



HAL
open science

Impact des contraintes physiques sur la maturation des mégacaryocytes : rôle de la rigidité de l'environnement

Alicia Aguilar

► **To cite this version:**

Alicia Aguilar. Impact des contraintes physiques sur la maturation des mégacaryocytes : rôle de la rigidité de l'environnement. Embryologie et organogenèse. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ014 . tel-01560013

HAL Id: tel-01560013

<https://theses.hal.science/tel-01560013>

Submitted on 11 Jul 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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR_S949, EFS-Grand Est, Université de Strasbourg

Thèse présentée par :

Alicia AGUILAR

Soutenue le : **10 avril 2017**

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

Sciences de la Vie et de la Santé/Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Impact des contraintes physiques sur la
maturation des mégacaryocytes : rôle de la
rigidité de l'environnement**

THÈSE dirigée par :

Madame LEON Catherine

DR2, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur PAYRASTRE Bernard

Professeur, Université de Toulouse III

Madame Le BOUSSE-KERDILES Marie-Caroline

DR2, Université de Paris XI

EXAMINATEUR :

Monsieur GALZI Jean-Luc

DR1, Université de Strasbourg

Inserm UMR_S949

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

Directeur : Dr Christian Gachet

Etablissement Français du Sang (EFS – Grand Est)

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

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

Directeur de thèse :

Madame Catherine LEON, PhD

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

Remerciements

Le début de ce manuscrit marque également la fin de ma thèse. En réalité, cette page qui se tourne représente quatre ans et demi et pourtant je ne les ai pas vus passer. Cela s'explique certainement, en dehors de la qualité du travail dans ce laboratoire, par les qualités humaines des gens qui le font vivre.

Je tiens tout d'abord, à remercier madame Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, monsieur Bernard Payrastre et monsieur Jean-Luc Galzi, car c'est à vous que s'adresse en premier ce manuscrit. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

J'aimerais remercier Christian Gachet, directeur de l'UMR_S949 et de l'EFS-Grand EST. Grâce à vous j'ai pu intégrer ce laboratoire et m'y épanouir pendant ces quatre ans. Merci de votre soutien lors du concours de l'école doctorale et de vos conseils tout au long de ma thèse qui m'ont permis aussi bien de faire évoluer mon projet de thèse que mon projet professionnel.

Car c'est aussi grâce à eux que j'ai pu réaliser ma thèse, je remercie le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche ainsi que la société française d'hématologie.

Je remercie François Lanza, directeur de l'équipe 2 pour ses conseils, ses suggestions et surtout pour ses questions lors des réunions d'équipe. J'ai eu « la chance » de présenter de nombreuses fois en réunion et cela, je pense, m'a été extrêmement bénéfique.

Je remercie Catherine Léon, ma directrice de thèse, pour avoir cru en moi dès le master. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé gérer ce projet, de m'avoir fait participer à tous les aspects du métier de chercheur, tout en m'apportant ton aide et ton expertise à chaque fois que j'en avais besoin. C'était une belle collaboration ☺.

Merci à Josiane et Patricia qui m'ont appris mes premières manip. Merci à toutes les deux pour votre disponibilité. C'était vraiment un plaisir de travailler avec vous.

A celles que j'ai encadrées, Sule et Gabrielle, merci de m'avoir supportée ;). Et Julie, merci pour ton aide sur la suite du projet. Je te souhaite de réussir quel que soit ton futur parcours.

Merci à tous les membres de l'équipe 2, vous avez tous participé à l'avancement de ce projet et à sa

réalisation, merci Henri, Catherine Angénieux, Manuela, Nathalie et plus particulièrement François, Anita, Catherine Strassel, Léa et Seb pour leur aide sur le papier méthyl.

Pour sa collaboration sur le papier, ses conseils et son aide sur tous les aspects physiques de ce travail, je remercie Dominique Collin.

Merci aux membres de l'équipe 1 : Pierre, Nico, Béatrice, Blandine, Stéphanie, Catherine Ravanat, Arnaud même si nous n'avons pas de réunions en commun, j'ai eu l'occasion d'échanger avec chacun, merci pour vos conseils.

J'aimerais remercier mon équipe d'adoption : la microscopie électronique. Merci Anita de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'apprendre cette belle technique qu'est la microscopie électronique à transmission. En dehors de l'aspect « technique », merci pour ta gentillesse, tes encouragements et tes félicitations après les présentations, ce sont des petites choses mais ça fait tellement plaisir. Merci à Fabienne, Jean-Yves et Neslihan, pour votre aide et votre bonne humeur communicative. Merci à tous, descendre faire des inclusions était aussi le moyen d'ensoleiller certaines journées.

