



Génération de plaquettes in vitro à partir de cellules souches hématopoïétiques

Audrey Pietrzyk-Nivau

► To cite this version:

Audrey Pietrzyk-Nivau. Génération de plaquettes in vitro à partir de cellules souches hématopoïétiques. Biologie moléculaire. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P626 . tel-01424112

HAL Id: tel-01424112

<https://theses.hal.science/tel-01424112>

Submitted on 2 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Ecole Doctorale Médicament Toxicologie Chimie Imagerie

INSERM UMR_S 1140 «Innovations Thérapeutiques en Hémostase»

GENERATION DE PLAQUETTES *IN VITRO*

A PARTIR DE CELLULES SOUCHES

HEMATOPOÏÉTIQUES

Par Audrey PIETRZYK-NIVAU

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 15 Décembre 2014

Devant un jury composé de :

D ^r Catherine Léon	(Rapporteur)
D ^r Jean-Philippe Rosa	(Rapporteur)
D ^r Isabelle Dusanter	(Examineur)
D ^r Catherine Le Visage	(Examineur)
P ^r Pascale Gaussem	(Examineur)
D ^r Dominique Baruch	(Directrice de thèse)

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Professeur Pascale Gaussem de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de me faire l'honneur de présider ma thèse. Je vous remercie pour toute votre disponibilité à mon égard, lors de mes 4 années au laboratoire.

Je remercie chaleureusement tous les autres membres de mon jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Je remercie tout d'abord le Docteur Catherine Léon et le Docteur Jean-Philippe Rosa d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Docteur Isabelle Dusanter et le Docteur Catherine Le Visage qui ont accepté d'examiner ce travail.

Des remerciements particuliers à ma directrice de thèse, le Docteur Dominique Baruch pour son encadrement au cours de ces 4 années. Merci de m'avoir accordée votre confiance en me prenant en thèse à la suite de mon master 2. Merci d'avoir été toujours à l'écoute et présente ainsi que pour tous vos précieux conseils. Merci aussi d'avoir été si patiente avec moi car je le sais, je ne suis pas toujours facile.

Je remercie tous nos collaborateurs de l'unité INSERM UMR_S 1148, le Docteur Didier Letourneur, le Docteur Catherine Le Visage, Sidi-Mohammed Derkaoui ainsi que Rachida Aid-Launais pour leur implication dans ce travail. Merci à Didier et Catherine d'avoir toujours répondu à mes questions et d'avoir pris le temps de relire un bon nombre de fois le papier 3D lors de nos soumissions. Merci à Mohammed et Rachida d'avoir toujours répondu à mes demandes (même urgentes) de matrices ou d'enzymes.

Un grand merci au Docteur Sophie Gandrille sans qui je n'aurais jamais pu faire mes dernières manipulations de qPCR. Merci de m'avoir permis d'apprendre de nouvelles techniques et d'avoir toujours été à l'écoute lors de mes nombreuses questions.

Je tiens à remercier le DIM Stem Pole qui m'a permis d'obtenir une bourse pour réaliser cette thèse. Merci également au Professeur Pascale Gaussem et au Docteur Catherine Boisson-Vidal de m'avoir accordé un financement de 3 mois supplémentaires pour terminer cette thèse.

Merci aux Docteurs Isabelle Gouin-Thibault et Virginie Siguret de m'avoir donné goût à l'enseignement lors des Travaux Pratiques d'Hématologie. Merci à toi Virginie de m'avoir accordée ta confiance pour le projet de lames virtuelles. Ce fut une expérience professionnelle et personnelle très enrichissante.

Un grand merci à toute l'unité INSERM UMR_S 1140 pour leur accueil, leur gentillesse et leur patience envers moi. Merci à Florence pour ton aide dans la partie administrative; sans toi, cela aurait été très compliquée. Merci à Blandine, Bérengère, Françoise pour leur soutien et leur gentillesse durant mes 4 années passées au labo. Merci pour toutes nos discussions sur des sujets divers et variés. Merci à Anna d'avoir toujours été présente et à l'écoute. Merci d'avoir partagé tous ces nombreux « tea-time » du matin qui nous ont permis de discuter de nombreuses choses. Un merci particulier à Sonia qui m'a toujours soutenue au cours de ces 4 années au laboratoire. Merci de m'avoir permis d'apprendre autant de choses en culture cellulaire, en cytométrie, en microscopie et j'en passe. Merci pour ta confiance, tes conseils et ton écoute tant sur le plan professionnel que personnel. Merci à tous les chercheurs de l'unité: Christilla, Eduardo, Dominique P., Bernard, Catherine, Sophie d'avoir contribué au bon déroulement de cette thèse.

Un merci particulier aux thésards pour nos grandes discussions philosophiques sur la thèse et le monde en général:

Elise et Elene, merci pour votre confiance, votre gentillesse et votre soutien.

Tatiana, merci pour ta bonne humeur.

Nour, merci d'avoir accepté mon caractère et de m'avoir initié à la géographie.

Georges et Adeline, les deux petits nouveaux, merci pour votre bonne humeur et votre sourire au quotidien.

Benoît, merci de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir supporté pendant ces 3 années.

Merci aux post-docs du laboratoire, Elisa et Alex. Alex, merci d'avoir toujours répondu présent lors de mes questions et de mes doutes. Merci pour ton aide et ta bonne humeur au quotidien. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle vie de CR.

Merci à tous les anciens membres de l'unité qui m'auront manqué durant cette dernière année: Isabelle, Jessica, Juliana, Tiphaine, Zahia et Marion.

Isabelle, merci pour ta gentillesse et tes avis plutôt objectifs sur de nombreux sujets.

Jessica, tu l'as dit toi-même, il ne faut pas se fier aux apparences... Contente de t'avoir connue et encore toutes mes excuses pour Fernanda.

Juliana, merci pour ton apport enjoué de soleil au quotidien.

Tiphaine, merci pour ta joie et ta bonne humeur inimitable.

Zahia, merci pour tes conseils, ta gentillesse et ton soutien (même encore aujourd'hui). Beaucoup de bonheur avec ta petite famille.

Marion, que dire ... Merci de m'avoir accordée ton amitié. La dernière année sans toi n'a pas été pareille mais merci d'avoir toujours été là pour m'écouter. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie avec Jonathan.

Mes derniers mots iront à ma famille:

Merci à mes parents de m'avoir permis d'aller jusqu'à ce doctorat et de m'avoir toujours laissé choisir ma voie. Merci de m'avoir toujours soutenue dans n'importe quelle circonstance et pour tout ce que vous m'avez transmis; si j'en suis là c'est grâce à vous. Merci d'être des parents irremplaçables.

Merci à mes grands-parents de m'avoir toujours suivi depuis mon plus jeune âge et d'être des grands-parents présents et attentifs même pour une petite fille de 26 ans.

Sébastien et Elodie, merci d'avoir toujours cru en moi et pour votre soutien. Sébastien, sache que ta sœur aussi est très fière de toi.

Ma belle-famille (Didier, Viviane, Gwendolyn et Amandine), merci de m'avoir toujours soutenu et encouragé. Merci de m'avoir accepté dans votre famille telle que je suis.

Nicolas, mon mari depuis 5 mois maintenant, je mesure la chance que j'ai de t'avoir. Merci de m'avoir poussé à faire cette thèse et d'avoir toujours été à mes côtés pendant toutes ces années. Merci d'avoir supporté ma mauvaise humeur et mon sale caractère ces dernières semaines. Je te dédie cette thèse...

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
ABREVIATIONS.....	9
PREAMBULE.....	13
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE 1: CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES ET MEGACARYOPOÏÈSE	16
<i>I. Structure de la moelle osseuse hématopoïétique</i>	<i>16</i>
<i>II. Cellules souches hématopoïétiques</i>	<i>20</i>
1. Historique	20
2. Marqueurs des cellules souches hématopoïétiques	20
3. Fonctions des cellules souches hématopoïétiques et leurs régulateurs.....	22
3.1. Fonctions.....	22
3.2. Régulateurs	24
<i>III. Différenciation mégacaryocytaire</i>	<i>28</i>
1. Des progéniteurs au mégacaryocyte mature	28
2. Régulateurs de la mégacaryopoïèse	32
2.1. Les cytokines et facteurs de croissance	32
2.2. Les facteurs de transcription.....	34
<i>IV. Etude de la différenciation mégacaryocytaire in vitro</i>	<i>36</i>
1. Utilisation des cellules souches hématopoïétiques	36
2. Utilisation des cellules souches pluripotentes	38
2.1. Origine et propriétés des cellules ES et iPS.....	38
2.2. Protocoles de génération de mégacaryocytes à partir de cellules souches pluripotentes.....	39
CHAPITRE 2: THROMBOPOÏÈSE ET PLAQUETTES SANGUINES	42
<i>I. Thrombopoïèse</i>	<i>42</i>
1. Formation des proplaquettes et libération des plaquettes	42

2. Système de membrane de démarcation	46
<i>II. Plaquettes sanguines</i>	48
1. Morphologie des plaquettes sanguines	48
1.1. La zone périphérique	49
1.2. Le cytoplasme	49
1.3. Le cytosquelette.....	51
2. Signalisation plaquettaire.....	52
2.1. Adhésion plaquettaire	53
2.2. Activation plaquettaire	53
2.2.1. Récepteurs d'adhérence.....	53
2.2.2. Récepteurs couplés aux protéines G	54
2.2.3. Récepteurs de type intégrine	56
2.3. Changement de forme et sécrétion plaquettaire	56
2.4. Agrégation plaquettaire	57
2.5. Activité procoagulante des plaquettes	58
3. Pathologies plaquettaires.....	59
3.1. Macrothrombopénies héréditaires.....	59
3.2. Maladie de Willebrand.....	62
3.4. Cas de thrombocytoses associées à des syndromes myéloprolifératifs.....	63
CHAPITRE 3: APPROCHES EXPERIMENTALES POUR L'AMELIORATION DE LA PRODUCTION PLAQUETTAIRE <i>IN VITRO</i> ...	64
<i>I. Biomatériaux</i>	64
<i>II. Bioréacteurs</i>	68
BUT DU TRAVAIL DE THESE	73
RÉSULTATS	76
CHAPITRE 1 - ARTICLE I: THREE-DIMENSIONAL ENVIRONMENT SUSTAINS HEMATOPOIETIC STEM CELL DIFFERENTIATION INTO PLATELET-PRODUCING MEGAKARYOCYTES	77
CHAPITRE 2 - ARTICLE II: PROOF OF PRINCIPLE FOR EFFICIENCY IN THROMBOSIS OF SHEAR-GENERATED PLATELETS	119
DISCUSSION	151
ANNEXES	160
ANNEXE 1: PUBLICATIONS.....	161
ANNEXE 2: COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES	162
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	163

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique de la structure de la moelle osseuse et des vaisseaux sinusoïdes	17
Figure 2: Modèles de régulation des CSH au sein de la moelle osseuse.....	19
Figure 3: Schéma de l'engagement en différenciation des CSH	23
Figure 4: Modèles de division symétrique (A1 et A2) et asymétrique (B)	24
Figure 5: Voie de signalisation Notch	26
Figure 6: Voie de signalisation Wnt.....	27
Figure 7: Schéma de la mégacaryopoïèse	28
Figure 8: Schéma de différenciation des MEP dans le lignage érythro-mégacaryocytaire.....	29
Figure 9: Expression des marqueurs au cours de la différenciation mégacaryocytaire.....	29
Figure 10: Observation d'un mégacaryocyte mature au microscope optique	31
Figure 11: Voies de signalisation induites par la fixation de la TPO sur son récepteur Mpl	33
Figure 12: Facteurs de transcription impliqués dans la mégacaryopoïèse	34
Figure 13: Schéma d'expression de c-myc pour la production plaquettaire à partir d'iPS.....	41
Figure 14: Implication de c-myc, BM1 et BCL-XL dans l'obtention d'une lignée mégacaryocytaire immortalisée	41
Figure 15: Implication du VWF dans la formation des proplaquettes et des plaquettes	46
Figure 16: Processus de développement du système de membrane de démarcation.....	47
Figure 17: Observation d'une plaquette au repos en microscopie électronique	48
Figure 18: Voies de signalisation plaquettaire	52
Figure 19: Signalisations « inside-out » (A) et « outside-in » (B) de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$	56
Figure 20: Hydrogels poreux de polysaccharides constitués de pullulane et de dextrane.....	67
Figure 21: Modèle de bioréacteur mimant les compartiments de la moelle osseuse.....	69
Figure 22: Influence des flux bidirectionnels dans la production plaquettaire	70
Figure 23: Modélisation de la composition physiologique de la moelle osseuse pour la migration et la fragmentation des mégacaryocytes.....	71
Figure 24: Influence des flux parallèles dans la migration des mégacaryocytes et la production plaquettaire.....	72

Figure 25: Protocole pour l'étude de la différenciation mégacaryocytaire et de la production plaquettaire au sein des hydrogels de pullulane/dextrane et en culture liquide	74
Figure 26: Protocole pour les caractérisations in vitro et in vivo des plaquettes produites en conditions de flux à forces de cisaillement élevées, à partir de mégacaryocytes matures	75
Figure 27: Représentation schématique de la régulation des CSH au sein des hydrogels	157

Liste des tableaux

Tableau 1: Marqueurs phénotypes des populations de CSH humaines	21
Tableau 2: Marqueurs phénotypiques des populations de CSH murines	22
Tableau 3: Exemples de conditions de culture permettant l'amplification des CSH, la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire in vitro	37

ABREVIATIONS

- A** **Actine G:** Actine monomérique
ADP: Adénosine diphosphate
Akt: Lymphome cutané Akr à cellules T
AML-1: Leucémie aïgue myéloïde -1 (RUNX-1)
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
APC: Polypose adénomateuse familiale
ATP: Adénosine triphosphate
- B** **BFU-E:** Unité formant des groupes érythrocytaires
BFU-MK: Unité formant des groupes mégacaryocytaires
BCL-XL: Grand lymphome cutané à cellules B
BMI1: Région 1 homologue d'insertion du Mo-MLV dans les lymphomes cutanés à cellules B
BMP4: Protéine morphogénétique osseuse 4
- C** **CBP:** Protéine liant l'élément de réponse AMPc
CD: Cluster de différenciation
CFU-E: Unité formant des colonies érythrocytaires
CFU-MK: Unité formant des colonies mégacaryocytaires
CIP4: Protéine 4 interagissant avec Cdc42
CKI: Caséine kinase I
CLP: Progéniteurs communs lymphoïdes
CMP: Progéniteurs communs myéloïdes
COSs: Chitooligosaccharides
CSH: Cellules souches hématopoïétiques
CSL: Facteur liant le promoteur c/suppresseur de hairless/facteur de transcription lag-1
CSM: Cellules souches mésenchymateuses
CXCL2: Chimiokine CXC ligand 2

- D** **DAG** : 1,2-diacylglyc role
 DAPT: N-3,5-difluoroph nac tyl-L-alanyl-S-phénylglycine-t-butyl ester
 DMS: Système de membrane de démarcation
 Dsh: Disheveled
- E** **EKLF**: Facteur érythrocytaire de type Krüppel
 ERK: Kinase régulée par des signaux extracellulaires
 EPO: Erythropoïétine
 ES: Cellule souche embryonnaire
 E(spl): Activateur de scission
 Esrrb: Récepteur beta apparenté aux estrogènes
- F** **F-actine**: Actine fibrillaire
 FDP/AML: Maladie plaquettaire familiale/Leucémie a g e my lo ide
 FGF1: Facteur 1 de croissance des fibroblastes
 FLI-1: Friend leukemia integration-1
 Flt3-l: Ligand   tyrosine kinase apparent   Fms
 FOG-1: Friend of GATA-1
- G** **GATA-1**: Facteur de transcription globine-1
 G-CSF: Facteur stimulant les colonies granulocytaires
 GM-CSF: Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
 GMP: Progéniteurs granulocytaires et monocytaires
 GP: Glycoprotéine
 GSK3 : Glycogène synthase kinase 3
 GTPase: Guanine triphosphatase
- H** **HDF**: Fibroblaste dermique humain
 Hes1: Hairy enhancer of split-1
 HUVEC: Cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humain
 Hydrogel P/D: Hydrogel Pullulane/Dextrane
- I** **IL**: Interleukine
 IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate
 iPS: Cellule souche induite   la pluripotence
 ITAM: Motifs activateurs liés   des immunor cepteurs   tyrosine
- J** **JAK**: Janus kinase

- K** **KLF4**: Facteur 4 de type Krüppel
- L** **LRP**: Protéine apparentée au récepteur des lipoprotéines à faible densité (LDL)
LSK: Cellules Lin⁻/Sca⁺/c-kit⁺
LT-CSH: Long term-CSH
- M** **MAP**: Protéine active par des mitogènes
MAPK: Protéine kinase activée par des mitogènes
MEP: Progéniteurs mégacaryocytaires et érythrocytaires
MGG: May-Grünwald Giemsa
MK: Mégacaryocytes
MLC: Chaîne légère de la myosine
MPP: Progéniteurs multipotents
MYH9: Chaîne lourde non-musculaire 9 de la myosine
- N** **NBEAL**: Neurobeachin-like
NFIB: Facteur nucléaire IB
NF-E2: Facteur nucléaire-E2
NICD: Domaine intracellulaire de Notch-1
NMHCIIA: Chaîne lourde non-musculaire IIA de la myosine
- O** **OCT4**: Facteur de transcription 4 liant l'octamère
- P** **PAI-1**: Inhibiteur-1 de l'activateur au plasminogène
PAR: Récepteur activé par des protéases
PEC: Cellules progénitrices endothéliales
PF-4: Facteur 4 plaquettaire
PGI2: Prostaglandine I2
PI: Phosphoinositol
PI3k: Phosphatidylinositol 3 kinase
PKC: Protéine kinase C
PL : Phospholipase
PS: Phosphatidylsérine
- R** **RAS**: Sarcome de rat
RCPG: Récepteurs couplés aux protéines G
Rho-GEF: Facteurs d'échange des nucléotides guanine spécifique de Rho
- S** **S1P**: Shingosine 1 phosphate

- Sall4**: Facteur de transcription-4 de type Spalt
- SCF**: Facteur des cellules souches
- SDF-1**: Facteur-1 dérivé des cellules stromales
- SHC**: Domaine d'homologie 2 de src contenant
- SOX2 (SRY-box2)**: Sex determining region Y-box 2
- STAT**: Transducteurs du signal et activateurs de la transcription
- ST-CSH**: Short term-CSH
- T** **TACE**: Enzyme de conversion du facteur de nécrose tumorale (TNF)
- TCF**: Facteur des cellules T
- TGFβ**: Facteur β de croissance de transformation
- TLR9**: Récepteur-9 de type Toll
- TPO**: Thrombopoïétine
- TRAP**: Peptide activant le récepteur à la thrombine
- TXA₂**: Thromboxane A₂
- V** **VEGF**: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
- VWF**: Facteur von Willebrand
- 3D**: Structure tridimensionnelle

PREAMBULE

La moelle osseuse hématopoïétique représente le site majeur de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse chez l'adulte. Plus précisément, la moelle osseuse peut être définie sur un plan structurel, anatomique et fonctionnel. D'un point de vue structurel, la moelle osseuse est définie comme une structure tridimensionnelle s'étendant du compartiment ostéoblastique à la niche vasculaire. Les vaisseaux sinusoides constituent le prolongement de cette niche vasculaire. D'un point de vue anatomique et histologique, la moelle osseuse est composée de nombreux types de cellules: des cellules présentes dans le compartiment ostéoblastique (ostéoblastes, ostéocytes ...) et des cellules présentes dans la niche vasculaire (cellules endothéliales ...). D'un point de vue fonctionnel, la moelle osseuse est perpétuellement active *via* les cellules constituant le microenvironnement afin de réguler les différentes fonctions des cellules souches hématopoïétiques (maintien en quiescence, auto-renouvellement, entrée en différenciation). En effet, les contacts cellule/cellule ainsi que les contacts cellule/substrat mis en jeu au sein de la moelle osseuse permettent de maintenir constants les facteurs extrinsèques et intrinsèques nécessaires à ces différentes fonctions. Plusieurs équipes tentent de comprendre par des études *in vivo* le comportement des cellules du microenvironnement de la moelle osseuse et notamment, leur implication dans la niche hématopoïétique, concept encore largement controversé [1-3].

Ainsi, toutes ces caractéristiques du microenvironnement de la moelle osseuse sont très largement impliquées dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en mégacaryocytes ainsi que dans la migration de ces derniers vers les vaisseaux sinusoides pour permettre le processus de thrombopoïèse, processus permettant la libération de plaquettes sanguines dans la circulation. Plusieurs équipes tentent de mimer *in vitro* les compartiments de la moelle osseuse (compartiment ostéoblastique et niche vasculaire) ainsi que les forces de cisaillement du flux sanguin, nécessaires à la libération des plaquettes dans la circulation. Plus particulièrement, ces équipes utilisent des biomatériaux en combinaison avec des cellules/molécules retrouvées dans le microenvironnement de la moelle. Ceux-ci

sont possiblement associés à des systèmes microfluidiques dans le but d'étudier les processus de migration des mégacaryocytes, d'élongation des proplaquettes et de libération des plaquettes. La plupart de ces travaux ont d'ailleurs démontré l'importance de ces systèmes dans l'amélioration de la production plaquettaire *in vitro* [4-7]. Néanmoins, ces études ne caractérisent pas le processus de différenciation et de maturation mégacaryocytaire menant à l'augmentation de la production plaquettaire *in vitro*. De même, aucune caractéristique fonctionnelle *in vivo* de ces plaquettes n'a été réalisée.

Dans ce but, notre travail s'est concentré sur la caractérisation de ces différents points. Pour se faire, nous avons choisi d'utiliser d'une part des biomatériaux tridimensionnels constitués de polysaccharides mimant la structure de la moelle osseuse afin d'étudier la différenciation mégacaryocytaire *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques (**Article I**). D'autre part, l'utilisation d'un système de microfluidique mimant les forces de cisaillement élevées retrouvées dans la microcirculation [8] nous a permis d'étudier la production plaquettaire *in vitro* en conditions de flux, à partir de mégacaryocytes humains et murins. Par la suite, nous avons analysé la fonctionnalité *in vitro* et *in vivo* de ces plaquettes produites *in vitro* (**Articles I et II**).

Ce manuscrit est constitué d'une introduction comprenant 1) les cellules souches hématopoïétiques et la mégacaryopoïèse, 2) la thrombopoïèse, la physiologie des plaquettes sanguines et les pathologies plaquettaires et 3) les approches expérimentales pour l'amélioration de la production plaquettaire *in vitro*. Cette introduction est suivie d'une partie « résultats » comprenant les deux articles puis d'une discussion et de perspectives.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1: CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES ET MEGACARYOPOÏÈSE

La mégacaryopoïèse constitue l'ensemble des mécanismes permettant d'assurer un remplacement continu et régulé des mégacaryocytes (MK). Ce processus bien défini conduisant à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en MK matures se déroule au sein de la moelle osseuse hématopoïétique. Ce premier chapitre a pour but de présenter succinctement la structure de la moelle osseuse hématopoïétique, de définir le terme de CSH et de décrire la différenciation mégacaryocytaire ainsi que les protocoles d'études *in vitro* existants sur ce sujet.

I. Structure de la moelle osseuse hématopoïétique

La moelle osseuse est constituée de deux types de moelle : une moelle rouge et une moelle jaune qui demeurent respectivement, active et inactive d'un point de vue hématopoïétique [9]. La moelle osseuse hématopoïétique forme une structure tridimensionnelle (3D) s'étendant entre deux compartiments : le compartiment ostéoblastique et la niche vasculaire (Figure 1). Ces compartiments jouent un rôle majeur dans la régulation des CSH et forment la niche hématopoïétique [10, 11].

Compartiment ostéoblastique

Ce compartiment délimitant la partie osseuse de la moelle est constitué d'os spongieux et forme un réseau de lamelles osseuses appelées trabécules. Ces régions trabéculaires s'organisent en petits espaces appelés logettes où sont regroupées les CSH les plus immatures [12]. Au sein de ce compartiment ostéoblastique sont retrouvés différents types cellulaires tels que les ostéoblastes d'origine mésenchymateuse et localisés près des trabécules, les ostéoclastes d'origine hématopoïétique (monocytaire) ou encore les ostéocytes retrouvés dans la matrice extracellulaire [13, 14]. La matrice extracellulaire forme un réseau de fibrilles formées notamment de collagènes permettant de stabiliser le contenu des logettes et ainsi l'accrochage des CSH. Cette matrice extracellulaire forme avec les

cellules stromales d'origine mésenchymateuse, le stroma médullaire. Ce compartiment ostéoblastique par le biais des différents types cellulaires le constituant est primordial dans le maintien en quiescence des CSH [11, 15, 16].

Niche vasculaire

La niche vasculaire constitue le prolongement du compartiment ostéoblastique et est délimitée par l'endothélium vasculaire sinusoïde [17]. Dans cette niche sont retrouvés les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques engagés dans une voie de différenciation à l'origine des plaquettes, des globules rouges ou encore des globules blancs. Diverses cellules telles que les cellules endothéliales, les mégacaryocytes ou encore les cellules souches mésenchymateuses (CSM) permettent de réguler la prolifération et différenciation des progéniteurs au sein de cette niche [10, 18].

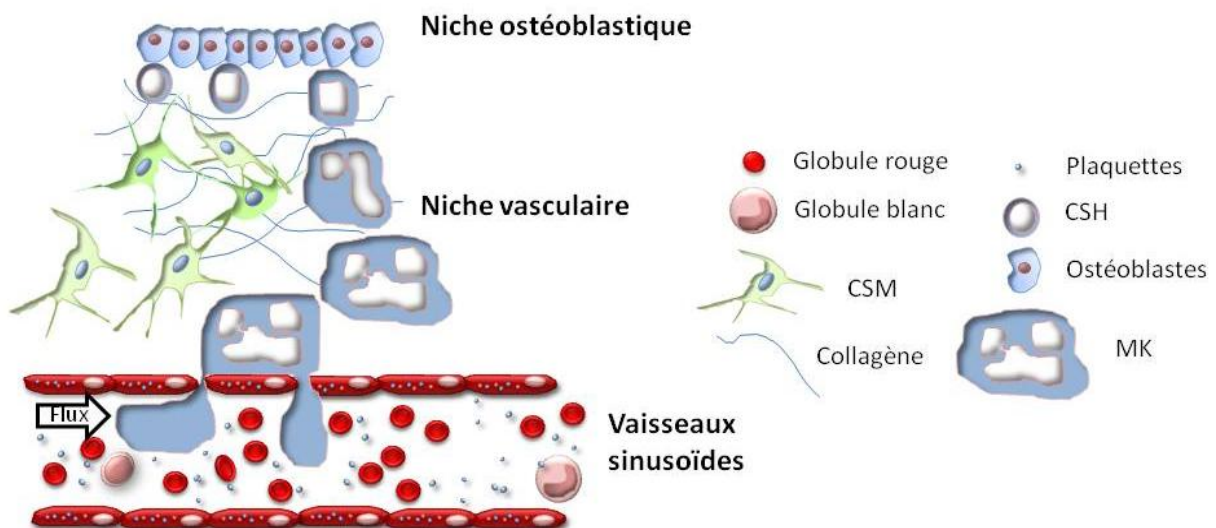


Figure 1: Représentation schématique de la structure de la moelle osseuse et des vaisseaux sinusoides

Ces deux compartiments de la moelle osseuse forment la niche hématopoïétique [10, 11]. Cette notion de « niche hématopoïétique » a été définie par Schofield en 1978 comme étant un lieu d'hébergement des CSH [19]. Bien qu'il soit admis aujourd'hui que les différentes fonctions des CSH soient contrôlées par le microenvironnement de la moelle osseuse, des controverses demeurent sur le rôle de chaque constituant cellulaire et/ou moléculaire. Ainsi, il existe actuellement différents modèles de niche hématopoïétique impliquant divers types cellulaires tels que les ostéoblastes, les ostéoclastes, les CSM, les monocytes ou encore les MK [10] (Figure 2). Au niveau ostéoblastique, des travaux soulignent une implication des ostéoblastes [20, 21] et des cellules stromales [22] dans la régulation de la taille et du nombre de CSH. De plus, les ostéoblastes sécrètent des facteurs telles que l'angiopoïétine ou la thrombopoïétine favorisant le maintien des CSH [23, 24]. CXCL12 (CXC-chemokine ligand 12) également sécrété par les ostéoblastes, régule la migration et la localisation des CSH [25]. De même, le remodelage de l'os par ces cellules (ostéoblastes et ostéoclastes) induit une augmentation de la concentration en calcium également connu pour influencer la localisation des CSH au sein du compartiment ostéoblastique [26]. D'autres types cellulaires tels que les cellules réticulaires ou les CSM sont également impliqués dans cette niche [27, 28].

Il a également été suggéré une implication des cellules présentes au sein de la niche vasculaire dans l'auto-renouvellement, le maintien et la localisation des CSH [11, 29]. De même que dans le compartiment ostéoblastique, des cellules réticulaires sont présentes dans la niche vasculaire. Celles-ci sécrètent de grandes quantités de CXCL12 régulant le maintien des CSH [27]. Ce facteur également exprimé par les cellules endothéliales favorise la migration des CSH dans la niche vasculaire [30, 31]. Les cellules endothéliales jouent aussi un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement des CSH notamment par le biais de la E-sélectine [32, 33]. Plusieurs études ont également souligné l'implication des MK, localisés près des sinusoides de la moelle osseuse [34], dans le maintien des CSH et le processus d'hématopoïèse [35-37].

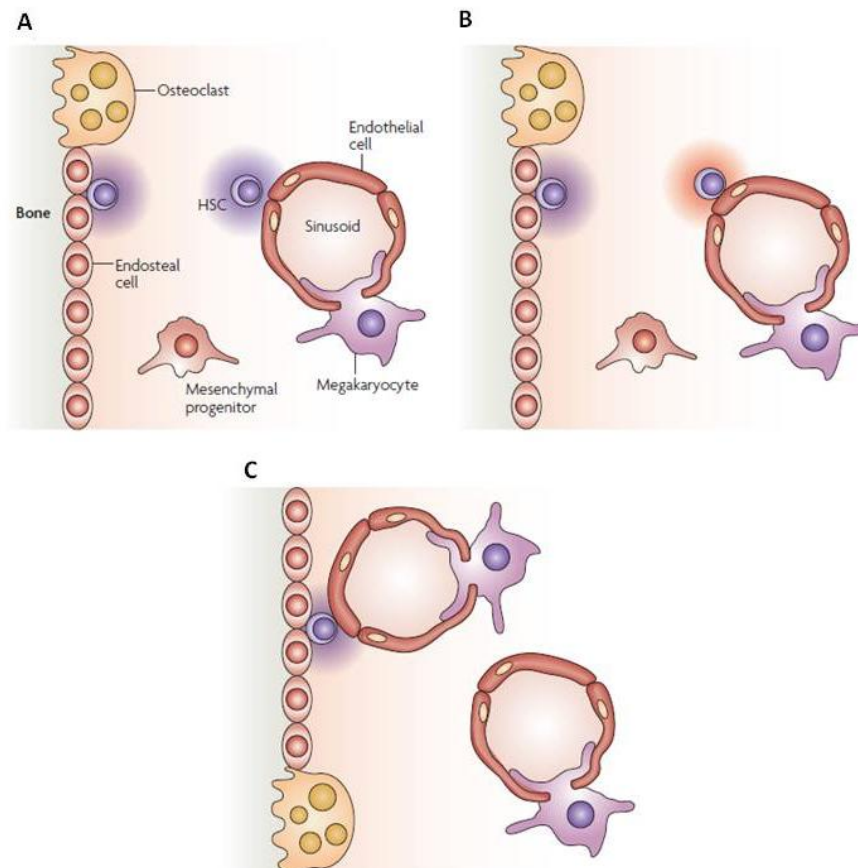


Figure 2: Modèles de régulation des CSH au sein de la moelle osseuse (D'après [10])

Différentes hypothèses de régulation des fonctions des CSH (quiescence, auto-renouvellement, entrée en différenciation) sont proposées. (A) Les niches ostéoblastique et vasculaire contribuent distinctement à la régulation du maintien en quiescence des CSH. (B) Les niches ostéoblastique et vasculaire régulent différemment les CSH : la première est impliquée dans le maintien en quiescence et la seconde dans l'auto-renouvellement et l'entrée en différenciation. (C) Une seule niche hématopoïétique régule le maintien des CSH près du compartiment ostéoblastique en faisant intervenir des cellules du compartiment ostéoblastique et de la niche vasculaire.

Ainsi, le concept de niche hématopoïétique demeure complexe avec une association de deux niches (ostéoblastique et vasculaire) renfermant différents types cellulaires. Toutes ces cellules participent aux mécanismes (contact cellule/cellule, expression de facteurs solubles...) nécessaires au maintien des CSH et au processus d'hématopoïèse.

II. Cellules souches hématopoïétiques

Toutes les cellules sanguines (plaquettes, globules rouges, globules blancs) ont pour origine les CSH de la moelle osseuse [38]. Les CSH présentent de nombreuses caractéristiques permettant d'assurer le renouvellement continu et régulé de ces cellules sanguines tout en maintenant l'homéostasie des tissus (moelle osseuse et sang).

1. Historique

Les CSH ont été mises en évidence en 1961 par Till et McCulloch et ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules de la moelle osseuse (environ 0,001%). Ces cellules souches proviennent d'hémangioblastes qui de par leur caractère bipotent sont capables de donner d'une part, les cellules endothéliales et d'autre part, les CSH retrouvées dans la moelle osseuse [39]. Ces dernières sont les premières cellules véritablement impliquées dans les lignages hématopoïétiques adultes.

2. Marqueurs des cellules souches hématopoïétiques

Les CSH n'expriment pas les marqueurs de surface spécifiques des lignages hématopoïétiques tels que le CD42b (MK et plaquettes), le CD11b (granulocytes et monocytes), le B220 (lymphocytes) ou encore le Ter119 (lignée érythrocytaire). Il est tout de même possible de les identifier et de les classer par rapport aux cellules engagées (progéniteurs hématopoïétiques) grâce à la mise en évidence de marqueurs phénotypiques. Il existe des différences notables entre les marqueurs de surface des CSH de l'homme et de la souris [40, 41].

Marqueurs humains

Chez l'homme, le marqueur de surface le plus utilisé et le premier à avoir été mis en évidence est l'antigène CD34 [42]. Bien que cet antigène puisse être impliqué dans la régulation et la localisation des CSH au sein de la moelle osseuse [43], son rôle précis est encore mal connu. De plus, il est important de noter que les cellules CD34⁺ représentent non

seulement la population de CSH (1-10%) mais également celle des progéniteurs hématopoïétiques (90-99%). En effet, de nombreuses cellules $CD34^+$ co-expriment l'antigène CD38 et sont donc classifiées de progéniteurs. Seules les cellules $CD34^+/CD38^-$ nommées LT-CSH (Long Term-CSH) sont capables de reconstitution hématopoïétique à long terme [44]. A l'inverse, les ST-CSH (Short Term-CSH encore appelées MPP pour multipotent progenitors) n'expriment que faiblement le CD38 ($CD34^+/CD38^{low}$) et ne sont capables de reconstituer que sur une courte période de quatre à douze semaines [45]. L'absence de l'antigène CD45RA à la surface des LT-CSH permet également de les discriminer des ST-CSH [46]. D'autre part, ces deux populations de CSH (LT-CSH et ST-CSH) présentent l'antigène CD90 (Thy1) à leur surface [47]. Enfin, bien que permettant d'enrichir les CSH, l'antigène CD133 présentant un profil d'expression similaire à l'antigène CD34 ne permet pas de discriminer ces deux populations [48]. Finalement, les LT-CSH humaines représentent les cellules $Lin^-/CD34^+/CD38^-/CD45RA^-/CD90^+$ (Tableau 1).

LT-CSH	ST-CSH (MPP)
Lin^-	Lin^-
$CD34^+$	$CD34^+$
$CD38^-$	$CD38^{low}$
$CD45RA^-$	$CD45RA^+$
$CD90^+$	$CD90^+$

Tableau 1: Marqueurs phénotypes des populations de CSH humaines

Marqueurs murins

De même que les CSH humaines, les CSH murines sont retrouvées dans la fraction Lin^- . Comme expliqué précédemment, ces cellules n'expriment pas les marqueurs de surface retrouvés dans les cellules en différenciation. Ainsi, lors de l'isolement des CSH murines ou d'études en cytométrie en flux, il est nécessaire d'exclure ces cellules en différenciation grâce aux anticorps anti-CD5 (lymphocytes T), anti-CD4 (lymphocytes T), anti-CD11b (granulocytes et monocytes), anti-B220 (lymphocytes B), anti-Mac (leucocytes), anti-Gr1 (granulocytes) et anti-Ter119 (lignée érythrocytaire). Après déplétion de ces progéniteurs, la population de cellules LSK ($Lin^-/Sca^+/c-kit^+$) peut être mise en évidence. Cette population cellulaire ne représente que 0,1% de la moelle osseuse [49, 50]. Bien qu'une implication de

Sca dans l'auto-renouvellement des CSH ait été montrée [51], le rôle précis de ces marqueurs est encore peu connu. Ces cellules LSK expriment également l'antigène CD150. Contrairement aux CSH humaines, seule la population de ST-CSH exprime l'antigène CD34; la population LT-CSH est négative pour cet antigène. De même, les LT-CSH n'expriment pas l'antigène FLk2 contrairement aux ST-CSH (Tableau 2). En conclusion, les LT-CSH murines présentent le phénotype suivant : $\text{Lin}^-/\text{Sca}^+/\text{c-kit}^+/\text{CD34}^-/\text{CD150}^+/\text{FLk2}^-$ et sont capables de reconstitution hématopoïétique à long terme [17, 52]. Ces LT-CSH engagées en différenciation donnent naissance aux ST-CSH ayant pour phénotype $\text{Lin}^-/\text{Sca}^+/\text{c-kit}^+/\text{CD34}^+/\text{CD150}^+/\text{FLk2}^+$ et possèdent un potentiel d'auto-renouvellement plus restreint [15].

LT-CSH	ST-CSH
Lin^-	Lin^-
Sca^+	Sca^+
c-kit^+	c-kit^+
CD34^-	CD34^+
CD150^+	CD150^+
FLk2^-	FLk2^+

Tableau 2: Marqueurs phénotypiques des populations de CSH murines

3. Fonctions des cellules souches hématopoïétiques et leurs régulateurs

3.1. Fonctions

Les cellules souches totipotentes représentent les cellules dont le potentiel permet de générer toutes les types cellulaires de l'organisme. Les cellules souches pluripotentes, elles, sont capables de se différencier dans tous les types cellulaires d'un même tissu. En opposition, les CSH n'étant capables de générer que les cellules sanguines sont qualifiées de multipotentes. Elles sont tout de même capables à elles seules de reconstituer la totalité du système sanguin (plaquettes, globules rouges, lymphocytes, monocytes, macrophages...).

Afin de maintenir l'homéostasie des tissus, il est nécessaire de maintenir un stock constant des CSH par auto-renouvellement mais également de permettre leur engagement en différenciation afin de conserver le taux de cellules dans la circulation sanguine. Ces processus d'auto-renouvellement et d'entrée en différenciation débutent toujours par une entrée en cycle des CSH. En s'engageant dans le processus d'auto-renouvellement, les CSH stoppent leur cycle cellulaire et restent à l'état de quiescence et d'indifférenciation. Dans le cas d'un engagement en différenciation, les CSH continuent leur cycle cellulaire et perdent ainsi leur capacité à se maintenir quiescentes et indifférenciées [21, 53]. Lors de leur entrée en différenciation, les CSH donnent naissance aux progéniteurs multipotents (MPP) à l'origine de deux autres progéniteurs: les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) et les progéniteurs communs myéloïdes (CMP). A ce stade, les cellules ont perdu leur capacité d'auto-renouvellement. Les CMP forment à leur tour, les progéniteurs granulo-monocytaires (GMP) et les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP). Ces progéniteurs s'engagent ensuite dans un lignage hématopoïétique précis et perdent leur capacité de prolifération au fur et à mesure de la différenciation [54] (Figure 3).

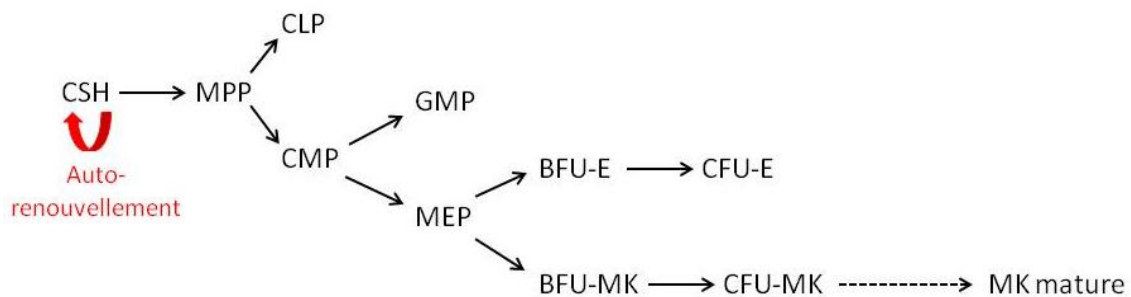


Figure 3: Schéma de l'engagement en différenciation des CSH

Deux modèles de division cellulaire co-existent au sein de la moelle osseuse: un premier modèle de division symétrique et un second modèle de division asymétrique [55] (Figure 4). Une division symétrique des CSH aboutit à deux cellules filles ayant les mêmes caractéristiques et le même devenir. Ainsi, les cellules formées demeurent toutes deux souches avec une capacité d'auto-renouvellement ou deviennent des progéniteurs capables de proliférer et de se différencier. A l'inverse, en cas de division asymétrique, les cellules filles résultantes n'ont pas les mêmes caractéristiques: l'une d'entre elle entre en différenciation tandis que la seconde reste dans la niche hématopoïétique afin de renouveler le pool de CSH. Des travaux suggèrent une implication du microenvironnement

dans le choix du mécanisme de division des CSH. En effet, une division asymétrique est retrouvée en cas d'homéostasie des tissus tandis qu'une division symétrique est nécessaire en cas par exemple, de régénération tissulaire [55].

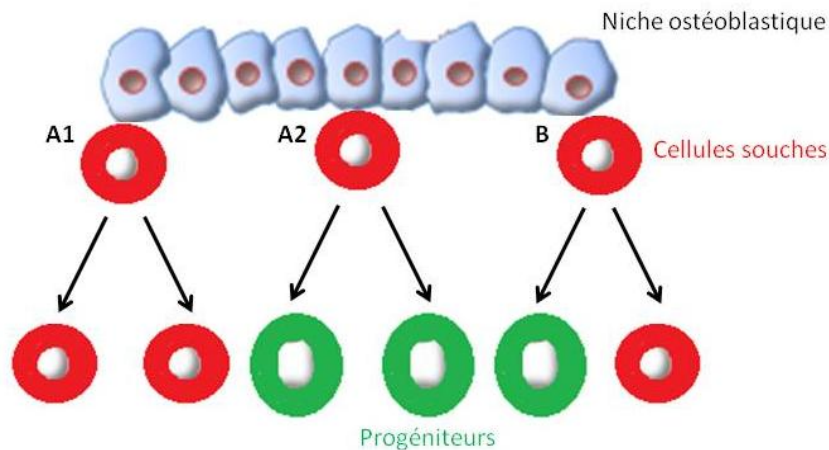


Figure 4: Modèles de division symétrique (A1 et A2) et asymétrique (B) (Modifiée de [55])

3.2. Régulateurs

Les différentes fonctions des CSH (quiescence, auto-renouvellement et entrée en différenciation) sont finement régulées par des facteurs extrinsèques et intrinsèques.

Les principaux régulateurs extrinsèques de ces fonctions sont les cytokines, hormones et facteurs de croissance tels que le stem cell factor (SCF), la thrombopoïétine (TPO), le fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L), les interleukines 3, 6, 11 (IL-3, IL-6 et IL-11), le granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) ou encore l'érythropoïétine (EPO). Bien que nécessaire au maintien en quiescence des CSH au sein de la moelle osseuse, ces facteurs ne permettent qu'un maintien à court terme des CSH *in vitro* [56]. Ces facteurs sont également nécessaires à l'engagement des CSH dans une voie de différenciation [57]. Physiologiquement, l'interaction de ces facteurs avec leurs récepteurs engendre une différenciation vers un lignage spécifique. Par exemple, l'EPO est essentielle à la différenciation érythrocytaire [58, 59] tandis que la TPO est nécessaire à la différenciation mégacaryocytaire [60, 61]. Ces cytokines sont également essentielles *in vitro* pour la prolifération et la différenciation des CSH.

Ces cytokines, hormones et facteurs de croissance retrouvés dans la circulation sanguine, sont également synthétisés par les cellules du microenvironnement de la moelle osseuse. L'interaction de ces facteurs avec leur récepteur à la surface des CSH induit l'activation de voies de signalisation impliquées dans la régulation des différentes fonctions des CSH: maintien en quiescence, auto-renouvellement, prolifération et différenciation [34, 62].

TPO - Mpl

Bien qu'étant un régulateur puissant de la mégacaryopoïèse, de nombreuses études faites sur des souris mutées pour la TPO ou son récepteur Mpl ont démontré le rôle de la TPO dans le maintien en quiescence et l'auto-renouvellement des CSH au sein de la niche hématopoïétique [24, 63, 64]. En effet, l'interaction de la TPO avec son récepteur Mpl à la surface des CSH induit l'activation de voies de signalisation telles que Jak/STAT ou PI3K/Akt. Ces voies de signalisation régulent de nombreux gènes tels que *p21* ou *p57* impliqués dans le maintien en quiescence des CSH [65]. Une inhibition de l'interaction de la TPO avec son récepteur par des anticorps bloquants engendre une diminution du nombre de CSH en quiescence. A l'inverse, une augmentation du taux de TPO dans la moelle osseuse favorise cette quiescence en augmentant l'expression de *p57* [24, 66]. Des études menées *in vitro* ont également mis en évidence un rôle clé de la TPO dans l'auto-renouvellement et la prolifération des CSH chez l'homme et chez la souris [67, 68].

SCF - c-Kit

Ce couple joue un rôle clé dans l'activité des CSH au sein de la moelle osseuse. Le récepteur c-Kit à la surface des CSH peut fixer le SCF membranaire ou soluble. Cette interaction induit l'activation de voies de signalisation telles que la voie PI3K/Akt ou la voie ERK à l'origine respectivement, du maintien en quiescence des CSH ou de leur entrée en différenciation. Le SCF membranaire permet d'activer plus facilement le récepteur c-Kit que le SCF soluble. A l'inverse du SCF soluble impliqué dans la migration et l'entrée en différenciation des CSH après clivage de la métalloprotéase 9 [69], le SCF membranaire apparaît comme un composant essentiel du microenvironnement de la moelle osseuse pour le maintien en quiescence des CSH et leur auto-renouvellement [70, 71].

Voie Notch-1

Cette voie de signalisation est activée par le ligand Jagged-1 qui se lie à son récepteur Notch-1 à la surface des CSH. Cette interaction induit le clivage de Notch-1 et par la suite, le transport de son domaine NICD vers le noyau (Notch-1 intracellular domain) où il régule l'expression de gènes cibles (Figure 5).

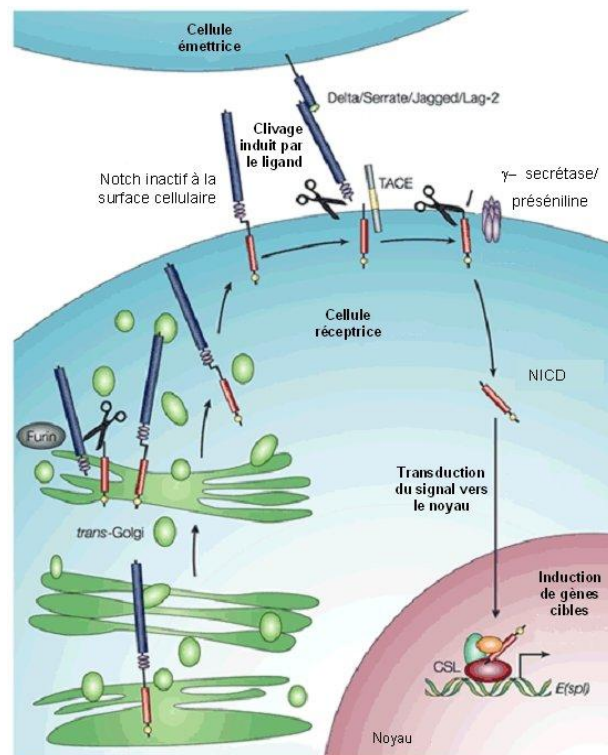


Figure 5: Voie de signalisation Notch (D'après [72])

La fixation de l'un de ses ligands à sa surface induit le clivage de Notch puis le transport du domaine NICD vers le noyau pour permettre la transduction du signal. Abréviations: TACE, enzyme de conversion du facteur de nécrose tumorale (TNF); CSL, facteur liant le promoteur c/suppresseur de « hairless »/facteur de transcription lag-1; E(spl), activateur de scission.

Au sein de la moelle osseuse, cette voie est active sur les CSH et réprimée sur les cellules en différenciation. L'inhibition de cette voie entraîne une perte des CSH *in vivo* [73]. De même, l'utilisation d'un agent pharmacologique, le DAPT (inhibiteur de la γ -sécrétase) engendre une accélération de la différenciation des CSH *in vitro*. D'autre part, le répresseur transcriptionnel Hes-1 (Hairy Enhancer of Split-1), un effecteur majeur de la voie Notch-1 est exprimé dans le noyau des CSH mais réprimé dans les cellules différenciées [74]. Dans la lignée érythro-mégacaryocytaire, Hes-1 inhibe l'activité de GATA-1 afin d'empêcher l'entrée en différenciation des CSH [75]. En induisant un gain de fonction de Notch-1, de nombreux travaux rapportent une augmentation de l'auto-renouvellement des CSH au profit de leur

engagement en différenciation [20, 76, 77]. Néanmoins, le rôle de cette voie est actuellement controversé. En effet, par l'utilisation de modèles murins, des équipes ont mis en évidence qu'une délétion de Notch-1 n'induisait pas de perte des CSH. Ainsi, la voie Notch est impliquée dans l'auto-renouvellement des CSH mais pourrait également être nécessaire à leur entrée en différenciation [78, 79].

