAPH1 dans la mégacaryopoïèse. A la fin de la maturation des mégacaryocytes, la formation de proplaquettes et la migration sont associées à des modifications importantes de la structure du cytosquelette. Nous avons émis l'hypothèse que grâce à sa double fonction dans la polymérisation de l'actine et la stabilisation des microtubules, DIAPH1 pourrait jouer un rôle essentiel dans les temps terminaux de la différenciation mégacaryocytaire.

Nos résultats ont montré qu'au cours de la différenciation mégacaryocytaire, l'expression de DIAPH1 augmente, alors que celles de DIAPH2 et DIAPH3 diminuent, ce qui suggère que DIAPH1 pourrait jouer un rôle plus important que DIAPH2 et DIAPH3 dans les stades tardifs de la différenciation mégacaryocytaire. Les études en immunomarquage montrent que DIAPH1 co-localise avec l'actine F, la tubuline et la myosine IIa en niveau de la membrane plasmique et des proplaquettes. Nous avons étudié la fonction de DIAPH1 par des stratégies d'inactivation (knockdown) et de surexpression d'une forme active de DIAPH1. Les résultats montrent que DIAPH1 est un effecteur important de Rho, pour réguler négativement la formation des proplaquettes en remodelant le cytosquelette d'actine et les microtubules. Le travail antérieur de notre équipe avait montré que Rho-ROCK régulait aussi négativement la formation des proplaquettes, en inhibant l'activation de la myosine IIa. En inhibant simultanément DIAPH1 et ROCK/myosine, nous avons montré que ces deux voies jouent un rôle additif dans la formation des proplaquettes.

Ces résultats suggèrent que la coopération entre les voies DIAPH1 et ROCK/myosine est nécessaire pour la formation de structures cellulaires dépendant de l'actomyosine, telles les fibres de stress et l'anneau contractile en agissant à la fois sur le remodelage du cytosquelette et en assurant un équilibre entre l'actomyosine et microtubules.

Mots-clés: Mégacaryocytes, Formation des proplaquettes, DIAPH1, Myosine, Actine, Microtubules, Cytosquelette, Rho

Contexte de la recherche:

Chaque jour, chez l'homme, environ 1×10^{11} plaquettes sont produites par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes (MK). Les plaquettes sont essentielles dans l'hémostase et la thrombose, mais également dans d'autres processus comme le développement, l'immunité innée, la néoangiogenèse et les métastases (1-3).

La maturation des MKs est un phénomène unique caractérisé par trois processus, tous accompagnés de remaniements majeurs du cytosquelette: 1) la polyploïdisation; 2) la formation des proplaquettes par le déroulement des membranes de démarcation; 3) la migration des MK vers la niche vasculaire où les plaquettes sont directement libérées dans le flux sanguin (4). Tous ces processus accompagnent de remaniements du cytosquelette d'actine et des microtubules.

Pendant plusieurs années, l'équipe où je prépare ma thèse, s'est concentrée sur les phases tardives de la mégacaryopoïèse. Les phases tardives de la mégacaryopoïèse représentent un modèle unique de différenciation, dont la dérégulation peut mener à une thrombocytopénie ou une thrombocytose dans des maladies héréditaires ou des maladies acquises comme les SMP (syndromes myéoprolifératifs) ou SMD (syndromes myéodysplasiques). Par ailleurs les thrombopénies induites par les différents médicaments anti-cancéreux que ce soient les chimiothérapies ou les petites molécules dites «ciblées» sont fréquentes et limitent l'utilisation de ces traitements.

Les Diaphanous-related formins (DRFs) sont des effecteurs importants des petites Rho GTPases. Ce sont des homologues chez les mammifères des *Diaphanous* chez la drosophile qui appartiennent à la famille des formines. La famille des formines joue un rôle crucial dans le remodelage du cytosquelette et au niveau protéique est caractérisé par deux domaines conservés: FH1 et FH2 (formin homology -1 et -2). Comme toutes les formines, DRFs contiennent les domaines FH1 et FH2, mais en plus elles ont un domaine DID dans le N-terminus, et un domaine DAD dans le C-terminus. Dans leur forme inactive, les domaines DID et DAD interagissent directement entre eux. Par contre, après la liaison de Rho, ils se séparent, la protéine change de structure et devient activée. Les DRFs catalysent la nucléation et la polymérisation de l'actine pour former des filaments d'actine non ramifiés (5). Les DRFs sont aussi capables de stabiliser et d'orienter les microtubules. Une dynamique importante des cytosquelettes d'actine et de tubuline est nécessaire au bon déroulement de la mégacaryopoïèse. Ceci met les DRFs dans une position idéale pour coordonner les fonctions qui dépendent de la coopération étroite entre le cytosquelette d'actine et de tubuline (6).