Avec tout le temps que j'y ai passé, je remercie l'équipe de l'animalerie. Merci Monique, Catherine Ziessel, Senay, Pascal, Florian, Ketty et Alain de prendre bien soin de nos petites souris.

Merci aux membres du club très restreint du « café de 8h » et de la cantine du NHC, ces deux pauses ont été très importantes pour moi. Merci : les deux Pascal, Valérie, Patricia, Nico, JYR, Véro, Jojo, Amandine, Catherine B., Seb, Léa (pour votre gentillesse et patience quand je venais me plaindre dans votre bureau, un grand merci).

Merci aux bureaux des thésards et des post-docs, aux membres actuels et passés : Morgane, Margot, Marion, Alicia B, Mathieu, Mariangela, Tim, Lynda, Salima, Emmanuelle, Elmina (merci d'avoir toujours cru en moi), Eric. Reine (miss Panda^^), bonne chance pour la suite, merci pour ton aide et pour ton soutien. Marie-Belle et Camille, merci de m'avoir supporté tous les jours de la rédaction et pour tout le reste, vous êtes géniales !

Au labo il me reste une personne à remercier, Sylvie. Tu as été un soutien essentiel pour moi tout au long de cette thèse. Tout simplement merci.

Fabien, j'ai tellement de raisons de te remercier. Tu as été (et tu es toujours) un grand frère pour moi, le premier chez qui j'allais quand j'avais un souci ou que je n'allais pas très bien. Sincèrement merci.

Laura, petite master 2 devenue une véritable amie, merci beaucoup d'être venue au sport avec moi, pour les starbucks et autres sorties. Surtout merci de toujours répondre à mes sms ! Je te souhaite une merveilleuse thèse !

Merci Audrey, mon amie de master, on en a partagé des galères toutes les deux. Tes mails étaient pour moi un vrai soutien. Merci d'avoir toujours pensé à moi !

Je vais finir ces remerciements en dédiant cette thèse à ceux qui comptent le plus pour moi.

A mes parents et ma petite Liloute ^^,

Sans vous rien de cela n'aurait été possible, vous avez toujours été là pour moi, vous m'avez soutenue quels que soient mes choix, malgré vos inquiétudes, vous m'avez permis de réaliser mes rêves.
Merci infiniment

Sommaire

Remerciements	I
Sommaire	I
Liste des figures	IV
Liste des tables	V
Liste des annexes.....	VI
Liste des abréviations	VII
Préambule	1
Introduction – Synthèse bibliographique	2
1 La moelle osseuse, lieu de la mégacaryopoïèse	2
1.1 Les plaquettes et leur formation	2
1.1.1 L'hématopoïèse	2
1.1.2 La mégacaryopoïèse	4
1.1.3 La maturation du mégacaryocyte	7
1.1.4 La thrombopoïèse	10
1.2 Structure de la moelle hématopoïétique	17
1.2.1 Localisation du tissu hématopoïétique	17
1.2.2 Composante cellulaire.....	17
1.2.3 Espace intercellulaire	19
1.3 La moelle osseuse, un environnement contraignant	21
1.3.1 Le confinement.....	21
1.3.2 La rigidité	22
1.3.3 Les forces hémodynamiques.....	22
2 Rigidité et mesures.....	23
2.1 Principe.....	23
2.2 Mesures	23
2.2.1 La microscopie à force atomique	24
2.2.2 La rhéologie	24
3 La mécanobiologie.....	27
3.1 Stimuli et mécanoréception	28
3.2 Le rôle du cytosquelette dans la mécanotransduction	30
3.2.1 Les différents types de cytosquelette	30
3.2.2 Le cytosquelette d'actine	31
3.2.3 La myosine.....	32
3.2.4 Les filaments intermédiaires	33
3.2.5 Le complexe LINC, lien physique entre cytosquelette cytoplasmique et	

nucléoplasmique	34
3.3 Les voies de mécanotransduction	36
3.3.1 La voie MKL1/SRF	36
3.3.2 La signalisation YAP/TAZ	37
4 Approches <i>in vitro</i> pour mimer l'environnement médullaire	39
4.1 La dimensionnalité en culture	39
4.2 Les débuts de la culture en 3D	40
4.3 Techniques et perspectives de la culture en 3D.....	41
4.4 La culture de cellules hématopoïétiques en 3D	41
4.5 L'intérêt des hydrogels pour la culture 3D	43
4.5.1 La culture en hydrogel.....	43
4.5.2 Propriétés de l'hydrogel.....	43
4.6 Le choix de la méthylcellulose.....	44
Travail de thèse	47
1 Hypothèse de départ.....	47
2 Objectifs du travail	48
2.1 Partie 1	48
2.2 Partie 2	48
Partie 1 : Importance de la rigidité de l'environnement sur la différenciation mégacaryocytaire et la formation des proplaquettes	49
1 L'environnement médullaire	49
2 Un rôle de la composante physique dans la maturation cellulaire.....	49
3 Méthodes (Annexe 1).....	49
4 Résultats (Article 1)	50
4.1 Caractérisation des propriétés physiques de la méthylcellulose	50
4.2 Caractérisation de la culture en hydrogel	50
4.3 Identification de mécanismes impliqués dans la maturation du MK en 3D	51
5 Conclusion	51
Article 1 : Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation	52
6 Discussion	53
Partie 2 : Rigidité : cytosquelette, proplaquettes et DMS.....	55
1 Introduction.....	55
2 Objectifs de l'étude	56
3 Matériel et méthodes.....	56
3.1 Matériel	56
3.2 Souris	56