Voie Wnt

Bien que controversée, la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions des CSH et notamment dans leur maintien en quiescence et leur prolifération. La fixation du ligand Wnt sur son récepteur Frizzled à la surface des CSH induit la translocation de la β -caténine vers le noyau. Son interaction avec des facteurs de transcription permet la transcription de gènes spécifiques (Figure 6) à l'origine du maintien en quiescence des CSH et du blocage de leur entrée en différenciation [80]. Une inhibition de la voie Wnt par l'inhibiteur Dickkopf (blocage du récepteur Frizzled) conduit à une prolifération des CSH [81]. Cette voie induit également l'augmentation de l'expression de Notch-1 lui-même impliqué dans l'auto-renouvellement des CSH. Cela souligne l'implication de la voie Wnt dans l'auto-renouvellement des CSH [82].

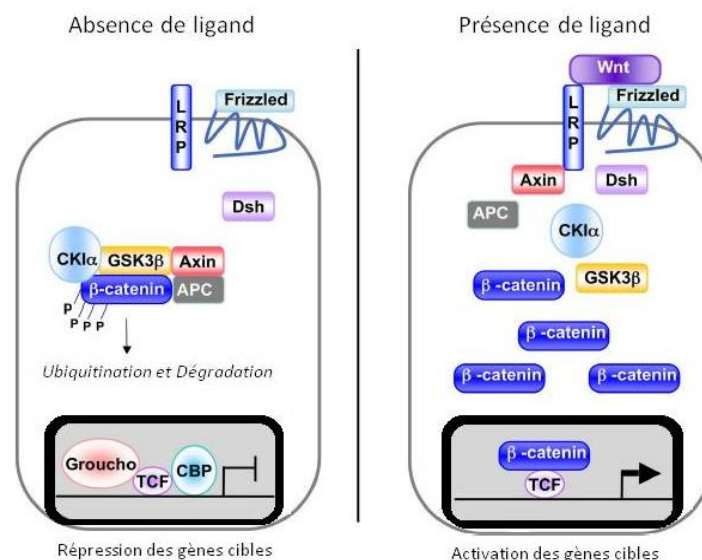


Figure 6: Voie de signalisation Wnt (D'après [83])

La fixation de Wnt sur ses récepteurs Frizzled et LRP induit la translocation de la β -caténine vers le noyau et l'activation des gènes cibles. Abréviations: LRP, protéine apparentée au récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL); Dsh, « disheveled »; APC, polyposé adénomateuse familiale; CKI, caséine kinase I; GSK3 β , glycogène synthase kinase 3; TCF, facteur des cellules T; CBP, protéine liant l'élément de réponse AMPc.

Parallèlement à ces facteurs extrinsèques, il existe également de nombreux facteurs intrinsèques aux CSH permettant de réguler leurs différentes fonctions et notamment, leur entrée en différenciation. Cette différenciation est médiée par un processus d'activation/répression des gènes impliquant de nombreux facteurs de transcription. Seuls les facteurs de transcription impliqués dans le processus de mégacaryopoïèse (EKLF, c-myb, FOG-1, GATA-1, FLI-1, RUNX-1, NF-E2) seront abordés par la suite.

III. Différenciation mégacaryocytaire

La différenciation mégacaryocytaire constitue l'ensemble des mécanismes aboutissant au MK mature, à l'origine des plaquettes sanguines. Comme chaque processus hématopoïétique, la mégacaryopoïèse a lieu au sein de la moelle osseuse et met en jeu différents groupes cellulaires en fonction de leur état de différenciation : les CSH, les progéniteurs mégacaryocytaires, les précurseurs mégacaryocytaires et les MK matures. Au cours de ce processus, les cellules perdent progressivement leur capacité de prolifération afin d'entrer en différenciation (Figure 7).

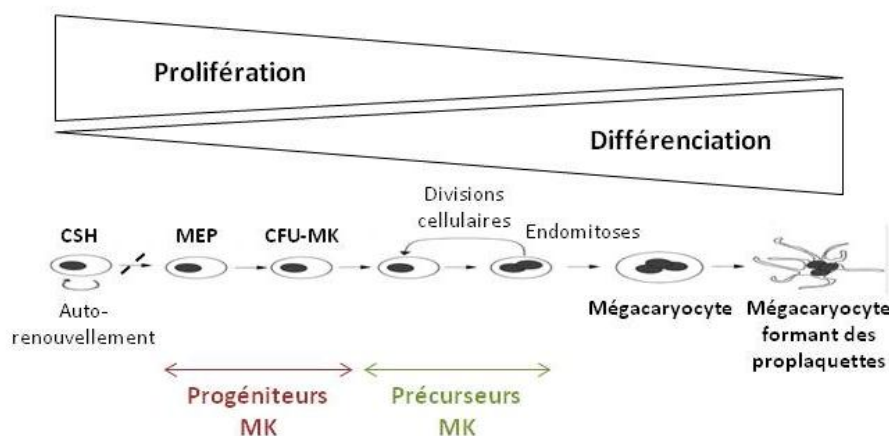


Figure 7: Schéma de la mégacaryopoïèse

1. Des progéniteurs au mégacaryocyte mature

Les progéniteurs bipotents MEP sont à l'origine soit des progéniteurs érythrocytaires précoces (BFU-E) et tardifs (CFU-E), soit des progéniteurs mégacaryocytaires précoces (BFU-MK) et tardifs (CFU-MK) [54] (Figure 8). A ce stade de la différenciation, les cellules perdent

leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération et sont strictement engagées dans la lignée mégacaryocytaire: on les qualifie alors de précurseurs mégacaryocytaires. Ces précurseurs subissent des étapes d'endomitose et de maturation cytoplasmique à l'origine du MK mature [84-86] (Figure 7).

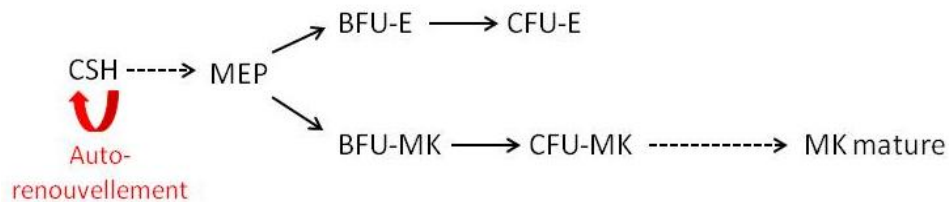


Figure 8: Schéma de différenciation des MEP dans le lignage érythro-mégacaryocytaire

Au cours de la différenciation mégacaryocytaire, différents marqueurs permettent d'identifier les cellules. En effet, comme les CSH, les progéniteurs mégacaryocytaires sont caractérisés par la présence du marqueur CD34 à leur surface qui disparaît progressivement au cours de la différenciation [87, 88]. De plus, il est possible de distinguer les BFU-MK des CFU-MK par l'expression du récepteur de surface du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA-DR^{low} et HLA-DR^{high}, respectivement) [89]. D'autre part, la glycoprotéine (GP) IIb (appelée aussi CD41 ou α IIb) ainsi que la GPIIb (appelée aussi CD61 et β 3) formant l'intégrine α IIb β 3 apparaissent au stade CFU-MK, en amont de tous les autres marqueurs mégacaryocytaires ou plaquettaires tels que GPIb (CD42b), GPV, GPVI ou encore le facteur Willebrand (VWF) [87, 88] (Figure 9).

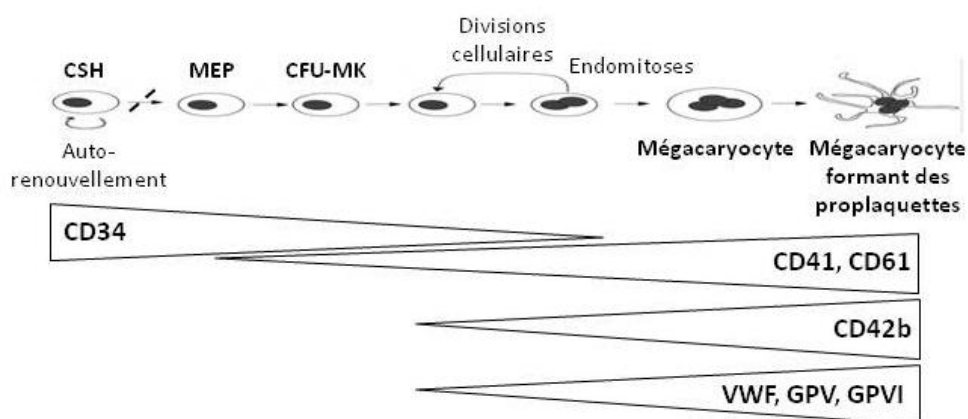


Figure 9: Expression des marqueurs au cours de la différenciation mégacaryocytaire

Les précurseurs mégacaryocytaires subissent un processus d'endomitose, processus de réplication de l'ADN sans division cellulaire, indispensable à la maturation des MK [90, 91]. Ce mécanisme de réplication permet de former des cellules polyploïdes de grande taille à partir de cellules diploïdes. Des études basées sur des techniques d'analyses pangénomiques ont démontré que ce processus d'endomitose conduit à une expression coordonnée de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'étape finale de mégacaryopoïèse et de libération plaquettaire [92, 93]. Ce processus d'endomitose nécessite donc une régulation fine impliquant différentes voies de signalisation. Les premières études réalisées sur des lignées cellulaires avaient souligné l'importance de la cycline B sous la dépendance de la kinase Cdc2, dans le processus de polyploïdisation [94, 95]. Des études plus récentes proposent que cette endomitose soit en lien avec un défaut tardif de la cytokinèse. Ce défaut se traduit par une formation incomplète de l'anneau contractile constitué de myosine II et d'actine fibrillaire (F-actine), requis pour générer les forces mécaniques nécessaires à la séparation des cellules [96, 97]. Notamment, la régulation de la chaîne lourde de la myosine non musculaire (myosine IIB appelée aussi MYH10) au sein de l'anneau contractile est nécessaire pour le passage de la mitose à l'endomitose. Plus particulièrement, une inactivation de l'expression de MYH10, induite par RUNX-1 engendre le processus d'endomitose [98]. Pour empêcher ce défaut tardif de cytokinèse, la GTPase RhoA est nécessaire afin de réguler le cytosquelette d'actine et ainsi, de produire les forces nécessaires à la séparation des cellules [99]. Les protéines Shp1 et Shp2 (tyrosines phosphatases), régulatrices de la petite GTPase RhoA, sont impliquées dans la formation de l'anneau contractile et ainsi, dans le processus de polyploïdisation. En effet, une inactivation de l'une de ces protéines ou une double inactivation entraîne un défaut de l'endomitose avec une ploïdie des MK bloquée aux stades 2N ou 4N [100]. Cette double inactivation induit également un défaut de fonction plaquettaire avec notamment une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [100]. Ces études ne s'opposent tout de même pas à une poursuite du cycle cellulaire en même temps que l'endomitose. En effet, bien que l'inhibition de la formation de l'anneau contractile empêche le MK de se diviser, d'autres processus peuvent réguler les cycles de réplication de l'ADN. Notamment, des régulateurs de la phase G1/S semblent impliqués dans la maturation des MK polyploïdes. Par exemple, les cyclines D et E semblent réguler positivement la phase G1 nécessaire au développement des MK matures polyploïdes [101, 102].

Comme l'indique son étymologie, le MK formé au cours de cette différenciation et maturation, est une cellule géante (méga) composée d'un noyau (caryocyte). La structure en lien avec la polypôidisation des MK peut être appréciée par microscopie après coloration de frottis au MGG. Comme expliqué précédemment, il existe des évolutions morphologiques des précurseurs mégacaryocytaires jusqu'au stade ultime de MK mature (Figure 10). Ce MK mature présente une taille d'environ 50 à 120 μm selon la quantité de cytoplasme persistant. Ce cytoplasme variablement abondant présente de nombreuses granulations à l'origine des futures plaquettes sanguines. D'autre part, le MK mature présente un noyau multilobé (>16N), dense et pycnotique (phénomènes de condensation de la chromatine).

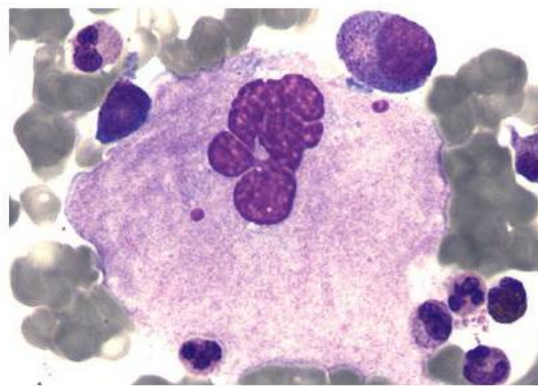


Figure 10: Observation d'un mégacaryocyte mature au microscope optique
(Laboratoire d'hématologie de l'AP-HP Charles Foix, avec autorisation)
Grossissement: x50

A ce stade, le MK mature migre vers les vaisseaux sinusoides afin de se fragmenter pour permettre la formation des proplaquettes et la libération des plaquettes. Il existe une chémokine, le SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) favorisant cette migration ainsi que la formation des proplaquettes et la libération des plaquettes [34, 103]. De même, la niche vasculaire de la moelle osseuse est composée de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène IV, la fibronectine, le fibrinogène ou encore le VWF qui favorisent les dernières étapes de maturation des MK, leur migration vers les vaisseaux sinusoides ainsi que la formation des proplaquettes [34]. Un rôle de la sphingosine 1 phosphate (S1P) dans la maturation des MK a également été démontré. En effet, des souris KO pour le récepteur S1P₄ (récepteur spécifique des tissus hématopoïétique et lymphatique) présentent des MK avec un cytoplasme constitué de nombreuses vacuoles au détriment des granulations nécessaires à la formation des plaquettes [104].

2. Régulateurs de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse nécessite une régulation fine et contrôlée. Celle-ci est opérée d'une part, par des cytokines et facteurs de croissance libérés dans l'environnement et d'autre part, par des facteurs de transcription spécifiques de la lignée mégacaryocytaire. Afin de maintenir constant le nombre de plaquettes dans la circulation sanguine, ces mécanismes vont agir tout au long de la différenciation mais également lors de la production plaquettaire.

2.1. Les cytokines et facteurs de croissance

Bien que jouant un rôle important dans le maintien en quiescence ou l'auto-renouvellement des CSH, de nombreuses cytokines et facteurs de croissance ont une fonction essentielle dans la différenciation mégacaryocytaire. Elles peuvent être produites par les CSH elles-mêmes, différents types cellulaires présents dans la moelle osseuse ou encore par des organes comme le foie, par exemple. Concernant la TPO, elle est produite par les cellules de Kupffer, cellules de la paroi des sinusoides hépatiques. Bien que de nombreuses cytokines (SCF, IL-3, IL-6, IL-11, Flt3-ligand) soient utilisées pour la prolifération et la différenciation des progéniteurs mégacaryocytaires *in vitro* [105-107], la TPO est définie comme agoniste majeur de la prolifération et de la différenciation mégacaryocytaire [108, 109]. Elle stimule l'expression de marqueurs spécifiques des progéniteurs et précurseurs mégacaryocytaire tels que le CD41, le CD61 ou encore le CD42b et favorise le processus d'endomitose à l'origine de la formation du système de membrane de démarcation [110-113].

La fixation de la TPO sur son récepteur Mpl induit la dimérisation de celui-ci conduisant à une phosphorylation des protéines kinases (Jak, par exemple) qui vont à leur tour phosphoryler des protéines de signalisation activant les voies de signalisation Jak/STAT, PI3k/Akt ou encore ERK/MAPK (Figure 11). Ces voies de signalisation sont à l'origine de la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération et de la différenciation cellulaire [114-116].

Concernant la voie de signalisation Jak/STAT, les protéines STAT présentes dans le cytoplasme sous forme de monomères inactifs sont activées par phosphorylation *via* les kinases Jak puis se dimérisent pour migrer vers le noyau et réguler la transcription de nombreux gènes (Figure 11). D'un point de vue de la différenciation mégacaryocytaire, les principales protéines STAT activées par la TPO et impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules sont STAT3 et STAT5 (A et B) [117, 118]. Plus précisément, STAT3 bien que nécessaire à la prolifération n'apparaît pas comme essentiel à la mégacaryopoïèse [119]. A l'inverse, la régulation de STAT5 est primordiale dans le développement mégacaryocytaire. En effet, une diminution de STAT5A/5B dans les cellules CD34⁺ entraîne la différenciation mégacaryocytaire. A l'inverse, une activation de ces protéines et notamment de STAT5A aboutit au processus d'érythropoïèse au détriment de la mégacaryopoïèse [120]. Parallèlement à cette voie de signalisation, la voie ERK/MAPK induit l'activation des protéines ERK 1/2 impliquées dans la différenciation et notamment dans le processus d'endomitose et de formation des proplaquettes [121]. A l'inverse, la p38 MAP kinase également activée par la voie ERK/MAPK, est nécessaire à la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires (Figure 11). De même, la PI3k contrôle le cycle cellulaire et le processus d'endomitose [116].

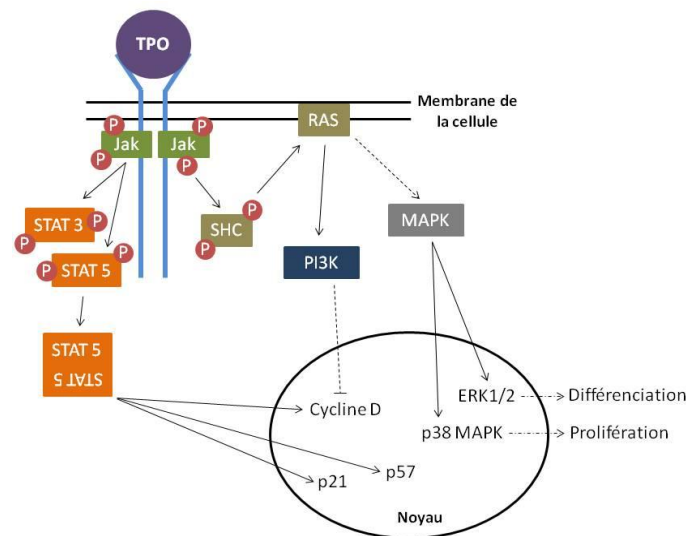


Figure 11: Voies de signalisation induites par la fixation de la TPO sur son récepteur Mpl

Les protéines Jak s'activent par phosphorylation lors de la dimérisation du récepteur induisant la phosphorylation de protéines telles que STAT ou SHC et ainsi, la cascade de la signalisation. Abréviations: Jak, janus kinase; STAT, transducteurs du signal et activateurs de la transcription; SHC, domaine d'homologie 2 de src contenant; RAS, sarcome de rat; PI3k, kinase phosphatidylinositol 3; MAPK, protéine kinase activée par des mitogènes; ERK, kinase régulée par des signaux extracellulaires.

La fixation de la TPO sur son récepteur Mpl à la surface des MK induit également une libération de facteur 4 plaquettaire (PF-4), facteur réprimant la différenciation mégacaryocytaire [122]. Ce facteur inhibe la maturation des cellules et la formation des proplaquettes soulignant un rétrocontrôle négatif du PF-4 sur l'action de la TPO au niveau des MK [123, 124].

2.2. Les facteurs de transcription

En parallèle de l'action extrinsèque des cytokines, plusieurs facteurs de transcription internes aux cellules régulent l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la différenciation mégacaryocytaire. Tous ces facteurs de transcription ont un rôle précis à chaque étape de la mégacaryopoïèse [125-127] (Figure 12).

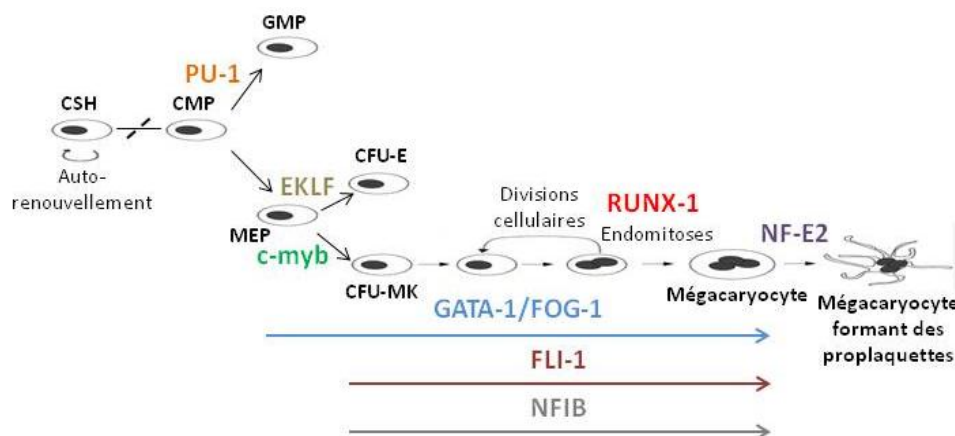


Figure 12: Facteurs de transcription impliqués dans la mégacaryopoïèse

Le facteur de transcription essentiel à l'engagement des cellules vers le lignage mégacaryocytaire et impliqué à toutes les étapes est GATA-1 (globin transcription factor-1; [128]). En effet, une augmentation de l'expression de GATA-1 au détriment de PU-1 (engagement granulocytes/monocytes) favorise le développement des MEP [129, 130]. FOG-1 (Friend of GATA-1) est nécessaire à GATA-1 pour le rendre fonctionnellement actif dans le lignage érythro-mégacaryocytaire [130-132]. L'association de ces deux facteurs permet notamment d'augmenter l'expression du gène codant pour CD41 [133]. Néanmoins, bien qu'il soit rapporté que GATA-1 forme des complexes activateurs ou inhibiteurs avec d'autres facteurs dans les MK, son mode de régulation est encore mal connu [134].

Une association de GATA-1 et FOG-1 avec FLI-1 (Friend leukemia integration-1) permet d'activer la transcription de gènes impliqués tardivement dans la différenciation mégacaryocytaire tels que CD42b ou PF-4 [135]. Ce facteur FLI-1 non détecté dans le lignage érythrocytaire agit en tandem avec EKLF (erythroid Krüppel-like factor) pour prévenir l'engagement des MEP soit dans le lignage érythrocytaire (EKLF), soit dans le lignage mégacaryocytaire (FLI-1; [136, 137]).

Différents travaux ont également rapporté une action du facteur de transcription RUNX-1 (appelé aussi AML-1, acute myeloid leukemia-1) en association avec GATA-1 dans la différenciation mégacaryocytaire [138, 139]. Des études sur des souris mutées pour RUNX-1 montrent une diminution de la polyploïdisation et du développement cytoplasmique comme cela avait été démontré pour GATA-1. De même, comme expliqué précédemment, une diminution de MYH10 induite par RUNX-1 contribue au processus d'endomitose soulignant l'implication de RUNX-1 dans l'étape tardif de la mégacaryopoïèse [98].

De même que les facteurs de transcription précédemment décrits, c-myb peut réguler la mégacaryopoïèse en agissant de pair avec GATA-1. Il a été montré qu'une diminution de l'activité de c-myb augmente l'engagement des MPP dans le lignage mégacaryocytaire. Cela améliore également la réponse de la TPO dans les cellules mégacaryocytaires [140].

Un facteur de transcription bien connu pour être impliqué tardivement dans la mégacaryopoïèse est NF (nuclear factor)-E2. Ce facteur est exprimé par différentes cellules hématopoïétiques telles que les cellules myéloïdes, érythrocytaires et bien évidemment, les MK [141]. NF-E2 agit comme un régulateur de la formation des proplaquettes en favorisant la maturation finale des MK. En effet, des souris mutées pour ce facteur sont incapables de produire des plaquettes circulantes [142]. De même, la culture *in vitro* de cellules mégacaryocytaires déficientes en NF-E2 engendrent des MK avec une démarcation membranaire désorganisée et de rares granulations [143]. D'autre part, le rôle de NF-E2 dans la maturation finale des MK et la formation des proplaquettes peut s'expliquer par la fonction de certains de ces gènes cibles telle que la tubuline $\beta 1$ [144]. De même que RUNX-1, FLI-1 ou c-myb, NF-E2 peut interagir avec GATA-1 [145, 146]. Il est toutefois intéressant de souligner que le niveau des facteurs de transcription impliqués dans la phase tardive de la mégacaryopoïèse (RUNX-1, FLI-1, NF-E2, GATA-1, FOG-1) n'augmente pas avec la polyploïdisation. A l'inverse, la transcription de leurs gènes cibles est augmentée [93].

Par ailleurs, une étude récente basée sur du séquençage d'ARN a mis en évidence l'implication du facteur de transcription NFIB (nuclear factor I/B) dans les étapes tardives de différenciation mégacaryocytaire. En effet, l'isoforme NFIB-S contenant des domaines de transactivation et de répression, favorise la maturation des MK à partir de cellules CD34⁺ [147]. Ainsi, ce facteur de transcription semble intervenir au cours de la différenciation mégacaryocytaire aux mêmes stades que GATA-1, FOG-1 ou encore FLI-1 (Figure 12).

La mégacaryopoïèse représente donc un système complexe et coordonné impliquant de nombreux facteurs extrinsèques du microenvironnement de la moelle osseuse tels que des cytokines (TPO), des facteurs de croissance (SCF) ou encore des hormones ainsi que des facteurs intrinsèques que sont les facteurs de transcription.

IV. Etude de la différenciation mégacaryocytaire *in vitro*

Actuellement, la différenciation mégacaryocytaire *in vitro* peut être réalisée à partir de CSH ou de cellules souches pluripotentes (ES et iPS). Ainsi, différents protocoles de différenciation existent pour atteindre des rendements en MK permettant d'étudier la production plaquettaire *in vitro*.

1. Utilisation des cellules souches hématopoïétiques

Il existe trois sources principales de CSH: la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang de cordon ombilical. Depuis quelques années, il est possible d'augmenter le taux de CSH connu pour être faible dans le sang périphérique en stimulant le passage dans la circulation sanguine par le biais de facteurs (traitement G-CSF, par exemple). Ainsi, même si la moelle osseuse reste la source majoritaire de CSH adultes, certaines études sont réalisées à partir de CSH de sang périphérique. La source de CSH représentée par le sang de cordon ombilical a été découverte dans les années 1980. Ce sang de cordon ombilical obtenu lors de l'accouchement permet de recueillir facilement des CSH fœtales comparées à la moelle osseuse ou au sang périphérique. Cette source de CSH est la plus couramment utilisée actuellement. D'autre part, il est important de noter que les CSH adultes ont un degré de

prolifération moindre en comparaison des CSH fœtales réduisant ainsi le nombre de MK matures. En revanche, cette source de CSH adultes permet d'obtenir des MK plus polyploïdes qu'avec les CSH fœtales.

Conditions de culture (cytokines, températures, agent chimique)	Effets	Références bibliographiques
IL-3, IL-6, Flt-3 ligand	Amplification des CSH Faible production plaquettaire	[105]
TPO + Polyéthylène glycol	Importante production plaquettaire (Facteur 10 d'augmentation de production par rapport à la combinaison IL-3, IL-6, Flt-3)	[105]
SCF, TPO, IL-3, Flt-3 ligand	Amplification des CSH (11 000 fois)	[148]
SCF, TPO, IL-11, Flt-3 ligand	Amplification importante des CSH (204 666,7 fois)	[148]
SCF, TPO, IL-3, IL-11, IL-9	Amplification importante des CSH (Effet IL-3) Importante production de MK polyploïdes (Effet dose-réponse du SCF) Production de plaquettes fonctionnelles	[149]
SCF, TPO, IL-6, Flt-3 ligand 39°C	Amplification des progéniteurs mégacaryocytaires (Facteur 7 par rapport à une culture à 37°C)	[150]
SCF, TPO, IL-6, IL-9 39°C	Augmentation du nombre de MK (Facteur 4 par rapport à une culture à 37°C)	[151]

Tableau 3: Exemples de conditions de culture permettant l'amplification des CSH, la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire *in vitro*

Que ce soit avec les CSH adultes ou fœtales, il existe de nombreux assemblages de cytokines permettant la différenciation *in vitro* des CSH en MK ainsi que la production plaquettaire [105, 148, 149]. Bien que peu de rendements soient rapportés, ces études montrent l'intérêt d'utiliser des combinaisons de cytokines pour permettre l'amplification des CSH. De plus, ces travaux soulignent l'importance de la TPO pour l'engagement *in vitro* des CSH dans le lignage mégacaryocytaire afin d'améliorer la production plaquettaire (Tableau 3). Le rôle de la

température dans la différenciation mégacaryocytaire à partir de CSH a également été rapporté. En effet, des études montrent qu'une culture *in vitro* de CSH à 39°C permet d'améliorer les rendements en MK et en plaquettes [150, 151] (Tableau 3). Le groupe de R. Lanza a récemment confirmé cet effet sur la différenciation *in vitro* des cellules iPS en MK en montrant notamment une amélioration des rendements en plaquettes lors d'une différenciation à 39°C [152].

Néanmoins, l'utilisation en culture de cellules primaires telles que les CSH ne permet pas d'obtenir des rendements en MK reproductibles et significatives *in vitro*. Dans ce cadre, les cellules ES et iPS représentent une potentielle source illimitée de cellules pour la différenciation mégacaryocytaire [153, 154].

2. Utilisation des cellules souches pluripotentes

2.1. Origine et propriétés des cellules ES et iPS

Cellules ES

Les cellules ES ont d'abord été mises en évidence chez la souris [155, 156] puis chez l'homme [157]. Ces cellules dérivent de la masse cellulaire interne d'un embryon au stade blastocyste et sont caractérisées de pluripotentes. Elles peuvent donc se différencier dans de nombreux types cellulaires constituant l'organisme et notamment en précurseurs hématopoïétiques [158-161]. Ces cellules sont également capables de s'auto-renouveler de façon illimitée.

Cellules iPS

Les cellules iPS, découvertes en 2006 et ne nécessitant pas la destruction d'un embryon, semblent être une source cellulaire inépuisable possédant les mêmes capacités de différenciation que les cellules ES. Il serait donc possible de reprogrammer des cellules adultes pour les rendre proches des cellules ES. Les premiers travaux réalisés sur des fibroblastes de souris ont suggéré comme combinaison optimale à cette reprogrammation les facteurs OCT4, SOX2, KLF4 et c-myc [162]. Cette technique a pu être transposée chez l'homme avec une reprogrammation des fibroblastes visibles en 10 jours [163, 164]. Par

ailleurs, bien que l'efficacité d'une reprogrammation réalisée sans la surexpression de l'oncogène diminue de 40%, des travaux ont prouvé la capacité de reprogrammer des fibroblastes en n'utilisant que 3 facteurs [165, 166]. Parallèlement à ces données, une équipe a proposé comme combinaison les facteurs OCT4, SOX2, NANOG et LIN28- permettant ainsi de s'affranchir de l'utilisation de l'oncogène c-myc [167]. Plus récemment, une équipe a proposé une nouvelle combinaison de 4 facteurs pour la reprogrammation des iPS: Sall4, Nanog, Esrrb et Lin28. Cette combinaison apparaît également comme favorable à l'obtention d'iPS présentant des caractéristiques biologiques nécessaires à leur redifférenciation [168]. Actuellement, il est possible de générer des lignées d'iPS à partir de nombreux types cellulaires et notamment de cellules humaines CD34⁺ [169-171].

2.2. Protocoles de génération de mégacaryocytes à partir de cellules souches pluripotentes

Plusieurs travaux menés chez la souris ont montré la possibilité de différenciation *in vitro* des cellules ES ou iPS en MK jusqu'à l'étape ultime de production plaquettaire. Afin d'obtenir une différenciation mégacaryocytaire et surtout, une production plaquettaire optimale, différentes protocoles ont été proposés [159, 172, 173].

La première étude réalisée chez l'homme a permis de différencier les cellules ES en MK CD41⁺/CD42b⁺ mais n'a pas permis de produire des plaquettes [174]. En adaptant ce protocole par combinaison de différents facteurs tels que des cellules nourricières (OP9, CH10T1/2) ou des cytokines (VEGF, TPO, SCF), une équipe a non seulement montré que la formation de sacs ES permettait de concentrer les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺/CD43⁺/CD45⁺ mais également que ces progéniteurs étaient capables de se différencier en MK fonctionnels (expression du CD41, du CD42b, développement du DMS ...) générant de nombreuses proplaquettes et plaquettes [175]. Ce protocole a également été utilisé à partir de cellules iPS et de la même manière, a permis de générer un grand nombre de plaquettes *in vitro* [146]. D'autres travaux ont montré qu'il était possible de générer des progéniteurs hématopoïétiques à partir de cellules pluripotentes sans utilisation de « feeder » (cellules nourricières). D'autres auteurs ont précisé qu'une production

plaquettaire adéquate n'était pas encore envisageable sans cette couche nourricière ou certains de ces constituants. Notamment, en absence de cette couche nourricière, peu de plaquettes présentent le CD42b à leur surface. Les rendements de production plaquettaire apparaissent également peu favorables à une utilisation de ces plaquettes pour des tests fonctionnels [176]. D'autre part, dans le but de s'affranchir de la formation variable et instable des corps embryoïdes (formation induite en l'absence d'une couche de cellules nourricières), l'équipe de GJ. Murphy a utilisé le protocole du Matrigel® (support de culture composé d'un grand nombre de protéines) pour induire la différenciation des iPS. En combinaison avec de nombreuses cytokines (VEGF, BMP4, TPO, SCF, IL-6, EPO, BMGF), ce protocole permet d'induire une expansion importante des progéniteurs hématopoïétiques et à terme, une différenciation érythrocytaire et mégacaryocytaire [177].

Les plaquettes dérivant de la différenciation des cellules pluripotentes présentent des caractéristiques similaires à celles des plaquettes sanguines (morphologie, expression du CD42b, du CD42a, de GPVI) mais de façon bien plus intéressante, l'intégrine $\alpha\text{Ib}\beta\text{3}$, essentielle pour l'agrégation plaquettaire, peut être activée en réponse à des agonistes. Ces plaquettes sont également capables d'intervenir dans la formation d'un thrombus *in vivo* [146, 176]. Ces données suggèrent donc que les plaquettes générées *in vitro* à partir de cellules iPS présentent les mêmes caractéristiques que les plaquettes sanguines.

En étudiant différentes combinaisons de facteurs de reprogrammation, une équipe a mis en évidence le rôle de c-myc dans la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire à partir de cellules iPS. c-myc promeut l'engagement des iPS dans le lignage mégacaryocytaire en favorisant la prolifération mais apparaît comme inhibiteur de la production plaquettaire [146]. Une expression transitoire de c-myc au cours de la différenciation mégacaryocytaire à partir d'iPS serait donc une approche intéressante afin d'améliorer le rendement plaquettaire (Figure 13).

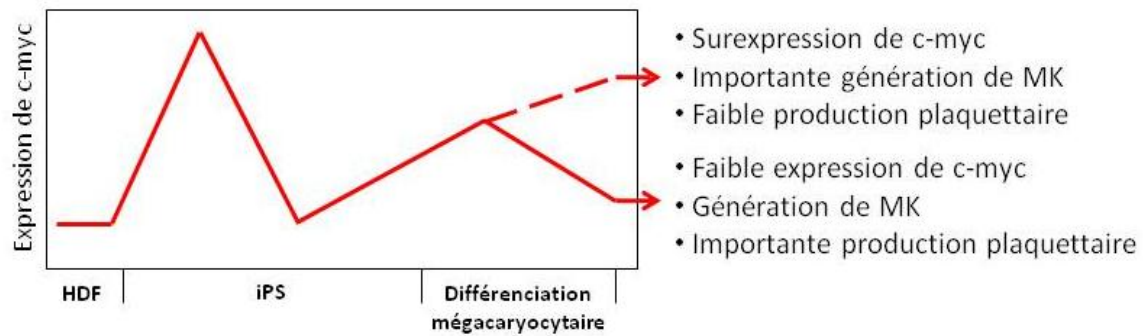


Figure 13: Schéma d'expression de c-myc pour la production plaquettaire à partir d'iPS

(Adaptée de [153])

Abréviation: HDF, fibroblaste dermique humain.

Récemment, une équipe a montré la possibilité d'établir des MK immortalisés à partir de cellules pluripotentes (ES et iPS). En effet, en respectant une hiérarchie dans l'expression ou l'extinction de 3 facteurs (c-myc pour promouvoir la prolifération, BMI1 et BCL-XL pour supprimer la sénescence et l'apoptose), il est possible de générer une lignée de MK immortalisés pouvant s'auto-renouveler pendant plusieurs mois [178] (Figure 14). L'arrêt de l'expression de ces facteurs conduit à une production de plaquettes fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* similairement aux plaquettes sanguines. Cette lignée de MK immortalisés représente une source potentielle pour la production illimitée de plaquettes.

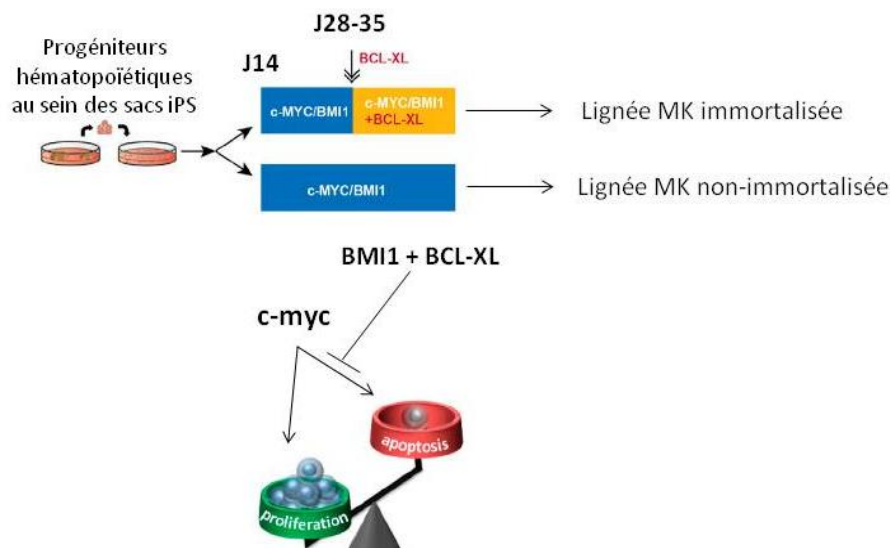


Figure 14: Implication de c-myc, BMI1 et BCL-XL dans l'obtention d'une lignée mégacaryocytaire immortalisée (Adaptée de [178])

L'action parallèle de BMI1 et BCL-XL supprime l'effet pro-apoptotique de c-myc permettant ainsi de maintenir la prolifération cellulaire et d'obtenir une lignée MK immortalisée. Abréviations: BCL-XL, grand lymphome cutané à cellules B; BMI1, région 1 homologue d'insertion du Mo-MLV dans les lymphomes cutanés à cellules B.

CHAPITRE 2: THROMBOPOÏÈSE ET PLAQUETTES SANGUINES

La thrombopoïèse constitue l'ensemble des mécanismes permettant au MK mature de produire des plaquettes sanguines nécessaires aux processus d'hémostase et de thrombose. La thrombopoïèse démarre dans la niche vasculaire de la moelle osseuse en contact avec les vaisseaux sinusoides et se termine dans la circulation sanguine. Ce chapitre a pour but de définir ce processus de thrombopoïèse et de décrire succinctement les plaquettes sanguines et leurs fonctions.

I. Thrombopoïèse

1. Formation des proplaquettes et libération des plaquettes

Bien qu'il ait été suggéré pendant plusieurs années que le MK relâchait par rupture des plaquettes préformées, tous les travaux accumulés depuis le siècle dernier démontrent l'importance de l'extension des MK dans les vaisseaux sinusoides de la moelle dans le processus de thrombopoïèse. En effet, les MK étendent de longs branchements appelés proplaquettes présentant une succession de renflements reliés par des ponts cytoplasmiques, à l'origine des plaquettes sanguines [84]. Ces étapes peuvent être visualisées *in vivo* [179-181]. De même, *in vitro*, une formation spontanée de proplaquettes peut être observée à partir de MK matures de souris [85, 182, 183] ou humains [8, 125, 184, 185].

La formation de ces proplaquettes requiert des remaniements importants du cytosquelette avec un rôle primordial des microtubules et de l'actine [84, 144, 182, 186].

Les microtubules et la tubuline $\beta 1$ notamment, s'orientent le long des proplaquettes et par action de la dynéine et de la kinésine (protéines motrices des microtubules; [187]), procurent les forces nécessaires à l'allongement des proplaquettes, à la libération plaquettaire [85] ainsi qu'à la migration des mitochondries et des granules du MK vers la plaquette [188]. L'expression de la tubuline $\beta 1$ dépend du facteur de transcription NF-E2. En effet, en absence de NF-E2, aucune expression de la tubuline n'est détectée. De même, les

MK ne sont pas capables de former des proplaquettes [144]. D'autre part, une étude a montré que des souris déficientes en tubuline $\beta 1$ produisaient 60% de plaquettes en moins que des souris sauvages [189]. De même, des mutations de la tubuline $\beta 1$ induisent une macrothrombopénie chez l'homme [190]. Ceci est en lien avec une étude précédente soulignant l'importance des microtubules et notamment de la dynéine, dans l'élargissement des proplaquettes [85]. Une étude récente propose une implication des deux petites G protéines, Rac et Cdc42 dans l'organisation de cette tubuline. En effet, il a été montré qu'une double inhibition de ces petites G protéines n'affecte pas le cytosquelette d'actine mais perturbe fortement l'organisation de la tubuline. Ce défaut d'organisation dérégule la dynamique des microtubules engendrant une formation anormale des proplaquettes. Ce défaut induit également une diminution de l'expression de certaines glycoprotéines plaquettaires: GPIb, GPV, GPIX, GPVI et l'intégrine $\alpha II\beta 3$ [191]. Cette étude montre donc l'importance de ces petites G protéines dans l'organisation de la tubuline ainsi que dans la formation des proplaquettes et des plaquettes.

Le cytosquelette de la F-actine présent dans les proplaquettes joue également un rôle primordial dans l'extension et la rupture de celles-ci pour libérer les plaquettes sanguines [84, 85]. Ce cytosquelette procure aussi les forces contractiles centripètes opposées à celles des microtubules évitant ainsi une formation trop rapide des proplaquettes et à terme, une libération plaquettaire inappropriée. La F-actine nécessite une régulation fine impliquant les petites G protéines de la famille Rho déjà connues pour avoir un rôle dans de nombreux processus cellulaires. Néanmoins, bien qu'il soit admis depuis quelques années que la petite G protéine RhoA contrôle les forces contractiles du cytosquelette d'actine, son rôle demeure complexe au cours du développement mégacaryocytaire. Des travaux ont montré que la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC2) induite par la voie Rho/ROCK forme un complexe actomyosine à l'origine de l'inhibition de la formation des proplaquettes [125] soulignant le rôle inhibiteur de RhoA dans la formation des proplaquettes. Par la suite, des études ont montré qu'une absence de RhoA au sein des mégacaryocytes conduit à une macrothrombopénie *in vivo* [192]. De plus, la délétion de RhoA engendre une perte des fonctions plaquettaires (sécrétion des granules, rétraction du caillot notamment) *in vitro* [193].

D'autre part, plusieurs travaux ont démontré le rôle de la myosine IIA (non muscle myosin heavy chain II-A, NMHCIIA) notamment *via* la voie Rho-Rho kinase-myosine IIA, dans la régulation de la formation des proplaquettes [194-197]. Une mutation du gène MYH9 (myosin heavy chain 9 non muscle) codant pour la chaîne légère de la myosine IIA induit une macrothrombopénie chez les patients. L'inactivation de ce gène restreinte au niveau MK, conduit à une formation *in vitro* de proplaquettes de taille plus grande pouvant expliquer la diminution du nombre de plaquettes. Ces plaquettes présentent une anomalie de la formation des fibres de stress ainsi qu'une anomalie de la signalisation outside-in de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [198]. De plus, l'inactivation de MYH9 conduit à une formation anormale des MK et notamment, du DMS qui apparaît plus abondant et anormalement dilatée [195]. Ces données permettent d'expliquer la formation anormalement grande des proplaquettes et par conséquent, la diminution du compte plaquettaire. Ces données sont également supportées par des travaux menés *in vitro* et *in vivo* sur des MK de souris mutées pour MYH9. Ces travaux montrent qu'une mutation pour le gène MYH9 induit une formation de proplaquettes avec moins de ramifications [199]. Une étude a également suggéré que RUNX-1 pourrait être impliqué dans cette formation de proplaquettes en régulant directement la myosine [196].

Le rôle de la myosine IIA dans la distribution finale des granules au sein des plaquettes a récemment été soulevé. En effet, une déficience en myosine IIA chez la souris ou une mutation chez un patient engendre au sein des MK, une modification de l'organisation de la F-actine et par conséquent, altère le positionnement des granules provoquant une distribution hétérogène des granules au sein des plaquettes sanguines [197].

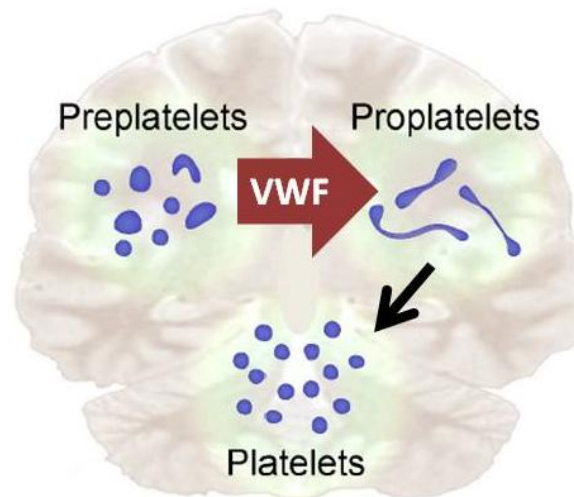
Ainsi, toutes ces études suggèrent que la régulation des microtubules et du cytosquelette d'actine des MK est essentielle pour une formation efficace des proplaquettes. Néanmoins, ces études se focalisent surtout sur des mutations de gènes et/ou de protéines impliqués dans ce cytosquelette mais il serait d'autant plus intéressant de savoir si une manipulation directe du cytosquelette permettrait de réguler cette formation de proplaquettes et ainsi, la libération des plaquettes.

Parallèlement aux microtubules et au cytosquelette d'actine, d'autres facteurs sont impliqués dans la formation des proplaquettes et la libération plaquettaire. Une étude

menée par Junt et ses collaborateurs a permis d'observer par microscopie multiphotonique intravitale, la formation en temps réel de proplaquettes dans la moelle osseuse d'une souris. Ces premières observations ont démontré l'importance des forces de cisaillement induites par le sang, dans l'extension des proplaquettes et la fragmentation des plaquettes. De même, dans un modèle *in vitro*, une augmentation significative du nombre de proplaquettes formées à partir des MK est observée lors d'une culture sous agitation comparée à une culture statique [180]. Une seconde étude en 2009 du groupe de D. Baruch a permis d'approfondir ces données en soulignant cette fois, l'importance des forces de cisaillement dans la production plaquettaire. En effet, l'équipe a démontré que l'exposition de MK humains à des forces de cisaillement élevées (1800 sec^{-1}) permet d'accélérer et de concentrer la production plaquettaire [8]. Les forces de cisaillement utilisées dans cette étude s'apparentent à celles retrouvées dans la microcirculation pulmonaire [200, 201] qui a été reconnu comme site potentiel de production plaquettaire [202, 203]. D'autre part, il a été montré qu'en complément des forces induites par les microtubules, l'interaction de la GPIb (CD42b) avec le VWF joue un rôle majeur dans le processus de production plaquettaire [8]. Ces données appuient donc l'idée que la libération intravasculaire de fragments de MK matures est favorisée par les forces de cisaillement du sang dans les vaisseaux sinusoïdes de la moelle osseuse.

Bien qu'il soit admis depuis plusieurs années que les proplaquettes soient à l'origine de la formation des plaquettes, une étude a souligné la capacité des plaquettes en culture à se déformer. Les plaquettes semblent capables de se dupliquer pour former une descendance. Ces plaquettes produites présentent une structure en forme d'haltère contenant chacune leur propre organite et cytosquelette [204]. Par la suite, une seconde étude a mis en évidence une nouvelle étape dans la formation plaquettaire : les préplaquettes [182]. Ceci suggère donc une hétérogénéité de la population de plaquettes circulantes dans le sang (préplaquettes, proplaquettes et plaquettes). Les préplaquettes sont de gros fragments condensés capables de manière réversible de former de gros fragments débobinés, les proplaquettes. Cette conversion de préplaquettes à proplaquettes est basée sur un processus mettant en jeu les forces exercées par les microtubules permettant de réguler et de prédire la taille des plaquettes générées [183].

D'autre part, notre équipe a mis en évidence un rôle majeur du VWF dans la conversion des préplaquettes en proplaquettes. En effet, nos études de perfusion de plaquettes lavées issues de souris déplétées en VWF ont montré une augmentation de la proportion de préplaquettes conduisant à une thrombopoïèse terminale diminuée [205]. Ainsi, la libération plaquettaire peut nécessiter deux étapes : la conversion des préplaquettes en proplaquettes puis la production plaquettaire à partir des proplaquettes (Figure 15). Il est néanmoins possible que ces préplaquettes soient piégées dans les microcapillaires de la moelle osseuse, des poumons ou encore de la rate conduisant ainsi à une libération plaquettaire à partir des proplaquettes produites par fragmentation des MK dans les vaisseaux sinusoides.