En utilisant différents modèles cellulaires, il a été démontré que la voie Rho-mDia est impliquée dans de nombreux processus cellulaires concernant le remodelage des structures d'actine. Parmi les mieux étudiés figurent la cytokinèse, la polarité cellulaire, l'adhésion cellulaire et la migration cellulaire. Des travaux récents ont également révélé que la signalisation de Rho-DIAPH1 pourrait aussi faciliter la transformation maligne (oncogénèse) des cellules, leur invasion et les métastases (7).

Il existe 15 membres de formines chez l'homme. Parmi eux, 7 formines sont présentes dans les MKs humains et 4 dans les plaquettes humaines.

DIAPH1 est encodé par le gène *Drf1* (*DIAPH1*) qui est localisé sur chromosome 5 en 5q31.3, une région chromosomique qui peut souvent subir une délétion dans les SMD (vrai syndrome 5q- ou autres SMD). La perte complète ainsi que des délétions interstitielles du chromosome 5 sont les anomalies les plus communes des myéodysplasies (SMD). Un travail de l'équipe d'A.S. Alberts a montré que l'inactivation de DIAPH1 chez les souris entraîne une maladie avec un phénotype intermédiaire entre SMP et SMD. En effet, il existe une splénomégalie, une fibrose médullaire et splénique, une hypercellularité avec une hématoopoïèse extramédullaire dans la rate et le foie et la présence de cellules myéloïdes immatures avec un rapport noyau/cytoplasme élevé. Le phénotype des souris KO pour DIAPH1, particulièrement la prolifération remarquable des progéniteurs hématoopoïétiques, suggère que DIAPH1 se comporte comme un gène suppresseur de tumeur (8).

L'objectif principal de cette thèse a été de caractériser le rôle de DIAPH1 sur les temps tardifs de la mégacaryopoïèse. À la fin de la maturation des MK, la formation de proplaquettes et la migration mégacaryocytaire sont associées à de profonds changements des structures du cytosquelette. Notre hypothèse est que DIAPH1, par son rôle crucial dans la polymérisation de l'actine et la stabilisation des microtubules, jouerait un rôle essentiel dans la formation des proplaquettes ou la migration des MK. Nous espérons que ce travail essentiellement fondamental permettra de mieux comprendre le mécanisme de la production plaquettaire et le rôle éventuel de DIAPH1 dans des maladies humaines.

Ce travail a été réalisé avec des MK humains provenant de culture primaire à partir de progéniteurs (cellules CD34⁺). Nous avons construit des vecteurs lentivirus qui contiennent des shRNA de DIAPH1 ou de sa forme active et par des approches (perte de fonction, gain de fonction) nous avons pu étudier le rôle de DIAPH1 sur la formation des proplaquettes *in vitro* et déterminer ses effets sur le cytosquelette.

Résultats-Partie I

L'expression des DIAPH dans la mégacaryopoïèse

Dans un premier temps, l'expression des DIAPHs a été étudiée par qRT-PCR et Western Blot. Les cellules CD34⁺ sont mises en culture en présence de TPO et SCF et sont ensuite triées en cytométrie de flux, par des marqueurs associés à la différenciation mégacaryocytaire comme le CD41 (GPIIb). Les MKs à J6 J9, J12 de culture correspondant à des stades successifs de différenciation sont collectés. Nos résultats montrent que l'expression de DIAPH1 au niveau ARN et protéique augmente au cours de la différenciation mégacaryocytaire alors que celle de DIAPH2 et de DIAPH3 diminue. Ceci suggère que DIAPH1 joue probablement un rôle plus important que DIAPH2 ou DIAPH3 dans les temps tardifs de la différenciation mégacaryocytaire. Par immunomarquage, nous avons montré que dans les MKs matures et les MKs plaquettoïdes, DIAPH1 colocalise avec la F-actine et la tubuline à la périphérie des

MK mature, et aussi le long des proplaquettes, surtout au niveau des renflements et des extrémités.

DIAPH1 inhibe la formation des proplaquettes en induisant les forces contractiles de l'actomyosine et en réduisant la stabilité des microtubules.

Ensuite, nous avons étudié le rôle de DIAPH1 en utilisant un ou plusieurs shRNA contre DIAPH1 vectorisés dans des lentivirus contenant la GFP. Pour cela nous avons synthétisés des siRNAs qui ont été électroporés dans les cellules HEL et nous avons étudié leur efficacité en évaluant le niveau de la protéine par Western Blot. Nous avons choisi deux séquences les séquences 7 et 8, qui inhibaient le mieux l'expression de DIAPH1. Ces deux séquences ont été clonées dans un vecteur lentiviral contenant la GFP.

Les cellules CD34⁺ ont été mises en culture en présence de TPO et SCF et transduites avec les vecteurs lentiviraux. Les cellules sont ensuite triées sur l'expression de la GFP en cytométrie de flux et remises en culture pour induire la formation de proplaquette et également pour tester l'efficacité de shRNA sur le niveau de DIAPH1 à la fois par western blot et qRT-PCR. Ces deux shRNAs sont capables d'inhiber l'expression de DIAPH1 de plus de 50% sans modifier l'expression de DIAPH2 et DIAPH3, ce qui démontre qu'ils sont spécifiques de DIAPH1 dans la famille DIAPH. Au niveau biologique, les deux shRNAs augmentent très significativement la formation des proplaquettes.

De façon intéressante, l'adhérence des MKs au collagène de type, une des principales protéines de la matrice extracellulaire médullaire, induit l'activation de RhoA et la formation de fibres de stress. L'inhibition de l'expression de DIAPH1 par shRNA diminue quantitativement et qualitativement la formation des fibres de stress. Notamment, les fibres de stress en présence des shRNA de DIAPH sont plus fines que dans le contrôle. La formation des fibres de stress suite à l'activation de Rho est liée à la polymérisation de l'actine et à l'activation de myosine II habituellement par phosphorylation de MLC2. L'inhibition de DIAPH1 ne change pas l'expression de pMLC2 ; il est donc probable que DIAPH1 agit surtout sur la polymérisation de l'actine à l'inverse de ROCK qui agit sur l'activation de la myosine en augmentant la phosphorylation de MLC2.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'inhibition de DIAPH1 sur la stabilité des microtubules. Les cellules mégacaryocytaires ont été cultivées sur des lames après dépôt de collagène. Le surnageant a été alors aspiré et les MKs ont été traités par du nocodazole à 5 μ M pendant 1h. Les cellules sont lavées et remises en cultures pour être récupérées toutes les 5 minutes pour étudier la reformation des microtubules. Nous avons trouvé que l'inhibition de DIAPH1 accélère très nettement l'allongement des microtubules (MTs). Les MTs stables sont caractérisés par des modifications post-transcriptionnelles: l'accumulation de tubuline détyrosinée (Glu-tubuline) dans le C-terminus. Les MT dynamiques sont eux caractérisés par un contenu élevé en tubuline tyrosinée (Tyr-tubuline) dans le C-terminus. Le ratio entre Glu-tubuline/Tyr-tubuline représente donc un reflet de la stabilité des microtubules. L'inhibition de l'expression de DIAPH1 par shRNA augmente la stabilité des microtubules comme indiqué par le rapport entre Glu-tubuline/Tyr-tubuline. L'ensemble de ces résultats

suggère que DIAPH1 régule négativement la formation de proplaquette en augmentant les forces contractiles de l'actine/myosine et en réduisant la stabilité des microtubules.

L'expression d'une forme active de DIAPH1 diminue la formation des proplaquettes

En parallèle, nous avons appliqué une stratégie gain de fonction en exprimant une forme spontanément active de DIAPH1 vectorisés dans des lentivirus contenant la GFP. Les cellules CD34⁺ sont mises en culture en présence de TPO et de SCF et sont transduites avec le vecteur lentiviral. Les cellules sont ensuite triées sur l'expression de la GFP en cytométrie de flux et remises en culture pour induire la formation des proplaquettes.

Les résultats montrent que l'expression de la forme active de DIAPH1 diminue la formation des proplaquettes. En plus, ces proplaquettes sont plus petites que celles du contrôle. Analysé par Image J, la surface de chaque proplaquette est aussi plus petite que celle du contrôle avec une diminution des branchements au niveau de chaque proplaquette.

Contrairement à ce qui avait été observé avec les shRNA, l'expression de la forme active de DIAPH1 augmente la formation des fibres de stress qui sont plus épaisses que dans le contrôle. L'expression de la forme active de DIAPH1 ralentit également l'allongement des microtubules, comme indiqué par la diminution du rapport entre Glu-tubuline/Tyr-tubuline.