*Figure 15: Implication du VWF dans la formation des proplaquettes et des plaquettes
(Adaptée de [204])*

2. Système de membrane de démarcation

Le processus d'endomitose permet de générer des MK multilobés (> 16N) avec un cytoplasme contenant de grandes quantités de protéines et de lipides nécessaires à la création du DMS. De nombreuses études ont démontré que ce DMS en continuité avec la membrane plasmique sert de réservoir de membrane et est à l'origine de la formation des proplaquettes. Ce DMS est à l'origine de la membrane plasmique des futures plaquettes [206-208]. Des données récentes ont souligné l'importance de la réorganisation du cytosquelette et de la membrane plasmique dans la formation du DMS [209-211]. Par exemple, une déficience pour la protéine CIP4 (Cdc42 interacting protein 4) connue pour

réguler les forces du cytosquelette, induit la formation de MK avec des phénotypes anormaux. Ces MK présentent une membrane plasmique rigide induisant une formation anormale du DMS d'où une diminution dans la formation des proplaquettes [211]. L'équipe de C. Gachet a suggéré un nouveau modèle de biogénèse du DMS faisant intervenir plusieurs membranes du MK [212] et non pas une seule membrane comme cela avait été précédemment rapporté [213-215]. Ainsi, celui-ci commence à se former à la périphérie de la cellule puis l'invagination de la membrane plasmique permet de former le pré-DMS. Le développement du DMS s'effectue ensuite à partir des membranes du Golgi et du réticulum endoplasmique [212] (Figure 16).

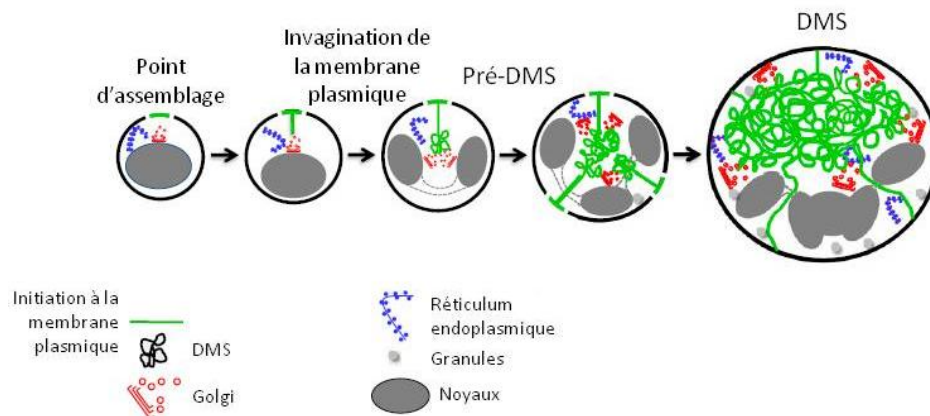


Figure 16: Processus de développement du système de membrane de démarcation (D'après [212])

La thrombopoïèse demeure donc un processus complexe nécessitant une régulation fine (formation du DMS, implication des petites G protéines, conversion des préplaquettes en proplaquettes) et mettant en jeu les forces de cisaillement du sang. Actuellement, de nombreuses équipes travaillent sur ce sujet en tentant de mimer au plus près les compartiments de la moelle osseuse (niche ostéoblastique et niche vasculaire). Cette approche permettrait 1) d'approfondir les connaissances sur la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse, 2) d'apporter de nouvelles informations sur la façon dont les forces de cisaillement influencent la formation des proplaquettes et la libération des plaquettes et 3) d'améliorer la production plaquettaire *in vitro* à des fins d'utilisation thérapeutique. Ces aspects seront développés dans le prochain chapitre.

II. Plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines provenant de la fragmentation des MK, sont des cellules anucléées de petite taille et de forme discoïde. Les plaquettes sont présentes à raison de 150 000 à 400 000 plaquettes/ μ L chez l'homme et de 400 000 à 1 600 000 plaquettes/ μ L chez la souris. Leur durée de vie est de 7 jours environ; les plaquettes vont ensuite être phagocytées par les macrophages de la moelle osseuse, la rate ou le foie. Elles sont majoritairement impliquées dans l'hémostase primaire où elles sont les premières à intervenir pour l'arrêt du saignement.

1. Morphologie des plaquettes sanguines

Au repos, les plaquettes sanguines sont de forme discoïde et mesurent entre 2 et 3 μ m. La microscopie électronique permet d'apprécier leur morphologie; elles présentent trois zones principales : la zone périphérique, le cytoplasme contenant les organelles et la zone du cytosquelette [216, 217] (Figure 17).

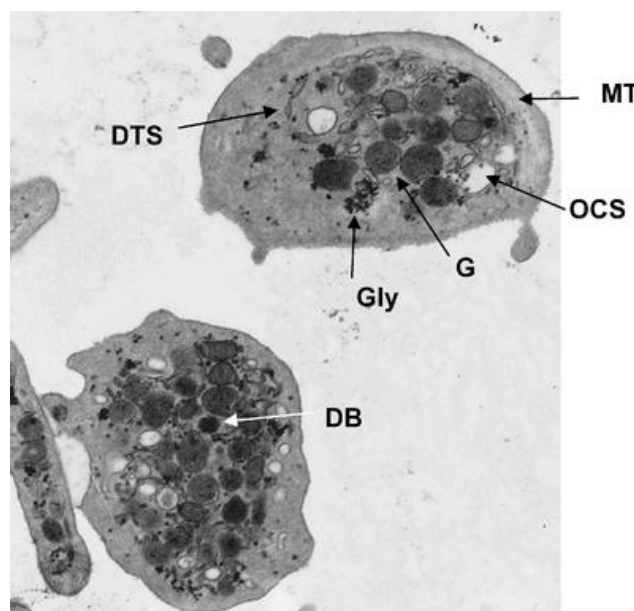


Figure 17: Observation d'une plaquette au repos en microscopie électronique (D'après [217])

Grossissement: x 22,500. Abréviations: DB, granule dense; DTS, système tubulaire dense; MT, microtubule; OCS, système caniculaire ouvert; G, granule α ; Gly, glycogène.

1.1. La zone périphérique

La zone périphérique est composée de la membrane plasmique, du système caniculaire ouvert et du système tubulaire dense.

Membrane plasmique

La membrane plasmique présente une bicouche lipidique constituée de feuillet externe et interne, dans laquelle sont assemblées des glycoprotéines. Le feuillet externe est composé de phospholipides neutres (phosphatidylcholines et sphingomyélines) tandis que le feuillet interne comprend des phospholipides riches chargés négativement (phosphatidylsérines, phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamines).

Système caniculaire ouvert

Le système caniculaire ouvert est connecté à la surface et forme des invaginations de la membrane plasmique au travers du cytoplasme. Ces invaginations intracytoplasmiques permettent non seulement d'endocyter des substances plasmatiques mais également de libérer des contenus intragranulaires, lors de l'activation plaquettaire.

Système tubulaire dense

Le système tubulaire dense représente un réseau analogue au réticulum endoplasmique lisse du MK. Il est capable de séquestrer le calcium et demeure ainsi, un système régulateur de l'activation plaquettaire [218].

1.2. Le cytoplasme

Le cytoplasme plaquettaire contient des mitochondries nécessaires au métabolisme énergétique, des peroxysomes, des grains de glycogène (réserves énergétiques) ainsi que des granules de sécrétion: les granules α , les granules denses et les lysosomes appelées aussi granules λ . En cas d'activation plaquettaire, ces granules sont capables de sécréter leur contenu par exocytose.

Granules α

Les granules α représentent les granules les plus abondants (50 à 80) et les plus grands (200 à 500 nm). Ils contiennent un grand nombre de protéines: protéines de l'inflammation (P-sélectine), de la coagulation (VWF, fibrinogène, facteur V ...), de croissance (SDF-1), inhibiteurs de la fibrinolyse (PAI-1; inhibiteur de l'activateur du plasminogène), protéines membranaires (CD42b, CD62P, CD41/CD61 ...) ou adhésives (VWF) [219, 220]. Ces granules peuvent également présenter à leur surface des protéines liant le GTP (Rap-1, Rab4 ...). Ces protéines requises dans le mécanisme de régulation de la sécrétion sont également présentes à la surface des granules denses [221]. Il a été récemment montré que d'autres protéines provenant des granules α pouvaient être libérées de façon différentielle [222].

Granules denses

Les granules denses présents en faible nombre (5 à 6) au sein de la plaquette sont de petite taille (150 nm). Ces granules stockent des nucléotides telles que l'ADP et l'ATP mais également du pyrophosphate, du calcium ou encore de la sérotonine. Les protéines membranaires retrouvées en grande quantité sur les granules α ainsi que les protéines lysosomales sont peu présentes sur les granules denses [220].

Une étude récente a mis en évidence un autre pool granulaire dense aux électrons, les granules T exprimant le TLR9 à leur surface (Toll Like Receptor 9). Néanmoins, ces granules ne présentent pas le même contenu, ni les mêmes protéines membranaires que les granules denses [223].

Lysosomes

Ces granules sont de structure arrondie de 175 à 250 nm de diamètre. Ils ont pour fonction la dégradation et le recyclage des macromolécules ou des particules endocytées. Ces granules sont des organites sécrétables après activation plaquettaire et sont principalement constitués d'enzymes actives en conditions acides et de protéines membranaires lysosomales (CD63 encore appelé LAMP-3, par exemple).

1.3. Le cytosquelette

Les constituants majeurs du cytosquelette plaquettaire sont des protéines fibrillaires : l'actine et les microtubules. Ce cytosquelette est fortement mis en jeu lors de changement de forme des plaquettes en cas d'activation et d'agrégation.

Actine

En complément du réseau de microtubules, l'actine participe au maintien de l'intégrité de la plaquette. L'actine comprend une forme monomérique (actine G) et une forme fibrillaire (F-actine; actine polymérisée). Elle représente 20% des protéines totales plaquettaires nécessaires à la contraction, la sécrétion, la rétraction du caillot ainsi qu'à l'émission de filopodes, la formation de lamellipodes et de fibres de stress [186]. Au repos, 40% de l'actine demeure sous forme fibrillaire. Après activation et étalement plaquettaire, 80% de l'actine sera fibrillaire [224]. Ceci résulte de la polymérisation de l'actine G en protofilaments qui vont s'associer deux à deux pour former la F-actine [225]. Ce remodelage du cytosquelette d'actine est sous l'influence de petite G protéines de la famille Rho (RhoA, Cdc42, Rac) [226]. Différentes protéines sont associées à la F-actine permettant la liaison du réseau d'actine avec des protéines membranaires telles que le complexe CD41/CD61 ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) ou CD42b (GPIb) [227].

Microtubules

Les microtubules retrouvés en périphérie interne de la plaquette permettent de maintenir la forme discoïde de celle-ci au repos; ils forment la bande marginale caractéristique des plaquettes sanguines [228]. L'association des sous-unités α et β (β1 dans les MK et les plaquettes) de la tubuline par des liaisons non covalentes forme des protofilaments *via* notamment, la dynéine et la kinésine [187], à l'origine de la formation des filaments. La tubuline polymérisée représente 60% de la tubuline présente au sein de la plaquette. Une étude récente de l'équipe de K. Sadoul a mis en évidence l'implication de la dynéine et de la kinésine dans le changement de forme des plaquettes au cours de l'activation. Tandis que la kinésine est rapportée comme essentielle au maintien au repos des plaquettes, la dynéine quant à elle est nécessaire à l'élongation des microtubules. Cette dynéine est à l'origine de la torsion de la bande marginale et du changement de forme de la plaquette [229].

2. Signalisation plaquettaire

En conditions physiologiques, il est nécessaire de maintenir les plaquettes au repos afin d'éviter toute formation inappropriée de thrombus. Pour cela, les cellules endothéliales sécrètent la prostaglandine I₂ (PGI₂) qui interagit avec son récepteur présent à la surface des plaquettes. L'activation de la voie de signalisation découlant de cette interaction permet de maintenir l'intégrine $\alpha\text{Ib}\beta\text{3}$ inactive à la surface des plaquettes (Figure 18).

L'hémostase constitue l'ensemble des mécanismes permettant de maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins (arrêt des hémorragies ou blocage des thromboses). Trois mécanismes sont simultanément initiés lors d'une brèche vasculaire : 1) l'hémostase primaire qui forme un clou plaquettaire permettant d'occlure la brèche, 2) la coagulation qui consolide ce clou plaquettaire en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges et 3) la fibrinolyse qui détruit le caillot ou limite son extension. L'hémostase primaire se décompose en plusieurs étapes: l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium, l'activation plaquettaire et pour finir, le recrutement d'autres plaquettes circulantes nécessaires à l'agrégation plaquettaire. Tous ces mécanismes mettent en jeu un grand nombre de récepteurs plaquettaires.

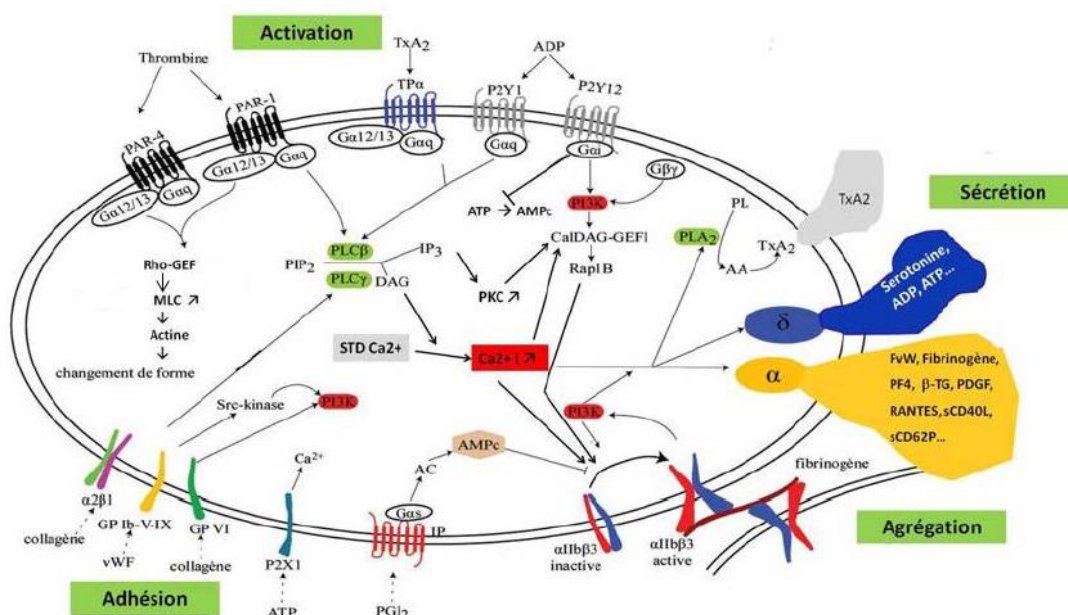


Figure 18: Voies de signalisation plaquettaire (Adaptée de [230-232])

2.1. Adhésion plaquettaire

Une lésion vasculaire entraîne l'interaction de constituants du sous-endothélium tels que le VWF, le collagène ou le fibrinogène avec leurs récepteurs présents à la surface des plaquettes (complexe GPIb-V-IX, GPVI et $\alpha\text{IIb}\beta 3$, respectivement). Cette interaction favorise l'adhésion plaquettaire à l'endothélium lésé; celle-ci est nécessaire pour induire l'activation des plaquettes. En cas de faibles forces de cisaillement, l'adhésion plaquettaire est principalement régulée par l'interaction du fibrinogène avec son récepteur. A l'inverse, en cas de forces de cisaillement élevées, l'adhésion dépend du complexe GPIb-IX-V qui se lie au VWF lui-même associé au collagène [233]. D'autre part, l'interaction du collagène avec son récepteur GPVI déclenche de nombreux signaux au sein des plaquettes. Ces signaux sont à l'origine de l'augmentation de l'affinité des récepteurs pour leurs ligands [234]. Ainsi, cette première étape d'adhésion favorise le ralentissement des plaquettes dans le flux sanguin pour favoriser le recrutement d'autres ligands par d'autres récepteurs plaquettaires et induire l'activation plaquettaire.

2.2. Activation plaquettaire

L'activation plaquettaire induite après stabilisation de l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium entraîne le changement de forme des plaquettes, l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ et ainsi, la sécrétion des contenus granulaires. De nombreux récepteurs et voies de signalisation sont mis en jeu lors de cette activation plaquettaire (Figure 18):

- Les récepteurs d'adhérence
- Les récepteurs couplés aux protéines G hétérodimériques (RCPG)
- Les récepteurs de type intégrine

2.2.1. Récepteurs d'adhérence

Le complexe GPIb-IX-V ainsi que la GPVI sont des récepteurs d'adhérence fixant respectivement, le VWF et le collagène. Ces récepteurs possèdent des voies de signalisation communes mais ne sont pas activées de la même manière. En effet, la liaison de GPVI à ses

ligands conduit à sa dimérisation et à la phosphorylation de FcR γ au niveau de son motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activator motif) par des kinases de la famille Src constitutivement associées au domaine cytoplasmique de GPVI. De même, l'activation du complexe GPIb-IX-V conduit à une activation de la voie des Src kinases. Dans les deux cas, l'activation de la voie des Src kinases conduit à une activation de la PI3k et de la phospholipase $\text{C}\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) [232] nécessaire à la mobilisation calcique et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Ceci aboutit à l'activation de la petite G protéine Rap1b conduisant à l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Figure 18).

2.2.2. Récepteurs couplés aux protéines G

En parallèle de l'adhésion plaquettaire, la coagulation est initiée par le facteur tissulaire présent dans la paroi vasculaire. Ceci va engendrer la formation de thrombine, un agoniste plaquettaire puissant. Cette thrombine permet également d'induire la formation de fibrine à partir du fibrinogène ce qui est indispensable pour maintenir stable l'agrégat plaquettaire. Cet agoniste plaquettaire (thrombine) tout comme l'ADP ou le thromboxane A_2 (TXA_2) sont solubles et vont activer leur RCPG.

Récepteurs à la thrombine

La thrombine active ses récepteurs par clivage protéolytique; ils sont donc nommés PAR pour « Protease-Activated Receptor ». Chez l'homme, les plaquettes expriment les récepteurs PAR-1 et PAR-4 tandis que chez la souris, les plaquettes expriment les récepteurs PAR-3 et PAR-4 [235, 236]. Chez l'homme, bien qu'étant tous deux essentiels à la plaquette, les récepteurs s'activent différemment. Le peptide activant le PAR-1 est le SFLLRN (TRAP-6 pour Thrombin receptor activating peptide-6) tandis que le PAR-4 est activé par le peptide GYPGKF. De même, ces deux récepteurs ne répondent pas aux mêmes doses de thrombine. Le PAR-1 nécessite de faibles doses tandis que le PAR-4 nécessite de fortes doses [237]. Chez la souris, après clivage et activation du PAR-4, le PAR-3 représente l'un de ses cofacteurs [238].

Récepteurs à l'ADP et au TXA₂

L'ADP et le TXA₂ de par leurs actions autocrines et paracrines, sont essentiels au maintien de l'activation plaquettaire. L'ADP stocké dans les granules denses, est libéré après activation plaquettaire pour interagir avec ces deux récepteurs : le P2Y₁ et le P2Y₁₂ [239]. Tout comme les récepteurs à la thrombine, le P2Y₁ et le P2Y₁₂ sont essentiels à la physiologie plaquettaire mais n'interviennent pas de la même manière. Le P2Y₁ est important dans le réarrangement du cytosquelette [240] tandis que le P2Y₁₂ favorise l'action de l'ADP [241]. Le TXA₂, dérivé de l'acide arachidonique se fixe sur son récepteur TP α couplé aux protéines G α_q et G $\alpha_{12/13}$ [242]. Cet agoniste agit localement du fait d'une courte demi-vie après fixation sur son récepteur.

L'interaction des agonistes avec leur RCPG induit l'activation des sous-unités des protéines G correspondantes. Cela conduit à l'activation de voies de signalisation plaquettaires à l'origine de l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (signalisation « inside-out »).

Premièrement, les sous-unités G α_q activent la PLC β induisant la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et de 1,2-diacylglycérol (DAG). Cela conduit à l'augmentation du calcium intraplaquettaire et à l'activation de la PKC [243]. Il en résulte l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ par la GTPase Rap1b [244] (Figure 18).

Deuxièmement, l'activation des sous-unités G α_{12} et G α_{13} (sous-groupe de Rho-GEF pour Rho-specific Guanine nucleotide Exchange Factors) induit un changement de forme des plaquettes par régulation de la phosphorylation de MLC. Cette régulation s'effectue *via* la petite GTPase RhoA et la Rho kinase induisant l'inhibition de la MLC phosphatase et ainsi, l'accumulation de MLC phosphorylée. Cela engendre un changement de forme des plaquettes [245] (Figure 18).

Troisièmement, la sous-unité G i régule négativement l'AMPc intraplaquettaire (inhibiteur de l'activation plaquettaire) en inhibant l'adénylate cyclase [246]. Les sous-unités β et γ , elles, activent la PI3k. Par la suite, PI3k induit l'activation d'Akt et de Rap1b [230, 247]. La PI3k est également capable de réguler l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ intraplaquettaire [248] (Figure 18).

2.2.3. Récepteurs de type intégrine

Ces récepteurs sont hétérodimériques et transmembranaires. Au sein de la plaquette, les intégrines sont constituées d'une sous unité β ($\beta 1$ ou $\beta 3$) et d'une sous unité α . On distingue par exemple, l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ (récepteur au collagène), l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ (récepteur de la laminine) ou encore l'intégrine $\alpha IIb \beta 3$ (récepteur au fibrinogène, au VWF ...). Cette dernière est présente en quantité abondante au niveau de la membrane plaquettaire et joue un rôle primordial dans la signalisation plaquettaire et l'agrégation.

Suite à l'activation plaquettaire *via* les RCPG ou les récepteurs d'adhérence, de nombreuses signalisations intraplaquettaires conduisent à l'activation de l'intégrine $\alpha IIb \beta 3$ caractérisant la signalisation « inside-out » [244, 248] (Figures 18 et 19A). Cette activation conduit à un changement de conformation de l'intégrine augmentant son affinité pour ses ligands (fibrinogène et VWF) déclenchant ainsi une signalisation « outside-in » de l'intégrine (Figure 19B). Cette signalisation entraîne la sécrétion des contenus granulaires, la rétraction du caillot et la génération de thrombine [249, 250].

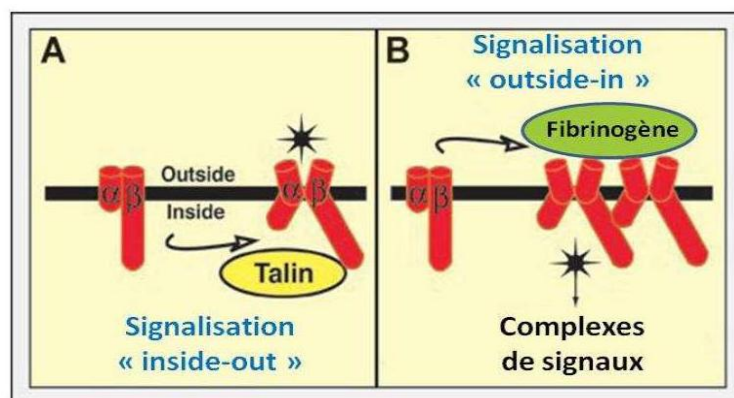


Figure 19: Signalisations « inside-out » (A) et « outside-in » (B) de l'intégrine $\alpha IIb \beta 3$ (D'après [250])

2.3. Changement de forme et sécrétion plaquettaire

Changement de forme

L'activation plaquettaire provoque la transformation des plaquettes qui passent d'une forme discoïde à une forme sphérique capable d'émettre des filopodes et des lamellipodes.

Ce changement de forme implique des réarrangements du cytosquelette dépendant de deux étapes de réorganisation des filaments d'actine : 1) perte de l'organisation du réseau d'actine sous membranaire (action du calcium intraplaquettaire) et formation de sites de nucléation et de polymérisation et 2) réassemblage des filaments d'actine [251]. Ces étapes induisent la formation de filopodes, lamellipodes, fibres de stress et anneaux contractiles. Les filopodes favorisent le ralentissement des plaquettes sur le site lésé tandis que les lamellipodes de par leurs extensions, permettent de recouvrir une plus grande surface [233]. En absence de la sous-unité $G\alpha_{13}$, aucun agoniste ne peut déclencher ces changements morphologiques induits par la phosphorylation de MLC *via* la voie Rho-kinase [252]. Lors de ces changements morphologiques, la fusion de la membrane des granules avec la membrane plasmique ou avec le système caniculaire ouvert entraîne la sécrétion plaquettaire.

Sécrétion plaquettaire

Suite à leur changement de forme, les plaquettes libèrent les facteurs solubles contenus dans les granules. Cette sécrétion s'effectue de façon chronologique en commençant par les facteurs contenus dans les granules α puis ceux des granules denses et enfin ceux des lysosomes.

2.4. Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire constitue le processus selon lequel les plaquettes adhèrent les unes aux autres pour former le clou plaquettaire. Ce processus est déclenché au cours de la première phase d'activation plaquettaire et est amplifié lors de la fixation du fibrinogène sur son récepteur, l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ active [232]. La signalisation « inside-out » engendre un changement conformationnel de l'intégrine augmentant ainsi sa concentration au niveau membranaire et son affinité pour le fibrinogène [253]. De même que les molécules libérées des granules plaquettaires, le fibrinogène conduit au recrutement des plaquettes environnantes dans l'agrégat plaquettaire.

La signalisation « outside-in » générée par l'interaction de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ avec le fibrinogène permet de stabiliser le clou plaquettaire. De plus, la formation d'un réseau de fibrine par l'activité procoagulante des plaquettes permet de consolider cet agrégat et de le maintenir ancré à la paroi du vaisseau sanguin.

2.5. Activité procoagulante des plaquettes

L'activation plaquettaire conduit à la perte de la répartition asymétrique des phospholipides de la membrane plasmique. L'augmentation importante de calcium intraplaquettaire suite à l'activation plaquettaire induit l'exposition de la phosphatidylsérine (PS; principal support de l'activité procoagulante) sur le feuillet externe de la membrane plasmique [254]. La PS se retrouve ainsi en contact avec les éléments circulants et offre une surface catalytique aux facteurs de coagulation. Ceci induit la génération de thrombine à partir de la prothrombine, au niveau du site de lésion. Comme souligné précédemment, la thrombine amplifie la réaction plaquettaire par sa fixation à ses récepteurs PAR et assure la conversion du fibrinogène monomérique soluble en polymère de fibrine insoluble. La fibrine formée va consolider l'agrégat plaquettaire en formant un maillage autour de celui-ci afin d'induire une hémostase complète. Ces processus font intervenir de nombreux facteurs plasmatiques et constituent la cascade de la coagulation.

Une accumulation de PS chargée négativement sur le feuillet externe peut provoquer un bourgeonnement plaquettaire et ainsi, l'émission de microparticules [255]. Ces microparticules sont de petites tailles et de composition lipidique hétérogène: on retrouve de la PS mais également des protéines d'adhésion. D'autre part, ces microparticules sont retenues sur le site d'adhésion et d'activation plaquettaire permettant ainsi d'augmenter la surface catalytique pour la coagulation [256].

L'exposition de la PS sur le feuillet externe de la membrane plaquettaire permet également d'éliminer de la circulation les plaquettes activées ou vieillissantes. La surface plaquettaire chargée négativement est reconnue par les macrophages circulants qui vont éliminer les plaquettes par phagocytose [257].

L'hémostase représente donc un processus complexe mettant en jeu un grand nombre de plaquettes sanguines et de nombreuses voies de signalisation intraplaquettaire. Actuellement, de nombreuses équipes s'intéressent à l'amélioration de la production plaquettaire *in vitro*.

3. Pathologies plaquettaires

Les pathologies portant sur la formation des plaquettes ne constituent pas un groupe à part. Elles sont présentées ci-dessous parmi les déficits membranaires, les défauts de sécrétion ou encore les anomalies géniques des protéines du cytosquelette.

3.1. Macrothrombopénies héréditaires

En termes de macrothrombopénies héréditaires liées à des déficits membranaires pour des complexes glycoprotéiques ou des intégrines, deux pathologies peuvent être citées: le syndrome de Bernard-Soulier ou la thrombasthénie de Glanzmann.

Le syndrome de Bernard-Soulier caractérisé par un déficit quantitatif ou fonctionnel du complexe GPIb-IX-V [258] conduit à une macrothrombopénie modérée à sévère ainsi qu'à un allongement du temps de saignement et à un défaut d'adhérence des plaquettes. Ces plaquettes ne peuvent pas lier le VWF empêchant ainsi leur adhésion au collagène en conditions de flux [259, 260]. Ainsi, en perdant ces sites de liaison, les plaquettes présentent un défaut d'adhérence et une mauvaise réponse aux agonistes. Ce syndrome peut être causé par de nombreuses mutations au sein des gènes GPIX, GPIb ou GPV. Une mutation dans le gène GPIb α entraîne une absence d'interaction entre celui-ci et la filamine A ou d'autres composants du cytosquelette. Cette absence d'interaction conduit à une instabilité de la membrane plaquettaire en conditions de flux [261]. De plus, cette anomalie est à l'origine d'une organisation anormale du DMS dans les MK ainsi que d'une extension modifiée des proplaquettes dans les vaisseaux sinusoides résultant en une production de plaquettes géantes. Des modèles de souris déficientes ou mutées pour GPIb α ou GPIb β sont actuellement utilisés pour mimer cette pathologie dans le but de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et d'identifier de potentiels cibles thérapeutiques. Ces souris présentent un phénotype comparable aux patients avec notamment un développement anormal de la membrane des MK et une formation modifiée des proplaquettes [262-264].

La thrombasthénie de Glanzmann est une maladie héréditaire liée à des anomalies quantitatives et/ou qualitatives de l'intégrine α IIb β 3 [265]. Cette maladie conduit à de sévères hémorragies chez les patients, en lien avec un manque de liaison des plaquettes au

fibrinogène [258, 266]. De plus, les plaquettes s'aggrègent faiblement entre elles et la rétraction du caillot est perturbée chez ces patients [267, 268]. La plupart des cas de thrombasthénie de Glanzmann présentent un compte et un volume plaquettaire normal. Cependant, dans de rares cas, une macrothrombopénie est observée en lien avec des mutations du domaine transmembranaire ou cytoplasmique des sous-unités αIIb ou $\beta 3$. Ces mutations sont généralement hétérozygotes et sont dues à une substitution ou une délétion d'acide aminé [269]. La première de ces études a montré qu'une perturbation du pont cytoplasmique entre les sous-unités αIIb et $\beta 3$ de l'intégrine, en lien avec une mutation au sein de celle-ci conduit à une activation incomplète de l'intégrine et provoque ainsi une formation anormale des proplaquettes [270]. Plus précisément, après différenciation *in vitro* de cellules $CD34^+$ issus de patients atteints par cette mutation, cette équipe observe une formation de MK avec des proplaquettes de plus grandes tailles en comparaison du contrôle [270]. Cette observation est en corrélation avec le compte et la morphologie plaquettaire observés dans la circulation des patients. De plus, les plaquettes de ces patients sont constitutivement actives comme démontré par la fixation augmentée de PAC-1 en conditions de repos [270, 271]. Cette activation permanente de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ au sein des MK influence négativement la formation des proplaquettes en lien avec la présence d'une macrothrombopénie chez les patients [271].

Des défauts de sécrétion des granules peuvent également être à l'origine de macrothrombopénies héréditaires comme cela est le cas dans le syndrome du pool-vide ou le syndrome des plaquettes grises.

Le syndrome hémorragique dans la maladie du pool vide est dû à une diminution de la libération des constituants des granules denses. Cette diminution a pour origine un déficit en granules denses de nature quantitative, se traduisant par une diminution du nombre de granules denses intraplaquettaire ou qualitatives, menant à une dysfonction de ces granules [272]. Actuellement, les mécanismes aboutissant à ces déficits en granules denses sont peu connus. Néanmoins, des greffes de moelle osseuse réalisées dans des modèles murins des syndromes de Hermansky-Pudlak et de Chediak-Higashi ont permis de corriger le phénotype hémorragique soulignant une implication des précurseurs mégacaryocytaires dans ce déficit [273].

Le syndrome des plaquettes grises également à l'origine d'hémorragies, est dû à une déficience sévère des granules α en termes de fonction et de contenu [274]. Plusieurs groupes ont mis en évidence une mutation du gène NBEAL2 (neurobeachin-like 2) dans ces plaquettes [275-277]. Ce gène est directement impliqué dans la biogénèse des granules α au niveau des MK. Plus récemment, deux équipes ont retrouvés le phénotype de cette maladie en utilisant des souris *Nbeal2*^{-/-}. Plus précisément, ces souris présentent une formation de thrombus altérée ainsi qu'une activité procoagulante anormale [278, 279]. Ces travaux démontrent l'importance de ce gène dans la formation de plaquettes non pathologiques.

Les macrothrombopénies héréditaires peuvent également avoir pour origine des anomalies géniques au niveau mégacaryocytaire ou plaquettaire: c'est le cas notamment de l'anomalie de May-Hegglin, du syndrome de la filamine A ou encore des thrombopénies familiales.

L'anomalie de May-Hegglin caractérisée par des mutations du gène MYH9 non musculaire est à l'origine de défauts protéiques au niveau du cytosquelette. Les patients atteints de cette anomalie présentent une macrothrombopénie modérée accompagnée de dysfonctions plaquettaires [280-282]. Les mutations au sein de ce gène sont à l'origine d'une perte partielle ou totale de l'expression et/ou de la fonction de la myosine IIA [283, 284]. Au niveau mégacaryocytaire, une diminution de la phosphorylation de MLC et de la fonction de la myosine ralentit la migration des MK vers les vaisseaux sinusoides et engendre des anomalies dans le processus de formation des proplaquettes [285]. Ces différentes anomalies géniques, protéiques et phénotypiques sont retrouvées dans les modèles de souris développés dans le but de mieux comprendre cette pathologie et d'identifier les mécanismes qui y sont associés [194, 195, 198, 199].

La filamine A présente une capacité d'interaction avec la GPIIb α soulignant ainsi les relations étroites entre les récepteurs de surface et le cytosquelette. Ainsi, des mutations dans le gène FLNA codant la protéine de la filamine A sont également à l'origine de macrothrombopénie et d'anomalies de fonctions plaquettaires [286, 287]. En réalisant des cultures in vitro de cellules CD34⁺ de patients atteints de filaminopathies, une étude récente a mis en évidence que ces mutations au sein du gène FLNA influencent la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire avec à terme, une macrothrombopénie et des plaquettes présentant notamment des granules de taille anormalement élevée [286]. Les thrombopénies familiales telles que la thrombopénie familiale FDP/AML (familial platelet

disorder/acute myeloid leukemia) provoquent également une diminution modérée du taux de plaquettes ainsi que leur dysfonctionnement. Ces symptômes sont généralement associés à d'autres pathologies hématologiques [196]. Ces anomalies sont dues à des mutations du gène AML1 entraînant ainsi une diminution du taux et/ou de la fonction de la protéine.

3.2. Maladie de Willebrand

Cette maladie peut être classifiée en 3 sous catégories en fonction de l'impact de la mutation du VWF sur les patients: la maladie de Willebrand de type 1, de type 2 et de type 3 [288-291]. La maladie de Willebrand de type 2 qui est due à une déficience qualitative du VWF représente 20% des cas et peut être divisée en 4 sous-unités. Les mutations de type 2A et 2M conduisent à une diminution de l'interaction entre le VWF et les plaquettes tandis que la mutation de type 2B induit un gain de fonction du VWF conduisant ainsi à une augmentation de l'affinité du VWF pour la GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes [292]. Chez les patients VWF 2B, une thrombopénie associée à la formation de plaquettes géantes et de plaquettes à l'aspect morphologiquement anormal est retrouvée [293-296]. Cette thrombopénie peut être expliquée par la formation de MK présentant de courtes elongations et produisant de larges proplaquettes, en lien avec le défaut d'interaction entre le VWF et la GPIIb [297] ou par la présence d'agrégats plaquettes/VWF circulants. La première hypothèse a été rapportée dans une étude de production plaquettaire *in vitro* en conditions de flux. En effet, en perfusant des MK sur une surface de VWF muté (mutation V1316M), l'équipe de D. Baruch a montré que les étapes de formation des proplaquettes étaient ralenties conduisant ainsi à une diminution du nombre de plaquettes produites et à une accumulation de proplaquettes [8]. La seconde hypothèse quant à elle, est supportée par l'observation du VWF à la surface des plaquettes des patients VWF 2B [293]. De même, *in vivo*, l'équipe de C. Denis a généré un modèle de souris présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques que les patients VWF 2B [298]. En utilisant ce modèle, cette équipe a mis en évidence que les agrégats plaquettes/VWF sont éliminés par les macrophages du foie ou de la rate expliquant ainsi ce défaut de compte plaquettaire [299]. Cette équipe a également montré que ces souris présentent des anomalies dans leur signalisation plaquettaire [300]. Ainsi, ce modèle de souris apparaît pertinent pour déterminer quelles voies de signalisation sont impliquées dans ces défauts plaquettaires

retrouvés chez les patients VWF 2B. En parallèle de cette maladie de VWF 2B, le syndrome « platelet-type VWD » peut être cité. Ce syndrome est dû à une mutation gain de fonction de la GPIb α également à l'origine de thrombopénies modérées à sévères chez les patients [301]. D'un point de vue phénotypique, ce syndrome est similaire à celui de la maladie de VWF 2B. Seules des analyses moléculaires permettent de discriminer ces deux syndromes [302].

3.4. Cas de thrombocytoses associées à des syndromes myéloprolifératifs

La maladie de Vaquez, la thrombocytose essentielle ou encore la myélofibrose primitive représentent trois syndromes myéloprolifératifs associés à des thrombocytoses. La thrombocytose essentielle est caractérisée par une prolifération prédominante de la lignée mégacaryocytaire induisant de graves thromboses associées à un allongement du temps de saignement et à des anomalies morphologiques des plaquettes. La maladie de Vaquez et la myélofibrose primitive sont caractérisées respectivement, par une prolifération prédominante de la lignée érythroblastique entraînant une augmentation de la masse globulaire et par une myélofibrose évolutive et une métaplasie myéloïde hépatosplénique. Toutes deux induisent des thromboses artérielles et veineuses du fait d'un nombre anormalement élevé de plaquettes sanguines. Ces trois syndromes myéloprolifératifs sont liés à une mutation du gène JAK2. Une étude a également rapporté un rôle du récepteur Mpl dans la myélofibrose primitive [303]. Actuellement, différents modèles murins existent afin de mieux comprendre les mécanismes responsables du développement de ces maladies: un modèle par surexpression de la TPO, un modèle par surexpression de Mpl muté et un modèle par surexpression de JAK2 muté [303]. Dans le premier modèle, une thrombocytose modérée à sévère en lien avec une hyperplasie mégacaryocytaire est retrouvée [304]. Cette dysmégacaryopoïèse peut être expliquée par une dérégulation du trafic de Mpl induite par la stimulation prolongée de TPO, provoquant ainsi une sécrétion inappropriée de cytokines dans le microenvironnement de la moelle osseuse. Les deux autres modèles apparaissent surtout comme des modèles d'étude de la physiopathologie des différentes maladies [305, 306].

CHAPITRE 3: APPROCHES EXPERIMENTALES POUR L'AMELIORATION DE LA PRODUCTION PLAQUETTAIRE *IN VITRO*

Même si la possibilité d'administrer à des fins thérapeutiques des plaquettes produites *in vitro* demeure actuellement à l'état de prospective, plusieurs approches permettent d'envisager des résultats encourageants. Des travaux expérimentaux ont montré la possibilité d'administrer *in vivo* des CSH ou des MK dans des souris. Ces administrations conduisent à une production de plaquettes fonctionnelles au sein des animaux. De plus, les données montrent que les plaquettes persistent plusieurs heures dans la circulation [307, 308]. De même, une étude clinique récente de phase I a montré la possibilité de greffer des progéniteurs mégacaryocytaires issus de la culture de CSH *in vitro*, à des patients thrombopéniques; cette greffe induit une augmentation en 2 heures du taux de plaquettes circulantes chez les patients, réduisant ainsi leur thrombopénie [309]. Néanmoins, dans ces modèles, une aplasie médullaire partielle ou totale (effet de la chimiothérapie) est nécessaire. Ainsi, il serait plus intéressant de se concentrer sur le produit final de cette différenciation *in vitro*: les plaquettes. En effet, l'utilisation des plaquettes produites *in vitro* permettrait de s'affranchir d'un besoin d'aplasie médullaire. Dans ce but, il est primordial d'augmenter les rendements de production plaquettaire *in vitro* que ce soit à partir de CSH ou de cellules souches pluripotentes (ES ou iPS). Pour ce faire, plusieurs équipes de recherches tentent de développer de nouvelles approches expérimentales. Ainsi, l'utilisation de biomatériaux ou encore de bioréacteurs est en plein essor afin d'améliorer cette production plaquettaire *in vitro* dans un but d'utilisation thérapeutique [310].

I. Biomatériaux

Les biomatériaux naturels ou synthétiques représentent l'une des approches expérimentales pouvant permettre d'améliorer la production plaquettaire *in vitro*. En effet, en mimant la structure 3D de la moelle osseuse, ces biomatériaux permettent de se rapprocher des conditions physiologiques mises en jeu lors de la différenciation mégacaryocytaire et de la thrombopoïèse. Ces biomatériaux permettent notamment de

mimer les interactions cellule/cellule ou cellule/substrat rencontrées dans la moelle osseuse. En effet, la culture liquide *in vitro* ne permet pas de mimer ces interactions essentielles à la régulation de la différenciation mégacaryocytaire [311] conduisant ainsi à un faible rendement en plaquettes. Dans ce but, différentes équipes ont développé des structures 3D mettant en évidence l'importance des facteurs environnementaux dans la régulation de la différenciation mégacaryocytaire et de la production plaquettaire *in vitro*.

En modélisant certaines interactions de la niche ostéoblastique *in vitro*, l'équipe d'A. Balduini a montré l'implication de la régulation des contacts cellule/cellule dans la maturation et la différenciation des MK [5]. Plus précisément, en co-cultivant des CSH de sang de cordon ombilical avec des ostéoblastes ou des CSM, ils montrent que les ostéoblastes ne jouent pas un rôle primordial dans la différenciation des MK et apparaissent même comme des inhibiteurs de la formation des proplaquettes. En revanche, une co-culture de CSH avec des CSM induit une amélioration de la maturation des MK. De même, cette co-culture induit une formation significativement plus importante de proplaquettes en comparaison d'une culture de CSH seule. Ces résultats appuient donc l'idée que les ostéoblastes jouent en rôle dans le maintien des CSH tandis que les CSM soutiennent leur différenciation vers le lignage mégacaryocytaire. D'autre part, l'analyse de la morphologie des proplaquettes révèle que seule la co-culture avec des CSM permet d'obtenir des proplaquettes fonctionnelles [312]. Cette étude prouve donc que les mécanismes induits par les contacts cellule/cellule au sein de la moelle osseuse régissent la maturation des MK et à la formation des proplaquettes [5].

D'autre part, il a été rapporté que l'utilisation de biomatériaux naturels/biologiques ou synthétiques comme supports physiques en culture, améliore l'expansion des CSH *in vitro*. Plus précisément, l'expansion des CSH apparaît comme étant plus importante lors de l'utilisation de matrices de fibrine (biomatériau biologique) en comparaison de biomatériaux synthétiques (polycaprolactone, par exemple). Cette expansion est d'autant plus marquée lors de co-culture avec des CSM [313]. La co-culture de CSH avec des CSM au sein d'un hydrogel poreux synthétique (polyéthyléneglycol diacrylate) permet également de conserver plus longtemps l'état « souche » des CSH et leur capacité d'auto-renouvellement en comparaison de celles cultivées en phase liquide [314]. Parallèlement, une équipe a montré

que l'utilisation de matrices décellularisées améliore l'expansion des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques [315]. De même, les CSH cultivées au sein d'un biomatériau constitué de polyuréthane notamment, sans ajout de cytokines sont capables de proliférer et se différencier [316]. La culture et l'expansion de CSH et de progéniteurs hématopoïétiques murins sont également améliorées sur chitooligosaccharides (COSs). De hautes concentrations en COSs induisent la différenciation des cellules CD34⁺ en progéniteurs hématopoïétiques [317].

L'équipe de LC. Lasky a montré que la culture de CSH au sein de biomatériaux synthétiques (polyester ou cristaux colloïdes greffés sur des hydrogels poreux de polyacrylamide) permet d'augmenter les rendements de production plaquettaire *in vitro*. Néanmoins, ces plaquettes produites demeurent inutilisables en thérapie du fait de leur état d'activation (expression des marqueurs CD62-P et CD63, connus pour être exprimés seulement sur les plaquettes activées) [4].

Parallèlement à ces études, d'autres équipes ont utilisés des biomatériaux biologiques composés de polysaccharides naturels pour la culture de PEC (cellules endothéliales progénitrices), de CSM ou encore de cellules ES [318-320]. Ces biomatériaux présentent de nombreuses caractéristiques et propriétés appropriées à la culture de CSH pour la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire *in vitro*.

Les hydrogels de polysaccharides sont des réseaux 3D hydrophiles composés de polymères d'origine naturelle réticulés de façon covalente ou ionique. En présence d'eau, ces polymères gonflent jusqu'à l'équilibre conférant à l'hydrogel une composition molle, élastique et déformable facilement manipulable. Leur composition ainsi que leur teneur élevée en eau font que ces hydrogels se rapprochent des tissus physiologiques et sont tolérés dans différents milieux biologiques. Dans un contexte de régénération osseuse, la biocompatibilité des polymères a été démontrée. En effet, ces polymères n'engendrent aucune réaction inflammatoire ou cytotoxique pouvant influencer la prolifération ou la différenciation des cellules [321].

Basée sur ces différents critères, l'équipe de D. Letourneur a développé des hydrogels composés de pullulane et de dextrane (hydrogel P/D), polysaccharides neutres et non immunogènes [322-324] (Figure 20). Le pullulane provient de la fermentation de l'amidon

par le champignon *A. pullulans*. Le dextrane, un dérivé du glucose est quant à lui, produit naturellement par les microbes vivant dans le sol. Comme pour tous les polymères, la nature chimique de ces polysaccharides peut être modifiée afin d'adapter leurs propriétés à celles recherchées [325]. Ainsi, il est possible d'obtenir un hydrogel P/D avec une composition, une structure et une élasticité mimant les propriétés de la moelle osseuse [326]. La taille des pores ainsi que la porosité de ces hydrogels peuvent être façonnées de telle sorte que l'hydrogel soit favorable à la culture et la différenciation de cellules *in vitro*. De plus, la capacité des polysaccharides à séquestrer les facteurs de croissance nécessaires à la régulation cellulaire favorise la prolifération et la différenciation cellulaire. Il a notamment été rapporté un effet pro-angiogénique du fucoïdane (polysaccharide sulfaté provenant d'une algue) sur la culture de PEC [322, 327]. L'équipe de D. Letourneur a également rapporté la possibilité de réaliser une différenciation des cellules ES dans ces hydrogels. Plus précisément, cette équipe montre que la présence de fucoïdane est bénéfique pour les premières étapes de différenciation des cellules cardiaques à partir des cellules ES [320]. Ces données récentes encouragent donc le développement de techniques combinant plusieurs méthodes (biomatériaux et cellules ES, par exemple) pour l'amélioration de la production plaquettaire *in vitro*. Enfin, la possibilité de dégrader ces hydrogels par lyse enzymatique demeure un atout majeur pour la caractérisation des cellules cultivées *in vitro* dans ces structures 3D [324, 328]. Ce dernier point appuyé par la capacité des polymères à se biodégrader représente un atout majeur pour l'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire [329].

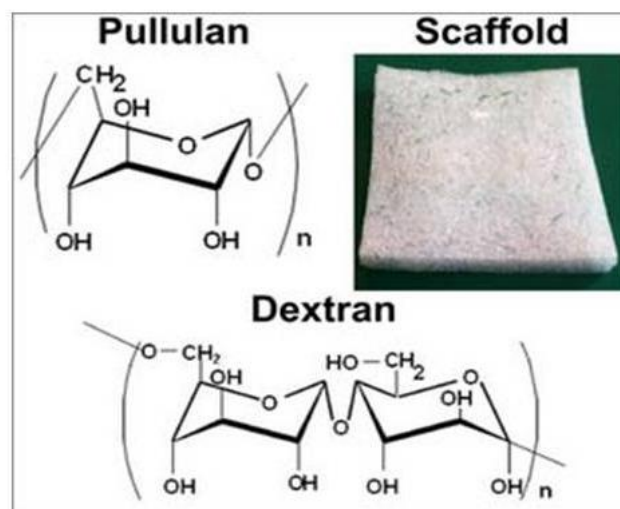


Figure 20: Hydrogels poreux de polysaccharides constitués de pullulane et de dextrane

Les nombreuses propriétés de ces hydrogels P/D et notamment leur capacité à incorporer des facteurs favorisant la prolifération et la différenciation cellulaire représentent des points clés dans le cadre de l'amélioration de la production plaquettaire *in vitro*. Dans ce but, nous avons utilisés ces hydrogels comme modèle d'étude pour la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire *in vitro* à partir des CSH (**Article I**).

II. Bioréacteurs

Depuis la mise en évidence de l'importance des forces de cisaillement du sang dans la production plaquettaire [8, 180], de nombreuses équipes développent des bioréacteurs mimant la niche vasculaire, les sinusoides de la moelle osseuse ainsi que les forces hémodynamiques afin de se rapprocher de l'environnement physiologique permettant le processus de thrombopoïèse. Ces bioréacteurs représentent la seconde approche pouvant permettre d'améliorer le rendement de production plaquettaire *in vitro*.

Les premières études sur ce sujet ont été réalisées à partir de biomatériaux synthétiques favorisant les échanges des cellules avec le milieu ou les gaz et permettant l'application d'un flux [4]. Cette équipe a comparé les rendements de production plaquettaire entre des cellules cultivées en phase liquide, au sein de structures 3D et au sein du bioréacteur composé de biomatériaux synthétiques dans lequel un flux est appliqué. Ainsi, bien que la production plaquettaire soit cumulée au fil des jours, cette étude montre l'avantage d'une culture en bioréacteur. En effet, environ 3×10^7 plaquettes sont produites au sein du bioréacteur contre 2×10^6 en phase liquide et 9×10^6 en structures 3D [4]. De plus, au sein du bioréacteur, la production plaquettaire peut être prolongée dans le temps à partir du même pool de CSH de départ. Néanmoins, comme expliqué précédemment, bien que ces plaquettes répondent aux agonistes et soient capables de s'activer, elles présentent à la base une forte expression de CD62P et CD63, incompatible avec une utilisation en thérapeutique [4].