Nous avons voulu alors savoir si la forme active de DIAPH1 pourrait empêcher l'augmentation de la formation des proplaquettes induite par l'inhibition de l'expression de la forme endogène de DIAPH1 par un shRNA. Pour cela, nous avons cloné un shRNA dirigé contre DIAPH1 endogène mais non contre sa forme active dans un vecteur lentivirus contenant comme gène rapporteur la Cherry. Ensuite, les cellules doubles infectées par le shRNA (cherry) et la forme active de DIAPH1 (GFP) sont triées sur la co-expression de la GFP et de la Cherry ainsi que du CD41 en cytométrie de flux.

Les résultats montrent que l'expression de la forme active de DIAPH1 est trois fois plus élevée que la forme endogène avant shRNA et qu'effectivement le shRNA diminue l'expression uniquement de la forme endogène. La forme active de DIAPH1 continue d'inhiber la formation des proplaquettes en présence du shRNA de DIAPH1.

L'ensemble de ces résultats suggère que DIAPH1 régule négativement la formation des proplaquettes en induisant les forces contractiles de l'actine/myosine et en réduisant la stabilité des microtubules.

Coopération entre DIAPH1 et la voie Rock/Myosine II sur la formation des proplaquettes

Le travail antérieur de notre équipe avait montré que l'inhibition de Rock et Rho augmente la formation des proplaquettes en inhibant l'activation de la myosine II (9). DIAPH1 comme effecteur de Rho semble jouer le même rôle que Rock et la Myosine II en inhibant la formation de proplaquette. Nous avons ensuite étudié le lien entre ces deux voies effectrices de Rho (Rock/myosine et DIAPH1) en étudiant les effets d'une double inhibition de DIAPH1

et de la myosine IIA par des shRNAs ou shRNA et blebbistatine et de DIAPH1 et Rock par shRNA et Y27632 par rapport à des simples inhibitions.

Par immunofluorescence, nous avons d'abord montré que DIAPH1 colocalise avec MYH9 à la périphérie des MK matures, et aussi le long des proplaquettes, surtout au niveau des renflements et des extrémités. L'inhibition chimique de Rock et de la myosine II accélère l'allongement des microtubules tout en détruisant l'assemblage de l'actine. Ces deux inhibitions augmentent la stabilité des MTs mesurée par l'augmentation du rapport entre Glu-tubuline/Tyr-tubuline. L'inhibition simultanée de DIAPH1 par un shRNA et celle de Rock/Myosine par Y27632 ou la blebbistatine augmente encore plus la formation des proplaquettes que chaque inhibition étudiée individuellement, ce qui suggère que DIAPH1 et Rock jouent des rôles additifs sur la formation des proplaquettes.

Nous avons ensuite étudié le lien direct entre la myosine IIA et DIAPH1 en infectant doublement des MK avec des shRNA contre DIAPH1 et contre MYH9. Pour cela, nous avons cloné et vectorisé les shRNA contre DIAPH1 dans un vecteur lentiviral contenant la Cherry comme gène rapporteur et un shRNA contre MYH9 dans un vecteur lentivirus contenant la GFP. Après double infection, les cellules Cherry⁺GFP⁺CD41⁺ ont été triées et remises en culture pour induire la formation des proplaquettes. Les résultats montrent que l'inhibition de DIAPH1 et de MYH9 ont des effets additifs sur l'augmentation de la formation des proplaquettes.

Nous avons ensuite étudié les effets coopératifs entre l'inhibition de Rock ou de la myosine II et l'inhibition de DIAPH1 sur la stabilité des microtubules. Les résultats montrent que la double inhibition de Rock ou de la myosine II par Y27632 ou la Blebbistatine et de DIAPH1 augmente très fortement le rapport entre Glu-tubuline/Tyr-tubuline.

DIAPH1 et Rock/myosine II sont des effecteurs de Rho, qui fonctionnent négativement dans la formation des proplaquettes. La coopération entre DIAPH1 et de Rock/myosine est nécessaire à l'ensemble des filaments d'actine/myosine, tels que les fibres de stress et l'anneau contractile qui dépendent de l'activation de Rho. De manière inattendue à la fois Rock et DIAPH1 agissent sur l'actomyosine et la stabilité des microtubules, ces effets sur les deux types de cytosquelette sont responsables de l'inhibition par Rho de la formation des proplaquettes.

Résultats-Partie II

Expression et localisation des myosines II non musculaires dans la mégacaryopoïèse

Les mammifères présentent trois isoformes des myosine II non musculaires (NM II) qui sont composées de deux chaînes lourdes identiques et de deux paires de chaînes légères. Les chaînes lourdes sont MYH9 (NM IIA), MYH10 (NM IIB) et MYH14 (NM IIC). Des mutations de *MYH9* entraînent une pathologie héréditaire caractérisée entre autre par une macrothrombocytopénie associée ou non à une surdité, une maladie rénale et une cataracte.

En utilisant des techniques de qRT-PCR et des westerns blots, nous avons étudié l'expression des myosines II au cours de la différenciation mégacaryocytaire et montré que seules MYH9 et MYH10 étaient exprimées. L'expression de MYH9 augmente au cours de la différenciation mégacaryocytaire alors que celle de MYH10 diminue si bien qu'il n'y a pratiquement plus de MYH10 présente dans les plaquettes. MYH9 est donc la seule myosine II présente dans les plaquettes et dans les MKs matures.

Le fait que MYH10 disparaît en cours de différenciation mégacaryocytaire pouvait faire penser que cette myosine II était impliquée dans les mitoses/endomitoses des mégacaryocytes.

Nous avons étudié la localisation de MYH9 et MYH10 au cours des mitoses et des endomitoses des mégacaryocytes. Par immunofluorescence, nous avons montré que MYH10 est la seule myosine qui s'accumule dans l'anneau contractile des mégacaryocytes en mitose/endomitose avec deux pôles (2N/4N). MYH9 est quasiment indétectable au niveau de l'anneau contractile alors qu'elle est présente dans le cytoplasme. Dans les endomitoses 4N/8N il existe toujours un anneau contractile avec une diminution de l'accumulation de MYH10.

Nous avons pu ensuite montrer par des expériences d'inhibition de la myosine II ou de surexpression de MYH10 que MYH10 joue un rôle essentiel dans la commutation mitose/endomitose. En son absence les cellules 4N ne donnent plus deux cellules filles 2N alors que sa surexpression favorise le retour en 2N (11).

Dans la dernière partie du travail nous avons montré que MYH9 et MYH10 étaient régulées transcriptionnellement par RUNX1, mais RUNX1 est un activateur transcriptionnel de MYH9 et un répresseur de MYH10. RUNX1 permet donc la synchronisation entre fin des mitoses et différenciation terminale en commutant de mitose en endomitose et plus tard en arrêtant les endomitoses en régulant l'expression de p19INK4D tout en induisant l'expression de gènes mégacaryocytaires/plaquettaires et en régulant le cytosquelette d'actomyosine.

Le domaine C-terminal détermine la localisation de MYH9 et MYH10 dans l'anneau contractile.

L'endomitose est un échec tardif de la cytokinèse associé à des défauts de l'anneau contractile avec d'une part une absence d'accumulation de myosine II par un double mécanisme (extinction de l'expression de MYH10 par RUNX1 et l'absence d'accumulation de MYH9) et un défaut partiel de l'activation de Rho/Rock (10). En effet l'inhibition de Rho/Rock par des inhibiteurs chimiques ou des shRNA augmente la polyploïdisation. Il est possible qu'il existe un lien entre le défaut d'activation de Rho et d'accumulation de MYH9.

Nous avons voulu d'abord comprendre quel domaine des MYH est responsable de l'accumulation des myosines II dans l'anneau contractile. Pour cela nous avons utilisé deux modèles de souris : dans l'un NMII-A est génétiquement remplacé par NM II-B et dans

l'autre par une NMHCII chimérique qui combine le domaine de la tête de NM IIA avec les domaines de la tige et de la queue de NM IIB (12).

Dans le premier modèle il existe une haploinsuffisance en MYH9 et une persistance d'expression de MYH10 au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Ce modèle nous a permis de confirmer le rôle de MYH10 dans la commutation mitose/endomitose. En effet l'expression continue de NMII-B (MYH10) diminue le niveau de MK ploïdie dans la moelle osseuse *in vivo* ainsi que dans les MKs cultivés 3 jours *in vitro*.

Dans le second modèle, la NMHCII chimérique (hNMHCII-AB) se localise dans l'anneau contractile et induit une diminution de la ploïdie des mégacaryocytes de la moelle *in vivo* ainsi que de la ploïdie des mégacaryocytes cultivés *in vitro*.