Basé sur un système combinant l'utilisation de vers à soie pour mimer les vaisseaux sinusoides et l'utilisation de molécules et facteurs retrouvés physiologiquement dans la niche vasculaire [330, 331], l'équipe d'A. Balduini a mimé les compartiments de la moelle

osseuse au sein d'un même bioréacteur afin d'étudier les différentes étapes de différenciation mégacaryocytaire et de production plaquettaire [332] (Figure 21). Au sein de ce modèle, la migration des MK vers les vaisseaux ainsi que l'extension des proplaquettes et la libération des plaquettes est visualisable en temps réel par microscopie confocale. Bien que ne permettant pas d'augmenter significativement le rendement plaquettaire, ce système permet d'obtenir des plaquettes intactes et fonctionnelles, similaires aux plaquettes sanguines. En effet, le marquage de la tubuline dévoile la forme discoïde de ces plaquettes non-activées. De plus, l'augmentation de l'expression de la P-sélectine à la surface de ces plaquettes après stimulation par des agonistes, révèle leur capacité d'activation et ainsi leur état fonctionnel à la sortie du bioréacteur [332].

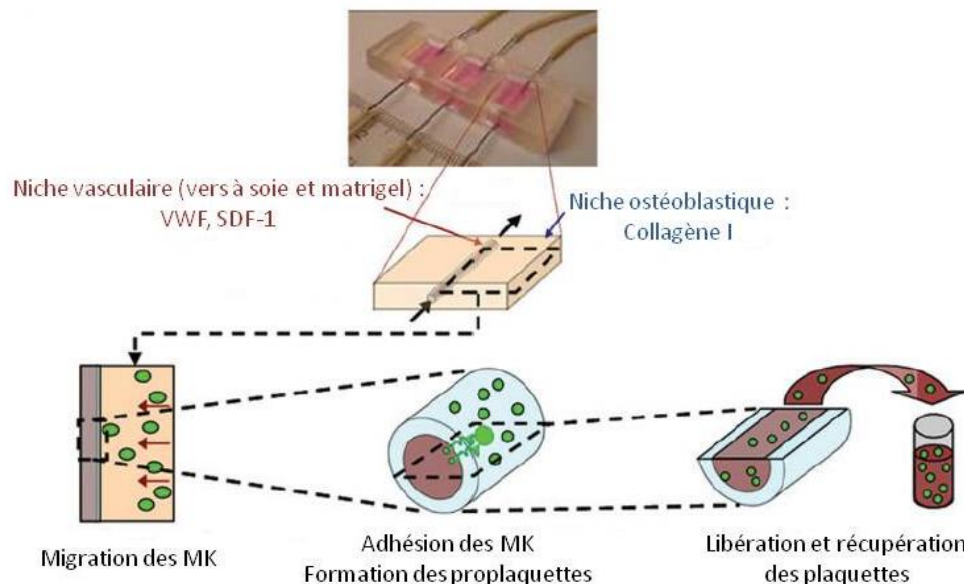


Figure 21: Modèle de bioréacteur mimant les compartiments de la moelle osseuse (D'après [332])

La migration des MK et la production plaquettaire sont visualisables respectivement, dans les compartiments « niche ostéoblastique » et « niche vasculaire ».

Deux travaux plus récents ont également mimés les compartiments de la moelle osseuse en se basant sur des concepts de microfluidique [7, 333].

En appliquant des flux bidirectionnels séparés par un angle précis, la première équipe a développé un bioréacteur permettant de mimer d'une part, la migration des MK de la niche vasculaire vers les sinusoides de la moelle et d'autre part, le flux sanguin permettant la production plaquettaire [333] (Figure 22). Plus précisément, la niche vasculaire est composée de cellules endothéliales (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells)

permettant la formation d'une barrière poreuse à l'interface niche/vaisseaux sinusoides et ainsi, la fixation des MK avant leur fragmentation dans les vaisseaux sinusoides. L'application d'un flux dans ce compartiment engendre la migration des MK vers cette barrière poreuse puis un second flux mimant les forces de cisaillement du sang induit la production plaquettaire à partir de ces MK.

La source de MK incluse dans ce dispositif provient de la différenciation des cellules ES ou iPS, selon le protocole décrit par le groupe de Yamanaka [146, 175]. Le nombre de plaquettes CD41a⁺/CD42b⁺ produites dans ce bioréacteur augmente de 3,6 fois en comparaison d'une production en statique. De plus, après stimulation par des agonistes, les plaquettes produites sous flux au sein du bioréacteur sont capables de lier l'anticorps PAC-1 démontrant leur capacité à activer l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [333]. Ces données soulignent donc la fonctionnalité *in vitro* de ces plaquettes.

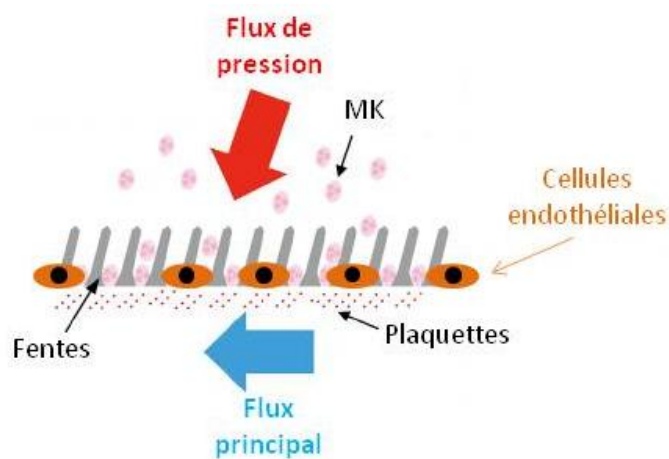


Figure 22: Influence des flux bidirectionnels dans la production plaquettaire (Adaptée de [333])

Par la suite, l'équipe de JE. Jr. Italiano a conçu un dispositif comprenant majoritairement deux canaux: le premier mime la niche vasculaire de la moelle osseuse et le second, les vaisseaux sanguins. Par utilisation de protéines de la matrice extracellulaire et par application de flux mimant les forces de cisaillement physiologiques, cette équipe a réalisé deux études différentes au sein de ce dispositif [7].

Premièrement, ces canaux sont recouverts de protéines de la matrice extracellulaire et/ou de cellules endothéliales (HUVEC) afin de reproduire la composition physiologique de la moelle. Plus précisément, de l'alginate ou du matrigel sont utilisés pour moduler l'organisation 3D de la matrice extracellulaire. En capturant les MK, ces gels permettent leur

fixation à l'interface niche vasculaire/vaisseaux sinusoides. De plus, en créant des pores, l'alginate force le passage de fragments de MK dans le compartiment mimant les vaisseaux sinusoides. D'autre part, des cellules endothéliales sont utilisées afin de reproduire la physiologie des vaisseaux sinusoides nécessaire à la production plaquettaire (Figure 23).

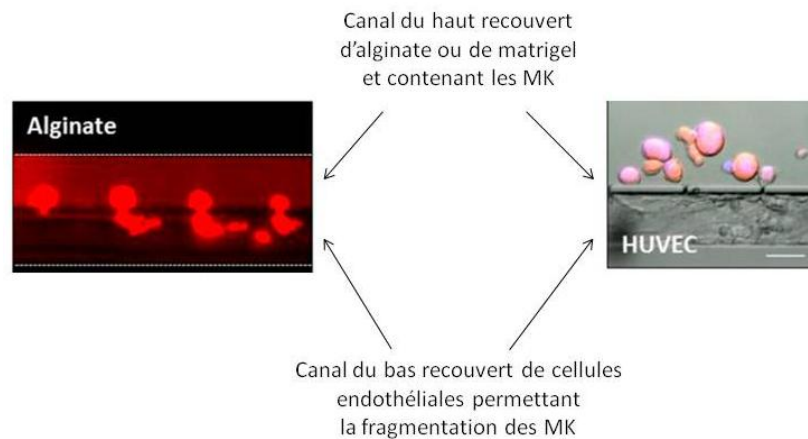


Figure 23: Modélisation de la composition physiologique de la moelle osseuse pour la migration et la fragmentation des mégacaryocytes (Adaptée de [7])

Deuxièmement, en contrôlant l'application des flux par des pompes (100 à 2500 sec^{-1} , forces de cisaillement physiologiques), une extension des fragments de MK différenciés à partir de cellules pluripotentes [7] est observable de façon similaire à ce qui est rapporté physiologiquement [179]. Par la suite, ces fragments sont capables de produire des préplaquettes, des proplaquettes et des plaquettes (Figure 24). Bien que les auteurs affirment obtenir une production plaquettaire doublée en comparaison de la production en statique, il est difficile de comprendre leurs données du fait d'un manque sur les quantités absolues de MK (obtenus à partir de différenciation iPS murins et humains) de départ et de plaquettes produites. En revanche, ces plaquettes produites présentent de nombreuses caractéristiques similaires à celles des plaquettes sanguines. En effet, l'observation en microscopie électronique montre une morphologie discoïde et anucléée de ces plaquettes. De même, des granules α , des granules denses ainsi que des mitochondries sont visibles au sein de ces plaquettes produites *in vitro*. D'autre part, la microscopie à immunofluorescence permet d'apprécier la formation de filopodes et de lamellipodes suite à la stimulation de ces plaquettes par des agonistes. Ces dernières données suggèrent donc que la combinaison d'un bioréacteur avec la technique des iPS permettrait de produire des plaquettes fonctionnelles *in vitro*.

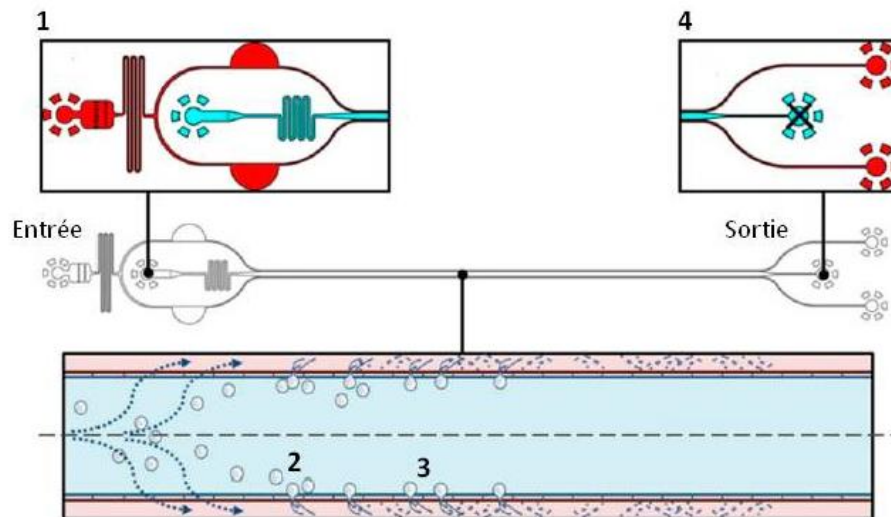


Figure 24: Influence des flux parallèles dans la migration des mégacaryocytes et la production plaquettaire (D'après [7])

Les MK issus de la différenciation des iPS sont introduits dans le puits d'entrée (1) puis le contrôle des flux permet la migration des MK vers les vaisseaux sinusoides (2) et leur fragmentation en proplaquettes et plaquettes (3). Les plaquettes sont ensuite recueillies dans le puits de sortie (4).

Finalement, bien qu'il soit encore nécessaire d'augmenter les rendements en plaquettes produites *in vitro* et de prouver la fonctionnalité de ces plaquettes *in vitro* mais surtout *in vivo*, ces approches expérimentales demeurent des avancées technologiques primordiales pour l'utilisation de ces plaquettes à des fins thérapeutiques.

BUT DU TRAVAIL DE THESE

De nouvelles approches se développent pour simuler la production plaquettaire à partir de cellules en culture, dont l'objectif se situe à long terme. Celui-ci est de parvenir à une production de plaquettes pouvant représenter un complément à l'apport transfusionnel. Dans ce contexte, l'intérêt de ces approches est double: d'une part l'ingénierie cellulaire ou tissulaire occupe une part croissante dans les approches de thérapie cellulaire pour améliorer l'efficacité ou la délivrance locale des cellules; d'autre part, le modèle de la production plaquettaire *in vitro* pour une application thérapeutique est transposable à la souris afin de développer des études *in vivo*.

Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser deux approches expérimentales afin de comprendre le mécanisme de différenciation mégacaryocytaire dans un environnement 3D, permettant d'augmenter les rendements de production plaquettaire. D'autre part, nous avons cherché à mettre en évidence des caractéristiques fonctionnelles des plaquettes produites en conditions de flux.

Ainsi, nous avons tout d'abord utilisé des hydrogels poreux de polysaccharides composés de pullulane et de dextrane afin de réaliser la différenciation mégacaryocytaire à partir des CSH humaines. Nous avons comparé la différenciation mégacaryocytaire ainsi que la production plaquettaire avec les conditions de culture habituelles en phase liquide. A différents temps de culture, nous avons pu étudier les cellules au sein des hydrogels ou suite à leur extraction par lyse enzymatique des hydrogels. Nous avons ainsi caractérisé les marqueurs de différenciation (CD34, CD41 et CD42b), la ploïdie des MK matures ainsi que les facteurs de transcription impliqués dans cette différenciation. Par ailleurs, nous avons étudié la production plaquettaire par perfusion des MK matures issus des deux conditions de culture, au sein d'un système de microfluidique mimant les forces de cisaillement élevées retrouvées dans la microcirculation. La fonctionnalité *in vitro* de ces plaquettes produites dans ces conditions a ensuite été étudiée (Figure 25). Les résultats de cette première étude ont fait l'objet d'un manuscrit soumis pour publication intitulé « Three-dimensional environment

sustains hematopoietic stem cell differentiation into platelet-producing megakaryocytes »
(Article I).

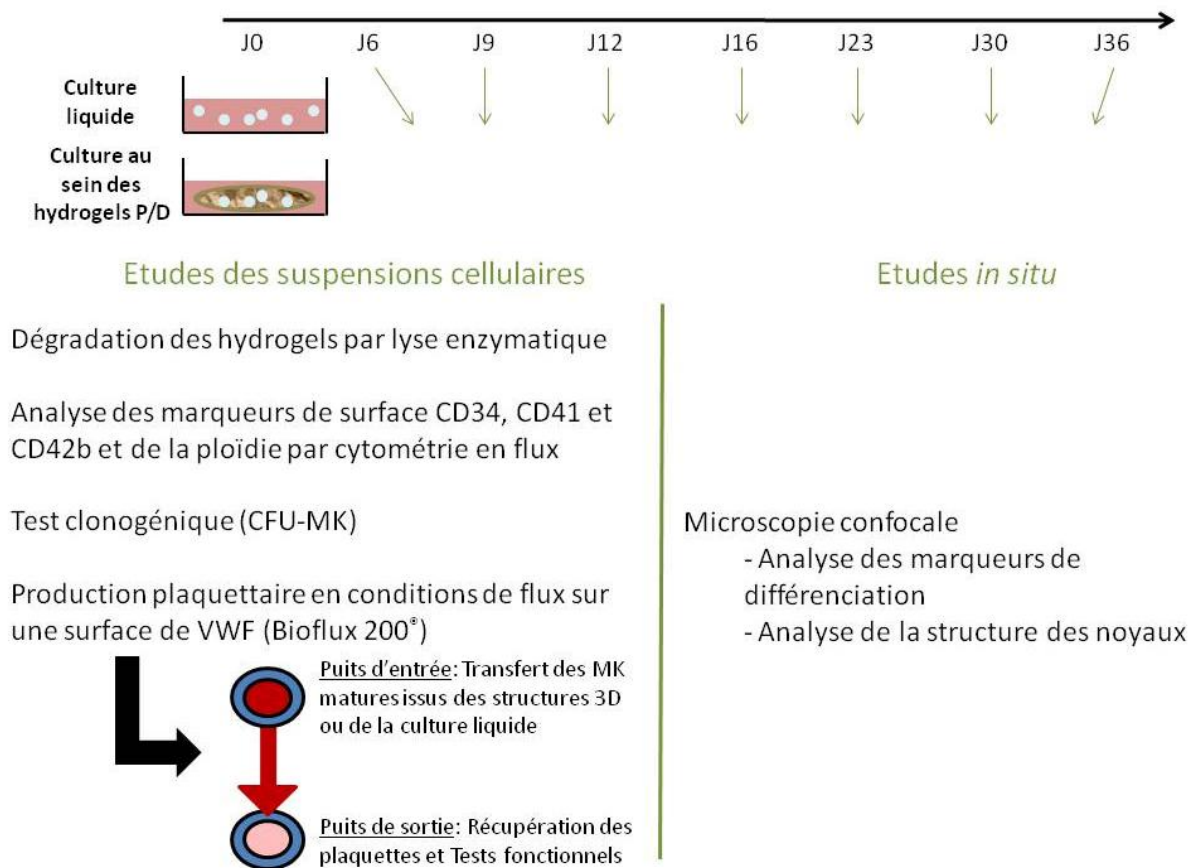


Figure 25: Protocole pour l'étude de la différenciation mégacaryocytaire et de la production plaquettaire au sein des hydrogels de pullulane/dextrane et en culture liquide

D'autre part, du fait d'une faible interaction de la GPIb humaine avec le VWF murin, il a été nécessaire de réaliser la production plaquettaire à partir de MK murins dans le système de microfluidique afin d'envisager une utilisation de ces plaquettes issues du flux pour des études de thrombose *in vivo*. En effet, des études *in vivo* des plaquettes produites *in vitro* étaient primordiales afin de caractériser la fonctionnalité de nos plaquettes dans un but d'utilisation thérapeutique. Ainsi, nous avons tout d'abord comparé les taux d'expression de nombreuses glycoprotéines des plaquettes murines produites en flux avec ceux des plaquettes sanguines. Par la suite, nous avons vérifié l'état d'activation de ces plaquettes murines issues du flux. Pour cela, nous avons stimulé les plaquettes par des agonistes puis caractérisé les microtubules ainsi que le cytosquelette d'actine et l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. En comparaison des plaquettes obtenues en statique, nous avons ensuite étudié la

capacité de ces plaquettes produites en flux à s'incorporer et à participer à la formation d'un thrombus *in vitro* et *in vivo*. Enfin, en utilisant des plaquettes humaines issues du flux, nous avons évalué leur capacité à s'incorporer dans la circulation d'une souris immunodéficiente et le temps de demi-vie de ces plaquettes au sein de ce modèle *in vivo*, en comparaison des plaquettes sanguines (Figure 26). Les résultats de cette seconde étude font l'objet d'un article en préparation intitulé « Proof of principle for efficiency in thrombosis of shear-generated platelets » (**Article II**).

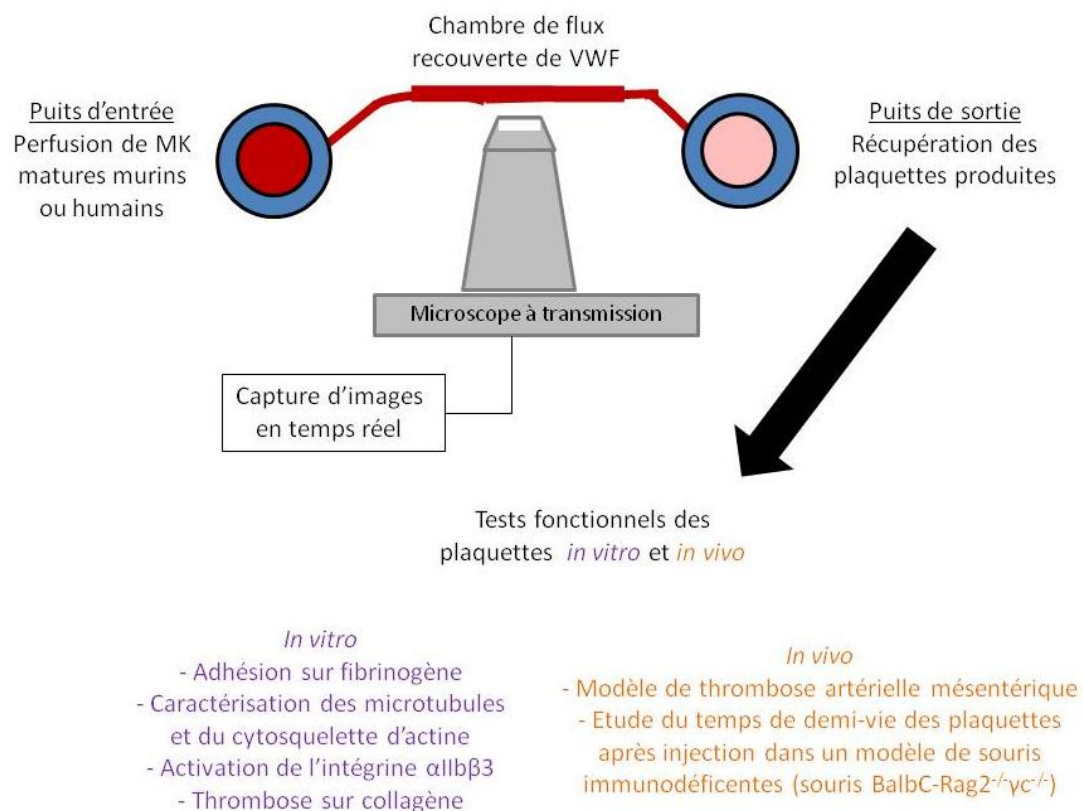


Figure 26: Protocole pour les caractérisations *in vitro* et *in vivo* des plaquettes produites en conditions de flux à forces de cisaillement élevées, à partir de mégacaryocytes matures

RÉSULTATS

CHAPITRE 1 - ARTICLE I: THREE-DIMENSIONAL ENVIRONMENT SUSTAINS HEMATOPOIETIC STEM CELL DIFFERENTIATION INTO PLATELET- PRODUCING MEGAKARYOCYTES

Titre

Three-dimensional environment sustains hematopoietic stem cell differentiation into platelet-producing megakaryocytes

Auteurs

Audrey PIETRZYK-NIVAU, Sonia POIRault-CHASSAC, Sophie GANDRILLE, Sidi-Mohammed DERKAOUI, Alexandre KAUSKOT, Didier LETOURNEUR, Catherine LE VISAGE, Dominique BARUCH

Article soumis en Octobre 2014 à PLoS One

Three-dimensional environment sustains hematopoietic stem cell differentiation into platelet-producing megakaryocytes

Audrey Pietrzyk-Nivau¹, Sonia Poirault-Chassac¹, Sophie Gandrille^{1,2}, Sidi-Mohammed Derkaoui³, Alexandre Kauskot¹, Didier Letourneur³, Catherine Le Visage³ and Dominique Baruch¹

¹INSERM, UMR-S 1140, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

²AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Department of Hematology, Paris, France

³INSERM, UMR-S 1148, University Paris Diderot, Paris; University Paris Nord, Villetaneuse, Sorbonne Paris Cité, France

Short title

Increased 3D megakaryocyte and platelet production

Corresponding author

Dr Dominique Baruch

INSERM UMR-S 1140

4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Mail: dominique.baruch@parisdescartes.fr

Tel: 33 1 53 73 99 38 / Fax: 33 1 44 07 17 72

Abstract: 228 words

Text: 3859 words

Figures: 8

References: 51

Key words: Hematopoietic stem cells, megakaryocytes, platelets, bone marrow structure

Abstract

Hematopoietic stem cells (HSC) differentiate into megakaryocytes (MK), whose function is to terminally release platelets. Attempts to improve *in vitro* platelet production have been hampered by the low amplification of MK. Providing HSC with an optimal three-dimensional (3D) architecture may favor MK differentiation by mimicking some crucial functions of the bone marrow structure. To this aim, porous hydrogel scaffolds were used to study MK differentiation from HSC as well as platelet production. Flow cytometry, qPCR and perfusion studies showed that 3D prolonged both cell proliferation and MK differentiation far beyond the limited shelf-life observed in liquid culture but also increased production of functional platelets. We provide evidence that these 3D effects were related to 1) persistence of MK progenitors and precursors and 2) prolongation of expression of EKLF and c-myb transcription factors involved in early MK differentiation. In addition, presence of abundant mature MK with increased ploidy and impressive cytoskeleton elongations was in line with expression of NF-E2 transcription factor involved in late MK differentiation. Platelets produced in flow conditions were functional as shown by integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation. This study demonstrates that spatial organization and biological cues synergize to improve MK differentiation and platelet production. Thus, 3D environment constitutes a powerful tool for unraveling the physiological mechanisms of megakaryopoiesis and thrombopoiesis in the bone marrow environment, potentially leading to an improved amplification of MK and platelet production.

Introduction

Hematopoietic stem cells (HSC) isolated from hematopoietic tissues (bone marrow, peripheral blood and cord blood) are self-renewing, multipotent progenitors of hematopoietic lineages leading to all mature blood cells. Structural factors regulating HSC proliferation remain poorly investigated [1]. Inside a tissue structure, cells are organized within the complex molecular framework of the extracellular matrix (ECM). ECM molecules provide tissues with the appropriate three-dimensional (3D) architecture and influence cell migration, proliferation, and differentiation [2]. In order to improve *in vitro* HSC proliferation, 3D structures have been used as physical support to ECM proteins, increasing cell-cell and cell-substrate interactions [3, 4].

In the megakaryocytic lineage, megakaryocyte (MK) progenitors proliferate and differentiate into MK precursors that become polyploid by endomitosis, i.e. DNA replication without cell division [5]. Platelets, which are essential for bleeding arrest, are formed from the enlarged cytoplasm of mature MK [5]. MK differentiation occurs *in vitro* in the presence of thrombopoietin (TPO), an essential cytokine for HSC proliferation and differentiation, acting as a MK proliferation, maturation and differentiation agonist [6].

In the bone marrow, interactions between bone cells, hematopoietic cells and vascular cells regulate hematopoiesis. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis, the final step of MK differentiation [7]. This process consists of proplatelet formation and platelet release into the circulation from MK fragments entering sinusoid vessels. Platelet release is not synchronized in liquid culture, resulting in a low platelet yield. Platelet production *in vitro* remains a challenging task, requiring synergy between biochemical and biophysical factors to reach high platelet yields. Thus, in the aim to improve *in vitro* platelet production, several novel approaches are currently developed. Hemodynamic shear forces contribute to proplatelet and platelet formation from mature MK *in vivo* [8] and *in vitro* [9]. We reported that platelet production *in vitro* is accelerated and concentrated in flow conditions [10], a process that has been recently reproduced by two others groups [9, 11]. A synergy between environment factors has been shown to be involved in i) MK differentiation within the

osteoblastic niche of the bone marrow [12], ii) MK migration to the vascular niche [13], and iii) platelet production from fully mature MK [10]. Indeed, most key events occurring during MK maturation appear to be reproduced *ex vivo* in liquid culture, except for the regulatory activities normally provided by the structural bone marrow microenvironment [14]. Even if MK differentiation studies in 3D environment are available [9, 11-13, 15, 16], information is still lacking on the influence of 3D organization not only on thrombopoiesis but also on megakaryopoiesis. 3D biomaterials formed by assembling polymers or biomolecules such as proteins or natural polysaccharides are extensively used in regenerative medicine. Hydrogels have proved valuable for expanding endothelial progenitor cells and for differentiating embryonic stem cells [17, 18]. So far, high yields of platelets have been achieved *ex vivo* from HSC using 3D scaffolds of nonwoven polyester fabric and inverted colloidal crystals/polyacrylamide porous hydrogels, but these platelets seemed activated [16]. Nevertheless, MK differentiation leading to this increased platelet production was not investigated in any of these 3D structures.

In this study, we examined how a porous 3D structure affects HSC proliferation, MK differentiation and platelet production. The results clearly demonstrate the effect of 3D environment not only on CD34⁺ cell proliferation but also on MK differentiation. We found that on one hand, 3D environment prolonged MK progenitor (CD34⁺/CD41⁻) differentiation into MK precursor (CD34⁻/CD41⁺) leading to mature MK (CD41⁺/CD42b⁺). On the other hand, 3D environment improved enlargement of these mature MK allowing increased platelet production in flow conditions.

Materials and Methods

Three-dimensional hydrogels

3D scaffolds were prepared from polysaccharide-based hydrogels as previously described [19, 20]. Hydrogels were composed of a 75:25 ratio of pullulan (MW 200 000; Hayashibara Inc, Okayama, Japan) and dextran (MW 500 000; Pharmacia, Uppsala, Sweden) at a concentration of 30% in water (w/v). The resulting hydrogels were porous and were obtained as dry disks of 5 mm in diameter and 1 mm thickness. They were used as a tool to reproduce the 3D environment required for CD34⁺ cell culture in comparison to liquid cell culture.

To study MK differentiation and platelet production in 3D hydrogels, enzymatic lysis of polysaccharides was used to recover the cell suspensions (3D cells). Pullulanase (from *Bacillus acidopullulyticus*, 44.4 U/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and dextranase (from *Chaetomium erraticum*, 5.3 U/mL; Sigma-Aldrich) were added to 3D hydrogels for 30 minutes at 37°C, unless otherwise stated. Following scaffold degradation, cells were recovered by centrifugation for 10 minutes at 290g and compared to cells cultured in liquid conditions (liquid-culture cells). Controls consisted of liquid-culture cells that were added to empty 3D hydrogels immediately before enzymatic treatment. In some experiments, enzymatic treatment of 3D hydrogels was followed by a bovine serum albumin (BSA; PAA Laboratories, Vélizy Villacoublay, France) density gradient centrifugation to separate matrix debris from viable cells (Supplementary Figure 1) [21].

CD34⁺ cell culture and differentiation

CD34⁺ cells were isolated from human umbilical cord blood (UCB), peripheral blood or bone marrow by using an immunomagnetic technique (Miltenyi Biotec, Paris, France) [22]. All samples were obtained with donor's informed consent and institutional ethics committee approval, in keeping with the Declaration of Helsinki. In order to control for inter-individual variations, CD34⁺ cell samples were separated in two aliquots of 300 000 cells, one for liquid culture and one for 3D hydrogel culture. For liquid culture, 150 000 cells per well were added to two 1-cm² wells (Greiner Bio-One, Les Ulis, France). For 3D hydrogel culture, 3 dry disks were seeded with 100 000 cells each (0.2 cm² per disk; Supplementary Figure 1). The disks were placed in 1-cm² wells, as their volume increased during rehydration. Gradual

incorporation of CD34⁺ cells within 3D hydrogels was achieved by stepwise addition of conditioned medium. The disks were transferred to new wells when fresh medium was added, on days 7, 9, 12, 16, 23 and 30 (Supplementary Figure 1). When the pores were fully occupied, some cells accumulated at the bottom of the wells. These cells were discarded when the hydrogels were transferred to new wells for medium renewal (Supplementary Figure 1). In this way, 3D cells were clearly distinguished from liquid-culture cells.

Online supplemental data available on the PloS One website described in detail the materials and methods listed below:

- Reagents and cell culture conditions
- Flow cytometry used for study of differentiation markers and ploidy
- Confocal immunofluorescence microscopy
- Clonogenic assay
- RNA extraction and real-time qPCR
- Platelet production in flow assay
- Platelet activation and spreading
- Statistical data analysis

Results

3D environment prolongs cell proliferation

The 3D environment was designed for optimal CD34⁺ cell proliferation and differentiation. Rehydrated transparent 3D hydrogels were organized into a complex network of large (200 μ m) pores (Figure 1A). UCB-derived CD34⁺ cells loaded on top of 3D entered pores within one hour after seeding (not shown). Pore occupancy by proliferating cells was dependent on the initial number of cells, and a condition of 100 000 cells/disk was selected for further experiments (Figure 1A). Cells maintained in 3D survived for at least 36 days (Figure 1B), whereas cells in liquid culture survived for no more than 16 days (Figure 1C). 3D hydrogel transparency allowed visualizing and studying cell behavior inside pores: cell clusters started to be visible on the second day. Cells proliferated and differentiated, as shown on 9 different microphotographs taken at 3-4 day intervals between the 2nd and 36th day of 3D culture (Figure 1B). In order to estimate total cell proliferation, cells grown in 3D and liquid culture were counted by means of image analysis (Figure 2). Between day 12 and day 16, cell numbers increased in 3D and decreased in liquid culture. Nevertheless, on day 16, total cell expansion relative to day 0 did not differ between the two conditions (51.3 ± 23.2 -fold in 3D vs 60.9 ± 30.4 -fold in liquid culture; NS). After day 16, whereas cells did not survive in liquid culture, cells were maintained in 3D up to day 36. Thus, 36 days after initial seeding (20 days after the end of cell survival in liquid culture), large numbers of cells were still present in 3D (Figure 2). Taken together, these results indicated that this 3D environment increased CD34⁺ cell proliferation, suggesting a role on megakaryocytic differentiation.

Cell ploidy in 3D environment

To better characterize the mechanism of prolonged cell proliferation in 3D, CD34⁺ cells were stained within the hydrogels. As shown in Figure 3, 12 days after seeding, MK precursors (CD41⁺/CD42⁻ cells) and mature MK (CD41⁺/CD42⁺ cells) were both present in 3D (Figure 3A-I), as in liquid culture (Figure 3A-II). In addition, nuclear staining indicated the presence of tetraploid cells within 3D (Figure 3A-III), contrary to liquid culture where diploid cells were seen (Figure 3A-IV).

Ploidy of mature MK was further investigated 11 days after seeding by flow cytometry assessment of nuclear markers. Cells were recovered from hydrogels by enzymatic

degradation of the pullulan-dextran structure in conditions providing the highest recovery while maintaining cell integrity, as determined by microscopy and analysis of surface markers (data not shown). Ploidy levels determined after selection of mature MK (CD41⁺/CD42⁺ cells) showed a higher ploidy in 3D than in liquid culture (Figure 3B). Cumulative data of three independent experiments showed significantly higher percentages of 4N ploidy classes in 3D mature MK than in liquid-culture mature MK ($30.5\% \pm 2.34\%$ vs $19.1\% \pm 3.45\%$; $p < 0.05$), whereas 2N ploidy was significantly more important in liquid culture than in 3D ($78.1\% \pm 4.04\%$ vs $64.2\% \pm 2.98\%$; $p < 0.05$; Figure 3C). Moreover, within in each ploidy class, CD41⁺/CD42⁺ cells were larger when obtained from 3D than from liquid cultures (data not shown). These results showed that the 3D environment enhanced megakaryocytic development by favoring endomitosis.

MK differentiation in 3D environment

To investigate if 3D structure may provide specific information for efficient *in vitro* megakaryopoiesis, UCB-derived CD34⁺ cell differentiation was analyzed by studying the kinetics of CD34, CD41 and CD42 expression. Figure 4 depicts two sequential phases of MK differentiation. From day 6 to day 15, CD41 and CD42 expression was similar in 3D and liquid culture (Figures 4A-C), with decreasing percentage of non-megakaryocytic cells (CD41⁻/CD42⁻; Figure 4A) and increasing percentages of MK precursors (CD41⁺/CD42⁻; Figure 4B) and of mature MK (CD41⁺/CD42⁺; Figure 4C). In addition, CD41⁺/CD42⁺ cells were larger in 3D than in liquid culture (data not shown). A significant population of CD34^{high} cells with a MFI $> 10^3$ was present on day 9 in 3D (11.3%) but absent in liquid culture. Moreover, CD34⁺ cells remained in 3D while they disappeared in liquid culture (Figure 4D). Interestingly in 3D from day 16 to day 23, a CD34⁺ cell population persisted (Figure 4D), while CD41 and CD42 were expressed by mature MK (Figure 4C). After day 16, no cells survived in liquid culture. These results suggested a prolongation of MK differentiation between day 16 and day 36 in 3D environment. Thus, 3D environment provides a suitable environment for maintenance of hematopoietic progenitor CD34⁺ cells.

To confirm more precisely the influence of 3D on non-megakaryocytic cell differentiation, we studied other hematopoietic lineages (Supplementary Figure 2). In particular, we identified the presence of myelomonocytic cells (CD11b⁺ and CD11b⁺/CD14⁺ cells) and macrophages (CD14⁺ cells) on days 23 and 36 (Supplementary Figure 2A). In addition, cells expressing the

glycophorin A (GpA) erythropoietic marker in 3D persisted during the differentiation between day 6 and day 36 (Supplementary Figure 2B).

In addition, in 3D, bipotent progenitors characterized by $CD41^+/GpA^+$ cells [23] persisted at late time points ($19.8\% \pm 4.8\%$ on day 23 and $15.4\% \pm 8.8\%$ on day 36; Figure 5D). These bipotent progenitors were also identified by studying megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) characterized as $CD34^+/CD41^-/CD45RA^-/CD123^-$ cells, 7 and 23 days after seeding. On day 7, the MEP percentage did not differ between the two conditions ($23.4\% \pm 3.8\%$ in 3D and $20.2\% \pm 4.6\%$ in liquid culture; Figure 5C). On day 23, although decreased compared to day 7, MEP percentage persisted in 3D ($0.4\% \pm 0.1\%$; $p < 0.05$).

CFU-MK potential was assessed in clonogenic assays performed with 3D cells recovered on days 16 and 23 and with liquid-culture cells recovered on day 16 (Figure 5). The number of CFU-MK on day 16 was significantly higher in 3D (556 ± 101) than in liquid culture (224 ± 88 ; $p < 0.05$) (Figure 5A). On day 23, CFU-MK colonies were still observed in 3D, in numbers similar to those seen in liquid culture on day 16 (Figure 5A). As shown in Figure 5B, CFU-MK colonies produced by cells recovered on day 16 were larger in 3D (Panels I and II) than in liquid culture (Panels III and IV), indicating the presence of more immature cells. Thus, mature MK and MK progenitors were maintained in 3D environment.

To support our previous results, we analyzed several transcription factors involved in megakaryopoiesis [24-26]. Therefore, we measured by RT-qPCR different gene expression products at day 9 in both conditions and at days 16 and 23 in 3D (Figure 6). On day 9, the expression of EKLF was increased in 3D in comparison to liquid culture. In contrast, the expression of other genes was not different in both conditions (Figure 6A). In 3D, the expression of EKLF involved in early MK differentiation [24, 25] decreased between day 9 and day 23 whereas the expression of RUNX-1 and NF-E2 involved in late MK differentiation [24-26] significantly increased (RUNX-1: $17.7\% \pm 8\%$ on day 9 and $84.9\% \pm 8.5\%$ on day 23, $p < 0.05$; NF-E2: $31.7\% \pm 16.2\%$ on day 9 and $87\% \pm 6.1\%$ on day 23, $p < 0.05$; Figure 6B). *c-myb*, gene involved in early MK differentiation, also significantly increased between day 9 and day 23 ($71.4\% \pm 9\%$ on day 9 and $97.6\% \pm 9.4\%$ on day 23; $p < 0.05$). In addition, the expression of GATA-1 and FLI-1 genes, involved in MK progenitor and precursor differentiation [24, 25], increased between day 9 and day 16 and then decreased until day 23. The persistence of

genes involved in early MK differentiation such as EKLF and c-myb, at late time point (day 23) was in line with the results of flow cytometry (MEP) and clonogenic assay (CFU-MK). Altogether, the persistence of MK progenitors, MK precursors and mature MK associated with late mRNA expression of several transcription factors provided strong evidence that 3D environment plays a major role on MK differentiation.

MK differentiation from adult cells

Culture of adult bone marrow and peripheral blood CD34⁺ cells in 3D environment (Supplementary Figure 3) yielded results similar to those obtained with cord blood cells (Supplementary Figure 3A). Twelve days after seeding, the percentages of CD34⁺/CD41⁻ cells (non-megakaryocytic cells and cell progenitors) derived from bone marrow cells (Supplementary Figure 3B, middle) were higher in 3D (25.9%) than in liquid culture (16.9%), as observed with cord blood cells (Supplementary Figure 3B, left). Likewise, using peripheral blood cells, these percentages were also higher in 3D than in liquid culture (32.4% ± vs 22.8%; Supplementary Figure 3B, right). Overall, these results showed that 3D environment represents a way to increase the yield of platelet-forming MK derived from both neonatal and adult CD34⁺ cells.

Mature MK cultured in 3D produce more functional platelets in flow conditions than liquid-culture MK

In order to demonstrate that culture in 3D yielded functional platelets, platelet production was studied in flow conditions after recovery of mature and viable MK from 3D on day 16. When exposed to a high shear rate in a microfluidic platform (Supplementary Figure 1), mature MK were able to elongate and to be fragmented into proplatelets and platelets (Figure 7A and Supplementary Video 1). Importantly, more numerous and larger cytoskeletal elongations were observed from 3D than liquid-culture mature MK (Figure 7A and Supplementary Video 2). This increased ability to elongate resulted in a significantly higher percentage of proplatelets/platelets (59% ± 4.2%) produced by 3D mature MK than liquid-culture MK (17.7% ± 2%, p<0.05; Figure 7B). Furthermore, platelet production from 3D mature MK was still observed up to day 36 (data not shown). As previously shown on platelets derived from liquid-culture MK [10], platelets from 3D culture MK were collected at the exit of the microchannels. Following thrombin activation of 3D platelets, filopodia,

lamellipodia and stress fibers formation was observed, indicating that these platelets were fully functional (Figure 8A). In addition, the α IIb glycoprotein, specific of MK and platelets, was expressed on the platelet membrane (Figure 8A). After platelet activation by PAR1-activated peptide, the activated form of integrin α IIb β 3 was observed by PAC1 binding whereas it was absent from non activated platelets (Figure 8B). These results demonstrated that this 3D environment allowed the recovery of fully functional platelets.

Discussion

HSC isolated from hematopoietic tissues differentiate into MK progenitors and then into mature MK, whose function is to terminally release platelets that are essential for bleeding arrest. To improve *in vitro* platelet production, several attempts are currently developed [9, 11, 16]. In this study, we demonstrate that the spatial organization conferred by 3D environment sustains a prolonged and improved MK differentiation, in line with the production of functional platelets.

We demonstrate by structural, functional and transcriptional analyses that the 3D environment provides progenitor commitment persistence and differentiation, increasing the number of both MK precursors and mature MK, improving the production of functional platelet. Other groups have demonstrated that both CD34⁺ progenitor cell maintenance and expansion were improved by using 3D scaffolds with pore sizes close to 200 μm [3, 4, 27]. Polysaccharide-based 3D hydrogels with an appropriate composition, structure and elasticity may mimic matrix properties and the bone marrow micro-environment naturally adapted to cell niches [28]. Indeed, porous hydrogels composed of pullulan and dextran displayed several characteristics suitable for studying HSC proliferation and MK differentiation, including their large pore size and high porosity, and also their ability to be enzymatically hydrolyzed [29]. In pullulan/dextran 3D structures, MK progenitors are accommodated inside the large pores favoring cell proximity (Figure 1). This confinement could also concentrate soluble factors such as SCF and TPO favoring CD34⁺ progenitor cell proliferation and MK differentiation. TPO is important not only for HSC and hematopoietic progenitor cell maintenance but also for MK differentiation (reviewed in Kiel and Morrison [30]). In 3D environment, TPO may exert both paracrine and autocrine effects, due to its increased local concentrations [31]. Indeed, cross-linked hydrogels have been shown to bind growth factors and cytokines through ionic interactions with phosphate residues [32]. This confinement was specific to pullulan/dextran 3D hydrogels since we also established that HSC incorporation and MK differentiation were not supported by two other scaffolds : fucoidan cross-linked hydrogels, previously shown to provide proangiogenic activity of endothelial progenitor cells [33], or a fibrin-based matrix shown to enhance HSC proliferation [3] (data not shown). In addition, time-dependent expression of transcription factors in 3D hydrogels confirmed MK

progenitor and precursor persistence. The expression of EKLF, c-myb, GATA-1 or FLI-1, involved in early MK differentiation and known to disappear in time in liquid culture [24, 25], persisted in late time points in 3D. The second effect of 3D environment was to provide a proliferative advantage of CD34⁺ cells leading to increased numbers of mature MK and to the production of functional platelets. This sustained HSC differentiation into MK could be mediated by juxtacrine cellular signaling such as the Notch pathways, by balancing proliferation and differentiation [22, 34, 35]. Preliminary results based on γ -secretase inhibition by DAPT suggested a Notch pathway implication in the 3D environment (data not shown).

In addition to the specific effect of 3D environment on MK differentiation, our data show that 3D structures improve not only MK differentiation but also erythropoietic and myelomonocytic differentiation. Indeed, CD34⁺ cell commitment in other lineages was observed in 3D, as shown by changes of myelomonocytic CD11b and CD14 markers [36, 37] and erythropoietic GpA marker [23]; the latter was in line with the persistence of EKLF transcription factor involved in megakaryocyte-erythroid commitment [25]. In addition to endogenously secreted cytokines and growth factors, this effect could be related to SCF persistence within the pores, known to induce CD34⁺ cell commitment in all hematopoietic lineages [38].

The role of polyploidy for increasing platelet formation has been suggested but it still remains unclear [39]. A gene profiling approach established that polyploidization and megakaryocyte differentiation were interrelated in particular *via* increased cytoplasm volume [40]. However so far, platelet formation was not addressed in these studies. Our results indicate that 3D mature MK sustain platelet production until day 36 compared to day 16 in liquid culture. Indeed, in a step-by-step comparison of MK differentiation in both conditions, our data clearly establish the influence of MK polyploidization during their maturation, on platelet production. Interestingly, the high proportion of released platelets in 3D was consistent with several markers related to the maturation of MK. Indeed, we observed larger MK as well as longer elongations of MK cytoskeleton with increased number of proplatelets in flow conditions. In addition, we observed an increased ploidy of UCB- and peripheral blood- mature MK (Supplementary Figure 3C). This shift towards 4N and 8N in 3D

suggests that the 3D structure may regulate not only HSC differentiation but also MK ploidy. A link between polyploidization and terminal MK differentiation has been demonstrated involving, for instance, non-muscle myosin IIB heavy chain repression and inhibition of Rho kinase signaling [41, 42]. In addition, the present work provides evidence for $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ inside-out and outside-in signaling of platelets. 3D platelets spread over fibrinogen matrix and upon activation with thrombin, a physiological agonist, reorganized their F-actin cytoskeleton as shown by the formation of filopodia, lamellipodia and stress fiber [43]. Furthermore, upon activation with the PAR1-activated peptide, the integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ modified its conformation and was stained by PAC1, an antibody binding only to activated platelets [44-47]. Most studies of platelet production from MK were focused on MK migration [9, 11, 13, 16]. Recently, alginate/matrigel gels were shown to accommodate mature MK but proplatelet formation was studied in a microfluidic platform *in vitro* without studying the influence of 3D environment on platelet formation [9]. In contrast, our model allows the investigation of 3D environment on both MK differentiation from HSC and platelet production in an *in vitro* microfluidic platform. Thus, this study demonstrates for the first time the effects of 3D environment on MK differentiation and in particular on the improvement of enlargement of mature MK leading to increase the production of functional platelets. Furthermore, 3D environment is mainly good to keep a continuous supply of CD34 cells to undergo MK differentiation.

Collectively, 3D environment promotes cell clustering, sustains and improves MK differentiation into fully mature MK leading to increase the production of functional platelets. This study provides the first direct evidence that spatial organization and biological cues synergize for efficient MK and platelet production. This 3D environment constitutes a powerful tool for unraveling the physiological mechanisms of megakaryopoiesis and thrombopoiesis in the bone marrow environment. Recent studies showed the feasibility of expanding human induced pluripotent stem cells (iPSCs) into MK underline potential therapeutic applications for generation of platelets [48-50]. Thus, even if a long step forward is necessary between this development and the ultimate goal to provide an alternative to blood-derived platelets, a combination of 3D structures with iPSCs might be of major interest for future therapeutic use.

Acknowledgments

The authors thank the Cell Therapy Unit of Saint Louis Hospital (Paris) for providing blood samples. This study is approved by the ethics committee/institutional review board “Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Cord Blood Bank, Saint-Louis Hospital, Paris, France”; the mothers give their written informed consent. We also thank Muriel Andrieu and Karine Labroquère of the Cochin Cytometry and Immunobiology Facility for the use of the BD CANTO 2 and BD LSR II cytometers, Rachida Aid for providing hydrogels and enzymes, and Samira Benadda and Fabien Legrand for the use of the Leica microscope system (IFR Claude Bernard, Paris). We thank Bruno Saubaméa of the Molecular and Cellular Imagery Platform for Leica transmission optical microscopy. We thank Isabelle Dusanter-Fourt and Evelyne Lauret (UMR_S 1016 and University Paris Descartes) for helpful discussions and critical reading of the manuscript. These studies were made available through the funding from DIM Stem Pole, INSERM, Universities Paris Descartes, Paris Diderot, Paris Nord and grants from ANR (ANR-09-EBIO-001-01; ANR-09-EBIO-001-09; ANR-10-EMMA-009-01; ANR-11-BSV-010-01).

Authorship Contributions and Disclosure of Conflicts of Interest

DB, DL, CLV and SPC designed the research. APN, SPC, SG, AK and SMD performed experiments and analyzed the data; DB, CLV, DL, AK and APN wrote the manuscript. SMD, DL and CLV are co-founders and shareholders of IMMATIS SAS.

References

1. Cabrita GJ, Ferreira BS, da Silva CL, Goncalves R, Almeida-Porada G et al. (2003) Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. *Trends Biotechnol* 21(5): 233-240.
2. Liu H, Roy K (2005) Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells. *Tissue Eng* 11(1-2): 319-330.
3. Ventura Ferreira MS, Jahnhen-Dechent W, Labude N, Bovi M, Hieronymus T et al. (2012) Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. *Biomaterials* 33(29): 6987-6997.
4. Raic A, Rodling L, Kalbacher H, Lee-Thedieck C (2014) Biomimetic macroporous PEG hydrogels as 3D scaffolds for the multiplication of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials* 35(3): 929-940.
5. Machlus KR, Italiano JE, Jr. (2013) The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 201(6): 785-796.
6. Kaushansky K (2005) Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci* 1044: 139-141.
7. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F et al. (2004) Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 10(1): 64-71.
8. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T et al. (2007) Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317(5845): 1767-1770.
9. Thon JN, Mazutis L, Wu S, Sylman JL, Ehrlicher A et al. (2014) Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* 124: 1857-1867.
10. Dunois-Larde C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Borde E et al. (2009) Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* 114(9): 1875-1883.
11. Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, Endo H, Dohda T et al. (2013) Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp Hematol* 41(8): 742-748.