Ces résultats démontrent que c'est le domaine C-terminal de MYH10 qui est responsable de la localisation dans l'anneau contractile.

La suite du travail va consister à démontrer s'il existe un lien en niveau d'activation de Rho et recrutement de MYH9 et MYH10 au niveau de l'anneau contractile et/ou si les différences entre les deux myosines sont liées à des différences dans les protéines d'échafaudage permettant le recrutement des myosines dans l'anneau contractile.

Présence de défauts de caryocinèse dans le MK en endomitose

Jusqu'à présent nous avons démontré que le MK lors d'une endomitose présente un défaut de cytokinèse tardif. Les défauts de cytokinèse sont fréquents et aboutissent à des cellules multinuclées, ce qui n'est pas le cas du mégacaryocyte qui est une cellule mononucléée mais avec un noyau multilobé. Ceci évoquait la possibilité d'autres anomalies de la « mitose » lors des endomitoses, en particulier un défaut de séparation des noyaux (caryocinèse).

Les Lamine A/C sont des composants importants de l'enveloppe nucléaire qui est rompu et détruite au cours de la première étape de la mitose pour être reformé autour des chromosomes dans les dernières étapes de la mitose.

Nous avons réalisé des immunomarquages de la Lamine au cours des endomitoses des MKs et montré que la membrane de nucléaire est détruite jusqu'en anaphase et elle commence à se reformer à la fin de la télophase. La membrane nucléaire reste cependant incomplète à la fin de l'endomitose, avec la présence de lamine entre les chromosomes séparés dans les cellules filles. On retrouve ces mêmes anomalies dans des endomitoses polyploïdes où il persiste des longs filaments d'ADN entourés de lamine entre les chromosomes séparés dans les « cellules filles ». La présence d'ADN a été confirmée par des marquages avec le TOTO et la présence de la phospho-histone 3 (phospho-H3) dans ces ponts. La phosphorylation de l'Histone 3 est spatialement et temporellement coordonné avec la condensation des chromosomes mitotiques. La présence de phospho-H3 dans ces ponts confirme l'existence de la persistance d'un lien d'ADN entre les chromosomes séparés et démontrent que la séparation est incomplète. Ces anomalies correspondent donc à la présence de ponts nucléoplasmiques

(NPM) dans l'endomitose.

FANCD2 et BLM jouent un rôle important dans la réplication et de réparation d'ADN. Il a été récemment suggéré que la disjonction des chromatides sœurs à l'origine des ponts nucléoplasmiques est souvent incomplète dans les cellules humaines, mais les protéines de Fanconi et BLM jouer un rôle coopératif dans la résolution de ces liens d'ADN

Nous avons donc voulu savoir si ces deux protéines étaient normalement exprimées au cours des endomitoses du mégacaryocyte.

L'expression de BLM et de FANCD2 a été retrouvée dans les mégacaryocytes par Western blots et immunofluorescence dans les MKs. Par ailleurs, FANCD2 et BLM ont été détectés dans les ponts nucléoplasmiques pendant l'endomitose de mégacaryocytaire comme dans la mitose classique. Ceci suggère que la voie FANCD2/BLM est au moins partiellement fonctionnelle dans les MKs.

Au total nous avons montré la présence d'un défaut de caryocinèse pendant les endomitoses du MK caractérisé par la présence de ponts nucléoplasmiques, qui ne sont pas complètement résolus à la fin de la télophase. Ce défaut augmente avec la ploïdie des MK et pourrait expliquer la formation d'un seul noyau multilobulé dans les mégacaryocytes polyploïdes.

Il sera donc important de déterminer les mécanismes précis responsables de la présence de ces ponts nucléoplasmiques dans les MKs en endomitose.

Perspectives

DIAPH1 et la migration mégacaryocytaire

Le processus de formation de proplaquette aboutit à libérer des plaquettes dans la circulation périphérique et ne s'enclenche donc que lorsque le MK rentre en contact avec les cellules endothéliales vasculaires pour empêcher la formation de plaquettes dans l'espace médullaire. La migration des MK dans l'espace médullaire de la « niche ostéoblastique », où les cellules souches hématopoïétiques résident, vers la « niche vasculaire » est un élément important dans la thrombopoïèse. Ce processus est régulé par des chimiokines et des cytokines, ainsi que par des interactions avec des cellules du stroma et de la matrice extracellulaire. Ce processus nécessite aussi une réorganisation dynamique du cytosquelette.