12. Pallotta I, Lovett M, Rice W, Kaplan DL, Balduini A (2009) Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis. *PLoS One* 4(12): e8359.
13. Pallotta I, Lovett M, Kaplan DL, Balduini A (2011) Three-dimensional system for the in vitro study of megakaryocytes and functional platelet production using silk-based vascular tubes. *Tissue Eng Part C Methods* 17(12): 1223-1232.
14. Reems JA, Pineault N, Sun S (2010) In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art. *Transfus Med Rev* 24(1): 33-43.
15. Malara A, Gruppi C, Pallotta I, Spedden E, Tenni R et al. (2011) Extracellular matrix structure and nano-mechanics determine megakaryocyte function. *Blood* 118(16): 4449-4453.
16. Sullenbarger B, Bahng JH, Gruner R, Kotov N, Lasky LC (2009) Prolonged continuous in vitro human platelet production using three-dimensional scaffolds. *Exp Hematol* 37(1): 101-110.
17. Lavergne M, Derkaoui M, Delmau C, Letourneur D, Uzan G et al. (2012) Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells. *Macromol Biosci* 12(7): 901-10.
18. Hamidi S, Letourneur D, Aid-Launais R, Di Stefano A, Vainchenker W et al. (2014) Fucoidan Promotes Early Step of Cardiac Differentiation from Human Embryonic Stem Cells and Long-Term Maintenance of Beating Areas. *Tissue Eng Part A* 20(7-8): 1285-1294.
19. Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D (2010) Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater* 6(9): 3640-3648.
20. Le Visage C, Gournay O, Benguirat N, Hamidi S, Chaussumier L et al. (2012) Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection. *Tissue Eng Part A* 18(1-2): 35-44.
21. Robert A, Cortin V, Garnier A, Pineault N (2012) Megakaryocyte and platelet production from human cord blood stem cells. *Methods Mol Biol* 788: 219-247.
22. Poirault-Chassac S, Six E, Catelain C, Lavergne M, Villeval JL et al. (2010) Notch/Delta4 signaling inhibits human megakaryocytic terminal differentiation. *Blood* 116(25): 5670-5678.

23. Klimchenko O, Mori M, Distefano A, Langlois T, Larbret F et al. (2009) A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* 114(8): 1506-1517.
24. Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W (2007) From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1: 318-327.
25. Dore LC, Crispino JD (2011) Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood* 118(2): 231-239.
26. Tijssen MR, Ghevaert C (2013) Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J Thromb Haemost* 11(4): 593-604.
27. Tiwari A, Tursky ML, Kirkland MA, Pande G (2014) Expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells on decellularized matrix scaffolds. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 28: 1C 15 1-1C 15 15.
28. Robert D, Fayol D, Le Visage C, Frasca G, Brule S et al. (2010) Magnetic micro-manipulations to probe the local physical properties of porous scaffolds and to confine stem cells. *Biomaterials* 31(7): 1586-1595.
29. Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P et al. (2011) Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 96(3): 535-542.
30. Kiel MJ, Morrison SJ (2008) Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 8(4): 290-301.
31. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z et al. (2001) Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97(10): 3075-3085.
32. Purnama A, Aid-Launais R, Haddad O, Maire M, Mantovani D et al. (2013) Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv and Transl Res* 1-11.
33. Thebaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D et al. (2007) Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 18(2): 339-345.

34. Cortegano I, Melgar-Rojas P, Luna-Zurita L, Siguero-Alvarez M, Marcos MA et al. (2014) Notch1 regulates progenitor cell proliferation and differentiation during mouse yolk sac hematopoiesis. *Cell Death Differ* 21(7): 1081-1094.
35. Mercher T, Cornejo MG, Sears C, Kindler T, Moore SA et al. (2008) Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3): 314-326.
36. Appleby LJ, Nausch N, Midzi N, Mduluzi T, Allen JE et al. (2013) Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol Lett* 152(1): 32-41.
37. Thacker E, Summerfield A, McCullough K, Ezquerro A, Dominguez J et al. (2001) Summary of workshop findings for porcine myelomonocytic markers. *Vet Immunol Immunopathol* 80(1-2): 93-109.
38. McNiece IK, Briddell RA (1995) Stem cell factor. *J Leukoc Biol* 58(1): 14-22.
39. Zimmet J, Ravid K (2000) Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol* 28(1): 3-16.
40. Raslova H, Kauffmann A, Sekkai D, Ripoché H, Larbret F et al. (2007) Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood* 109(8): 3225-3234.
41. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, Legrand C, Pan J et al. (2012) RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun* 3: 717.
42. Chang Y, Aurade F, Larbret F, Zhang Y, Le Couedic JP et al. (2007) Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood* 109(10): 4229-36.
43. Hartwig JH (1992) Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol* 118(6): 1421-1442.
44. Lu Q, Malinauskas RA (2011) Comparison of two platelet activation markers using flow cytometry after in vitro shear stress exposure of whole human blood. *Artif Organs* 35(2): 137-144.
45. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF (1985) Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 260(20): 11107-11114.
46. Jirouskova M, Jaiswal JK, Collier BS (2007) Ligand density dramatically affects integrin alpha IIb beta 3-mediated platelet signaling and spreading. *Blood* 109(12): 5260-5269.

47. Mazharian A, Roger S, Berrou E, Adam F, Kauskot A et al. (2007) Protease-activating receptor-4 induces full platelet spreading on a fibrinogen matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca²⁺ mobilization. *J Biol Chem* 282(8): 5478-5487.
48. Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H et al. (2014) Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 14(4): 535-548.
49. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R et al. (2010) Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 207(13): 2817-2830.
50. Takayama N, Eto K (2012) Pluripotent stem cells reveal the developmental biology of human megakaryocytes and provide a source of platelets for clinical application. *Cell Mol Life Sci* 69(20): 3419-3428.
51. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25(4): 402-408.

Figure legends

Figure 1: Cell morphology in 3D and in liquid culture

(A) Cell proliferation 12 days after cell seeding, relative to the initial cell number/scaffold. **(B)** Cell proliferation and differentiation in 3D between day 2 and day 36. **(C)** Cell proliferation and differentiation in liquid culture on days 2, 12 and 16. All images were acquired using the Axiovert 135 transmission optical microscope with 20X Plasic® magnification. Scale bar = 20 μm .

Figure 2: Comparison of cell proliferation in 3D environment and in liquid culture

Histogram representation of cell expansion relative to day 0 (300 000 cells plated) at different days of culture in 3D (black bars) and liquid culture (white bars). Proliferation was determined by cell imaging (Histolab), rather than by colorimetric assay, as polysaccharides produced a high background in the pNPP and MTT assays. Data are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments. In 3D, late time points (D23 and D36) were compared to day 12. Some cells exit from hydrogel pores, accumulated at the bottom of the wells (see Figure 1A) and therefore dismissed from the counts. Thus, only cells visible inside the pores of the 3D hydrogel were analyzed.

Figure 3: In situ characterization of differentiation markers and ploidy of mature MK

(A) Immunofluorescence staining of CD41 (green) and CD42b (red) cells growing inside pores of 3D (I) and in liquid culture (II). Nuclear staining of cell grown in 3D (III) and liquid culture (IV) with YOYO-1 marker (white). All images were acquired 12 days after seeding using the Leica 510 confocal microscope with 40X Plan-NeoFluar objective lens. Scale bar = 10 μm . **(B)** Representative flow cytometry analysis of a ploidy study after CD41, CD42b (to select mature MK) and Hoechst staining in 3D and liquid culture, 11 days after seeding. **(C)** Ploidy analysis by flow cytometry of CD41⁺/CD42⁺ UCB cells in 3D (black bars) compared to liquid culture (white bars), 11 days after seeding. Data are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments. *p<0.05. Abbreviation: UCB, umbilical cord blood.

Figure 4: Characterization of MK differentiation as a function of time

(A-C) Flow cytometry analysis of non-megakaryocytic cells ($CD41^-/CD42^-$), MK precursors ($CD41^+/CD42^-$) and mature MK ($CD41^+/CD42^+$) in 3D (closed circles, dotted lines) and liquid culture (open squares, full lines) between day 6 and day 36. Data are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$. In 3D, late time points (D23 and D36) were compared to day 6. **(D)** CD41/CD34 dot plots of one representative experiment in 3D and liquid culture on days 9, 16 and 23.

Figure 5: Characterization of CFU-MK and MEP

(A) Histogram representation of CFU-MK numbers per 25 000 cells seeded in 3D (black bars) and liquid culture (white bars) on days 16 and 23. Data are means $\pm$ SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$. In 3D, day 23 was compared to day 16. **(B)** Representative images of CFU-MK sizes in 3D (I and II) and liquid culture (III and IV) on day 16. Images were acquired using the Leica DM40000 B transmission optical microscope with 40X and 63X objectives. Bar = 10 μ m. **(C)** Flow cytometry analysis of MEP in 3D (black bars) and liquid culture (white bars) on days 7 and 23. Data are means $\pm$ SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ between day 7 and day 23 in 3D. **(D)** Flow cytometry analysis of $CD41^+/GpA^+$ cells in 3D (closed circles, dotted lines) and liquid culture (open squares, full lines) between day 7 and day 36. Data are means $\pm$ SEM of 4 independent experiments. In 3D, late time points (D23 and D36) were compared to day 7. Abbreviations: CFU-MK, colony forming unit-megakaryocyte; MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors.

Figure 6: Transcriptional analysis of different genes involved in MK differentiation

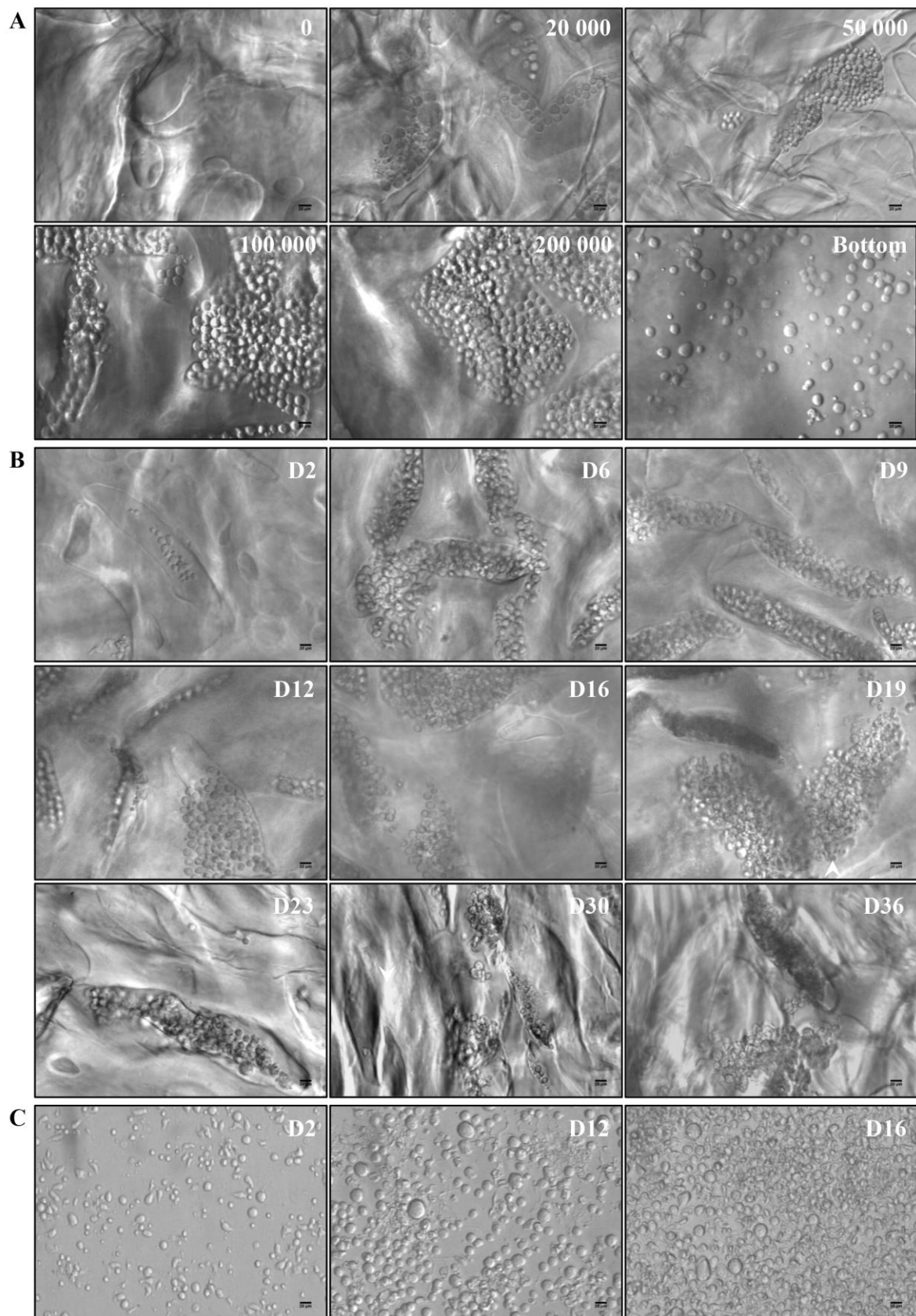
(A) Histogram representation of the expression levels of various genes determined by RT-qPCR in 3D (black bars) and liquid-culture (white bars) cells at day 9. **(B)** Histogram representation of time-dependent expression levels of various genes determined by RT-qPCR in 3D cells at days 9 (white bars), 16 (gray bars) and 23 (white bars). mRNA percentage of each gene was normalized to that of HPRT mRNA percentage and calibrated via the $\Delta\Delta C_t$ method [51]. Data are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$. In 3D, days 16 and 23 were compared to day 9. Commercial references of the primer mixes used for qPCR are detailed in Supplementary Table I.

Figure 7: MK deformation and platelet production in flow conditions

(A) Stages of MK deformations and reorganization into proplatelets and platelets at 20 minutes of perfusion in 3D (left panel) and in liquid culture (right panel) using Bioflux microfluidic platform to increase platelet formation from mature MK.[10] Images were acquired using the Axiovert 135 transmission optical microscope with 20X Plasdics[®] magnification. Bar = 20 μ m. **(B)** Histogram representation of proplatelet/platelet numbers as a percentage of total adherent cells per field recovered from mature MK obtained in 3D (black bars) and liquid culture (white bars). Data are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments.*p<0.05.

Figure 8: Functional properties of platelets collected at the exit of the microchannels

(A) Representative images of CD41 (green)/F-actin (red) staining on platelets collected after perfusion of 3D mature MK in microfluidic platform. Filopodia (arrowhead) and stress fibers (arrow) are visible on activated platelets. **(B)** Representative images of PAC1 staining of integrin α IIb β 3 activated (green) and of F-actin staining (red) on platelets collected after perfusion of 3D mature MK in microfluidic platform. Lamellipodia (asterisk) are visible on activated platelets. Images were acquired using the Axio Observer D1 fluorescence optical microscope with 63X Plasdics[®] magnification. Bar = 2 μ m.

**Figure 1**

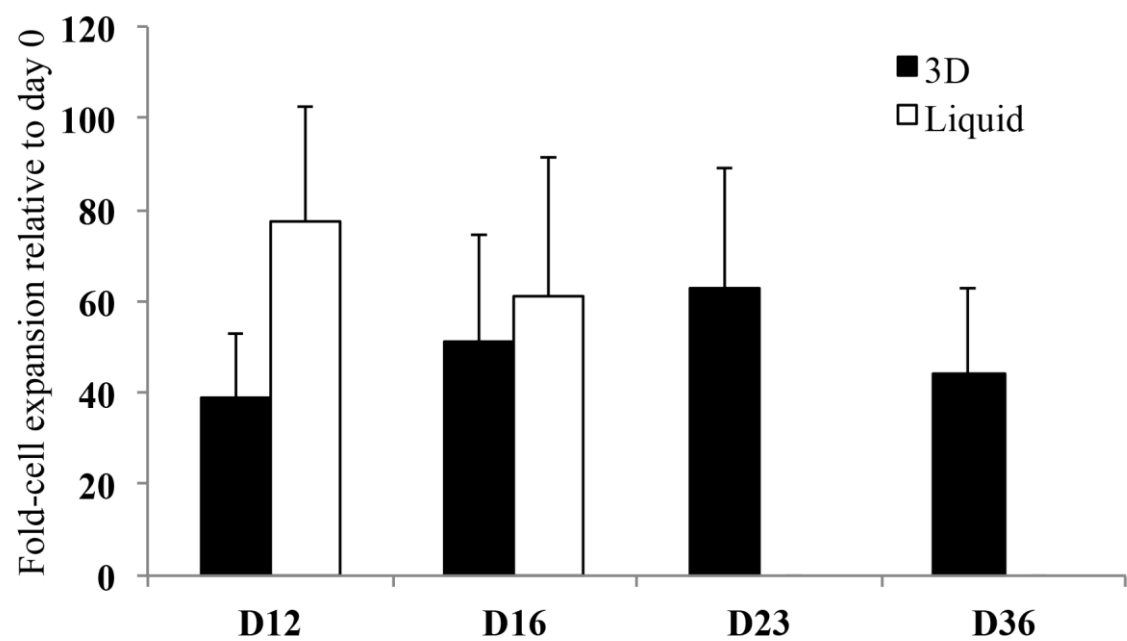


Figure 2

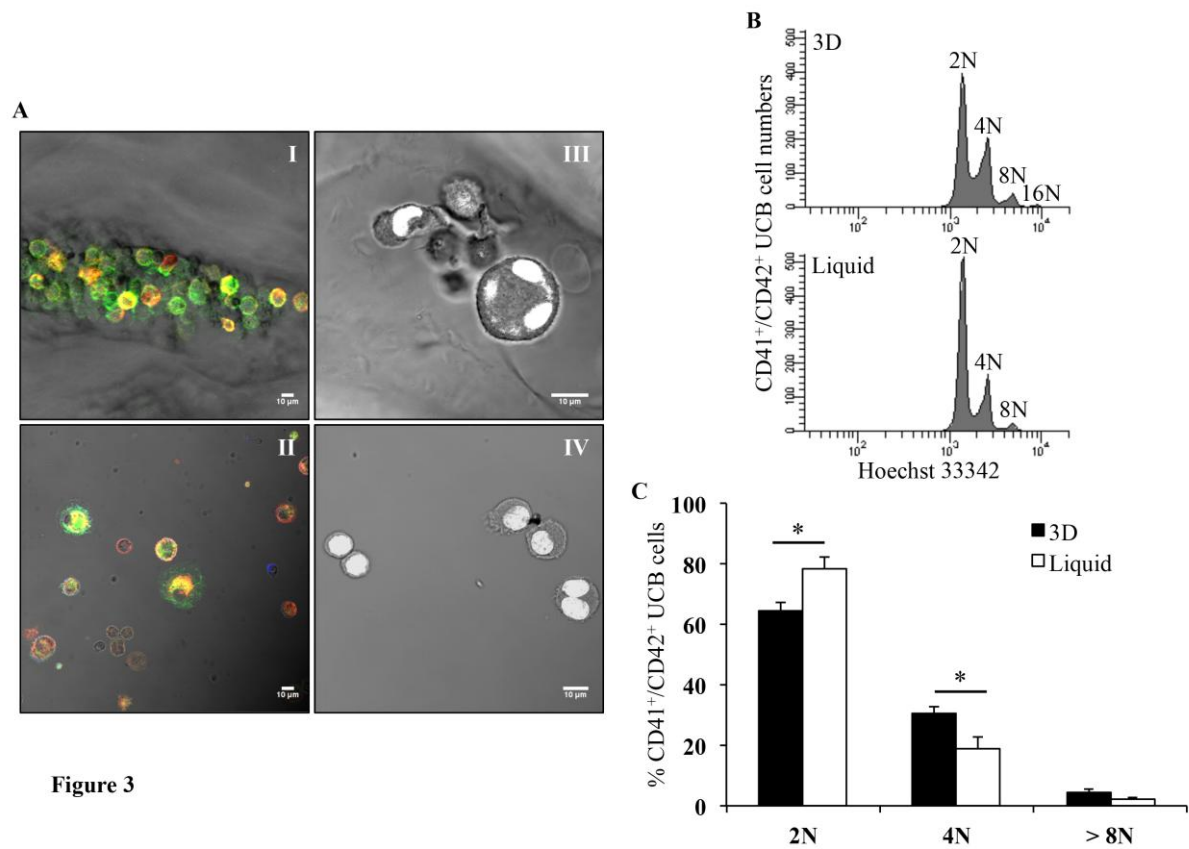


Figure 3

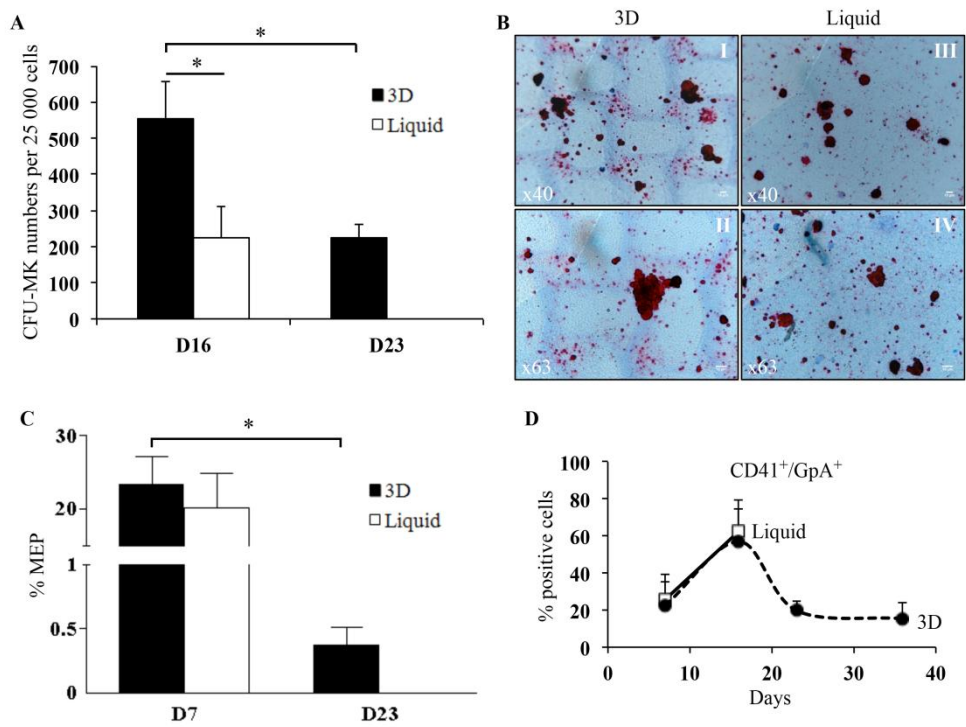
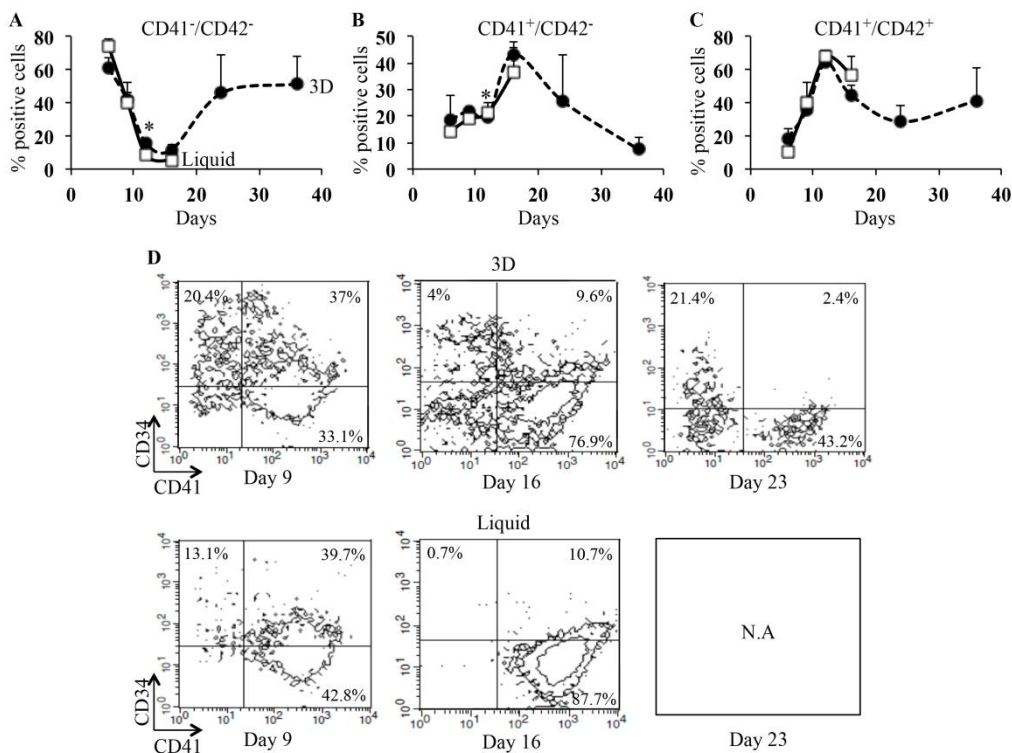


Figure 5

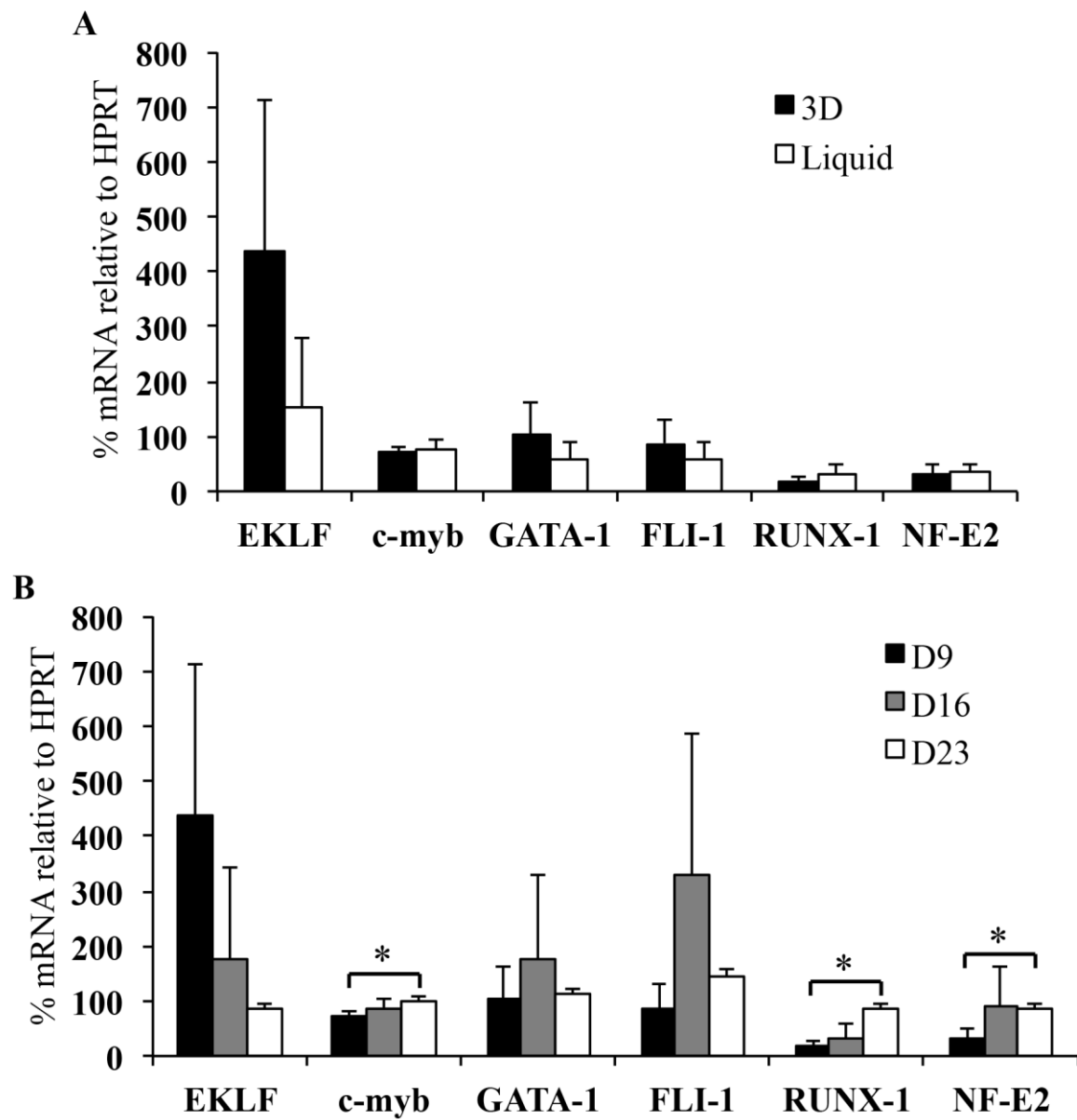


Figure 6

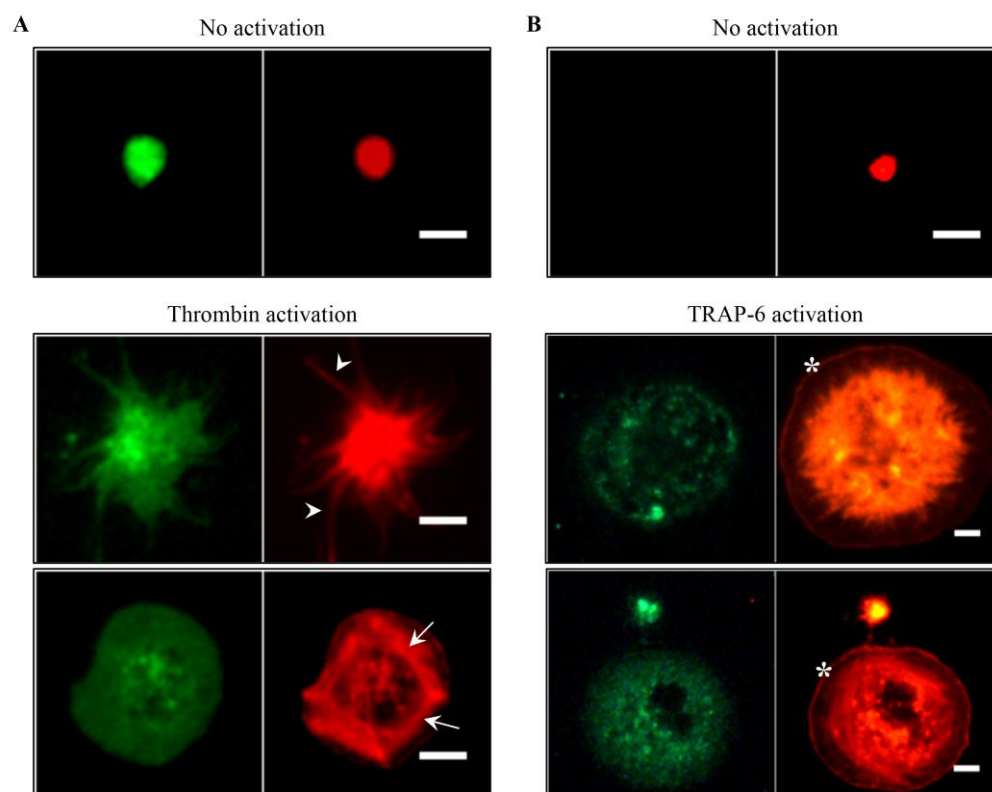
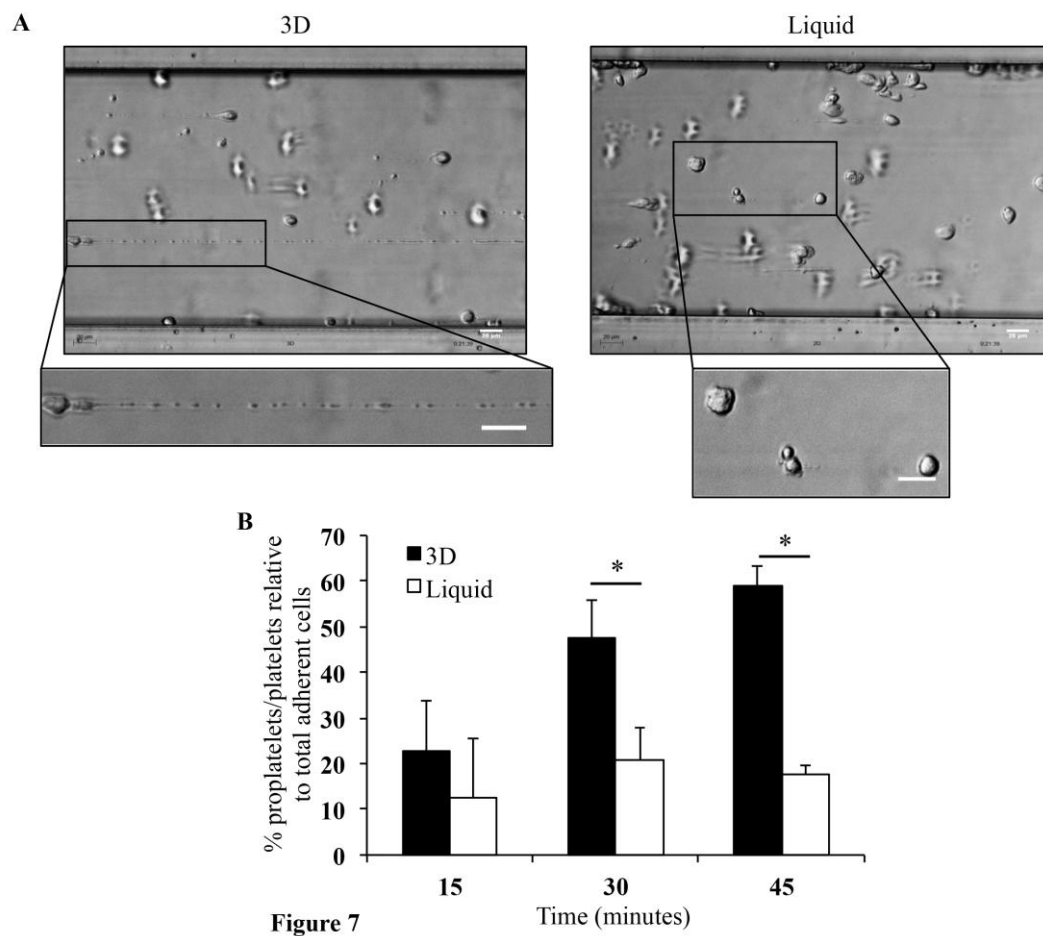


Figure 8

Three-dimensional environment sustains hematopoietic stem cell differentiation into platelet-producing megakaryocytes

Audrey Pietrzyk-Nivau¹, Sonia Poirault-Chassac¹, Sophie Gandrille^{1,2}, Sidi-Mohammed Derkaoui³, Alexandre Kauskot¹, Didier Letourneur³, Catherine Le Visage³ and Dominique Baruch¹

¹INSERM, UMR-S 1140, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

²AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Department of Hematology, Paris, France

³INSERM, UMR-S 1148, University Paris Diderot, Paris; University Paris Nord, Villetaneuse, Sorbonne Paris Cité, France

ONLINE SUPPLEMENTAL DATA

Short title

Increased 3D megakaryocyte and platelet production

Corresponding author

Dr Dominique Baruch

INSERM UMR-S 1140

4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Mail: dominique.baruch@parisdescartes.fr

Tel: 33 1 53 73 99 38 / Fax: 33 1 44 07 17 72

Supplemental Materials and Methods

Cell culture conditions

In 3D hydrogels and liquid cultures, CD34⁺ cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ in complete medium: Iscove modified Dulbecco's medium (IMDM; Gibco-Invitrogen, Saint-Aubin, France) supplemented with 15% BIT 9500 serum substitute (Stem Cells Technologies, Grenoble, France), α -monothioglycerol (Sigma-Aldrich) and liposomes (phosphatidyl-choline, cholesterol and oleic acid; Sigma-Aldrich) [1]. Human recombinant stem cell factor (SCF, 20 ng/mL; Miltenyi Biotec) and the thrombopoietin peptide agonist AF13948 (TPO, 50 nM) [2] were added once on day 0 to the culture medium, followed by 20 nM TPO alone without any addition of SCF thereafter.

Flow cytometry

Expression of the CD34, CD41 and CD42 differentiation markers was assessed between day 6 and day 36 by using a Calibur flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). 3D cells and liquid-culture cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human CD41a (α IIb), R-phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human CD42b (GPIIb α) (both from Beckman Coulter, Villepinte, France) and allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-human CD34 (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) for 30 minutes at 4°C. Controls were prepared with FITC mouse IgG₁, PE mouse IgG₁ (both from Beckman Coulter) and APC mouse IgG₁ (BD Pharmingen). In some experiments, cell viability was assessed with 7-aminoactinomycin D (7-AAD; BD Pharmingen). Results were analyzed with Cell Quest Pro software (BD Biosciences).

Expression of CD11b, CD14 and CD41 differentiation markers was assessed to characterize myelomonocytic populations. 3D cells and liquid-culture cells were incubated with FITC-conjugated mouse anti-human CD14 (BD Pharmingen), PE-conjugated mouse anti-human CD41a and PE-Cy7-conjugated mouse anti-human CD11b (BD Pharmingen). Controls were prepared with FITC mouse IgG_{2b} (BD Pharmingen), PE mouse IgG₁ and PE-Cy7 mouse IgG₁ (BD Pharmingen). Expression of CD41 and glycophorin A (GpA) differentiation markers was assessed to characterize erythropoietic populations. 3D cells and liquid-culture cells were incubated with PE-conjugated mouse anti-human CD41a and APC-conjugated mouse anti-

human GpA (BD Pharmingen). Controls were prepared with PE mouse IgG₁ and APC mouse IgG_{2b} (BD Pharmingen). In some experiments, cell viability was assessed with DAPI (100 µg/mL; Invitrogen). Acquisitions were made with a BD CANTO 2 flow cytometer and results were analyzed with DIVA software (BD Biosciences).

Megakaryocyte erythroid progenitors (MEP) population was characterized 7 and 23 days after seeding. 3D cells and liquid-culture cells were incubated with FITC-conjugated mouse anti-human CD41a, PE-conjugated mouse anti-human CD45RA, PE-cyanin 7 (PE-Cy7)-conjugated mouse anti-human CD123 (both from BD Pharmingen) and APC-conjugated mouse anti-human CD34 for 30 minutes at 4°C. Controls were prepared with FITC mouse IgG₁, PE mouse IgG_{2b}, PE-Cy7 mouse IgG_{2a} and APC mouse IgG₁ (BD Pharmingen). In some experiments, cell viability was assessed with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100 µg/mL). Acquisitions were made with a BD CANTO 2 flow cytometer and results were analyzed with DIVA software.

Ploidy of UCB or peripheral blood CD41⁺/CD42⁺ cells was studied 11 days after seeding. 3D cells and liquid-culture cells were incubated for 1 hour at 37°C with Hoechst medium (Hoechst 33342, 1 µg/mL; Molecular Probes, Saint-Aubin, France), FITC-conjugated mouse anti-human CD41a and PE-conjugated mouse anti-human CD42b to select a homogenous population of mature MK. Acquisitions were made with a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Hoechst staining was analyzed at an emission wavelength of 450 nm and results were analyzed with DIVA software.

Confocal immunofluorescence microscopy

In situ cell organization was analyzed 12 days after seeding, without enzymatic treatment. Cells in liquid culture were allowed to attach to L-polylysine coated plates (Thermo-Scientific, Brebières, France) for 20 minutes at 37°C and then fixed with 4% paraformaldehyde (PFA; Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), while cells in 3D were fixed *in situ*. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and treated with RNase (10 µg/mL; Sigma-Aldrich). Cells were then incubated with YOYO-1 (Cyanin Dimer Y3601, 0.2 µM; Invitrogen) for 1 h at room temperature or with FITC-conjugated mouse anti-human CD41a and PE-conjugated mouse anti-human anti-CD42b overnight at 4°C. Cells were

observed with a confocal microscope (Leica System Microscope 510; Zeiss, Gottingen, Germany) equipped with a 40X Plan-NeoFluar objective lens. YOYO-1 and FITC were excited at 491 nm and 488 nm respectively, and their fluorescent emissions were selected with a 505-530 nm bandpass filter. PE was excited at 543 nm and its fluorescence emission was selected with a 560-615 nm bandpass filter. Results were analyzed with LSM Image Browser software (Zeiss).

Clonogenic assay

Colony-forming unit (CFU)-MK potential was assessed using the MegaCult[®]-Collagen kit (Stem Cell Technologies). Sixteen and twenty-three days after seeding, 25 000 cells were plated in wells containing semi-solid MegaCult[®]-C medium. Cells were cultured in the presence of cytokines (50 nM TPO and 20 ng/mL SCF) for 10 days and colonies were quantified as recommended by the manufacturer, using a transmission optical microscope (Leica DM4000 B; Leica Microsystems, Heerbrugg, Germany) equipped with a camera (Leica DFC 420; Leica Microsystems).

RNA extraction and real-time qRT-PCR

Total RNAs were extracted with Trizol (Invitrogen) and extended solvent purification as previously reported [3] and complementary DNAs were synthesized using a commercially available kit (RT core kit; Eurogentec, Angers, France). The expression levels of erythroid Krüppel-like factor (EKLF), c-myb, globin transcription factor 1 (GATA-1), Friend leukemia integration-1 (FLI-1), acute myeloid leukemia-1 (AML-1) and nuclear factor (NF)-E2 were assessed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). All genes were normalized to the housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT). Probes for genes of interest were labeled at the 5'-end with cefamandole (FAM) and those for housekeeping gene with VIC. At the 3'-end, probes were labeled with tetramethylrhodamine (TAMRA; Applied Biosystems, Life Technologies, Saint Aubin, France). Commercial references of the primer mixes used for qPCR are detailed in the Supplementary Table I. PCR amplification was carried out for 10 minutes at 95°C followed by 50 cycles (15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C) in 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). The mRNA expressions were quantified via the $\Delta\Delta C_t$ method [4] and expressed in percentage compared with control.

Platelet production in flow assay

Cell suspensions were flown in microchannels by means of a pressure controller integrated in a BioFlux200[®] microfluidic platform (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA) [5, 6]. Microchannels were rinsed with 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) perfused at a shear stress of 20 dyn/cm² for 15 s, and then coated with human VWF (40 µg/mL; Wilfactin, Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, Lille, France) by perfusion at 20 dyn/cm² for 15 s and incubation in the absence of flow overnight at 4°C, before a final rinse with PBS for 10 min at 20 dyn/cm². Mature and viable MK in complete medium with a viscosity of 1 cP (0.98-1.05 cP) were perfused at 18 dyn/cm² for 45 min in the microchannel (Supplementary Figure 1). The chamber was then rinsed with PBS containing 1.25 mM EDTA for 30 min at 18 dyn/cm². Real-time platelet production was recorded at 20X Plasmic[®] magnification using a transmission optical microscope (Axiovert 135; Zeiss, Le Pecq, France) connected with a CCD camera (Q-click Imaging). Proplatelets and platelets were counted in the microchannel by using Histolab software (Microvision Instruments, Evry, France) [2].

Platelet activation and spreading

Platelet-forming MK and platelet suspensions were collected at the outlet of the flow chamber and centrifuged for 10 min at 1240 *g* (Supplementary Figure 1). The pellet was deposited on BSA density gradient and centrifuged for 15 min at 80 *g* to separate mature MK from platelets [7]. Fractions containing platelets were centrifuged for 10 min at 1240 *g*. Platelets were suspended in Hepes-Tyrode buffer [8] containing 2 mM CaCl₂. On the one hand, platelet suspensions were either not activated or activated with thrombin (1 U/mL; Sigma-Aldrich) for 10 minutes of preincubation. Platelets were then added to fibrinogen (200 µg/mL; Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France)-coated glass ibidi chamber slides (Biovalley, Marne-La-Vallée, France). CD41a/phalloidin staining was then performed as previously described [2]. The coverslips were mounted in DABCO mounting solution (Dako, Trappes, France). CD41/F-actin staining was observed at 63X Plasmic[®] magnification using a fluorescence optical microscope (Axio Observer D1; Zeiss; Supplementary Figure 1). On the other hand, platelet suspensions were either not activated or activated with PAR1-activated peptide (TRAP-6, 10 µM; Bachem, Bubendorf, Switzerland) and directly added to fibrinogen (20 µg/mL)-coated glass ibidi chamber slides. Platelets were then incubated with FITC-conjugated mouse anti-human PAC-1 (BD Biosciences) for 10 minutes to stain the activated

integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$, fixed with 4% PFA, permeabilized with 0.1% Triton-X100 and incubated with AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse IgM (BD Biosciences) for 45 minutes [9, 10]. Finally, platelets were incubated with AlexaFluor 546-phalloidin (Invitrogen) for 20 minutes to stain F-actin. The coverslips were mounted in DABCO mounting solution and activated integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ /F-actin staining was observed at 63X Plasdic[®] magnification with Axio Observer D1 (Supplementary Figure 1).

Statistic data analysis

Results are expressed as means of independent experiments $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical significance was evaluated with Mann-Whitney test, using StatView statistical software. p values <0.05 were considered significant.

Supplemental Table

Supplementary Table I: Commercial references of the primer mixes used for qPCR

<i>Genes</i>	<i>Assay ID Human</i>
<i>EKLF</i>	Hs00610592_m1
<i>c-myb</i>	Hs00920556_m1
<i>GATA-1</i>	Hs01085823_m1
<i>FLI-1</i>	Hs00956711_m1
<i>RUNX-1</i>	Hs00231079_m1
<i>NF-E2</i>	Hs0023251_m1
<i>HPRT</i>	Hs02800695_m1

Supplemental Figures

Supplementary Figure 1: Schematic outline of steps from 3D cell culture, MK differentiation, mature MK extraction from hydrogels and perfusion, and platelet production

Step 1: CD34⁺ cells were seeded inside 3D pores at day 0 in presence of 50 nM TPO and 20 ng/mL SCF.

Steps 2 and 3: On days 7, 9 and 12, the disks were transferred in new wells and fresh medium containing 20 nM TPO was added.

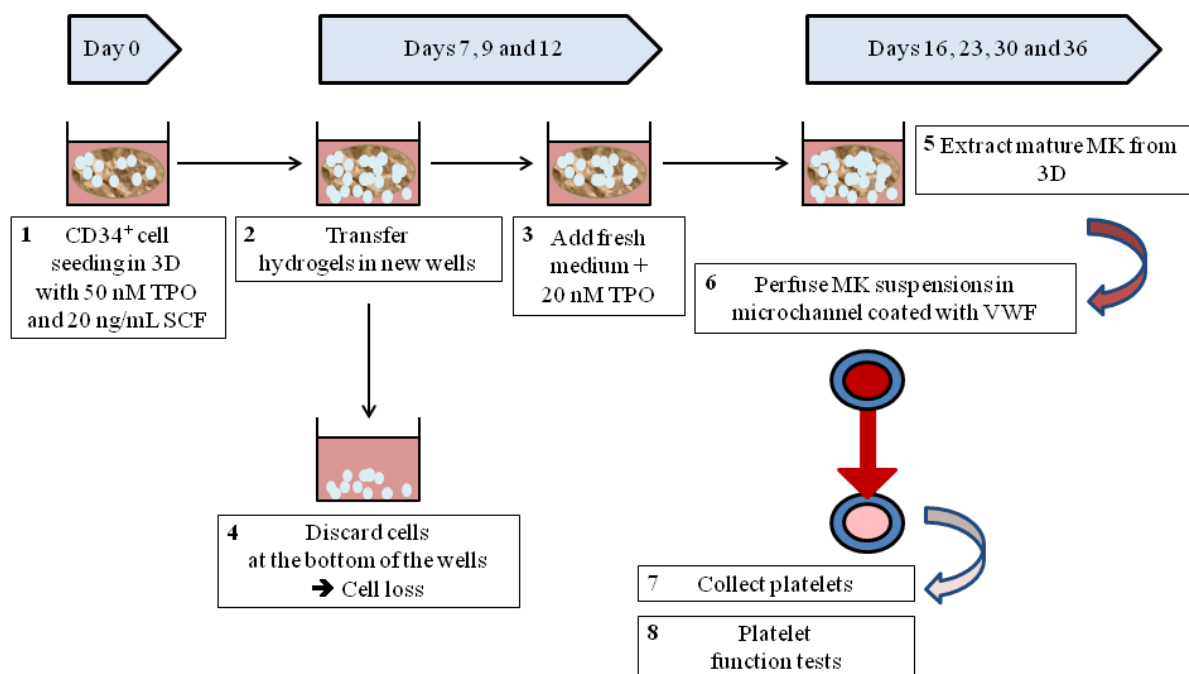
Step 4: Cells excluded from 3D and accumulated at the bottom of the wells were discarded.

Step 5: On days 16, 23, 30 and 36, mature MK were extracted from 3D by enzymatic lysis.

Step 6: Platelets were produced by mature MK perfusion in microchannels coated with VWF.

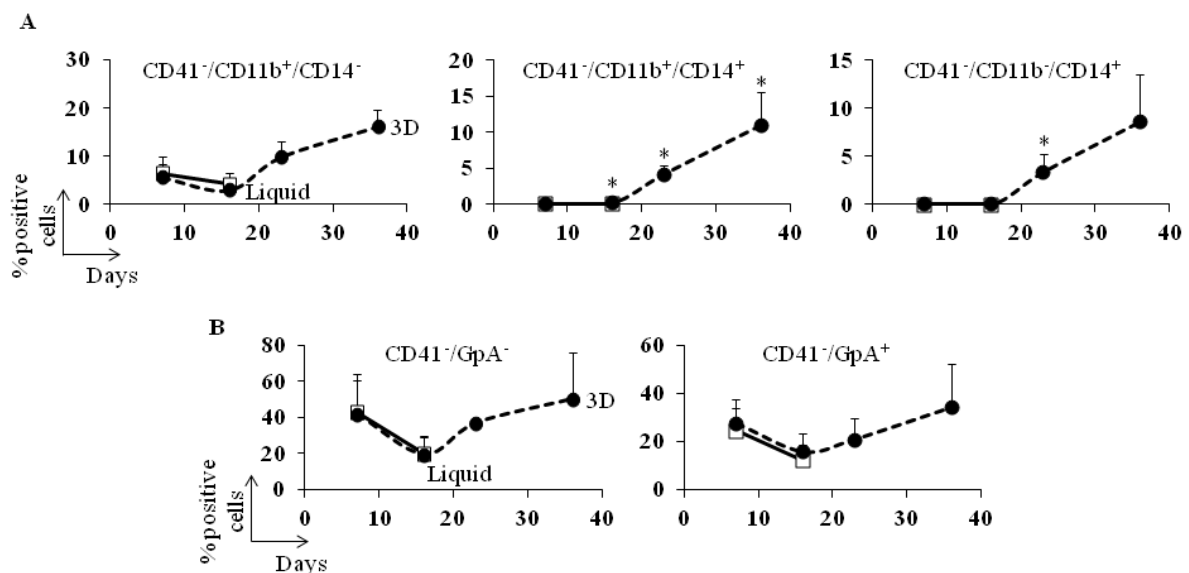
Steps 7 and 8: At the end of the perfusion, platelets were collected and platelet functions were assessed.

Abbreviations: TPO, thrombopoietin; SCF, stem cell factor; MK, megakaryocyte; VWF, von Willebrand factor.



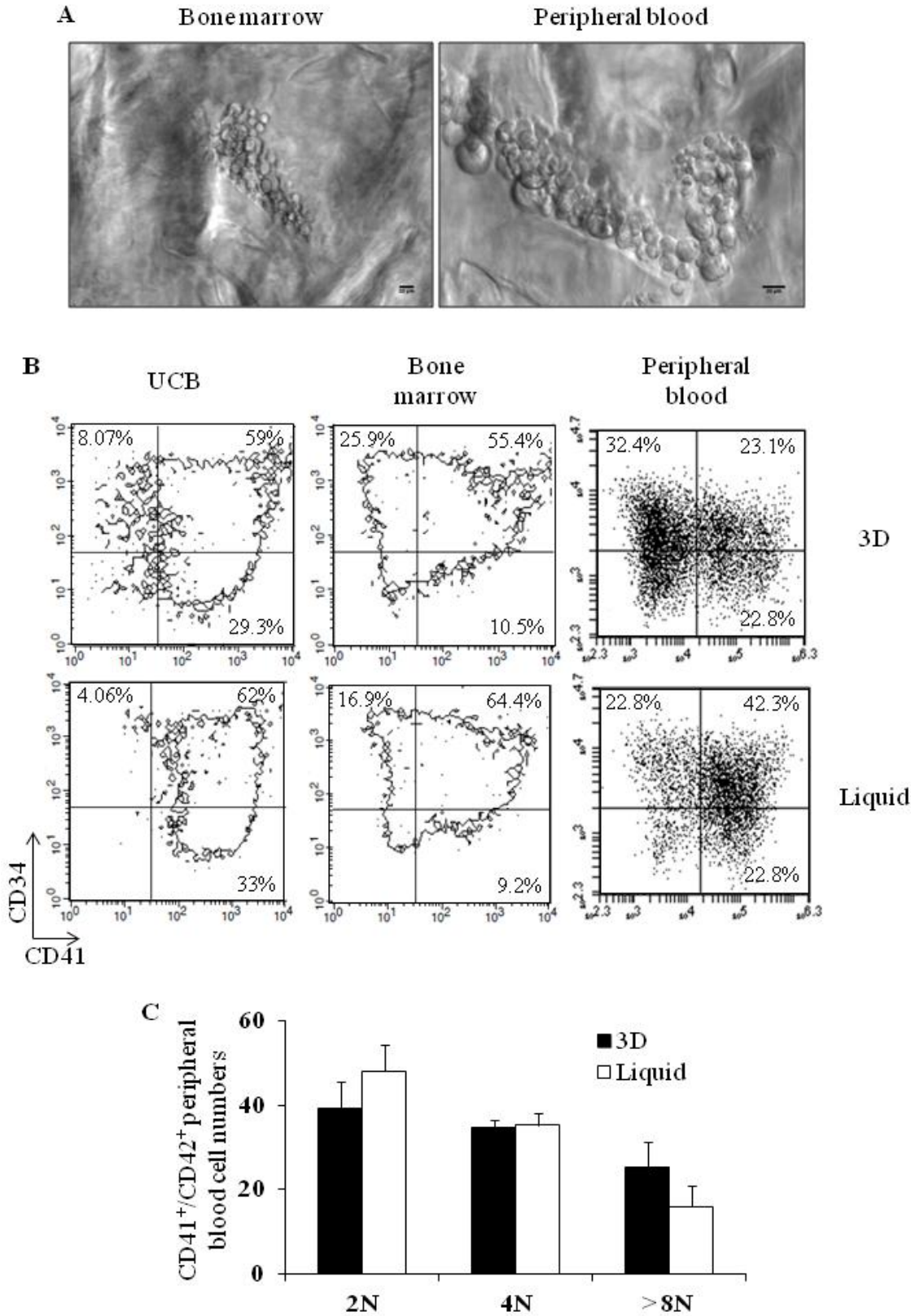
Supplementary Figure 2: Effect of 3D environment on the expression of myelomonocytic and erythropoietic markers

(A) Flow cytometry analysis of $CD41^-/CD11b^+/CD14^-$, $CD41^-/CD11b^+/CD14^+$ (both myelomonocytic cells) and $CD41^-/CD11b^-/CD14^+$ (macrophages) cells in 3D (closed circles, dotted lines) and liquid culture (open squares, full lines) between day 7 and day 36. **(B)** Flow cytometry analysis of $CD41^-/GpA^-$ and $CD41^-/GpA^+$ (erythrocytic cells) cells in 3D (closed circles, dotted lines) and liquid culture (open squares, full lines) between day 7 and day 36. Data are means $\pm$ SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$. In 3D, late time points (days 23 and 36) were compared to day 7. Results indicate that the effect of 3D environment also results in commitment into the erythropoietic and myelomonocytic lineages during a second wave of differentiation that takes place between day 16 and day 36.



Supplementary Figure 3: Proliferation and differentiation of neonatal and adult CD34⁺ cells inside 3D environment

(A) Bone marrow and peripheral blood cell proliferation inside 3D pores, 12 days after seeding. Images were acquired using the Axiovert 135 transmission optical microscope with 20X Plasdics[®] magnification. Bar = 20 μ m. **(B)** CD41/CD34 dot plots of one representative experiment in 3D and liquid culture on day 12. Similar results are obtained with neonatal or adult CD34⁺ cells with the persistence of non-megakaryocytic cells and cell progenitors (CD34⁺/CD41⁻ cells); these cells could still commit in the megakaryocytic lineage. **(C)** Flow cytometry ploidy analysis of CD41⁺/CD42⁺ peripheral blood cells in 3D (black bars) compared to liquid culture (white bars). Data are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments. Results show higher percentages of 8N ploidy classes in 3D cells (25.3% $\pm$ 6.1%) than in liquid-culture cells (15.9% $\pm$ 4.9%), whereas 2N ploidy was more frequent in liquid culture (48.1% $\pm$ 6.3%) than in 3D (39.3% $\pm$ 6.4%). Abbreviation: UCB, umbilical cord blood.



Supplemental Videos

Supplementary Video 1 and 2

Mature and viable MK were recovered from 3D or liquid culture on day 16 and perfused at a shear rate of 1800 s^{-1} for 45 min on VWF-coated microchannels. Different steps of platelet production were visualized in real-time using the Axiovert 135 transmission optical microscope with 20X Plasdac® magnification. Digital images were recorded at 0.25 images/s using Replay software (Microvision Instruments). For visualization, Archimed software (Microvision Instruments) was used to grab frames and record at a velocity of 10 images/sec (40-fold acceleration). Bar = 20 μm .

Video 1: Platelet production in flow conditions from 3D mature MK

The video shows extremely long MK elongations similar to beads-on-a-thread. Proplatelets and platelets are also visible in the last section of the video.

Video 2: Platelet production in flow conditions from liquid-culture mature MK

Compared to mature MK obtained from 3D culture, notice the shorter elongations interacting with the surface during the first part of the video and the reduced production of proplatelets and platelets during the second part of the video.

References

1. Poirault-Chassac S, Six E, Catelain C, Lavergne M, Villeval JL et al. (2010) Notch/Delta4 signaling inhibits human megakaryocytic terminal differentiation. *Blood* 116(25): 5670-5678.
2. Dunois-Larde C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Borde E et al. (2009) Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* 114(9): 1875-1883.
3. Yu C, Young S, Russo V, Amsden BG, Flynn LE (2013) Techniques for the isolation of high-quality RNA from cells encapsulated in chitosan hydrogels. *Tissue Eng Part C Methods* 19(11): 829-838.
4. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408.
5. Conant CG, Schwartz MA, Nevill T, Ionescu-Zanetti C (2009) Platelet adhesion and aggregation under flow using microfluidic flow cells. *J Vis Exp* (32): 1644.
6. Conant CG, Schwartz MA, Beecher JE, Rudoff RC, Ionescu-Zanetti C et al. (2011) Well plate microfluidic system for investigation of dynamic platelet behavior under variable shear loads. *Biotechnol Bioeng* 108(12): 2978-2987.
7. Robert A, Cortin V, Garnier A, Pineault N (2012) Megakaryocyte and platelet production from human cord blood stem cells. *Methods Mol Biol* 788: 219-247.
8. Poirault-Chassac S, Nguyen KA, Pietrzyk A, Casari C, Veyradier A et al. (2013) Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor. *PLoS One* 8(5): e63810.
9. Mazharian A, Roger S, Berrou E, Adam F, Kauskot A et al. (2007) Protease-activating receptor-4 induces full platelet spreading on a fibrinogen matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca²⁺ mobilization. *J Biol Chem* 282(8): 5478-5487.
10. Jirouskova M, Jaiswal JK, Collier BS (2007) Ligand density dramatically affects integrin alpha IIb beta 3-mediated platelet signaling and spreading. *Blood* 109(12): 5260-5269.

CHAPITRE 2 - ARTICLE II: PROOF OF PRINCIPLE FOR EFFICIENCY IN THROMBOSIS OF SHEAR-GENERATED PLATELETS

Titre

Proof of principle for efficiency in thrombosis of shear-generated platelets

Auteurs

Audrey PIETRZYK-NIVAU, Sonia POIRAUULT-CHASSAC, Alexandre KAUSKOT, Evelyne LAURET,
Cécile V DENIS, Dominique BARUCH

Article en cours de préparation

Proof of principle for efficiency in thrombosis of shear-generated platelets

Audrey Pietrzyk-Nivau^{*}, Sonia Poirault-Chassac^{*}, Alexandre Kauskot^{*}, Evelyne Lauret[†], Cécile V Denis[‡] and Dominique Baruch^{*}

^{*}INSERM, UMR-S 1140, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[†]INSERM UMR 1016, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[‡]INSERM UMR 770, University Paris-Sud 11, UniverSud Paris, Bicêtre, France

Corresponding author

Dr Dominique Baruch

INSERM UMR-S 1140

4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France

e-mail: dominique.baruch@parisdescartes.fr

Phone: 33 1 53 73 99 38 / Fax: 33 1 44 07 17 72

Short title: In vivo effect of platelets produced in vitro

Abstract: 198

Text: 3469

Figures: 7

Table: 1

References: 21

Abstract

Platelets originate from megakaryocytes (MK) by intravascular fragmentation. Evidence for platelet production from human MK exposure to high shear has been already demonstrated. The present aim was to assess whether platelets produced *in vitro* after exposure of MK to high shear rates, were functional in *in vivo* models. Murine bone marrow MK exposed to high shear stress (18 dyn/cm²) produced proplatelets and platelets. During high shear exposure, most platelets released from MK translocated on VWF and less than 5% were firmly adherent. We demonstrate that shear-generated platelets present hallmarks of functional platelets *in vitro* and *in vivo*. These shear-generated platelets expressed normal glycoprotein levels, responded to platelet agonist by reorganizing their cytoskeleton and by shifting the conformation of the integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ to an activated state. Using the FeCl₃ thrombosis model, these platelets specifically incorporated into the growing thrombus *in vivo*. Finally, survival of human platelets in immunodeficient mouse was assessed. Human shear-generated platelets infused into Rag2^{-/-} $\gamma\text{c}^{-/-}$ mice were detected up to 16 hours *in vivo*. Altogether, our results indicate the potential relevance of platelets generated *in vitro* following MK exposure to high shear rates. This constitutes a proof of principle of shear-generated platelets for efficiency in thrombosis.

Introduction

Hematopoietic stem cells (HSC) of the bone marrow are committed into the megakaryocytic lineage by differentiating into well-characterized progenitor and precursor cells, ultimately leading to mature megakaryocytes (MK) whose function is to terminally release platelets, which are absolutely essential for bleeding arrest. Mature MK undergo complete cytoskeleton reorganization with microtubule involvement, resulting in pseudopodial elongations called proplatelets, whose tips contain the organelles and eventually release platelets [1,2,3]. Each day, approximately 10^{11} platelets are produced in man by MK fragmentation. Defects of the MK lineage can give rise to insufficient platelet production and bleeding syndromes of varying severity. Attempts to increase platelet production remain a challenging issue and require integrating the synergy between biochemical and biophysical processes. Approaches have provided further insight into the physiological factors of platelets production, notably the role of the shear rate. In *in vivo* model, Junt et al., observed the detachment of large cytoplasmic fragments into circulating blood and suggested that high shear rates appeared to free them from the parent cells and might contribute to platelet formation [4]. In agreement with this model, we have shown that *in vitro* human MK exposure to high shear rates encountered in small vessels was essential to rapid proplatelet and platelet formation, a process driven by microtubule polymerization and absolutely dependent on an interaction between von Willebrand factor (VWF) and GPIb [5]. Exposure to shear rates drives to synchronize platelet production, where MK are converted into proplatelets and release platelets within 20 minutes, contrary to static conditions that require several hours, often without platelet release and unsuccessful in synchronizing platelet production. Application of shear rates within a microfluidic bioreactor has been also developed by other groups to increase proplatelet production [6,7]. However, the functionality of shear-generated platelets has never been investigated *in vivo*.

In the present study, we demonstrate that platelets produced *in vitro* in a flow chamber on a VWF surface, present hallmarks of functional platelets *in vitro* and *in vivo*. These shear-generated platelets express normal glycoprotein levels, respond to platelet agonist by reorganizing their cytoskeleton and by shifting the conformation of the integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ to an activated state, persist in circulation up to 16 hours. In more physiologic activation systems

in a flow chamber and *in vivo*, where collagen, VWF and shear rates are operating, we demonstrate that shear-generated platelets participate in a murine thrombus formation. These hallmarks allow generating functional platelets, able to be involved in haemostasis and thrombosis.

Materials and Methods

Ethics Statement

All protocols on animals were in accordance with the regional regulations established by the ethics committee for animal experimentation (Comité d’Ethique en Experimentation Animale de Paris Descartes and Comité d’Ethique en Experimentation Animale de l’IRCIV).

Umbilical cord blood samples were obtained with the donors’ informed consent and institutional ethics committee (AP-HP) approval, in keeping with the Declaration of Helsinki.

Mice

C57Bl/6J male mice (age 8-12 weeks) were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). BalbC-Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} mice (age 8-12 weeks) were provided by Plateforme d’Evaluation Préclinique (Institut Gustave Roussy; Villejuif, France).

Cell culture

Murine TPO (10 mg/kg; Miltenyi Biotec, Paris, France) was administered by intra-peritoneal injections to mice for 3 days ending 24 hours before bone marrow extraction. Mice (6-25) were killed by pentobarbital for harvesting of femurs and tibiae of posterior legs. Progenitor cells were enriched in the cell suspensions by negative selection using immuno-magnetic beads-coupled sheep anti-rat antibody (Dyna; Life Technologies, Saint-Aubin, France) after cell incubation with rat antibodies cocktail in order to recover the lineage-depleted cells [8]. Mouse MK were obtained from progenitor cells cultured in complete serum free medium - [Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco-Invitrogen, Saint-Aubin, France) containing 15% BIT, liposomes, α-monothioglycerol and TPO (10 ng/mL, Miltenyi Biotec)]. Following 6-7 days, mature MK were selected on a 1.5 to 3% (w:v) BSA gradient immediately prior to shear experiment.

Perfusion studies

The microfluidic platform BioFlux200[®] (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA) consists of 24 individual microchannels connected to two series of 24 wells (entrance and exit wells) allowing microscopic observation in the flow chamber [9]. Microchannels were coated by the murine rVWF or human VWF as previously described for murine or human MK perfusion

[10]. Following purification by BSA gradient, murine mature MK (between 0.5 to 2×10^5 cells/ml) in complete medium displaying a viscosity of 1 cP (0.98 - 1.05 cP) were perfused at 18 dyn/cm² in the microchannel. Three runs of 45 min at the temperature of 37°C were performed sequentially. For removal of cells remaining in the microchannel, the chamber was rinsed with PBS containing 1.25 mM EDTA for 30 min at 18 dyn/cm². After mixing with the cell suspension, the final EDTA concentration was 0.36 mM.

The 48-well plate was positioned on the stage of an inverted microscope (Axiovert 135; Zeiss, Le Pecq, France). A CCD camera (Sony and Q-click Imaging) was used to visualize cells, using a 20X PlasDIC modulation contrast objective. Continuous recording was performed with a digital image recorder (Replay Software; Microvision Instruments, Evry, France) at 0.5 image/s.

In some experiments, binding of soluble fibrinogen coupled to AlexaFluor-488 used at a tracer concentration was visualized using a high resolution bio-imaging platform (EMCCD MGi Plus Qimaging Rolera camera; Roper Scientific, Evry, France) [11].

Thrombosis model

Platelets were produced *in vitro* and the fractions containing platelets or MK ($110g$ for 2 min for MK fraction; supernatant centrifuged at $750g$ for 10 min for platelet fraction) were labeled for one hour with 1 $\mu\text{g/ml}$ calcein (Interchim, Montluçon, France) for *ex vivo* studies or with DiOC₆ for *in vivo* studies (10 $\mu\text{mol/L}$; Molecular Probes). After centrifugation, the pellets were suspended in HEPES-Tyrodé buffer.

Ex vivo thrombus formation was evaluated by a whole-blood perfusion supplemented by labeled platelets in microchannels of Vena8 FLUORO+ Biochips (Cellix Ltd, Dublin, Ireland) coated by fibrillar collagen (100 $\mu\text{g/ml}$, collagen HORM). Blood sample from one mouse was collected on anti-coagulant (PPACK/lepirudin, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 100 U/mL respectively). Labeled platelets (0.03% to 0.4%) were added to anticoagulated blood and perfused for 4 minutes at 40 $\mu\text{l/min}$ (shear rate 1000 s⁻¹). Then, the microchannel was washed with HEPES-Tyrodé buffer containing 0.1% BSA. During washing step, images were recorded in real-time using phase-contrast and fluorescence microscopy.

To study *in vivo* thrombus formation, the platelet fraction or the MK fraction (2 - 5×10^6 platelets) was injected into the retroorbital venous plexus. Ferric chloride injury was induced as described by Denis et al [12]. The mesentery was exteriorized through a midline

abdominal incision then a single arteriole and adjacent venule were selected. A filter paper strip was immersed in a ferric chloride solution (7.5% FeCl₃; Sigma-Aldrich) and applied on the surface of the selected vessels during 5 minutes. Platelet accumulation was recorded for 40 minutes from the time of filter paper placement.

Half-life of human platelets in immunodeficient mice

Platelets and proplatelets obtained by shear exposure of human MK as described above or human washed platelets from donors were injected (1.5×10^6 platelet/mouse) in BalbC-Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} mice. Blood samples from injected mice were taken after 1, 3, 16 and 22 hours for analysis of human platelets. Blood samples were blocked with anti-murine FcR antibody (CD16/CD32, BD biosciences) then incubated with anti-human CD41-FITC and anti-mouse CD41-PE antibodies and followed by erythrocyte lysis (FACS lysing, BD biosciences). The samples were analyzed by flow cytometry (C6Accuri, BD Accuri).

Statistics

We used Student's unpaired *t*-test for statistical analysis; *p* values < 0.05 were considered significant. Error bars represent the standard error of the mean (SEM).

Online supplemental data described in detail the materials and methods listed below:

- Proteins
- Antibodies
- Human cell culture
- Isolation of blood platelets
- Platelet characterization by flow cytometry and confocal immunofluorescence

Results

Production of functional MK from in vivo to in vitro

The aim of the present study was to assess whether platelets produced *in vitro* were functional *in vivo*. Our lab previously provided evidence for platelet production from human MK exposure to high shear, a process involving GPIb binding to VWF and microtubule reorganization; however the functionality of these platelets has not been investigated *in vivo*. In order to characterize platelets produced by MK exposed to high shear rates (shear-generated platelets), we first needed to increase platelet production by perfusing a significative number of murine mature MK in the microfluidic platform. Several attempts to optimize MK differentiation from murine bone marrow progenitors had been carried out. Because TPO as the major regulator that promotes the growth and development of MK from their HSC precursors [13], a TPO pretreatment in mice was designed to increase the number of murine bone marrow progenitors. After 3 days of TPO treatment, hematopoietic progenitors (referred to as Lin⁻ cells) were isolated from the bone marrow and then differentiated in cell culture during 6.5 days. This pretreatment doubled the number of MK in TPO-treated mice compared to non-treated mice (11267 ± 2969 vs 22102 ± 3070 , respectively; $p < 0.05$; Figures 1A-C). Accumulating evidence suggests that the cytoskeleton is the principal machinery for platelet production [14,15,16]. Tubulin reorganization is essential for proplatelet formation and powers proplatelet elongation. We then investigated the tubulin organization along the cell culture duration. Tubulin staining showed that cells reached a complete tubulin polymerization at day 6.5 compared to day 3 (Figure 1D), hence MK at this stage (6.5 days) were considered as mature MK, suitable for exposure to high shear rates over a VWF matrix, as previously described [5]. Exposure of these MK in the microfluidic platform demonstrated that MK were able to produce platelets in flow conditions (Figure 1E). Altogether, these results showed that TPO pretreatment in mice followed by 6.5 days of culture allows increasing the production yield of mature MK able to release platelets in flow condition.

Behaviour of mature MK exposed to high shear rates on a murine VWF matrix

Then, we investigated the behavior and the platelet production of murine mature MK in flow conditions. Murine MK express CD42b, the GPIb receptor, that binds poorly to human VWF

[17]. Thus, murine rVWF was used to as coating protein, prior to MK exposure. When exposed to a high shear rate in a microfluidic platform, mature MK were able to reversibly adhere by rolling and translocating on the VWF surface. These adherent MK displayed elongations, cytoskeletal reorganization and fragmentation into proplatelets and platelets during to 55 minutes of perfusion (Figure 2). In contrast to human MK that required fragmentation of proplatelets into platelets [5], mouse platelets were released either from proplatelets or directly from uncoiled MK and from MK with partially elongated cytoskeleton. Nevertheless, additionally to specific shorter murine MK elongations, we also observed some extremely long cytoskeletal elongations as well as beads-on-a-threads (Figure S1) leading to platelet formation, as previously shown with human MK [5]. In addition, controls consisted of MK perfusion on BSA-coated channels resulting in the absence of MK adhesion and proplatelet/platelet production (data not shown).

To assess properties of shear-generated platelets, evaluation of duration of contacts with the VWF surface was performed on the video recordings of platelets released in microfluidic channels at the end of each run in the absence of EDTA. Proplatelets and platelets were classified as either rolling/translocating (3-10" duration of contacts) or firmly adherent platelets (contact > 11"). The majority of platelets ($98 \pm 0.9\%$) rolled and translocated on the surface and only $2 \pm 0.9\%$ were firmly adherent at the end of the first 45 min of perfusion. Interestingly, the proportion of firmly adherent platelets did not increase between the first and the third run ($97 \pm 0.8\%$ of rolling platelets vs $3 \pm 0.9\%$ of adherent platelets after 90 minutes of perfusion; $n=4$) indicating that prolonged shear exposure did not induce platelet activation. Furthermore, no platelet aggregate was observed (data not shown). Overall, these results showed that a prolonged perfusion of murine mature MK on VWF surface in the microfluidic platform allows a significant platelet production.

Characterization of the functional state of shear-generated platelets

To investigate whether shear-generated platelets were functional, several properties were analyzed on those platelets. Firstly, we analyzed the surface expression of various glycoproteins by flow cytometry and immunofluorescence staining. We observed similarities in the cell-surface expression of integrin α IIb, integrin α 2, GPIX, GPV, GPVI, GPIb α and GPIb β on shear-generated platelets compared to blood platelets (Table I and Figure 3). Secondly, we had previously shown that human platelets released from mature MK could be analyzed

by a static platelet adhesion assay to fibrinogen [5]. On the one hand, we excluded the presence of MK and we identified cells as platelets in shear-generated and blood platelets by staining the α Ib glycoprotein (CD41) combined with a Hoechst staining (nucleus presence). Platelets were identified by the expression of CD41 in the absence of Hoechst staining (data not shown). This identification was confirmed by the cellular size and morphology ($3.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Without stimulation, platelets were only able to spread on fibrinogen without reorganizing their cytoskeleton (Figure 4A). However, upon PAR4-activated peptide (TRAP-4) stimulation, shear-generated platelets reorganized their actin cytoskeleton, showing filopodia, lamellipodia and stress fiber formation as blood platelets (Figure 4A). Thirdly, we investigated the capacity of the integrin α Ib β 3 to change its conformation to the activation state by using both Jon/a antibody specific of the activated integrin α Ib β 3 and soluble fibrinogen. We observed that TRAP-4 stimulation increased by $140 \pm 5\%$ the activation state of the integrin α Ib β 3 measured by Jon/a staining (Figure 4B). Soluble fibrinogen binds only on platelets when the integrin α Ib β 3 is in an active state [11]. We used fibrinogen-Alexa488 to analyze fibrinogen binding on platelets in real-time in flow conditions. We observed that fibrinogen bound on shear-generated platelets only in the presence of TRAP-4 (Figure S2), demonstrating that platelets remained inactive in the microchannels and required exogenous stimulation to activate the integrin α Ib β 3. Altogether, these results demonstrated that shear-generated platelets were able to be activated following agonist stimulation as shown by cytoskeletal reorganization, integrin α Ib β 3 activation allowing soluble fibrinogen binding at the platelet surface.

Capacity of shear-generated platelets to participate to ex vivo and in vivo thrombosis

Because we demonstrated that shear-generated platelets were able to be activated in various *in vitro* models, we also characterized the behavior of shear-generated platelets to participate to *ex vivo* and *in vivo* thrombus formation. For *ex vivo* thrombosis model, we carried out perfusion of fluorescent-labeled platelets with mouse whole-blood over a fibrillar collagen matrix at a shear rate of 1000 s^{-1} and we looked at incorporation of perfused platelets into growing thrombus. As shown on Figure 5, the thrombus formation was observed in real-time with shear-generated platelets as well as blood platelets readily incorporated into the developing thrombi. Surprisingly, this was not the case for static-generated platelets (platelets released in cell culture), since in this condition platelets were

not incorporated into the thrombus (Figure 5). We also investigated the capacity of shear-generated platelets to participate to the *in vivo* thrombus formation after a FeCl_3 injury on mesenteric vessels. At the exit of the microchannels, cell suspensions were collected and centrifuged to recover a supernatant fraction containing the proplatelets and platelets, and in the pellet fraction, the intact MK and naked nuclei. As shown on Figure 6, shear-generated platelets were incorporated in the thrombus (Figure 6A) and formed the thrombus when platelets were infused at a higher concentration (Figure 6B). By contrast both shear and static MK fraction and static platelet fraction were not able to incorporate in the thrombus. Indeed, fluorescence in the thrombus was only observed when shear-generated platelets were infused but not for other fractions (shear and static MK fraction and static platelet fraction). These results provided evidence for specific functionality of shear-generated platelets compared to static-generated platelets and especially on their capacity to contribute to thrombus formation *ex vivo* and *in vivo*.

Half-life of human shear-generated platelets in in vivo mouse model

To demonstrate the capacity of shear-generated platelets to persist *in vivo*, we studied the half-life and the clearance of these platelets after injection in an immunodeficient mouse model. To allow discrimination between platelets from the host mice and infused shear-generated platelets, we used human MK for platelet production. To this end, we infused 1.5×10^6 human shear-generated or blood platelets in $\text{Rag2}^{-/-} \gamma_c^{-/-}$ mice. To discriminate both platelet populations (human and mouse), we used an anti-human CD41-FITC (infused shear-generated platelets) and an anti-mouse CD41-PE (host mouse platelets) antibodies. Compared to blood platelets, only human shear-generated platelets infused in mice were detectable 16 hours post-infusion. Furthermore, shear-generated platelets half-life ($t_{1/2}$ = clearance of 50% infused platelets) was 11h by contrast to 1.5h for blood platelets (Figure 7). The shear-generated platelets may represent young platelets and proplatelets that could explain this prolongation of half-life compared to aging blood platelets.

Discussion

This study demonstrates that platelets produced *in vitro* in a flow chamber on a VWF surface, exhibit hallmarks of functional platelets *in vitro* and *in vivo*. These shear-generated platelets express similar glycoprotein levels as blood platelets and likewise are able to rearrange their actin and tubulin cytoskeleton and to shift the conformation of the major integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ to an activated state after agonist stimulation. These hallmarks allow generating functional platelets, able to be involved in the *ex vivo* and *in vivo* thrombus formation.

Previous study established the importance of high shear rates (1800 sec^{-1}) on cell remodeling and cytoskeleton reorganization of human mature MK leading to accelerated proplatelet formation and platelet release [5]. In this study, we demonstrate the capacity of murine MK to release large number of functional platelets in conditions reproducing the high shear rates encountered in the microcirculation. As previously described [5] and in this study, MK exposed to VWF at high shear rates developed structures as elongations, beads-on-thread, as well as proplatelets devoid of a nucleus reproducing *in vivo* mechanisms, promoting platelet formation [4]. *In vitro* platelet production and their *in vivo* infusion seems a better strategy instead of MK infusion directly into the circulation. Indeed, MK sequestration has been reported in the lung alveolar capillary bed [18]. In addition, we investigated the behaviour of shear-generated platelets in various *in vivo* models as well as platelet half-life in immunodeficient mice, thrombosis in a flow chamber and thrombosis induced by FeCl_3 on mesenteric vessels.

Importantly, we demonstrated that newly generated platelets have a prolonged half-life in immunodeficient mice. Indeed, shear-generated platelets were characterized by a prolonged half-life sufficient to observe their persistence in the mouse circulation up to 16h. This demonstrated that the clearance time of platelets is in correlation with a resting state and not with an activated state that would have reduced considerably the half-life [19]. Glycoprotein expression on the platelet surface is also a determinant in platelet clearance. Previously, it had been suggested that metalloproteinases are present in the media of culture and shortens *ex vivo* generated platelet half-life [20] by cleaving the glyco

extracellular portion of GPIb α , inactivating the GPIb/IX receptor [21]. Shear-generated platelets express a normal range for major receptors notably GPIb α suggesting that the shedding of glycoproteins on these platelets did not occur. This observation could be explained by the production time necessary to release platelets. Indeed, in static conditions the delay to release platelets is longer (16 hours) than the short time (< 30min) to generate platelets in shear conditions [5].

Because human GPIb does not interact with mouse VWF, shear-generated platelets from murine MK had to be assessed in mouse models of thrombosis.

We first examined the morphology *in vitro* of shear-generated platelets. Platelets generated by MK exposure to high shear rates were similar in their morphology, glycoprotein expression and capacity to respond to platelet agonists compared to blood platelets. The functional nature of shear-generated platelets was confirmed by their agonist-induced cytoskeletal reorganization, indistinguishable from blood platelets, on a fibrinogen matrix (filopodia, lamellipodia and stress fiber formation). By contrast, platelets generated in static condition showed a disturbed morphology in resting state. Thus, the regular discoid shape, a feature of resting platelets was disturbed, compared to shear-generated or blood platelets. These points highlight the role of VWF and shear to produce platelets with properties similar to blood platelets. We extended our earlier findings by showing that expression of the activated form of integrin α IIb β 3 on the platelet surface occurred upon stimulation with agonists leading to promote interaction with soluble fibrinogen and thrombi formation. In more physiological activation systems in the flow chamber and *in vivo*, where collagen, VWF and shear rates are operating, we demonstrated that shear-generated platelets participate in a murine thrombus formation. Altogether, these data demonstrated for the first time that shear-generated platelets specifically on a VWF surface are functional not only *in vitro* but also *in vivo*.

In vitro platelet production remains a challenging task, requiring synergy between biochemical and biophysical factors to reach high platelet yields. This study provides direct evidence that platelets generated by high shear rates and VWF surface present hallmarks of functional platelets *in vitro* and *in vivo* leading to their involvement in thrombus formation.

These shear-generated platelets could constitute a complementary approach to blood platelets for future clinical applications.

Acknowledgements

The Agence Nationale de la Recherche (ANR) funded the project (EBIO 2009). This study was also made available through the funding from DIM Stem Pole, INSERM, Universities Paris Descartes and Paris Sud. The authors thank the Plateforme Préclinique d'Evaluation (IRCIV, Villejuif, France) for the use of the immunodeficient mice. We thank C. Martin and all technicians for the access of the animal facility (IMTCE, Université Paris Descartes, Paris). We also thank Bruno Saubamea for the access of the confocal microscope (IMTCE, University Paris Descartes, Paris).

Authorship contribution

Conceived and designed the experiments: CVD, DB. Performed the experiments: SPC, APN, CVD. Analyzed the data: SPC, CVD, DB. Designed the study: DB, CVD. Contributed reagents, materials, analysis tools: CVD, EL. Wrote the manuscript: DB, CVD, AK, APN.

Disclosure of conflicts of interest

Authors report no conflict of interest.

References

1. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 115: 3348-3354.
2. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. (2005) Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 106: 4066-4075.
3. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, Kahle E, Galjart N, et al. (2005) Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 106: 4076-4085.
4. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, et al. (2007) Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317: 1767-1770.
5. Dunois-Larde C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Borde E, et al. (2009) Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* 114: 1875-1883.
6. Thon JN, Mazutis L, Wu S, Sylman JL, Ehrlicher A, et al. (2014) Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* 124: 1857-1867.
7. Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, Endo H, Dohda T, et al. (2013) Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp Hematol* 41: 742-748.
8. Chagraoui H, Sabri S, Capron C, Villeval JL, Vainchenker W, et al. (2003) Expression of osteoprotegerin mRNA and protein in murine megakaryocytes. *Exp Hematol* 31: 1081-1088.
9. Conant CG, Nevill JT, Zhou Z, Dong JF, Schwartz MA, et al. (2011) Using well-plate microfluidic devices to conduct shear-based thrombosis assays. *J Lab Autom* 16: 148-152.
10. Poirault-Chassac S, Nguyen KA, Pietrzyk A, Casari C, Veyradier A, et al. (2013) Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor. *PLoS One* 8: e63810.
11. Legendre P, Salsmann A, Rayes J, Trassard O, Kieffer N, et al. (2006) CHO cells expressing the high affinity $\alpha(\text{IIb})\beta 3$ T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear. *J Thromb Haemost* 4: 236-246.

12. Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, et al. (1998) A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9524-9529.
13. Kaushansky K (2005) Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci* 1044: 139-141.
14. Hartwig JH, Italiano JE, Jr. (2006) Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol Dis* 36: 99-103.
15. Tablin F, Castro M, Leven RM (1990) Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci* 97 (Pt 1): 59-70.
16. Thon JN, Italiano JE (2010) Platelet formation. *Semin Hematol* 47: 220-226.
17. Ware J, Russell S, Ruggeri ZM (1997) Cloning of the murine platelet glycoprotein Ib α gene highlighting species-specific platelet adhesion. *Blood Cells Mol Dis* 23: 292-301.
18. Fuentes R, Wang Y, Hirsch J, Wang C, Rauova L, et al. (2010) Infusion of mature megakaryocytes into mice yields functional platelets. *J Clin Invest* 120: 3917-3922.
19. Josefsson EC, Burnett DL, Lebois M, Debrincat MA, White MJ, et al. (2014) Platelet production proceeds independently of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Nat Commun* 5: 3455.
20. Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, et al. (2008) Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J Exp Med* 205: 1917-1927.
21. Bergmeier W, Burger PC, Piffath CL, Hoffmeister KM, Hartwig JH, et al. (2003) Metalloproteinase inhibitors improve the recovery and hemostatic function of in vitro-aged or -injured mouse platelets. *Blood* 102: 4229-4235.

Table

Table I: Comparison of mean fluorescence intensity of different integrins and glycoproteins in shear-generated and blood platelets

Blood and shear-generated platelets were labeled with several antibodies and MFI of each integrin or glycoprotein was determined by flow cytometry. Data are means $\pm$ SEM of 3 experiments. No difference was noted between blood and shear-generated platelets.

	Mean Fluorescence Intensity (A.U)	
	Blood platelets	Shear-generated platelets
Integrin α IIb	510.8 $\pm$ 78.1	462.2 $\pm$ 18.7
GPIb α	78.3 $\pm$ 41.1	90.9 $\pm$ 46.1
GPIX	164.4 $\pm$ 52.6	93.2 $\pm$ 1.5
GPV	74.5 $\pm$ 5.9	69.7 $\pm$ 24.1
Integrin α 2	41.1 $\pm$ 4.6	42.9 $\pm$ 0.6
GPVI	46.0 $\pm$ 3.3	38.5 $\pm$ 1.1

Figure legends

Figure 1: Characterization of mouse bone marrow progenitor differentiation into mature MK

(A-B) Morphology of progenitors after harvesting bone marrows of non-treated (A) or TPO-treated (B) mice for 3 days. Images were acquired using the Axiovert 135 optical microscope at 20X Plasdic[®] magnification. **(C)** Histogram representation of MK number obtained per mouse on day 6.5 from culture of bone marrow progenitors of non-treated or TPO-treated mice. Data are means $\pm$ SEM of 3 experiments. * $p < 0.05$. **(D)** Tubulin organization of MK after adhering to polylysine coated slides and tubulin staining on days 3, 6 and 7. Images were acquired using the Leica TCS SP2 AOBS confocal microscope at 63X magnification. Scale bar = 10 μm . **(E)** Representative image of MK elongating and producing platelets in flow conditions after DiOC₆ staining. MK (asterix) and proplatelets/platelets (arrow) are visible. Image was acquired using the Axiovert 135 optical microscope at 20X Plasdic[®] magnification. Scale bar = 10 μm .

Figure 2: Snapshots of video recordings of MK deformation and platelet production in flow conditions

Murine mature MK were perfused on VWF surface in Bioflux microfluidic platform at a high shear rate of 1800 sec^{-1} . In less than one hour, mature MK exposed to high shear rates adhere, elongate, extend and reorganize their cytoskeleton then separate into proplatelets and finally release platelets. Images were acquired using the Axiovert 135 optical microscope at 20X Plasdic[®] magnification. Scale bar = 20 μm .

Figure 3: Comparison of GPIb α and GPIb β staining in shear-generated, static and blood platelets

(A) Representative images of GPIb α staining on non-activated blood, shear-generated and static platelets. **(B)** Representative images of GPIb β staining on non-activated blood, shear-generated and static platelets. Images were acquired using the Axio Observer D1 fluorescence optical microscope with 63X Plasdic[®] magnification. Scale bar = 5 μm .

Figure 4: Characteristics of shear-generated platelets collected at the exit of the microchannels

(A) Representative images of tubulin (green)/F-actin (red) staining on shear-generated platelets either not stimulated or stimulated with TRAP-4 or thrombin. Filopodia, lamellipodia and stress fiber formation is visible on activated shear-generated platelets. Images were acquired using a confocal microscope at 63X magnification. Scale bar = 5 μm . **(B)** Representative images of CD41 staining (green) and of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (green) on blood and shear-generated platelets. Focus points are visible on activated platelets. Images were acquired using the Axio Observer D1 fluorescence optical microscope with 63X Plasic[®] magnification. Scale bar = 5 μm .

Figure 5: Comparison of implication of shear-generated, static and blood platelets in the ex vivo thrombus formation

Blood, shear-generated and static platelets labeled with calcein were perfused with mouse whole blood on fibrillar collagen matrix at a shear rate of 1000 sec^{-1} . Shear-generated platelets are able to incorporate in the thrombus as well as blood platelets. In contrast, static platelets are not able to incorporate in the thrombus. Images were acquired using the Axio Observer D1 fluorescence optical microscope with 40X Plasic[®] magnification. Scale bar = 20 μm .

Figure 6: In vivo thrombus formation in presence of shear-generated platelets

After injury induction by FeCl_3 thrombosis model, shear- or static-generated platelets but also shear- or static-generated MK labeled with DiOC₆ were injected in mice. **(A)** Representative images of thrombus formation after injection of different MK or platelet fractions. Only shear-generated platelets were able to incorporate and participate to *in vivo* thrombus formation. **(B)** Real-time formation of thrombus with shear-generated platelets. Images were acquired using a fluorescence optical microscope.

Figure 7: Half-life of human shear-generated and blood platelets in an immunodeficient mouse model

Human shear-generated or blood platelets were injected in $\text{Rag2}^{-/-}\gamma\text{c}^{-/-}$ immunodeficient mice. At different times, mouse blood was labeled with anti-human CD41-FITC and anti-

mouse CD41-PE to discriminate human platelets and murine platelets. Flow cytometry analysis of human shear-platelet (closed squares, full lines) and blood platelet (closed triangles, dotted lines) percentage in mouse blood after injection of 1.5×10^6 platelets. Half-life appeared as different between shear-generated platelets and blood platelets. Data are means $\pm$ SEM of 3 experiments for shear-generated platelets and 4 experiments for blood platelets. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