L'une des perspectives est de savoir si DIAPH1 est impliquée dans la migration des MKs et à leur réponse chimiotactique à SDF1, principale chimiokine régulant la migration des MK. Le travail prévu est de purifier les cellules CD34⁺ à partir de sang adulte et de les cultiver en présence de TPO, de les transduire avec un shRNA contre DIAPH1 dans un vecteur lentivirus contenant la Cherry. Ces cellules seront éventuellement soit infectées par des shRNA contre MYH9 et MYH10 (les deux chaînes lourdes de myosine II) et codant la GFP, soit traitées par des inhibiteurs de Rock et de la myosine II (Y27632 et blebbistatine) afin d'étudier le rôle respectif de DIAPH1 et de la voie Rock/myosine II sur la migration des MK en réponse à SDF1.

La migration sera d'abord étudiée en utilisant des chambres de DUNN recouvertes de différentes protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène I et le fibrinogène sous vidéo-microscopie. Ceci nous permettra d'observer directement le comportement des cellules soumises à un gradient de concentration linéaire de SDF1. La vitesse et la direction de migration des MK en réponse à SDF1 seront analysées par Image J. De plus, après adhésion des mégacaryocytes à des MEC, la structure de migration, comme les complexes d'adhérence focale, les podosomes, les lamellipodes et la formation de fibres de stress seront analysés par immunomarquage.

DIAPH1 et la polyplôïisation des mégacaryocytes

Rock est un effecteur de Rho-GTPase. Il a été montré que la voie Rho/Rock/myosine II est impliquée dans le processus d'endomitose et de polyplôïisation des mégacaryocytes. Des résultats préliminaires ont montré que DIAPH1 augmente légèrement la polyplôïisation des MKs. Il sera donc intéressant d'étudier son rôle précis dans la polyplôïisation aussi bien *in vitro* et *in vivo*.

Les fonctions des autres DRFs dans la mégacaryopoïèse

Notre travail a montré que l'extinction de DIAPH1 par ARN interférence ne modifie pas l'expression de DIAPH2 et DIAPH3 dans les MKs humaines. Plusieurs autres membres de la famille des formines sont présents dans les MKs et les plaquettes, comme FHOD1, INF2 ou DAAM1. Il sera donc intéressant d'étudier si d'autres formines sont impliqués dans la formation des proplaquettes et si elles ont un rôle redondant ou synergique dans l'organisation du cytosquelette d'actine et de microtubule au cours de la différenciation mégacaryocytaire, la formation de proplaquette et la migration mégacaryocytaire.

Il a été démontré que mDia2 est essentielle pour la cytocinèse des cellules de mammifère en fournissant un squelette d'actine pour le montage de l'anneau contractile et maintenir sa position au milieu d'une cellule en division. L'expression des deux autres DRFs, DIAPH2 (mDia3) et DIAPH3 (mDia2), diminue au cours de la différenciation MK. Ainsi, il sera très intéressant d'étudier si l'extinction de ces deux DIAPH est nécessaire pour la polyplôïisation des mégacaryocytes et la formation des proplaquettes. Il faudra particulièrement étudier la fonction de DIAPH3 (mDia2) dans la cytocinèse et la migration cellulaire.

DIAPH1 et l'activation de MAL/SRF

MAL1 est un co-activateur transcriptionnel du facteur de réponse au sérum (SRF). Le complexe transcriptionnel MAL/SRF est régulé par le niveau de G-actine dans les cellules et régule de transcriptionnellement un nombre important de gènes du cytosquelette d'actine impliqués en particulier dans la migration des cellules et d'autres processus dépendants de l'actine. Le complexe MAL/SRF est impliqué dans la formation des plaquettes et la migration des mégacaryocytes en régulant entre autres par MYL9 et MMP9. Donc, il est intéressant

d'étudier si polymérisation d'actine induite par DIAPH1 dans le noyau et le cytoplasme pourrait réguler l'activité de MAL/SRF et l'expression des gènes en aval, ceci permettrait de réguler la formation de proplaquette et la migration mégacaryocytaire non pas de manière instantanée, mais en cours de différenciation ou au cours de la stimulation de la mégacaryopoïèse.