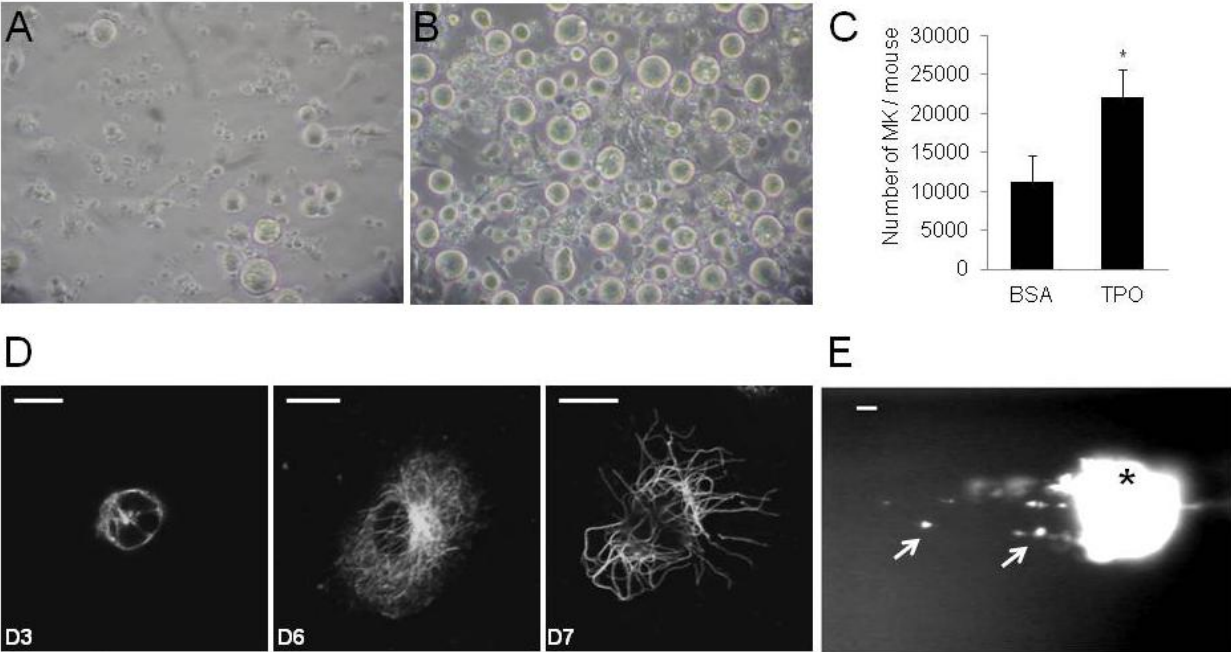


Figure 1

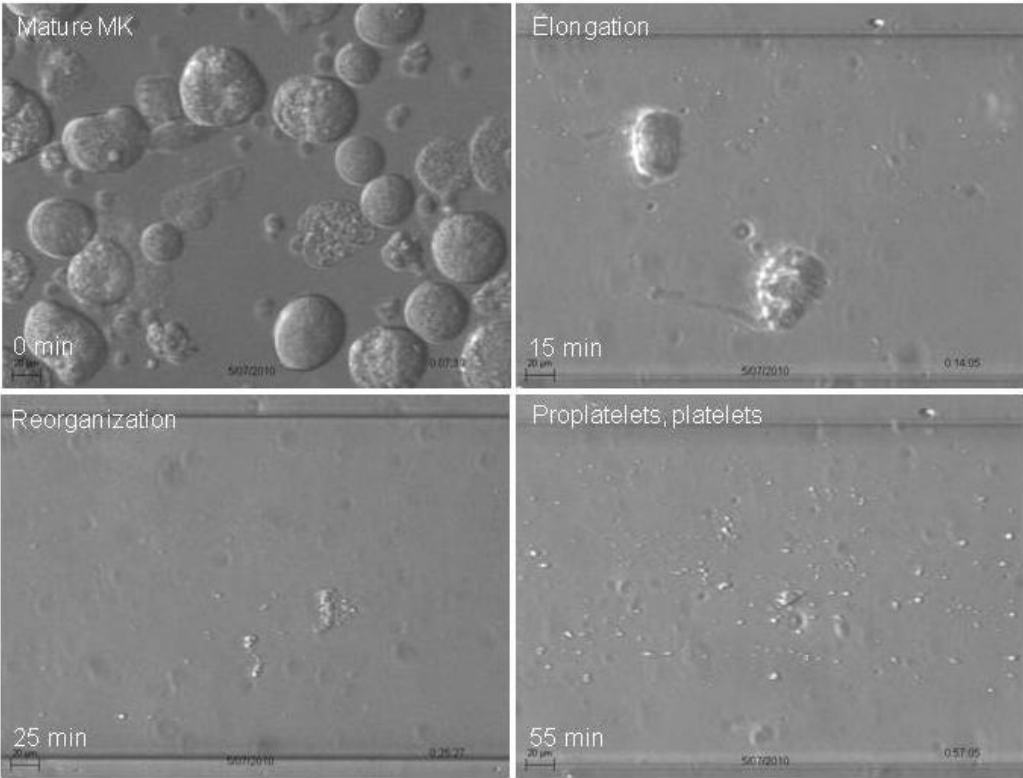


Figure 2

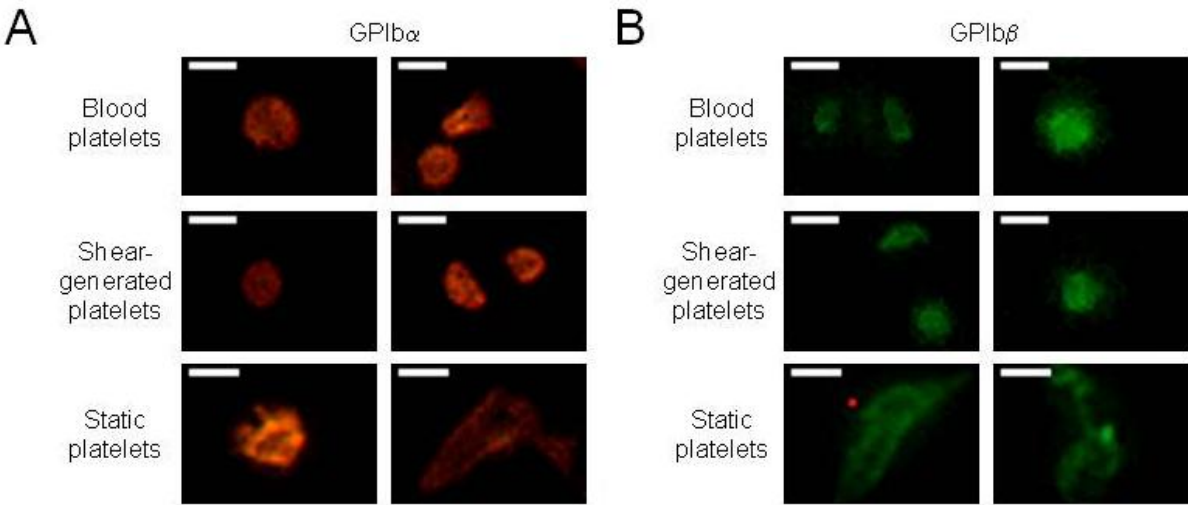


Figure 3

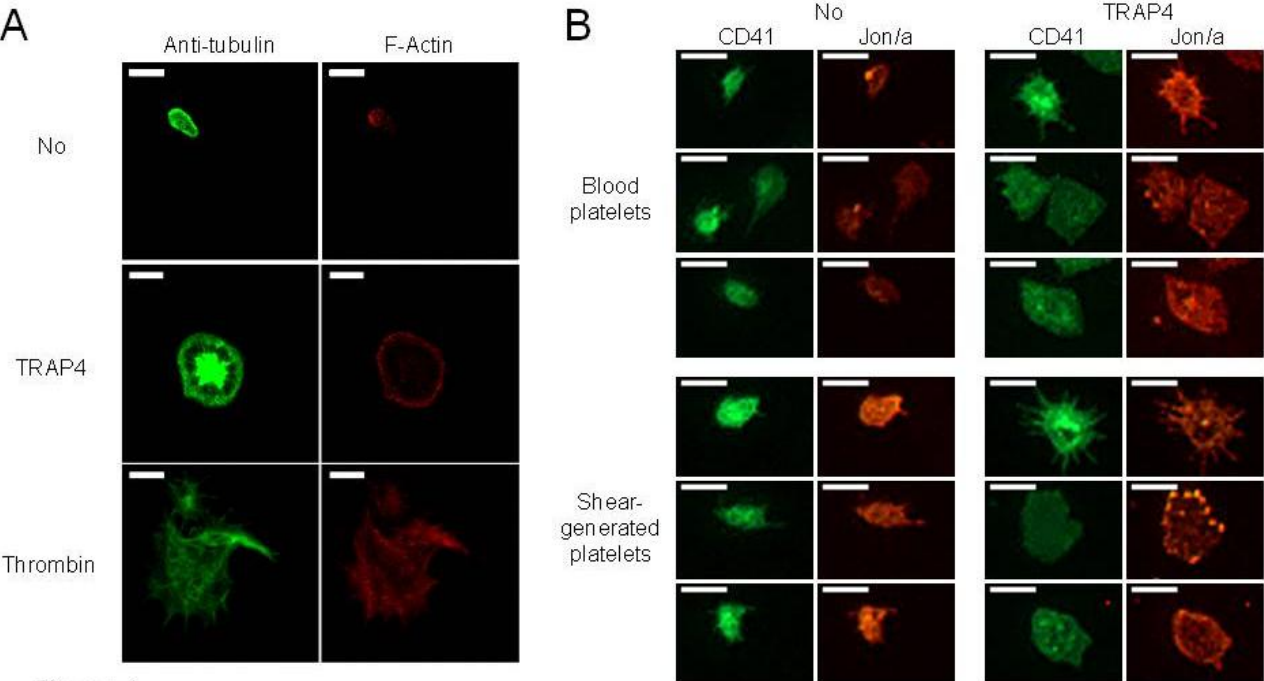


Figure 4

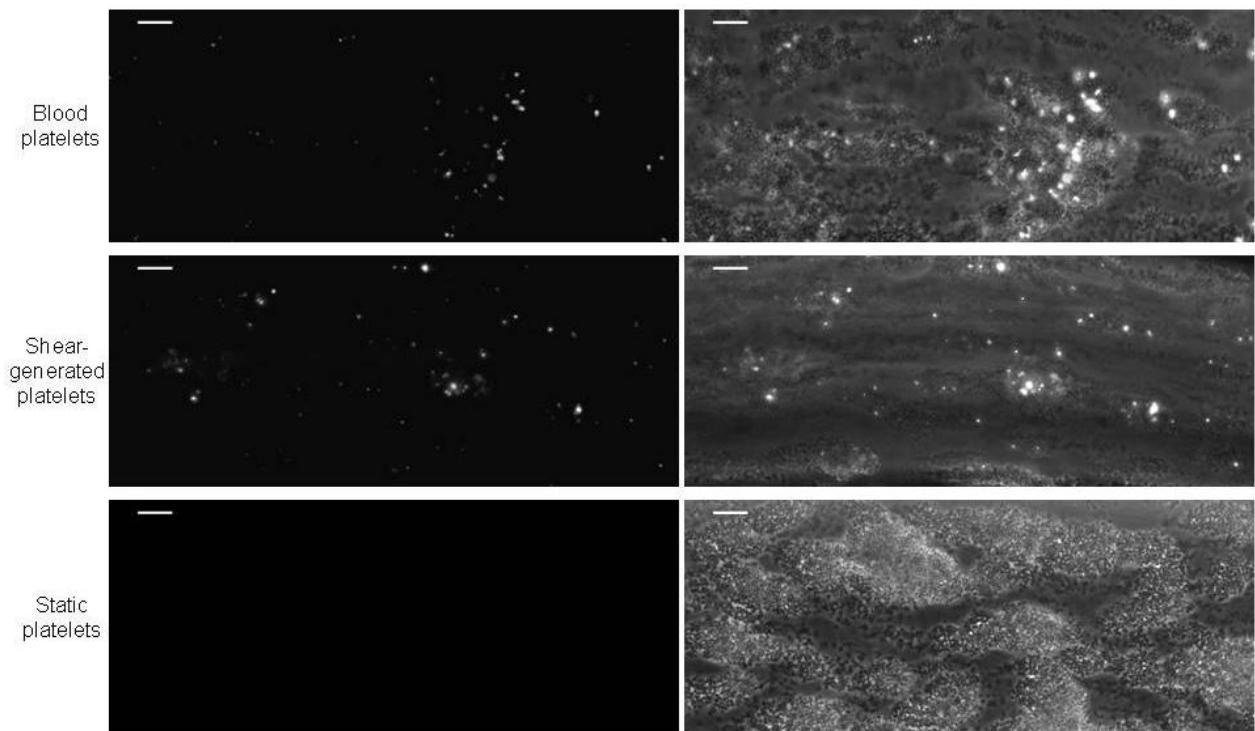


Figure 5

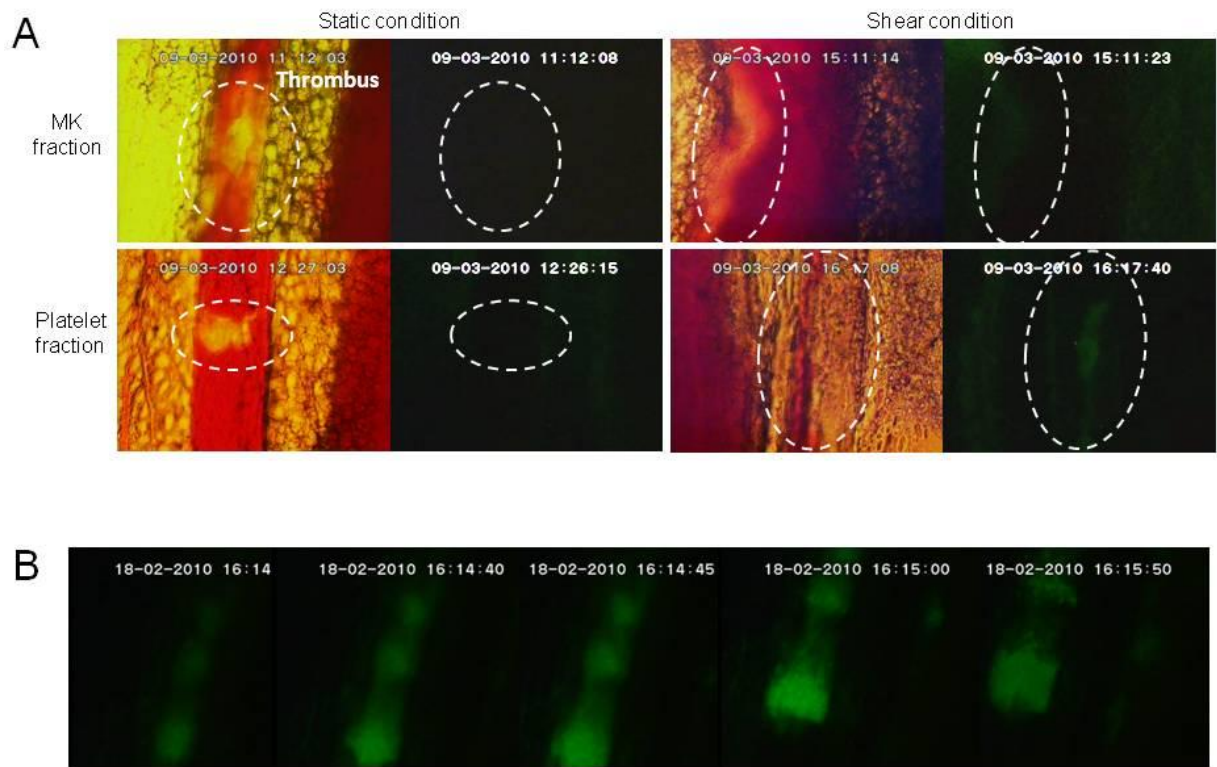


Figure 6

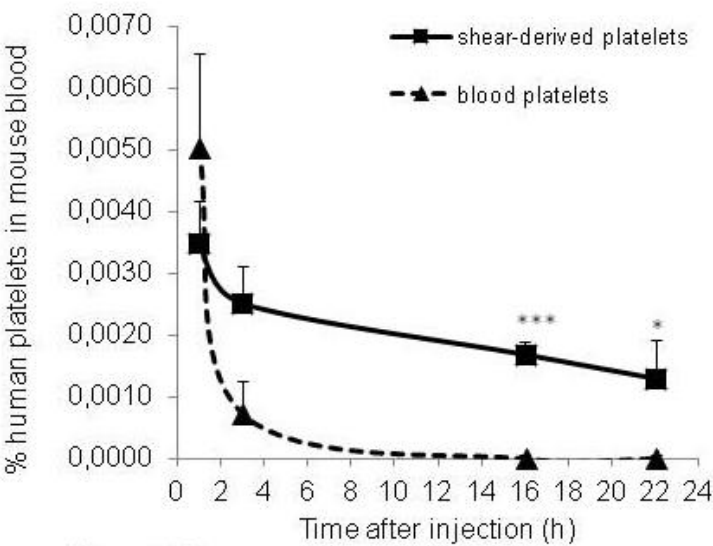


Figure 7

Proof of principle for efficiency in thrombosis of shear-generated platelets

Audrey Pietrzyk-Nivau^{*}, Sonia Poirault-Chassac^{*}, Alexandre Kauskot^{*}, Evelyne Lauret[†], Cécile V. Denis[‡] and Dominique Baruch^{*}

^{*}INSERM, UMR-S 1140, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[†]INSERM UMR 1016, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[‡]INSERM UMR 770, University Paris-Sud 11, UniverSud Paris, Bicêtre, France

ONLINE SUPPLEMENTAL DATA

Short title: In vivo effect of platelets produced in vitro

Corresponding author

Dr Dominique Baruch

INSERM UMR-S 1140

4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France

e-mail: dominique.baruch@parisdescartes.fr

Phone: 33 1 53 73 99 38 / Fax: 33 1 44 07 17 72

Supplemental Materials and Methods

Proteins

Human VWF was a gift of Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (Wilfactin; Lille, France). Fibrinogen was from Hyphen BioMed (Neuville-sur-Oise, France). Human VWF and fibrinogen were purified and depleted of contaminant fibronectin and of fibrinogen and VWF, respectively [1]. Human fibrinogen coupled to AlexaFluor-488 was purchased from Molecular Probes (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Murine VWF was obtained from murine recombinant VWF (rVWF) and was a gift of Cécile V. Denis [2]. Thrombin was purchased from Sigma and PAR4 activated peptide (GYPGQV, TRAP4) were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). AlexaFluor-546 phalloidin was purchased from Molecular Probes.

Antibodies

Monoclonal rat antibodies (MoAb) directed against mouse mature hematopoietic cell receptors (CD11b/Mac1, Ly6G/Gr1, Ter 119, CD45R/B220, CD4, CD5) were from eBioscience (Paris, France). R-Phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse CD42b (GPIb α) and PE-conjugated rat anti-mouse Jon/a were from Emfret Analytics (Würzburg, Germany). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat anti-mouse CD42a (GPIX), CD42c (GPIb β), CD42d (GPV), GP VI, and CD49b (α 2) were also from Emfret Analytics. PE-conjugated rat anti-mouse CD41 was from BD Pharmingen (Le Pont de Claix, France). Monoclonal antibody directed against human platelet receptor [FITC-conjugated mouse anti-human CD41a (α IIb)] and non-immune antibody were from Beckman Coulter (Villepinte, France). Mouse anti-human β -tubulin MoAb was from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Rabbit polyclonal anti-human VWF antibody was from Dako (Trappes, France). The secondary antibodies AlexaFluor-488 and 546-conjugated goat anti-rat and AlexaFluor-488-conjugated goat anti-mouse were from Molecular Probes.

Human cell culture

Human MK were obtained from precursor cells isolated from umbilical cord blood samples. CD34⁺ cells were obtained and cultured as previously reported with addition of liposomes in the culture medium [3].

Isolation of blood platelets

For isolation of mouse platelets, mice were anesthetized by pentobarbital and whole-blood was collected by cardiac puncture. Platelets were counted with an electronic cell counter MS9-3 (Melet Schloesing, Osny, France), using the standard parameters for mice and adjusted to a concentration of 2.5×10^8 platelets/mL [4].

Isolation of human platelets was performed on whole-blood obtained from healthy individuals and drawn into 15% (v/v) acid citrate dextrose (ACD) pH 5.8. Human platelets were prepared as reported and resuspended in HEPES-Tyrod buffer [3]. Platelet concentration was adjusted to 1.5×10^8 platelets/mL.

Platelet characterization by flow cytometry and confocal immunofluorescence

The effluent was spun down at low speed (110g for 2 min) for platelet separated of nuclei. The supernatant supplemented with apyrase and PGE1 was centrifuged at 750g for 10 min to collect proplatelets and platelets in the pellet resuspended in HEPES-Tyrod buffer to process either as suspensions or as adherent cells. To process effluents for immunofluorescence, aliquots of unactivated and thrombin activated (1 U/ml) or TRAP4 (100 μ M) cells were pretreated 10 min at 37°C with 2 mM CaCl₂ then all suspension was added on μ -chamber glass slide Ibidi (Biovalley, Marne-la-vallée, France) coated beforehand fibrinogen (200 μ g/ml) and incubated for 30 min at 37°C in static conditions. The immunofluorescence labelling with anti- β -tubulin MoAb (2 μ g/ml) and AlexaFluor-546 phalloidin (30 nmol/L) were made as previously described [3]. The coverslips were then washed and incubated with Hoechst (10 μ l/ml, Molecular Probes) before mounting in DABCO. Tubulin/F-actin staining was analyzed with a Leica TCS SP2 AOBS confocal microscopy. In the same manner, unactivated platelets adhered on fibrinogen and incubated with antibody rat anti-mouse CD42b and CD42c (Emfret) followed by the goat anti-rat conjugated AlexaFluor-488 or 546.

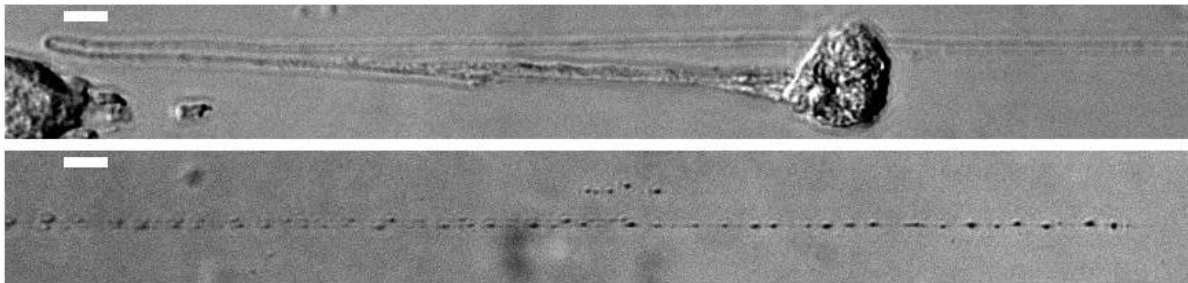
To study the activated form of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ by immunofluorescence, platelets were added on μ -chamber glass slide Ibidi (Biovalley, Marne-la-vallée, France) coated beforehand fibrinogen (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and incubated for 20 min at 37°C with or without TRAP4 (100 μM). Then, PE-labeled Jon/a was incubated in the wells after removal of the supernatant for 10 min. After fixation with 4% paraformaldehyde for 15 minutes, platelets were incubated with AlexaFluor-546 goat anti-rat. Then, platelets were permeabilized for 5 min with 0.1% Triton X-100 in PBS and non-specific binding was blocked in PBS-BSA 2%. Platelets were incubated with rat anti-mouse CD41 FITC (BD biosciences). Finally, the coverslips were washed and incubated with Hoescht before mounting in DABCO. Analysis of marker CD42b, CD42c and Jon/a was obtained with the Axio Observer D1 fluorescence optical microscope (Zeiss, Le Pecq, France).

The measurement of the surface marker expression CD42a, CD42d, GP VI, CD49b and CD41 were achieved by flow cytometry analysis (BD Calibur). The shear-generated or blood platelets (20 μl) were incubated with the antibodies conjugated with FITC or PE for 20 min before analysis by flow cytometry.

Supplemental Figures

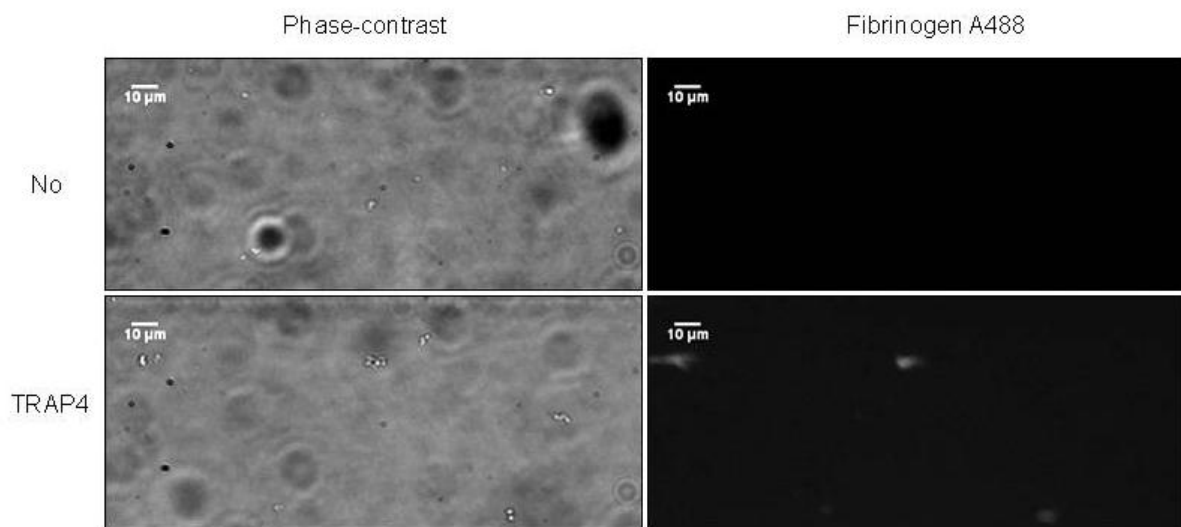
Supplementary Figure 1: Snapshots of video recordings of mouse MK elongations

Mature MK were perfused on VWF surface in Bioflux microfluidic platform at a high shear rate of 1800 sec^{-1} . MK elongations were visualized in real-time using the Axiovert 135 optical microscope with 20X Plasdac[®] magnification. Scale bar = 10 μm . Examples of MK elongations observed in microchannels during perfusion with in particular, the presence of numerous beads-on-a-threads (lower panel). These elongations were similar to the ones observed with human MK perfusion in the microfluidic platform [3].



Supplementary Figure 2: Capacity of shear-generated platelets to bind fibrinogen

Shear-generated platelets were directly either not activated or activated with PAR4 activated peptide in the microchannels and labeled with AlexaFluor-488 conjugated fibrinogen. Representative phase-contrast and fluorescent images of shear-generated platelets in the microchannels after no activation or activation and staining. Only activated platelets were able to bind fibrinogen at their surface. Images were acquired using the Axio Observer D1 fluorescence optical microscope with 20X Plasdico[®] magnification. Scale bar = 10 μm .



References

1. Legendre P, Salsmann A, Rayes J, Trassard O, Kieffer N, et al. (2006) CHO cells expressing the high affinity $\alpha(\text{IIb})\beta 3$ T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear. *J Thromb Haemost* 4: 236-246.
2. Marx I, Christophe OD, Lenting PJ, Rupin A, Vallez MO, et al. (2008) Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIb/IIIa. *Blood* 112: 603-609.
3. Dunois-Larde C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Borde E, et al. (2009) Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* 114: 1875-1883.
4. Poirault-Chassac S, Nguyen KA, Pietrzyk A, Casari C, Veyradier A, et al. (2013) Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor. *PLoS One* 8: e63810.

DISCUSSION

Mon travail comportant des approches de bioingénierie par l'utilisation de structures 3D et d'un modèle de flux se situe dans une vision actuelle de la problématique générale de la thérapie cellulaire. Au début de ce travail, seul le groupe de Lasky avait démontré un rôle des structures 3D et du flux sur la production plaquettaire. Tandis que leurs travaux montraient une amélioration des rendements de production plaquettaire, deux points importants restaient à résoudre: le mécanisme de différenciation des cellules menant à cette amélioration ainsi que l'obtention de plaquettes fonctionnelles. En effet, les plaquettes obtenues dans leurs conditions étaient activées [4]. Notre modèle 3D d'hydrogels poreux de P/D nous a permis non seulement de confirmer l'amélioration de la production plaquettaire et d'obtenir des plaquettes non activées mais surtout de déchiffrer en conditions 3D les principales étapes de la différenciation des CSH en MK et de proposer un mécanisme menant à cette production plaquettaire.

Notre modèle apparaît comme pertinent face à d'autres modèles constitués de protéines physiologiques ou de biomatériaux synthétiques. Ce modèle a notamment été validé *in vitro* et *in vivo* dans l'amélioration de la prise de greffe des CSM dans l'infarctus du myocarde [319], dans la différenciation de cellules endothéliales [318, 322] et plus récemment, de cellules ES [320]. Par ailleurs, ces modèles 3D sont largement utilisés dans une gamme d'études précliniques orientées vers la thérapie cellulaire. Par exemple, des modèles précliniques de thérapie cardiaque ont consisté à favoriser l'implantation de progéniteurs cardiaques dérivés de cellules ES humaines dans des modèles animaux d'infarctus du myocarde, en utilisant un réseau de fibrine [334-336].

Sur un plan expérimental, le modèle 3D d'hydrogels poreux de P/D présente une action qui semble assez exclusive au regard d'autres structures 3D utilisées notamment pour la différenciation des CSH. En effet, dans notre étude, l'utilisation d'un réseau de fibrine s'est avérée incompatible avec l'incorporation et la prolifération des CSH. Ceci indique que l'identification d'une géométrie optimale est une étape importante de l'utilisation de réseaux 3D dans la différenciation des CSH. La spécificité des hydrogels que nous avons utilisés est confirmée par l'absence d'incorporation de cellules dans des matrices de polycaprolactone dont la taille des pores est comparable à celle des hydrogels de

P/D. Enfin, la présence de fucoïdane dans les hydrogels de P/D de taille et de porosité comparables s'est avérée délétère pour l'incorporation des cellules. Ainsi, la structure et les caractéristiques physico-chimiques des hydrogels P/D sont essentielles pour la différenciation des CSH en MK. Cependant, ce modèle présente aussi des limites dues aux difficultés techniques et à l'absence de reproductibilité de l'action des enzymes selon les lots. En particulier, nous avons été confrontés à de nombreux problèmes liés à la nécessité d'une dégradation des hydrogels par lyse enzymatique. Celle-ci engendre une perte importante des cellules limitant ainsi les analyses des cellules en suspension. Par exemple, des études sur des populations cellulaires restreintes (progéniteurs mégacaryocytaires, précurseurs mégacaryocytaires ou MK matures) suite à un tri cellulaire ou encore des études de dosage de cytokines n'ont pas pu être envisagées du fait d'une perte non négligeable de cellules suite à cette lyse enzymatique. De même, l'obtention d'un nombre restreint de MK matures suite à cette lyse ne nous a pas permis d'envisager des études d'agrégation ou de sécrétion plaquettaire à la suite de la production plaquettaire réalisée en conditions de flux. De plus, la fragilité des hydrogels représente aussi une limite à l'utilisation de techniques d'imagerie telle que la microscopie confocale. En effet, leur rapidité à se dégrader en cas de chaleur ou d'exposition aux rayons lasers ne permet pas une utilisation prolongée de ces hydrogels lors de captures d'images en microscopie. Cette limite d'utilisation représente donc un frein quant à l'analyse *in situ* des cellules au sein des hydrogels.

L'ensemble de nos résultats nous a tout de même permis de formuler un modèle en réponse à nos principales observations: 1) la persistance de progéniteurs mégacaryocytaires, 2) la prolongation de la différenciation mégacaryocytaire répétée de façon séquentielle et 3) l'augmentation de la ploïdie et de la taille des MK en lien avec l'amélioration de la production plaquettaire.

La persistance de progéniteurs mégacaryocytaires et leurs entrées répétées en différenciation que nous avons identifiées peut être liée à la préservation des contacts cellule-cellule ou cellule-substrat au sein des hydrogels. Ces contacts non retrouvés en conditions de culture liquide, sont rapportés comme essentiels à la régulation des CSH et notamment, à leur entrée en différenciation [10]. En effet, ces contacts sont

nécessaires pour permettre l'activation de voies de signalisation telles que celles induites par la TPO ou le SCF. Ces voies déclenchées lors d'un contact entre une cellule du microenvironnement et la CSH, sont impliquées dans le maintien en quiescence des CSH [65] mais également dans leur entrée en différenciation dans le lignage mégacaryocytaire [109]. Dans notre modèle, la TPO et le SCF apportés de façon exogène pourraient rester séquestrés au sein des cavités. De plus, les cellules elles-mêmes pourraient être capables de sécréter des facteurs tels que la TPO augmentant ainsi sa concentration locale au sein des cavités. Ces deux hypothèses peuvent être en lien avec l'activation de voies de signalisation permettant de conserver des progéniteurs mégacaryocytaires au sein des hydrogels. Ainsi, il serait intéressant de réaliser un dosage de ces cytokines à différents temps de culture afin de savoir si elles persistent et à quelle concentration au sein des hydrogels. Une étude approfondie des voies de signalisation telle que Jak/STAT, induites par la TPO serait également un plus dans la compréhension de ce modèle.

La voie de signalisation Notch est également connue pour être déclenchée lors de contact cellule/cellule [337, 338]. Nos résultats préliminaires suite à une inhibition de la γ -sécrétase (inhibition du clivage de NICD et ainsi, de la transduction du signal vers le noyau) montrent une perte du maintien des progéniteurs mégacaryocytaires au sein des hydrogels. De plus, bien que le domaine NICD ne soit pas détectable sur nos cellules issues des hydrogels, l'étude par RT-qPCR du gène Hes-1 (gène transcrit lors de la signalisation Notch) montre une persistance de celui-ci à des temps tardifs. Une étude plus précise sur des populations cellulaires restreintes ($CD34^+$ et $CD34^+/CD41^+$) permettrait de confirmer l'implication de la voie Notch dans le maintien de cellules $CD34^+$ et de progéniteurs mégacaryocytaires au sein des hydrogels.

Kiel et Morrison (comme illustré sur la Figure 2 de l'introduction) ont proposé différents modèles de niche hématopoïétique [10]. Bien que n'ayant pas deux niches distinctes au sein de notre modèle 3D, les résultats présentés nous permettent de pencher en faveur du modèle selon lequel des CSH peuvent être maintenues en quiescence en même temps que d'autres entrent en différenciation, comme indiqué sur le panneau B de la Figure 2. Par ailleurs, des études récentes ont permis de confirmer le rôle des MK dans le maintien en quiescence des CSH et la régulation de leur prolifération [339, 340]. La

première équipe a rapporté un rôle différent des MK en fonction des conditions: en conditions homéostatiques, les MK maintiennent en quiescence les CSH tandis qu'en cas de stress hématopoïétique, les MK induisent l'expansion des CSH. Ces deux fonctions sont sous le contrôle de voies de signalisation induites par les MK: le maintien en quiescence fait intervenir la voie du TGF- β (transforming growth factor) tandis que la prolifération des CSH est régulée par la voie du FGF1 (fibroblast growth factor 1) [339]. En utilisant des souris *Cxcl4*^{-/-}, la seconde équipe a mis en évidence le rôle du PF-4 dans le maintien en quiescence et la prolifération des CSH [340]. Ce facteur connu pour réprimer la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire [341] apparaît également comme un inhibiteur de la prolifération des CSH [340]. En effet, cette étude montre qu'un prétraitement des souris avec du CXCL4 réduit la prolifération des CSH *in vitro* et diminue le nombre de CSH *in vivo* du fait d'un maintien en quiescence de celles-ci. En revanche, dans les souris déficientes en CXCL4, la prolifération des CSH ainsi que leur nombre sont augmentés [340]. Ainsi, sachant que le PF-4 présente une forte affinité pour l'héparine ou pour le dextrane [342], il est possible d'envisager que dans notre modèle de structures 3D, du PF-4 sécrété par les MK puisse se lier au dextrane. Par conséquent, de faibles quantités de PF-4 libre seraient présentes au sein des hydrogels conduisant ainsi à la prolifération des CSH et à la différenciation mégacaryocytaire. A l'inverse, en cas de faible liaison du PF-4 avec les hydrogels, des quantités plus importantes de PF-4 libre pourraient être présentes au sein des cavités permettant ainsi le maintien en quiescence des CSH. Ces dernières hypothèses permettent ainsi de renforcer notre modèle selon lequel les CSH peuvent entrer en différenciation en même temps que d'autres se maintiennent en quiescence (Figure 27). Ce modèle d'action du PF-4 sur les CSH pourrait être retrouvé au sein de la moelle osseuse en supposant une liaison entre ce facteur sécrété par les MK et les protéoglycanes ou glycosaminoglycanes formant le microenvironnement.

Par ailleurs, notre étude a permis de confirmer le lien existant entre la polyploïdisation des MK et la production plaquettaire [91, 93]. Les MK issus des hydrogels présentent une ploïdie et une taille cytoplasmique augmentées, à l'origine d'une augmentation de la production plaquettaire en conditions de flux. La formation des proplaquettes et des plaquettes met en jeu un système complexe faisant intervenir MLC. Notamment, le

maintien de la phosphorylation de MLC régule négativement la formation des proplaquettes [125, 195]. Notre étude préliminaire de MLC phosphorylée a révélé une augmentation de son taux dans les cellules issues des hydrogels en comparaison de celles issues de la culture liquide. Notre étude ayant été réalisée sur une population cellulaire totale et non pas sur les MK, il est primordial de réitérer et d'approfondir ces travaux afin de préciser l'implication de MLC et de la voie Rho-Rho kinase dans la régulation de la formation des proplaquettes au sein des hydrogels.

Parallèlement, il est connu que le DMS est impliqué dans la formation des proplaquettes et des plaquettes [206, 208, 212]. Une étude du DMS des MK issus des hydrogels pourrait également être d'un intérêt majeur dans la compréhension de l'augmentation de la production plaquettaire dans ces conditions. Une augmentation de la taille du DMS serait attendue dans les MK issus des hydrogels en comparaison de ceux issus de culture liquide. L'équipe de C. Léon a d'ailleurs récemment montré qu'une différenciation de cellules Lin⁻ murines en méthylcellulose permet d'augmenter le développement du DMS et d'améliorer son organisation au sein des MK (Communication affichée, Congrès EUPLAN, Septembre 2014; Communication orale, Club Mégacaryocytes/Plaquettes, Novembre 2014).

Notre modèle de flux nous a permis d'obtenir des plaquettes non activées suite à la perfusion des MK issus des hydrogels. Les rendements de production plaquettaire obtenus dans ces conditions nous ont permis d'effectuer la mesure d'adhésion sur fibrinogène, de démontrer la fonctionnalité in vitro des plaquettes et notamment, leur capacité à activer l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ indispensable aux processus d'agrégation, de sécrétion plaquettaire et de rétraction du caillot [250]. Pour envisager des tests in vivo de ces plaquettes, il serait nécessaire d'améliorer encore ces rendements. Pour se faire, il serait intéressant de modifier la structure des hydrogels de P/D par ajout de protéines de la matrice extracellulaire tels que le collagène ou l'héparine connus pour améliorer l'expansion des progéniteurs et la différenciation mégacaryocytaire [343, 344]. Parallèlement, l'utilisation de cellules ES ou iPS dont le potentiel permet une prolifération et une différenciation continues [146, 178], en combinaison des hydrogels de P/D pourrait permettre d'obtenir une source continue et illimitée de MK et par conséquent, de plaquettes. La faisabilité de cette combinaison a déjà été rapportée lors

de la culture de cellules ES au sein de ces hydrogels pour la différenciation cardiaque [320]. De plus, des études récentes ont rapporté la possibilité de réaliser la production plaquettaire au sein de bioréacteurs dans des conditions proches des conditions physiologiques, à partir de MK différenciés de cellules ES et iPS [7, 333]. Ces données soulignent donc la faisabilité de combiner les cellules pluripotentes avec les hydrogels de P/D et le modèle de flux dans le but d'augmenter les rendements de production plaquettaire.

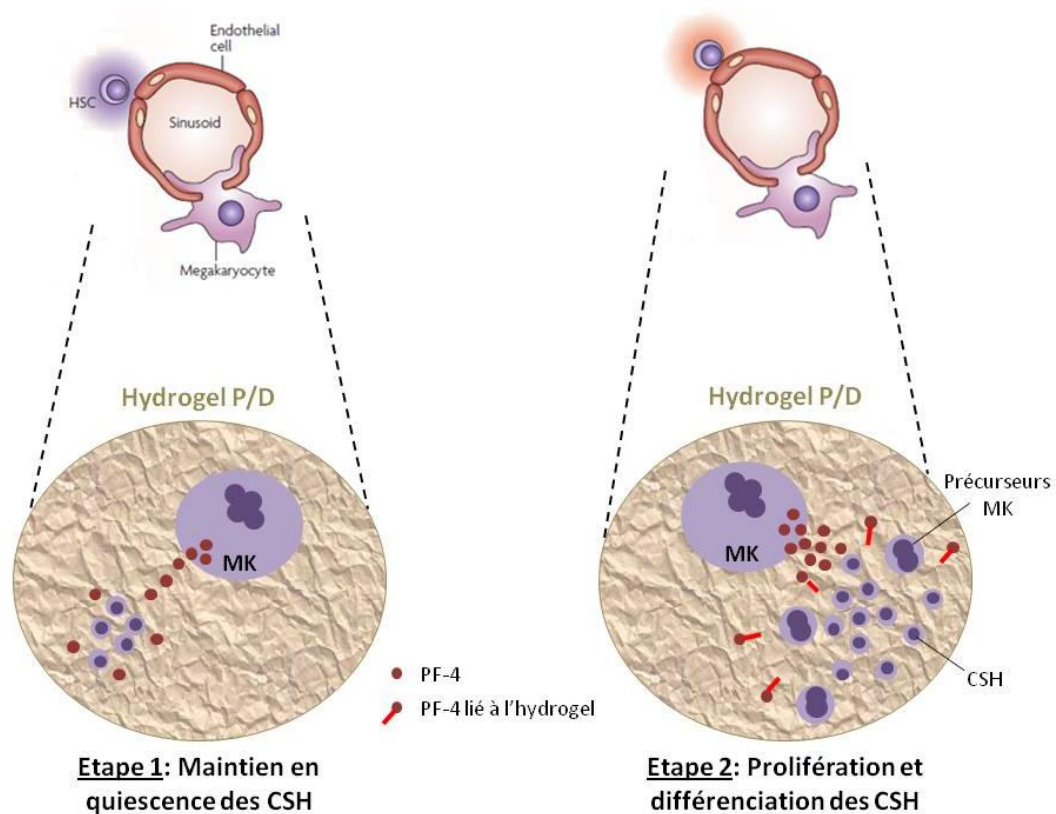


Figure 27: Représentation schématique de la régulation des CSH au sein des hydrogels

En absence de liaison au dextrane, le PF-4 sécrété par les MK induit un maintien en quiescence des CSH tandis que sa liaison à l'hydrogel conduit à la prolifération et la différenciation des CSH.

Cette étude représente donc une avancée dans la compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu au sein des structures 3D, menant à une amélioration de la production plaquettaire en conditions de flux. En effet, tous les travaux sur le sujet n'ont pas émis d'hypothèses quant à ces mécanismes. Les derniers travaux des groupes d'Italiano et d'Eto rapportent seulement la nécessité d'utiliser des approches de bioingénierie et notamment des systèmes de microfluidique pour se rapprocher des conditions physiologiques afin d'augmenter le rendement de production plaquettaire in

vitro [7, 333]. Les modèles proposés par le groupe de Balduini semblent être les plus pertinents par rapport aux nôtres. En effet, bien que n'expliquant pas le processus de différenciation mégacaryocytaire au sein de leur bioréacteur, ce groupe a tout même montré l'importance de l'environnement physiologique de la moelle osseuse dans la migration des MK vers le site de production plaquettaire. Cet environnement et cette migration sont absolument nécessaires à la production plaquettaire [6].

Les études utilisant ces bioréacteurs et ces modèles de microfluidique [4, 7, 332, 333] pour la production plaquettaire *in vitro* n'ont pas permis d'aboutir à la caractérisation des fonctions plaquettaires *in vivo*. Dans le but d'obtenir des réponses sur ces fonctions *in vivo*, nous avons réalisé la production plaquettaire dans notre modèle de flux à partir notamment de MK murins afin de réaliser des études de thrombose *in vivo*. L'ensemble de nos résultats nous a permis de montrer que les plaquettes obtenues en flux sont capables 1) de s'incorporer et de participer à la formation d'un thrombus et 2) de se maintenir en circulation.

Bien que des études précédentes aient montré la capacité des plaquettes obtenues *in vitro* en conditions statiques à s'incorporer à un thrombus [146], notre étude révèle que seules les plaquettes produites en flux en sont capables. Ceci souligne l'importance de l'interaction des forces de cisaillement et du VWF avec les MK et les plaquettes dans l'obtention de plaquettes fonctionnelles *in vivo*. Néanmoins, notre étude de thrombose *in vivo* s'est limitée à l'utilisation de plaquettes murines. Ainsi, dans le but d'utiliser les plaquettes obtenues en conditions de flux à des fins thérapeutiques, il est nécessaire de vérifier la capacité d'incorporation des plaquettes humaines à un thrombus *in vivo*. Pour se faire, l'utilisation de souris humanisées pour le VWF est à envisager étant donné la faible interaction de la GPIb humaine avec le VWF murin [345, 346].

Par ailleurs, seules les plaquettes obtenues en conditions de flux sont capables de se maintenir dans la circulation *in vivo*. En effet, nous rapportons une incapacité des plaquettes sanguines et des plaquettes obtenues en statique à se maintenir en circulation. D'une part, il est possible que les plaquettes nouvellement formées présentent des caractéristiques et des fonctions potentiellement perdues par les

plaquettes sanguines en fin de vie. De plus, les données récentes de la littérature ont mis en évidence la capacité des proplaquettes à se fragmenter continuellement dans la circulation sanguine [204]. Ces proplaquettes se maintiennent à un état d'équilibre avec les préplaquettes représentant ainsi une nouvelle étape de production plaquettaire [182]. Nous avons par la suite montré que la conversion des préplaquettes en proplaquettes nécessite la présence de VWF pour permettre le maintien d'une thrombopoïèse normale [205]. Ainsi, dans ce présent travail, il est possible d'imaginer que la fraction injectée à la souris possède des proplaquettes et des plaquettes nouvellement formées en conditions de flux mais également des préplaquettes capables de se fragmenter de façon continue dans la circulation sanguine. Ceci pourrait expliquer la persistance de plaquettes chez la souris en comparaison des plaquettes du sang. D'autre part, des travaux ont suggéré une implication des métalloprotéinases et notamment d'ADAM17 dans la régulation du temps de demi-vie des plaquettes issues de culture [347]. Cette dernière raccourcit le temps de demi-vie des plaquettes. Il serait donc intéressant d'utiliser des inhibiteurs de métalloprotéinases afin de savoir si elles sont impliquées dans la régulation du temps de demi-vie et dans la fonctionnalité des plaquettes obtenues en statique dans nos conditions de culture. De plus, ADAM17 coupe la partie extracellulaire de GPIIb/IIIa inactivant ainsi le récepteur GPIIb [348]. Pourtant, en conditions de flux, les MK sont capables d'adhérer au VWF et de libérer des plaquettes fonctionnelles. Une expertise des mécanismes mis en jeu lors de l'adhésion des MK au VWF en conditions de flux serait un plus pour comprendre pourquoi les plaquettes produites dans ces conditions sont fonctionnelles contrairement aux plaquettes obtenues en statique.

Finalement, nos travaux représentent un double intérêt: la mise en place de systèmes permettant d'étudier dans un environnement proche du microenvironnement de la moelle osseuse, les mécanismes de mégacaryopoïèse et de thrombopoïèse. D'autre part, la mise en avant du caractère fonctionnelle in vitro mais surtout in vivo des plaquettes produites au sein du système de flux, demeure un atout majeur quant à leur utilisation dans un cadre de thérapie cellulaire.

ANNEXES

ANNEXE 1: PUBLICATIONS

Article publié

Poirault-Chassac S, Nguyen KA, **Pietrzyk A**, Casari C, Veyradier A, Denis CV, Baruch D. *Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor*. **PLoS One**. 2013; 8:e63810. (Impact factor : 3.53)

Article soumis

Pietrzyk-Nivau A, Poirault-Chassac S, Gandrille S, Derkaoui SM, Kauskot A, Letourneur D, Le Visage C, Baruch D. Three-dimensional environment sustains hematopoietic stem cell differentiation into platelet-producing megakaryocytes. *Soumis à PLoS One*.

Article en préparation

Pietrzyk-Nivau A, Poirault-Chassac S, Kauskot A, Lauret E, Denis C, Baruch D. Proof of principal for efficiency in thrombosis of shear-generated platelets.

ANNEXE 2: COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

Communications orales

- *Effect of three-dimensional hydrogel scaffolds on Megakaryocyte differentiation and platelet production* - Autour de la cellule souche - Bordeaux - Mars 2013
- *Augmentation de la production de mégacaryocytes et de plaquettes en système de culture tridimensionnelle* - Club MK/Plaquettes - Toulouse - Décembre 2013
- *Effet des structures poreuses tridimensionnelles sur la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire* - ED MTCl - Paris - Avril 2014
- *Preuve de concept de l'efficacité en thrombose des plaquettes générées in vitro en conditions de flux* - Club MK/Plaquettes - Paris - Novembre 2014

Communications affichées

- *Culture de mégacaryocytes humains sur matrices tridimensionnelles d'hydrogels de polysaccharides* - SFBCT - Reims - Septembre 2011
- *Effect of three-dimensional hydrogel scaffolds on megakaryocyte differentiation and platelet production* - EUPLAN - Maastricht - Septembre 2012
- *Effect of three-dimensional hydrogel scaffolds on megakaryocyte differentiation* - ESGC - Versailles - Octobre 2012
- *Effets des matrices d'hydrogels tridimensionnels sur la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire* - SFH - La Défense - Mars 2013
- *Effets des matrices d'hydrogels tridimensionnels sur la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire* - ED MTCl - Paris - Avril 2013
- *Effect of three-dimensional hydrogel scaffolds on megakaryocyte differentiation and platelet production* - ISTH – Amsterdam - Juin-Juillet 2013
- *Augmentation de la production de mégacaryocytes et de plaquettes en système de culture tridimensionnelle* - DIM Biothérapies - Paris - Novembre 2013

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, Cote D, Rowe DW, Lin CP, Scadden DT. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*. 2009; 457(7225): 92-96.
2. Xie Y, Yin T, Wiegnaebe W, He XC, Miller D, Stark D, Perko K, Alexander R, Schwartz J, Grindley JC, Park J, Haug JS, Wunderlich JP, Li H, Zhang S, Johnson T, Feldman RA, Li L. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*. 2009; 457(7225): 97-101.
3. Lassailly F, Griessinger E, Bonnet D. "Microenvironmental contaminations" induced by fluorescent lipophilic dyes used for noninvasive in vitro and in vivo cell tracking. *Blood*. 2010; 115(26): 5347-5354.
4. Sullenbarger B, Bahng JH, Gruner R, Kotov N, Lasky LC. Prolonged continuous in vitro human platelet production using three-dimensional scaffolds. *Exp Hematol*. 2009; 37(1): 101-110.
5. Pallotta I, Lovett M, Rice W, Kaplan DL, Balduini A. Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8359.
6. Pallotta ML. Evidence for the presence of a FAD pyrophosphatase and a FMN phosphohydrolase in yeast mitochondria: a possible role in flavin homeostasis. *Yeast*. 2011; 28(10): 693-705.
7. Thon JN, Mazutis L, Wu S, Sylman JL, Ehrlicher A, Machlus KR, Feng Q, Lu S, Lanza R, Neeves KB, Weitz DA, Italiano JE, Jr. Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood*. 2014; 124(12): 1857-1867.
8. Dunois-Larde C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Borde E, Baruch D. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood*. 2009; 114(9): 1875-1883.
9. Kricun ME. Red-yellow marrow conversion: its effect on the location of some solitary bone lesions. *Skeletal Radiol*. 1985; 14(1): 10-19.
10. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(4): 290-301.
11. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res*. 2014; 2014: 128436.

12. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001; 97(8): 2293-2299.
13. Miyamoto K, Yoshida S, Kawasumi M, Hashimoto K, Kimura T, Sato Y, Kobayashi T, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Hao W, Morioka H, Chiba K, Yasuda H, Penninger JM, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T. Osteoclasts are dispensable for hematopoietic stem cell maintenance and mobilization. *J Exp Med*. 2011; 208(11): 2175-2181.
14. Lymperi S, Ersek A, Ferraro F, Dazzi F, Horwood NJ. Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood*. 2011; 117(5): 1540-1549.
15. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(2): 93-106.
16. Calvi LM. Osteolineage cells and regulation of the hematopoietic stem cell. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013; 26(3): 249-252.
17. Kiel MJ, Iwashita T, Yilmaz OH, Morrison SJ. Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells. *Dev Biol*. 2005; 283(1): 29-39.
18. Yoon KA, Cho HS, Shin HI, Cho JY. Differential regulation of CXCL5 by FGF2 in osteoblastic and endothelial niche cells supports hematopoietic stem cell migration. *Stem Cells Dev*. 2012; 21(18): 3391-3402.
19. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4(1-2): 7-25.
20. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003; 425(6960): 841-846.
21. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003; 425(6960): 836-841.
22. Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev*. 2007; 21(23): 3044-3060.

23. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004; 118(2): 149-161.
24. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(6): 685-697.
25. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002; 3(7): 687-694.
26. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, Kos CH, Pollak MR, Brown EM, Scadden DT. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006; 439(7076): 599-603.
27. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006; 25(6): 977-988.
28. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131(2): 324-336.
29. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005; 121(7): 1109-1121.
30. Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben-Hur H, Lapidot T, Alon R. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest*. 1999; 104(9): 1199-1211.

31. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000; 95(11): 3289-3296.
32. Li B, Bailey AS, Jiang S, Liu B, Goldman DC, Fleming WH. Endothelial cells mediate the regeneration of hematopoietic stem cells. *Stem Cell Res*. 2010; 4(1): 17-24.
33. Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, Jacobsen RN, Forristal CE, Patton JT, Magnani JL, Levesque JP. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med*. 2012; 18(11): 1651-1657.
34. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F, Rafii S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. 2004; 10(1): 64-71.
35. Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJ, Orkin SH. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*. 1995; 81(5): 695-704.
36. Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, Paoletti F, Rana RA, Lorenzini R, Migliaccio G, Migliaccio AR. Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood*. 2002; 100(4): 1123-1132.
37. Kacena MA, Gundberg CM, Horowitz MC. A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells. *Bone*. 2006; 39(5): 978-984.
38. Metcalf D. On hematopoietic stem cell fate. *Immunity*. 2007; 26(6): 669-673.
39. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 1998; 125(4): 725-732.
40. Iwasaki H, Akashi K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene*. 2007; 26(47): 6687-6696.
41. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(2): 120-136.

42. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984; 133(1): 157-165.
43. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(26): 12240-12244.
44. Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(4): 1470-1474.
45. Zhong RK, Astle CM, Harrison DE. Distinct developmental patterns of short-term and long-term functioning lymphoid and myeloid precursors defined by competitive limiting dilution analysis in vivo. *J Immunol.* 1996; 157(1): 138-145.
46. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(6): 635-645.
47. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(7): 2804-2808.
48. Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL. Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother.* 2001; 55(4): 186-194.
49. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; 241(4861): 58-62.
50. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood.* 1992; 80(12): 3044-3050.
51. Ito CY, Li CY, Bernstein A, Dick JE, Stanford WL. Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. *Blood.* 2003; 101(2): 517-523.
52. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell.* 2005; 121(2): 295-306.

53. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Spangrude GJ, Weissman IL. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol.* 1993; 122(4): 897-902.
54. Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood.* 1996; 88(4): 1284-1296.
55. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006; 441(7097): 1068-1074.
56. Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood.* 1999; 94(7): 2161-2168.
57. Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood.* 1998; 92(2): 345-347; discussion 52.
58. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Camilleri JP, Bariety J, Tambourin P, Varet B. Identification of tissues and cells producing erythropoietin in the anemic mouse. *Contrib Nephrol.* 1988; 66: 17-24.
59. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biol.* 1989; 109(6 Pt 1): 3005-3013.
60. Kaushansky K, Broudy VC, Lin N, Jorgensen MJ, McCarty J, Fox N, Zucker-Franklin D, Lofton-Day C. Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(8): 3234-3238.
61. Geddis AE. Megakaryopoiesis. *Semin Hematol.* 2010; 47(3): 212-219.
62. Schweikle E, Baessler T, Yildirim S, Kanz L, Mohle R, Weisel KC. Osteoprotegerin positively regulates hematopoietic progenitor cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012; 7(1): 72-77.
63. Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, Hess D, Donahue C, de Sauvage FJ, Eaton DL. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood.* 1998; 92(1): 4-10.
64. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(3): 1195-1200.

65. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Mansson R, Thoren LA, Ekblom M, Alexander WS, Jacobsen SE. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(6): 671-684.
66. Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Suda T. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1176: 36-46.
67. Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood*. 1996; 88(2): 429-436.
68. Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000; 192(9): 1281-1288.
69. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002; 109(5): 625-637.
70. Driessen RL, Johnston HM, Nilsson SK. Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol*. 2003; 31(12): 1284-1291.
71. Thoren LA, Liuba K, Bryder D, Nygren JM, Jensen CT, Qian H, Antonchuk J, Jacobsen SE. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol*. 2008; 180(4): 2045-2053.
72. Fortini ME. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(9): 673-684.
73. Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, Reya T. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*. 2005; 6(3): 314-322.
74. Yu X, Alder JK, Chun JH, Friedman AD, Heimfeld S, Cheng L, Civin CI. HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding. *Stem Cells*. 2006; 24(4): 876-888.

75. Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, Gale K, Ishiko J, Satoh Y, Tanaka H, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Enver T, Kanakura Y. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem*. 2005; 280(6): 4929-4939.
76. Burns CE, Traver D, Mayhall E, Shepard JL, Zon LI. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev*. 2005; 19(19): 2331-2342.
77. Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, Takanashi M, Kozuma S, Takato T, Nakahata T, Nishikawa M, Sakano S, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. *Stem Cells*. 2006; 24(11): 2456-2465.
78. Maillard I, Koch U, Dumortier A, Shestova O, Xu L, Sai H, Pross SE, Aster JC, Bhandoola A, Radtke F, Pear WS. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(4): 356-366.
79. Varnum-Finney B, Halasz LM, Sun M, Gridley T, Radtke F, Bernstein ID. Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells. *J Clin Invest*. 2011; 121(3): 1207-1216.
80. Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, Leutz A. Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol*. 2006; 7(10): 1037-1047.
81. Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, Scadden DT. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(3): 274-283.
82. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003; 423(6938): 409-414.
83. Eisenmann DM. Wnt signaling. *WormBook*. 2005; 1-17.
84. Italiano JE, Jr., Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*. 1999; 147(6): 1299-1312.
85. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 2005; 115(12): 3348-3354.

86. Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N, Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J Thromb Haemost.* 2009; 7 Suppl 1: 227-234.
87. Debili N, Issaad C, Masse JM, Guichard J, Katz A, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation. *Blood.* 1992; 80(12): 3022-3035.
88. Tomer A. Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood.* 2004; 104(9): 2722-2777.
89. Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, Srouf EF, Hoffman R. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood.* 1989; 74(1): 145-151.
90. Ebbe S. Biology of megakaryocytes. *Prog Hemost Thromb.* 1976; 3: 211-229.
91. Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol.* 2000; 28(1): 3-16.
92. Raslova H, Roy L, Vourc'h C, Le Couedic JP, Brison O, Metivier D, Feunteun J, Kroemer G, Debili N, Vainchenker W. Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood.* 2003; 101(2): 541-544.
93. Raslova H, Kauffmann A, Sekkai D, Ripoche H, Larbret F, Robert T, Le Roux DT, Kroemer G, Debili N, Dessen P, Lazar V, Vainchenker W. Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood.* 2007; 109(8): 3225-3234.
94. Datta NS, Williams JL, Caldwell J, Curry AM, Ashcraft EK, Long MW. Novel alterations in CDK1/cyclin B1 kinase complex formation occur during the acquisition of a polyploid DNA content. *Mol Biol Cell.* 1996; 7(2): 209-223.
95. Zhang Y, Wang Z, Liu DX, Pagano M, Ravid K. Ubiquitin-dependent degradation of cyclin B is accelerated in polyploid megakaryocytes. *J Biol Chem.* 1998; 273(3): 1387-1392.
96. Geddis AE, Fox NE, Tkachenko E, Kaushansky K. Endomitotic megakaryocytes that form a bipolar spindle exhibit cleavage furrow ingression followed by furrow regression. *Cell Cycle.* 2007; 6(4): 455-460.

97. Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, Vainchenker W, Chang Y. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*. 2008; 112(8): 3164-3174.
98. 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; 3: 717.
99. Melendez J, Stengel K, Zhou X, Chauhan BK, Debidda M, Andreassen P, Lang RA, Zheng Y. RhoA GTPase is dispensable for actomyosin regulation but is essential for mitosis in primary mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 2011; 286(17): 15132-15137.
100. Mazharian A, Mori J, Wang YJ, Heising S, Neel BG, Watson SP, Senis YA. Megakaryocyte-specific deletion of the protein-tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 causes abnormal megakaryocyte development, platelet production, and function. *Blood*. 2013; 121(20): 4205-4220.
101. Muntean AG, Pang L, Poncz M, Dowdy SF, Blobel GA, Crispino JD. Cyclin D-Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization. *Blood*. 2007; 109(12): 5199-5207.
102. Eliades A, Papadantonakis N, Ravid K. New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization. *J Biol Chem*. 2010; 285(24): 18909-18917.
103. Pitchford SC, Lodie T, Rankin SM. VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelet production in mice. *Blood*. 2012; 120(14): 2787-2795.
104. Golfier S, Kondo S, Schulze T, Takeuchi T, Vassileva G, Achtman AH, Graler MH, Abbondanzo SJ, Wiekowski M, Kremmer E, Endo Y, Lira SA, Bacon KB, Lipp M. Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4. *FASEB J*. 2010; 24(12): 4701-4710.
105. Norol F, Vitrat N, Cramer E, Guichard J, Burstein SA, Vainchenker W, Debili N. Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells. *Blood*. 1998; 91(3): 830-843.

106. Poirault-Chassac S, Six E, Catelain C, Lavergne M, Villeval JL, Vainchenker W, Lauret E. Notch/Delta4 signaling inhibits human megakaryocytic terminal differentiation. *Blood*. 2010; 116(25): 5670-5678.
107. Chen L, Xie X, Liu D, Lyu Y, Yue W, Shi W, Xi J, Zhang X, Nan X, Wang J, Zhou J, Li Y, He L, Yao H, Li S, Pei X. [Study on the induction and differentiation of megakaryocyte progenitor cell derived from umbilical cord blood]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014; 35(3): 187-190.
108. Choi ES, Hokom M, Bartley T, Li YS, Ohashi H, Kato T, Nichol JL, Skrine J, Knudten A, Chen J, et al. Recombinant human megakaryocyte growth and development factor (rHuMGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets in vitro. *Stem Cells*. 1995; 13(3): 317-322.
109. Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1044: 139-141.
110. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*. 1994; 369(6481): 568-571.
111. Debili N, Wendling F, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Hunt P, Vainchenker W. The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood*. 1995; 86(7): 2516-2525.
112. Papayannopoulou T. Biologic effects of thrombopoietin, the Mpl ligand, and its therapeutic potential. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996; 38 Suppl: S69-73.
113. Cramer EM, Norol F, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Masse JM, Debili N. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood*. 1997; 89(7): 2336-2346.
114. Dorsch M, Fan PD, Bogenberger J, Goff SP. TPO and IL-3 induce overlapping but distinct protein tyrosine phosphorylation in a myeloid precursor cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 214(2): 424-431.
115. Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem*. 1999; 274(19): 13480-13484.

116. Geddis AE, Fox NE, Kaushansky K. Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors. *J Biol Chem*. 2001; 276(37): 34473-34479.
117. Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood*. 1997; 89(2): 483-492.
118. Kirito K, Fox N, Kaushansky K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003; 102(9): 3172-3178.
119. Kirito K, Kaushansky K. Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol*. 2006; 13(3): 151-156.
120. Olthof SG, Fatrai S, Drayer AL, Tyl MR, Vellenga E, Schuringa JJ. Downregulation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in CD34+ cells promotes megakaryocytic development, whereas activation of STAT5 drives erythropoiesis. *Stem Cells*. 2008; 26(7): 1732-1742.
121. Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood*. 1999; 94(4): 1273-1282.
122. Pang L, Weiss MJ, Poncz M. Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest*. 2005; 115(12): 3332-3338.
123. Gewirtz AM, Calabretta B, Rucinski B, Niewiarowski S, Xu WY. Inhibition of human megakaryocytopoiesis in vitro by platelet factor 4 (PF4) and a synthetic COOH-terminal PF4 peptide. *J Clin Invest*. 1989; 83(5): 1477-1486.
124. Oda M, Kurasawa Y, Todokoro K, Nagata Y. Thrombopoietin-induced CXC chemokines, NAP-2 and PF4, suppress polyploidization and proplatelet formation during megakaryocyte maturation. *Genes Cells*. 2003; 8(1): 9-15.
125. Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W. From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 Suppl 1: 318-327.
126. Deutsch VR, Tomer A. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br J Haematol*. 2013; 161(6): 778-793.

127. Tijssen MR, Ghevaert C. Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(4): 593-604.
128. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M, Orkin SH. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*. 1997; 90(1): 109-119.
129. Nutt SL, Metcalf D, D'Amico A, Polli M, Wu L. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*. 2005; 201(2): 221-231.
130. Arinobu Y, Mizuno S, Chong Y, Shigematsu H, Iino T, Iwasaki H, Graf T, Mayfield R, Chan S, Kastner P, Akashi K. Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(4): 416-427.
131. Lu J, Guo S, Ebert BL, Zhang H, Peng X, Bosco J, Pretz J, Schlanger R, Wang JY, Mak RH, Dombkowski DM, Preffer FI, Scadden DT, Golub TR. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell*. 2008; 14(6): 843-853.
132. Chlon TM, Dore LC, Crispino JD. Cofactor-mediated restriction of GATA-1 chromatin occupancy coordinates lineage-specific gene expression. *Mol Cell*. 2012; 47(4): 608-621.
133. Gaines P, Geiger JN, Knudsen G, Seshasayee D, Wojchowski DM. GATA-1- and FOG-dependent activation of megakaryocytic alpha IIB gene expression. *J Biol Chem*. 2000; 275(44): 34114-34121.
134. Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJ, Vyas P, de Boer E, Grosveld F, Strouboulis J. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J*. 2005; 24(13): 2354-2366.
135. Wang X, Crispino JD, Letting DL, Nakazawa M, Poncz M, Blobel GA. Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *EMBO J*. 2002; 21(19): 5225-5234.
136. Starck J, Cohet N, Gonnet C, Sarrazin S, Doubeikovskaia Z, Doubeikovski A, Verger A, Duterque-Coquillaud M, Morle F. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(4): 1390-1402.
137. Bouilloux F, Juban G, Cohet N, Buet D, Guyot B, Vainchenker W, Louache F, Morle F. EKLF restricts megakaryocytic differentiation at the benefit of erythrocytic differentiation. *Blood*. 2008; 112(3): 576-584.

138. Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood*. 2003; 101(11): 4333-4341.
139. Waltzer L, Ferjoux G, Bataille L, Haenlin M. Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J*. 2003; 22(24): 6516-6525.
140. Emambokus N, Vegiopoulos A, Harman B, Jenkinson E, Anderson G, Frampton J. Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb. *EMBO J*. 2003; 22(17): 4478-4488.
141. Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature*. 1993; 362(6422): 722-728.
142. Shivdasani RA, Fielder P, Keller GA, Orkin SH, de Sauvage FJ. Regulation of the serum concentration of thrombopoietin in thrombocytopenic NF-E2 knockout mice. *Blood*. 1997; 90(5): 1821-1827.
143. Lecine P, Blank V, Shivdasani R. Characterization of the hematopoietic transcription factor NF-E2 in primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem*. 1998; 273(13): 7572-7578.
144. Lecine P, Italiano JE, Jr., Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood*. 2000; 96(4): 1366-1373.
145. McCormack MP, Hall MA, Schoenwaelder SM, Zhao Q, Ellis S, Prentice JA, Clarke AJ, Slater NJ, Salmon JM, Jackson SP, Jane SM, Curtis DJ. A critical role for the transcription factor Scl in platelet production during stress thrombopoiesis. *Blood*. 2006; 108(7): 2248-2256.
146. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med*. 2010; 207(13): 2817-2830.

147. Chen L, Kostadima M, Martens JH, Canu G, Garcia SP, Turro E, Downes K, Macaulay IC, Bielczyk-Maczynska E, Coe S, Farrow S, Poudel P, Burden F, Jansen SB, Astle WJ, Attwood A, Bariana T, de Bono B, Breschi A, Chambers JC, Choudry FA, Clarke L, Coupland P, van der Ent M, Erber WN, Jansen JH, Favier R, Fenech ME, Foad N, Freson K, van Geet C, Gomez K, Guigo R, Hampshire D, Kelly AM, Kerstens HH, Kooner JS, Laffan M, Lentaigne C, Labalette C, Martin T, Meacham S, Mumford A, Nurnberg S, Palumbo E, van der Reijden BA, Richardson D, Sammut SJ, Slodkiewicz G, Tamuri AU, Vasquez L, Voss K, Watt S, Westbury S, Flicek P, Loos R, Goldman N, Bertone P, Read RJ, Richardson S, Cvejic A, Soranzo N, Ouwehand WH, Stunnenberg HG, Frontini M, Rendon A. Transcriptional diversity during lineage commitment of human blood progenitors. *Science*. 2014; 345(6204): 1251033.
148. Zhang KY, Liu J, Jia YJ, Li W, Duan L, Gao SM, Cui S, Gong ZY, Ni L, Zhang ZX. [Influence of cytokine combinations on proliferation and differentiation of umbilical cord blood CD34(+) cells into megakaryocytes/platelets in vitro]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011; 19(4): 1053-1057.
149. Panuganti S, Schlinker AC, Lindholm PF, Papoutsakis ET, Miller WM. Three-stage ex vivo expansion of high-ploidy megakaryocytic cells: toward large-scale platelet production. *Tissue Eng Part A*. 2013; 19(7-8): 998-1014.
150. Proulx C, Dupuis N, St-Amour I, Boyer L, Lemieux R. Increased megakaryopoiesis in cultures of CD34-enriched cord blood cells maintained at 39 degrees C. *Biotechnol Bioeng*. 2004; 88(6): 675-680.
151. Pineault N, Boucher JF, Cayer MP, Palmqvist L, Boyer L, Lemieux R, Proulx C. Characterization of the effects and potential mechanisms leading to increased megakaryocytic differentiation under mild hyperthermia. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(3): 483-493.
152. Feng Q, Shabrani N, Thon Jonathan N, Huo H, Thiel A, Machlus Kellie R, Kim K, Brooks J, Li F, Luo C, Kimbrel Erin A, Wang J, Kim K-S, Italiano J, Cho J, Lu S-J, Lanza R. Scalable Generation of Universal Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2014; 3:1-15.
153. Gekas C, Graf T. Induced pluripotent stem cell-derived human platelets: one step closer to the clinic. *J Exp Med*. 2010; 207(13): 2781-2784.

154. Takayama N, Eto K. In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol.* 2012; 788: 205-217.
155. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292(5819): 154-156.
156. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78(12): 7634-7638.
157. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282(5391): 1145-1147.
158. Mitjavila-Garcia MT, Cailleret M, Godin I, Nogueira MM, Cohen-Solal K, Schiavon V, Lecluse Y, Le Pesteur F, Lagrue AH, Vainchenker W. Expression of CD41 on hematopoietic progenitors derived from embryonic hematopoietic cells. *Development.* 2002; 129(8): 2003-2013.
159. Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Berton A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(20): 12819-12824.
160. Eto K, Leavitt AL, Nakano T, Shattil SJ. Development and analysis of megakaryocytes from murine embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 2003; 365: 142-158.
161. Pick M, Azzola L, Osborne E, Stanley EG, Elefanty AG. Generation of megakaryocytic progenitors from human embryonic stem cells in a feeder- and serum-free medium. *PLoS One.* 2013; 8(2): e55530.
162. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4): 663-676.
163. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; 131(5): 861-872.
164. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(8): 2883-2888.

165. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(1): 101-106.
166. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(1): 10-12.
167. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007; 318(5858): 1917-1920.
168. Buganim Y, Markoulaki S, van Wietmarschen N, Hoke H, Wu T, Ganz K, Akhtar-Zaidi B, He Y, Abraham BJ, Porubsky D, Kulenkampff E, Faddah DA, Shi L, Gao Q, Sarkar S, Cohen M, Goldmann J, Nery JR, Schultz MD, Ecker JR, Xiao A, Young RA, Lansdorp PM, Jaenisch R. The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell Stem Cell.* 2014; 15(3): 295-309.
169. Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood.* 2009; 113(22): 5476-5479.
170. Takenaka C, Nishishita N, Takada N, Jakt LM, Kawamata S. Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. *Exp Hematol.* 2010; 38(2): 154-162.
171. Nishishita N, Takenaka C, Fusaki N, Kawamata S. Generation of human induced pluripotent stem cells from cord blood cells. *J Stem Cells.* 2011; 6(3): 101-108.
172. Fujimoto TT, Kohata S, Suzuki H, Miyazaki H, Fujimura K. Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells in vitro. *Blood.* 2003; 102(12): 4044-4051.
173. Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, Nakauchi H. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J Exp Med.* 2008; 205(8): 1917-1927.
174. Gaur M, Kamata T, Wang S, Moran B, Shattil SJ, Leavitt AD. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J Thromb Haemost.* 2006; 4(2): 436-442.

175. Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T, Eto K, Nakauchi H. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood*. 2008; 111(11): 5298-5306.
176. Lu SJ, Li F, Yin H, Feng Q, Kimbrel EA, Hahm E, Thon JN, Wang W, Italiano JE, Cho J, Lanza R. Platelets generated from human embryonic stem cells are functional in vitro and in the microcirculation of living mice. *Cell Res*. 2011; 21(3): 530-545.
177. Smith BW, Rozelle SS, Leung A, Ubellacker J, Parks A, Nah SK, French D, Gadue P, Monti S, Chui DH, Steinberg MH, Frelinger AL, Michelson AD, Theberge R, McComb ME, Costello CE, Kotton DN, Mostoslavsky G, Sherr DH, Murphy GJ. The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation. *Blood*. 2013; 122(3): 376-385.
178. Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita KI, Koike T, Harimoto KI, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, Nishimura S, Eto K. Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2014; 14(4): 535-548.
179. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat*. 1976; 145(2): 183-205.
180. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Jr., Shivdasani RA, von Andrian UH. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007; 317(5845): 1767-1770.
181. Zhang L, Orban M, Lorenz M, Barocke V, Braun D, Urtz N, Schulz C, von Bruhl ML, Tirniceriu A, Gaertner F, Proia RL, Graf T, Bolz SS, Montanez E, Prinz M, Muller A, von Baumgarten L, Billich A, Sixt M, Fassler R, von Andrian UH, Junt T, Massberg S. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med*. 2012; 209(12): 2165-2181.
182. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, Larson MK, Hoffmeister K, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol*. 2010; 191(4): 861-874.

183. Thon JN, Macleod H, Begonja AJ, Zhu J, Lee KC, Mogilner A, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun.* 2012; 3: 852.
184. Choi ES, Hokom MM, Nichol JL, Hornkohl A, Hunt P. Functional human platelet generation in vitro and regulation of cytoplasmic process formation. *C R Acad Sci III.* 1995; 318(3): 387-393.
185. Miyazaki R, Ogata H, Iguchi T, Sogo S, Kushida T, Ito T, Inaba M, Ikehara S, Kobayashi Y. Comparative analyses of megakaryocytes derived from cord blood and bone marrow. *Br J Haematol.* 2000; 108(3): 602-609.
186. Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36(2): 99-103.
187. Italiano JE, Jr., Bergmeier W, Tiwari S, Falet H, Hartwig JH, Hoffmeister KM, Andre P, Wagner DD, Shivdasani RA. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood.* 2003; 101(12): 4789-4796.
188. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood.* 2005; 106(13): 4066-4075.
189. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Jr., Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol.* 2001; 11(8): 579-586.
190. Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood.* 2009; 113(2): 458-461.
191. Pleines I, Dutting S, Cherpokova D, Eckly A, Meyer I, Morowski M, Krohne G, Schulze H, Gachet C, Debili N, Brakebusch C, Nieswandt B. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42. *Blood.* 2013; 122(18): 3178-3187.
192. Suzuki A, Shin JW, Wang Y, Min SH, Poncz M, Choi JK, Discher DE, Carpenter CL, Lian L, Zhao L, Abrams CS. RhoA is essential for maintaining normal megakaryocyte ploidy and platelet generation. *PLoS One.* 2013; 8(7): e69315.

193. Pleines I, Hagedorn I, Gupta S, May F, Chakarova L, van Hengel J, Offermanns S, Krohne G, Kleinschnitz C, Brakebusch C, Nieswandt B. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood*. 2012; 119(4): 1054-1063.
194. Balduini A, Pallotta I, Malara A, Lova P, Pecci A, Viarengo G, Balduini CL, Torti M. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *J Thromb Haemost*. 2008; 6(11): 1900-1907.
195. Eckly A, Strassel C, Freund M, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C, Leon C. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood*. 2009; 113(14): 3182-3189.
196. Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, Balayn N, Gilles L, Rameau P, Nurden P, Alessi MC, Debili N, Vainchenker W, Heller PG, Favier R, Raslova H. Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood*. 2012; 120(13): 2708-2718.
197. Pertuy F, Eckly A, Weber J, Proamer F, Rinckel JY, Lanza F, Gachet C, Leon C. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood*. 2014; 123(8): 1261-1269.
198. Leon C, Eckly A, Hechler B, Aleil B, Freund M, Ravanat C, Jourdain M, Nonne C, Weber J, Tiedt R, Gratacap MP, Severin S, Cazenave JP, Lanza F, Skoda R, Gachet C. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood*. 2007; 110(9): 3183-3191.
199. Zhang Y, Conti MA, Malide D, Dong F, Wang A, Shmist YA, Liu C, Zerfas P, Daniels MP, Chan CC, Kozin E, Kachar B, Kelley MJ, Kopp JB, Adelstein RS. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood*. 2012; 119(1): 238-250.
200. Weibel ER, Gomez DM. Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science*. 1962; 137(3530): 577-585.
201. Nishio K, Suzuki Y, Aoki T, Suzuki K, Miyata A, Sato N, Naoki K, Kudo H, Tsumura H, Serizawa H, Morooka S, Ishimura Y, Suematsu M, Yamaguchi K. Differential contribution of various adhesion molecules to leukocyte kinetics in pulmonary microvessels of hyperoxia-exposed rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157(2): 599-609.

202. Levine RF, Eldor A, Shoff PK, Kirwin S, Tenza D, Cramer EM. Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol.* 1993; 51(4): 233-546.
203. Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol.* 2000; 157(1): 69-74.
204. Schwertz H, Koster S, Kahr WH, Michetti N, Kraemer BF, Weitz DA, Blaylock RC, Kraiss LW, Greinacher A, Zimmerman GA, Weyrich AS. Anucleate platelets generate progeny. *Blood.* 2010; 115(18): 3801-3809.
205. Poirault-Chassac S, Nguyen KA, Pietrzyk A, Casari C, Veyradier A, Denis CV, Baruch D. Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor. *PLoS One.* 2013; 8(5): e63810.
206. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel).* 1957; 29(3): 267-290.
207. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood.* 1982; 60(1): 213-219.
208. Schulze H, Korpál M, Hurov J, Kim SW, Zhang J, Cantley LC, Graf T, Shivdasani RA. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood.* 2006; 107(10): 3868-3875.
209. Sabri S, Foudi A, Boukour S, Franc B, Charrier S, Jandrot-Perrus M, Farndale RW, Jalil A, Blundell MP, Cramer EM, Louache F, Debili N, Thrasher AJ, Vainchenker W. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood.* 2006; 108(1): 134-140.
210. Patel-Hett S, Wang H, Begonja AJ, Thon JN, Alden EC, Wandersee NJ, An X, Mohandas N, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation. *Blood.* 2011; 118(6): 1641-1652.
211. Chen S, Su Y, Wang J. ROS-mediated platelet generation: a microenvironment-dependent manner for megakaryocyte proliferation, differentiation, and maturation. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e722.

212. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, Geerts W, Proamer F, Rinckel JY, Leon C, Lanza F, Gachet C. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood*. 2014; 123(6): 921-930.
213. Behnke O. An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J Ultrastruct Res*. 1968; 24(5): 412-433.
214. MacPherson GG. Origin and development of the demarcation system in megakaryocytes of rat bone marrow. *J Ultrastruct Res*. 1972; 40(1): 167-177.
215. Shaklai M, Tavassoli M. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *J Ultrastruct Res*. 1978; 62(3): 270-285.
216. Blache D. [Structure and function of blood platelets]. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*. 1992; 100(4): A17-24.
217. Freson K, Labarque V, Thys C, Wittevrongel C, Geet CV. What's new in using platelet research? To unravel thrombopathies and other human disorders. *Eur J Pediatr*. 2007; 166(12): 1203-1210.
218. Ebbeling L, Robertson C, McNicol A, Gerrard JM. Rapid ultrastructural changes in the dense tubular system following platelet activation. *Blood*. 1992; 80(3): 718-723.
219. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood*. 2000; 96(10): 3334-3342.
220. King SM, Reed GL. Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol*. 2002; 13(4): 293-302.
221. Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, Nishioka H, Tabuchi A, Kita T. Small GTPase Rab4 regulates Ca^{2+} -induced alpha-granule secretion in platelets. *J Biol Chem*. 2000; 275(43): 33844-33849.
222. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008; 111(3): 1227-1233.
223. Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H, Devine MT, Fuchs TA, Weyrich AS, Semple JW, Flaumenhaft R, Italiano JE, Jr. T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol*. 2012; 198(4): 561-574.

224. Barkalow KL, Italiano JE, Jr., Chou DE, Matsuoka Y, Bennett V, Hartwig JH. Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation. *J Cell Biol.* 2003; 161(3): 557-570.
225. Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 2009; 326(5957): 1208-1212.
226. Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* 1995; 23(3): 456-459.
227. Hartwig J, Italiano J, Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(7): 1580-1586.
228. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, Drabek K, Isaac NA, Hoffmeister K, Shivdasani RA, Bulinski JC, Galjart N, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood.* 2008; 111(9): 4605-4616.
229. Diagouraga B, Grichine A, Fertin A, Wang J, Khochbin S, Sadoul K. Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation. *J Cell Biol.* 2014; 204(2): 177-185.
230. Woulfe DS. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(10): 2193-2200.
231. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006; 99(12): 1293-1304.
232. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(12): 2341-2349.
233. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007; 109(12): 5087-5095.
234. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 2003; 102(2): 449-461.
235. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C, Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998; 394(6694): 690-694.
236. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(12): 6642-6646.

237. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(8): 1800-1814.
238. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature.* 2000; 404(6778): 609-613.
239. Gachet C, Leon C, Hechler B. The platelet P2 receptors in arterial thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36(2): 223-227.
240. Savi P, Beauverger P, Labouret C, Delfaud M, Salel V, Kaghad M, Herbert JM. Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett.* 1998; 422(3): 291-295.
241. Guidetti GF, Lova P, Bernardi B, Campus F, Baldanzi G, Graziani A, Balduini C, Torti M. The Gi-coupled P2Y12 receptor regulates diacylglycerol-mediated signaling in human platelets. *J Biol Chem.* 2008; 283(43): 28795-28805.
242. Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(2): 504-508.
243. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature.* 1997; 389(6647): 183-186.
244. Cifuni SM, Wagner DD, Bergmeier W. CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets. *Blood.* 2008; 112(5): 1696-1703.
245. Riobo NA, Manning DR. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26(3): 146-154.
246. Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem.* 2002; 277(48): 46035-46042.
247. Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37: 167-203.
248. Jackson SP, Schoenwaelder SM. PI 3-Kinase p110beta regulation of platelet integrin alpha(IIb)beta3. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; 346: 203-224.

249. Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in $\alpha\text{IIb}\beta_3$ signalling and platelet function. *Nature*. 1999; 401(6755): 808-811.
250. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*. 2004; 104(6): 1606-1615.
251. Bearer EL, Prakash JM, Li Z. Actin dynamics in platelets. *Int Rev Cytol*. 2002; 217: 137-182.
252. Moers A, Nieswandt B, Massberg S, Wettschureck N, Gruner S, Konrad I, Schulte V, Aktas B, Gratacap MP, Simon MI, Gawaz M, Offermanns S. G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nat Med*. 2003; 9(11): 1418-1422.
253. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$. *J Clin Invest*. 2005; 115(12): 3363-3369.
254. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002; 88(2): 186-193.
255. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*. 2003; 1(7): 1655-1662.
256. Flaumenhaft R, Mairuhu AT, Italiano JE. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles. *Semin Thromb Hemost*. 2010; 36(8): 881-887.
257. Nagata S. Apoptosis and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1209: 10-16.
258. Nurden AT, Caen JP. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature*. 1975; 255(5511): 720-722.
259. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis*. 2006; 1: 46.
260. Berndt MC, Andrews RK. Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica*. 2011; 96(3): 355-359.
261. Cranmer SL, Ashworth KJ, Yao Y, Berndt MC, Ruggeri ZM, Andrews RK, Jackson SP. High shear-dependent loss of membrane integrity and defective platelet adhesion following disruption of the GPIIb/IIIa-filamin interaction. *Blood*. 2011; 117(9): 2718-2727.
262. Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 2002; 100(6): 2102-2107.

263. Strassel C, Eckly A, Leon C, Petitjean C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica*. 2009; 94(6): 800-810.
264. Balduini A, Malara A, Pecci A, Badalucco S, Bozzi V, Pallotta I, Noris P, Torti M, Balduini CL. Proplatelet formation in heterozygous Bernard-Soulier syndrome type Bolzano. *J Thromb Haemost*. 2009; 7(3): 478-484.
265. Nurden AT, Pillois X, Fiore M, Heilig R, Nurden P. Glanzmann thrombasthenia-like syndromes associated with Macrothrombocytopenias and mutations in the genes encoding the α IIb β 3 integrin. *Semin Thromb Hemost*. 2011; 37(6): 698-706.
266. Phillips DR, Agin PP. Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *J Clin Invest*. 1977; 60(3): 535-545.
267. Patel YM, Patel K, Rahman S, Smith MP, Spooner G, Sumathipala R, Mitchell M, Flynn G, Aitken A, Savidge G. Evidence for a role for α IIb β 3 in mediating weak agonist-induced platelet aggregation in human platelets: reduced α IIb β 3 expression and defective Gi signaling in the platelets of a patient with a chronic bleeding disorder. *Blood*. 2003; 101(12): 4828-4835.
268. Nurden AT, Fiore M, Nurden P, Pillois X. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood*. 2011; 118(23): 5996-6005.
269. Nurden AT, Pillois X, Wilcox DA. Glanzmann thrombasthenia: state of the art and future directions. *Semin Thromb Hemost*. 2013; 39(6): 642-655.
270. Ghevaert C, Salsmann A, Watkins NA, Schaffner-Reckinger E, Rankin A, Garner SF, Stephens J, Smith GA, Debili N, Vainchenker W, de Groot PG, Huntington JA, Laffan M, Kieffer N, Ouwehand WH. A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the α IIb β 3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. *Blood*. 2008; 111(7): 3407-3414.
271. Bury L, Malara A, Gresele P, Balduini A. Outside-in signalling generated by a constitutively activated integrin α IIb β 3 impairs proplatelet formation in human megakaryocytes. *PLoS One*. 2012; 7(4): e34449.

- 272. Masliah-Planchon J, Darnige L, Bellucci S. Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br J Haematol.* 2013; 160(1): 5-11.
- 273. Novak EK, McGarry MP, Swank RT. Correction of symptoms of platelet storage pool deficiency in animal models for Chediak-Higashi syndrome and Hermansky-Pudlak syndrome. *Blood.* 1985; 66(5): 1196-1201.
- 274. Gunay-Aygun M, Zivony-Elboum Y, Gumruk F, Geiger D, Cetin M, Khayat M, Kleta R, Kfir N, Anikster Y, Chezar J, Arcos-Burgos M, Shalata A, Stanescu H, Manaster J, Arat M, Edwards H, Freiberg AS, Hart PS, Riney LC, Patzel K, Tanpaiboon P, Markello T, Huizing M, Maric I, Horne M, Kehrel BE, Jurk K, Hansen NF, Cherukuri PF, Jones M, Cruz P, Mullikin JC, Nurden A, White JG, Gahl WA, Falik-Zaccai T. Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p. *Blood.* 2010; 116(23): 4990-5001.
- 275. Albers CA, Cvejic A, Favier R, Bouwmans EE, Alessi MC, Bertone P, Jordan G, Kettleborough RN, Kiddle G, Kostadima M, Read RJ, Sipos B, Sivapalaratnam S, Smethurst PA, Stephens J, Voss K, Nurden A, Rendon A, Nurden P, Ouwehand WH. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat Genet.* 2011; 43(8): 735-737.
- 276. Gunay-Aygun M, Falik-Zaccai TC, Vilboux T, Zivony-Elboum Y, Gumruk F, Cetin M, Khayat M, Boerkoel CF, Kfir N, Huang Y, Maynard D, Dorward H, Berger K, Kleta R, Anikster Y, Arat M, Freiberg AS, Kehrel BE, Jurk K, Cruz P, Mullikin JC, White JG, Huizing M, Gahl WA. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet.* 2011; 43(8): 732-734.
- 277. Kahr WH, Hinckley J, Li L, Schwartz H, Christensen H, Rowley JW, Pluthero FG, Urban D, Fabbro S, Nixon B, Gadzinski R, Storck M, Wang K, Ryu GY, Jobe SM, Schutte BC, Moseley J, Loughran NB, Parkinson J, Weyrich AS, Di Paola J. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet.* 2011; 43(8): 738-740.
- 278. Deppermann C, Cherpokova D, Nurden P, Schulz JN, Thielmann I, Kraft P, Vogtle T, Kleinschnitz C, Dutting S, Krohne G, Eming SA, Nurden AT, Eckes B, Stoll G, Stegner D, Nieswandt B. Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice. *J Clin Invest.* 2013; 123(8): 3331-3342.

279. Kahr WH, Lo RW, Li L, Pluthero FG, Christensen H, Ni R, Vaezzadeh N, Hawkins CE, Weyrich AS, Di Paola J, Landolt-Marticorena C, Gross PL. Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2(-/-) mice. *Blood*. 2013; 122(19): 3349-3358.
280. Noris P, Spedini P, Belletti S, Magrini U, Balduini CL. Thrombocytopenia, giant platelets, and leukocyte inclusion bodies (May-Hegglin anomaly): clinical and laboratory findings. *Am J Med*. 1998; 104(4): 355-360.
281. Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo Nigro C, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Savino M, Del Vecchio M, d'Apolito M, Iolascon A, Zelante LL, Savoia A, Balduini CL, Noris P, Magrini U, Belletti S, Heath KE, Babcock M, Glucksman MJ, Aliprandis E, Bizzaro N, Desnick RJ, Martignetti JA. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet*. 2000; 26(1): 103-105.
282. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J, Denison JC, Gregory MC, White JG, Barker DF, Greinacher A, Epstein CJ, Glucksman MJ, Martignetti JA. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet*. 2001; 69(5): 1033-1045.
283. Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia*. 2012; 18 Suppl 4: 154-160.
284. Balduini CL, Savoia A, Seri M. Inherited thrombocytopenias frequently diagnosed in adults. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(6): 1006-1019.
285. Pecci A, Bozzi V, Panza E, Barozzi S, Gruppi C, Seri M, Balduini CL. Mutations responsible for MYH9-related thrombocytopenia impair SDF-1-driven migration of megakaryoblastic cells. *Thromb Haemost*. 2011; 106(4): 693-704.
286. Nurden P, Debili N, Coupry I, Bryckaert M, Youlyouz-Marfak I, Sole G, Pons AC, Berrou E, Adam F, Kauskot A, Lamaziere JM, Rameau P, Fergelot P, Rooryck C, Cailley D, Arveiler B, Lacombe D, Vainchenker W, Nurden A, Goizet C. Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood*. 2011; 118(22): 5928-5937.

287. Berrou E, Adam F, Lebret M, Fergelot P, Kauskot A, Coupry I, Jandrot-Perrus M, Nurden A, Favier R, Rosa JP, Goizet C, Nurden P, Bryckaert M. Heterogeneity of platelet functional alterations in patients with filamin A mutations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33(1): e11-18.
288. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y, O'Brien L, Othman M, Rivard G, Rapson D, Hough C, Lillicrap D. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood.* 2007; 109(1): 145-154.
289. Goodeve A. Genetics of type 1 von Willebrand disease. *Curr Opin Hematol.* 2007; 14(5): 444-449.
290. Cumming A, Grundy P, Keeney S, Lester W, Enayat S, Guilliatt A, Bowen D, Pasi J, Keeling D, Hill F, Bolton-Maggs PH, Hay C, Collins P. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 2006; 96(5): 630-641.
291. Bellissimo DB, Christopherson PA, Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Haberichter SL, Shapiro AD, Abshire TC, Leissinger C, Hoots WK, Lusher JM, Ragni MV, Montgomery RR. VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood.* 2012; 119(9): 2135-2140.
292. Ware J, Dent JA, Azuma H, Sugimoto M, Kyrle PA, Yoshioka A, Ruggeri ZM. Identification of a point mutation in type IIB von Willebrand disease illustrating the regulation of von Willebrand factor affinity for the platelet membrane glycoprotein Ib-IX receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(7): 2946-2950.
293. Nurden P, Chretien F, Poujol C, Winckler J, Borel-Derlon A, Nurden A. Platelet ultrastructural abnormalities in three patients with type 2B von Willebrand disease. *Br J Haematol.* 2000; 110(3): 704-714.
294. Loffredo G, Baronciani L, Noris P, Menna F, Federici AB, Balduini CL. von Willebrand disease type 2B must be always considered in the differential diagnosis of genetic thrombocytopenias with giant platelets. *Platelets.* 2006; 17(3): 149-152.
295. Lopez-Fernandez MF, Martin R, Lopez-Berges C, Ramos F, Bosch N, Batlle J. Further specificity characterization of von Willebrand factor inhibitors developed in two patients with severe von Willebrand disease. *Blood.* 1988; 72(1): 116-120.

296. Moll S, Lazarowski AR, White GC, 2nd. Giant platelet disorder in a patient with type 2B von Willebrand's disease. *Am J Hematol.* 1998; 57(1): 62-67.
297. Nurden P, Gobbi G, Nurden A, Enouf J, Youlyouz-Marfak I, Carubbi C, La Marca S, Punzo M, Baronciani L, De Marco L, Vitale M, Federici AB. Abnormal VWF modifies megakaryocytopoiesis: studies of platelets and megakaryocyte cultures from patients with von Willebrand disease type 2B. *Blood.* 2010; 115(13): 2649-2656.
298. Rayes J, Hollestelle MJ, Legendre P, Marx I, de Groot PG, Christophe OD, Lenting PJ, Denis CV. Mutation and ADAMTS13-dependent modulation of disease severity in a mouse model for von Willebrand disease type 2B. *Blood.* 2010; 115(23): 4870-4877.
299. Casari C, Du V, Wu YP, Kauskot A, de Groot PG, Christophe OD, Denis CV, de Laat B, Lenting PJ. Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. *Blood.* 2013; 122(16): 2893-2902.
300. Casari C, Berrou E, Lebreton M, Adam F, Kauskot A, Bobe R, Desconclois C, Fressinaud E, Christophe OD, Lenting PJ, Rosa JP, Denis CV, Bryckaert M. von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopathy by inhibiting integrin α IIb β 3. *J Clin Invest.* 2013; 123(12): 5071-5081.
301. Poon MC, Rand ML, Jackson SC. 2B or not to be--the 45-year saga of the Montreal Platelet Syndrome. *Thromb Haemost.* 2010; 104(5): 903-910.
302. Othman M. Platelet-type von Willebrand disease and type 2B von Willebrand disease: a story of nonidentical twins when two different genetic abnormalities evolve into similar phenotypes. *Semin Thromb Hemost.* 2007; 33(8): 780-786.
303. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 2006; 3(7): e270.
304. Ulich TR, del Castillo J, Senaldi G, Kinstler O, Yin S, Kaufman S, Tarpley J, Choi E, Kirley T, Hunt P, Sheridan WP. Systemic hematologic effects of PEG-rHuMGDF-induced megakaryocyte hyperplasia in mice. *Blood.* 1996; 87(12): 5006-5015.
305. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood.* 2006; 107(11): 4274-4281.

306. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006; 108(5): 1652-1660.
307. Fuentes R, Wang Y, Hirsch J, Wang C, Rauova L, Worthen GS, Kowalska MA, Poncz M. Infusion of mature megakaryocytes into mice yields functional platelets. *J Clin Invest*. 2010; 120(11): 3917-3922.
308. Salles II, Thijs T, Brunaud C, De Meyer SF, Thys J, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Human platelets produced in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice upon transplantation of human cord blood CD34(+) cells are functionally active in an ex vivo flow model of thrombosis. *Blood*. 2009; 114(24): 5044-5051.
309. Xi J, Zhu H, Liu D, Nan X, Zheng W, Liu K, Shi W, Chen L, Lv Y, Yan F, Li Y, Xie X, Wang Y, Yue W, Xu X, Wei X, Zhu J, Huang X, Pei X. Infusion of megakaryocytic progenitor products generated from cord blood hematopoietic stem/progenitor cells: results of the phase 1 study. *PLoS One*. 2013; 8(2): e54941.
310. Lambert MP, Sullivan SK, Fuentes R, French DL, Poncz M. Challenges and promises for the development of donor-independent platelet transfusions. *Blood*. 2013; 121(17): 3319-3324.
311. Reems JA, Pineault N, Sun S. In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art. *Transfus Med Rev*. 2010; 24(1): 33-43.
312. Pecci A, Malara A, Badalucco S, Bozzi V, Torti M, Balduini CL, Balduini A. Megakaryocytes of patients with MYH9-related thrombocytopenia present an altered proplatelet formation. *Thromb Haemost*. 2009; 102(1): 90-96.
313. Ventura Ferreira MS, Jahnen-Dechent W, Labude N, Bovi M, Hieronymus T, Zenke M, Schneider RK, Neurs S. Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. *Biomaterials*. 2012; 33(29): 6987-6997.
314. Raic A, Rodling L, Kalbacher H, Lee-Thedieck C. Biomimetic macroporous PEG hydrogels as 3D scaffolds for the multiplication of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials*. 2014; 35(3): 929-940.
315. Tiwari A, Tursky ML, Kirkland MA, Pande G. Expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells on decellularized matrix scaffolds. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2014; 28: 1C 15 1-1C 15 15.

316. Mortera-Blanco T, Mantalaris A, Bismarck A, Aqel N, Panoskaltsis N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. *Biomaterials*. 2011; 32(35): 9263-9270.
317. Wei X, Chen W, Mao F, Wang Y. Effect of chitooligosaccharides on mice hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Biol Macromol*. 2013; 54: 71-75.
318. Lavergne M, Derkaoui M, Delmau C, Letourneur D, Uzan G, Le Visage C. Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells. *Macromol Biosci*. 2012; 12(7): 901-910.
319. Le Visage C, Gournay O, Benguirat N, Hamidi S, Chaussumier L, Mougenot N, Flanders JA, Isnard R, Michel JB, Hatem S, Letourneur D, Norol F. Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(1-2): 35-44.
320. Hamidi S, Letourneur D, Aid-Launais R, Di Stefano A, Vainchenker W, Norol F, Le Visage C. Fucoidan Promotes Early Step of Cardiac Differentiation from Human Embryonic Stem Cells and Long-Term Maintenance of Beating Areas. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20(7-8): 1285-1294.
321. Lubiatuski P, Kruczyński J, Gradys A, Trzeciak T, Jaroszewski J. Articular cartilage repair by means of biodegradable scaffolds. *Transplant Proc*. 2006; 38(1): 320-322.
322. Thebaud NB, Pierron D, Bareille R, Le Visage C, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2007; 18(2): 339-345.
323. Abed A, Deval B, Assoul N, Bataille I, Portes P, Louedec L, Henin D, Letourneur D, Meddahi-Pelle A. A biocompatible polysaccharide hydrogel-embedded polypropylene mesh for enhanced tissue integration in rats. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14(4): 519-527.
324. Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P, Louedec L, Flaud P, Bataille I, Letourneur D, Meddahi-Pelle A. Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2011; 96(3): 535-542.

- 325. Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater.* 2010; 6(9): 3640-3648.
- 326. Robert D, Fayol D, Le Visage C, Frasca G, Brule S, Menager C, Gazeau F, Letourneur D, Wilhelm C. Magnetic micro-manipulations to probe the local physical properties of porous scaffolds and to confine stem cells. *Biomaterials.* 2010; 31(7): 1586-1595.
- 327. Purnama A, Aid-Launais R, Haddad O, Maire M, Mantovani D, Letourneur D, Hlawaty H, Le Visage C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv and Transl Res.* 2013; 1-11.
- 328. Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 82(2): 336-342.
- 329. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27(18): 3413-3431.
- 330. Lovett M, Cannizzaro C, Daheron L, Messmer B, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. *Biomaterials.* 2007; 28(35): 5271-5279.
- 331. Lovett ML, Cannizzaro CM, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Gel spinning of silk tubes for tissue engineering. *Biomaterials.* 2008; 29(35): 4650-4657.
- 332. Pallotta I, Lovett M, Kaplan DL, Balduini A. Three-dimensional system for the in vitro study of megakaryocytes and functional platelet production using silk-based vascular tubes. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011; 17(12): 1223-1232.
- 333. Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, Endo H, Dohda T, Takayama N, Nakauchi H, Arai F, Fukuda T, Eto K. Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp Hematol.* 2013; 41(8): 742-748.
- 334. Xiong Q, Hill KL, Li Q, Suntharalingam P, Mansoor A, Wang X, Jameel MN, Zhang P, Swingen C, Kaufman DS, Zhang J. A fibrin patch-based enhanced delivery of human embryonic stem cell-derived vascular cell transplantation in a porcine model of postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells.* 2011; 29(2): 367-375.

335. Vallee JP, Hauwel M, Lepetit-Coiffe M, Bei W, Montet-Abou K, Meda P, Gardier S, Zammaretti P, Kraehenbuehl TP, Herrmann F, Hubbell JA, Jaconí ME. Embryonic stem cell-based cardiopatches improve cardiac function in infarcted rats. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1(3): 248-260.
336. Menasche P, Vanneaux V, Fabreguettes JR, Bel A, Tosca L, Garcia S, Bellamy V, Farouz Y, Pouly J, Damour O, Perier MC, Desnos M, Hagege A, Agbulut O, Bruneval P, Tachdjian G, Trouvin JH, Larghero J. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J.* 2014.
337. Mercher T, Cornejo MG, Sears C, Kindler T, Moore SA, Maillard I, Pear WS, Aster JC, Gilliland DG. Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008; 3(3): 314-326.
338. Cortegano I, Melgar-Rojas P, Luna-Zurita L, Siguero-Alvarez M, Marcos MA, Gaspar ML, de la Pompa JL. Notch1 regulates progenitor cell proliferation and differentiation during mouse yolk sac hematopoiesis. *Cell Death Differ.* 2014; 21(7): 1081-1094.
339. Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, Ahamed J, Li L. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2014; 20(11): 1321-1326.
340. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, Scheiermann C, Schiff L, Poncz M, Bergman A, Frenette PS. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med.* 2014; 20(11): 1315-1320.
341. Lambert MP, Rauova L, Bailey M, Sola-Visner MC, Kowalska MA, Poncz M. Platelet factor 4 is a negative autocrine in vivo regulator of megakaryopoiesis: clinical and therapeutic implications. *Blood.* 2007; 110(4): 1153-1160.
342. Mouton C, Calderon J, Janvier G, Vergnes MC. Dextran sulfate included in factor Xa assay reagent overestimates heparin activity in patients after heparin reversal by protamine. *Thromb Res.* 2003; 111(4-5): 273-279.
343. Malara A, Gruppi C, Pallotta I, Spedden E, Tenni R, Raspanti M, Kaplan D, Tira ME, Staii C, Balduini A. Extracellular matrix structure and nano-mechanics determine megakaryocyte function. *Blood.* 2011; 118(16): 4449-4453.
344. Maurer AM, Gezer A. Promoting Effects of Heparin on ex vivo Expansion of Megakaryocytopoiesis from Human Cord Blood CD34+ Cells. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40(5): 344-350.

345. Magallon J, Egalka M, Diacovo TG. Humanizing thrombi in mice. *Trends Cardiovasc Med.* 2011; 21(1): 33-36.
346. Magallon J, Chen J, Rabbani L, Dangas G, Yang J, Bussel J, Diacovo T. Humanized mouse model of thrombosis is predictive of the clinical efficacy of antiplatelet agents. *Circulation.* 2011; 123(3): 319-326.
347. Bergmeier W, Piffath CL, Cheng G, Dole VS, Zhang Y, von Andrian UH, Wagner DD. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIbalpha shedding from platelets in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2004; 95(7): 677-683.
348. Bergmeier W, Burger PC, Piffath CL, Hoffmeister KM, Hartwig JH, Nieswandt B, Wagner DD. Metalloproteinase inhibitors improve the recovery and hemostatic function of in vitro-aged or -injured mouse platelets. *Blood.* 2003; 102(12): 4229-4235.

Titre: Génération de plaquettes *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques

Résumé: La mégacaryopoïèse représente le processus de différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en mégacaryocytes (MK). Ce processus précède la thrombopoïèse qui aboutira à la formation des plaquettes sanguines. Ces processus complexes ont lieu 1) au sein de la structure tridimensionnelle (3D) de la moelle osseuse, 2) dans les vaisseaux sinusoides de la moelle et 3) dans la circulation sanguine. Le but général de ce travail a été de comprendre le mécanisme de chaque étape. Le premier objectif a été d'étudier les effets d'une structure poreuse 3D mimant celle de la moelle osseuse, sur la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire *in vitro*. Cette étude a permis de démontrer que la synergie entre l'organisation spatiale et les signaux du microenvironnement améliore la production en MK et en plaquettes. Par la suite, nous avons souhaité caractériser *in vitro* et *in vivo* les plaquettes produites en conditions de flux. Nous avons notamment mis en évidence la capacité des plaquettes produites *in vitro* dans un système de microfluidique, à s'incorporer et à participer à la formation d'un thrombus *in vitro* et *in vivo* contrairement aux plaquettes obtenues en statique. Ces travaux prouvent donc l'intérêt d'une part, de mimer le microenvironnement de la moelle osseuse et d'autre part, de reproduire les forces de cisaillement du sang afin d'améliorer et d'augmenter la production de plaquettes *in vitro* pour de futures applications en thérapeutique.

Mots Clés: CSH, MK, plaquettes, moelle osseuse, structures 3D, flux, forces de cisaillement

Title: *In vitro* platelet generation from hematopoietic stem cells

Abstract: Megakaryopoiesis is a process allowing hematopoietic stem cell (HSC) to proliferate and differentiate into megakaryocytes (MK). It is followed by thrombopoiesis allowing blood platelet production. These processes occur 1) in the bone marrow three-dimensional (3D) structure, 2) in the bone marrow sinusoid vessels and 3) in the blood flow. Our general aim was to decipher the mechanism associated to each process. The first objective was to study the effects of porous 3D structure on MK differentiation and platelet production. This study demonstrated that the synergy between spatial organization and biological cues improved MK and platelet production. We also characterized platelets produced from mature MK in flow conditions, with respect to their *in vitro* and *in vivo* properties. We highlighted the capacity of flow-derived platelets to incorporate in a thrombus *in vitro* and *in vivo*, compared to static-derived platelets. These works represent some new developments for mimicking the bone marrow structure and to reproduce blood shear forces in order to improve and increase *in vitro* platelet production for therapeutic use.

Key Words: HSC, MK, platelets, bone marrow, 3D structures, flow, high shear rates