Au total la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la formation des proplaquettes et de libération de plaquettes sont importantes en recherche fondamentale mais également certainement pour mieux comprendre les thrombocytopénies et thrombocytoses héréditaires, voir acquises. La maîtrise de ces mécanismes pourrait améliorer les techniques pour produire des plaquettes in vitro, ce qui pourrait faciliter la production de plaquettes in vitro en grande quantité dans un but transfusionnel.

References:

1. Blood Coagulation as an Intrinsic Pathway for Proinflammation: A Mini Review. Chu AJ. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009 Sep 1.
2. The role of platelet CD154 in the modulation in adaptive immunity. Sprague DL, Sowa JM, Elzey BD, Ratliff TL. *Immunol Res*. 2007;39(1-3):185-93.
3. The implication of platelet activating factor in cancer growth and metastasis: potent beneficial role of PAF-inhibitors and antioxidants. Tsoupras AB, Iatrou C, Frangia C, Demopoulos CA. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 Aug;9(4):390-9
4. From hematopoietic stem cells to platelets. Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:318-27.
5. Schönichen A, Geyer M. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Feb;1803(2):152-63. Epub 2010 Jan 25.
6. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. Chesarone MA, DuPage AG, Goode BL. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jan;11(1):62-74.
7. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 Jun;28(1-2):65-76. Rho signaling, ROCK and DIAPH1, in transformation, metastasis and invasion.
8. Peng J, Kitchen SM, West RA, Sigler R, et al. Myeloproliferative defects following targeting of the Drf1 gene encoding the mammalian DIAPHanous related formin DIAPH1. *Cancer Res*. 2007 Aug 15;67(16):7565-71.
- 9 Chang Y, Aurade F, Larbret F, et al. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood*. 2007; May 15;109:4229-4236.
10. Larissa L. et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*. 2008; Oct 15;112(8):3164-74.
11. Larissa L. et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun*. 2012; Mar 6;3:717.
12. Wang et al. Nonmuscle myosin II isoform and domain specificity during early mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; Aug 17;107(33):14645-50.

Scientific contributions

Publications:

1. **Pan J**, Lordier L, Meyran D, Rameau P, Lecluse Y, Kitchen-Goosen S, Badirou I, Mokrani H, Narumiya S, Alberts AS, Vainchenker W and Chang Y. The formin DIAPH1 (mDia1) regulates megakaryocyte proplatelet formation by remodeling the actin and microtubule cytoskeletons. *Blood*. 2014. Oct 8. pii: blood-2013-12-544924.
2. Badirou I, **Pan J**, Legrand C, Wang A, Lordier L, Boukour S, Roy A, Vainchenker W, Chang Y. Transgenic mouse models demonstrate the Carboxyl-terminal depended recruitment of non-muscle myosin II to megakaryocyte contractile ring during polyploidization. *Blood*. 2014. Sep 2. pii: blood-2014-06-584995.
3. Lordier L, **Pan J**, Naim V, Jalil A, Badirou I, Rameau P, Larghero J, Debili N, Rosselli F, Vainchenker W, Chang Y. Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis. *Cell Cycle*. 2012, 11(23):4385-9. **Lordier L and Pan J contributed equally to this work.**
4. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, Legrand C, **Pan J**, Rameau P, Jouni D, Bluteau O, Mercher T, Leon C, Gachet C, Debili N, Vainchenker W, Raslova H, Chang Y. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun*. 2012. 6(3):717.
5. Mu C, Wang S, Zhang S, **Pan J**, Chen N, Li X, Wang Z, Liu H. Small heat shock protein LimHSP16.45 protects pollen mother cells and tapetal cells against extreme temperatures during late zygotene to pachytene stages of meiotic prophase I in David Lily. *Plant Cell Rep*. 2011. 30(10):1981-9.

Manuscripts under review:

- Idinath Badirou, **Jiajia PAN**, Sylvie Souquere, Celine Legrand, Gérard Pierron, Aibing Wang, Larissa Lordier, Anita Roy, Christian Gachet, William Vainchenker, Catherine Leon and Yunhua Chang. Distinct localizations and roles of nonmuscle myosin II during proplatelet formation and platelet release. (*Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2014)

Conferences:

- 05/2012, Les 8^{èmes} journées scientifiques de Roscoff. Poster presentation.
- 10/2012, Les 19^{èmes} congrès 2012 du CHO (Club Hématopoïèse et Oncogénèse). Poster presentation.
- 05/2013, Les 9^{èmes} journées scientifiques de Roscoff. Oral presentation.
- 05/2014, EMBO Conference Series. Microtubules: Structure, regulation and functions. Poster presentation.