3.3	Culture de progéniteurs mégacaryocytaires	56
3.4	Formation de proplaquettes <i>in vitro</i>	57
3.5	Culture en présence d'inhibiteurs du cytosquelette et des dynamines	57
3.6	Immunomarquages et microscopie confocale	57
3.7	Microscopie électronique à transmission (MET).....	58
3.8	Microscopie électronique à balayage à faisceau d'ions focalisés (FIB-SEM)	59
4	Résultats	59
4.1	Le cytosquelette d'actine participe à l'effet positif de la culture en 3D sur la formation des proplaquettes	59
4.2	Les contraintes physiques influencent l'organisation du DMS <i>via</i> des mécanismes actifs	60
4.2.1	Le DMS se remanie en fonction de la rigidité du milieu	60
4.2.2	Le remaniement du DMS est un phénomène actif	61
4.2.3	Rôle des dynamines.....	61
5	Discussion	67
	Discussion Générale	70
	Annexe 1 : Three dimensional culture in methylcellulose-based hydrogel to improve megakaryocyte differentiation	74
	Annexe 2 : Commentaire de l'article Aguilar et al, Blood 2016	75
	Annexe 3 : Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage	76
	Bibliographie.....	i

Liste des figures

Figure 1 : L'hématopoïèse, de la cellule souche à la plaquette sanguine.....	2
Figure 2 : Les voies biaisées de la mégacaryopoïèse	4
Figure 3 : Les facteurs de transcription de la mégacaryopoïèse	6
Figure 4 : Le Mégacaryocyte	8
Figure 5 : Biogenèse et expansion du DMS.....	9
Figure 6 : La biogenèse des granules plaquettaires.....	10
Figure 7 : Formation des proplaquettes <i>in situ</i>	11
Figure 8 : Deux voies pour produire les plaquettes.....	12
Figure 9 : Formation des proplaquettes et transport des organelles	13
Figure 10 : La microscopie à force atomique, méthode et réponse	24
Figure 11 : Rhéologie, méthode et réponse.....	25
Figure 12 : Schéma global de la mécanotransduction	27
Figure 13 : Les différents stimuli de la mécanotransduction	28
Figure 14 : Le cytosquelette	30
Figure 15 : Le complexe LINC et les voies de mécanotransduction	35
Figure 16 : La cellule dans ses différents environnements	39
Figure 17 : La culture de cellules hématopoïétiques en 3D	43
Figure 18 : La méthylcellulose, structure et formation du gel	46
Figure II-1 : Le cytosquelette d'actine, un acteur de la maturation des MKs et de la formation des proplaquettes.....	63
Figure II-2 : Le DMS se remanie en fonction de la rigidité du milieu.....	64
Figure II-3 : Le réarrangement du DMS est un phénomène actif.....	65
Figure II-4 : Les dynamines, importantes dans la formation des proplaquettes.....	66

Liste des tables

Table 1 : Composition cellulaire et protéique de la moelle	19
--	----

Liste des annexes

Annexe 1: Papier en préparation - Three dimensional culture in methylcellulose-based hydrogel to improve megakaryocyte differentiation

Annexe 2: Commentaire de l'article Aguilar et al, Blood 2016

Annexe 3: Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage

Liste des abréviations

2D/3D : deux Dimensions/trois Dimensions

Actine G/Actine F : Actine Globulaire/Actine Filamenteuse

AFM : Atomic Force Microscopy

BSA : Bovine Serum Albumin

CLP : Common Lymphoid Progenitor

CMP : Common Myeloid Progenitor

DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium

DMS : Demarcation Membrane System

DMSO : DimethylSulfOxyde

GFP : Green Fluorescent Protein

GMP : Granulocyte-Monocyte Progenitor

FIB-SEM : Focused Ion Beam- Scanning Electron Microscopy

FGF : Fibroblast Growth Factor

FLI1 : Friend Leukemia virus Integration 1

FOG1 : Friend Of GATA 1

GAG : GlycosAminoGlycan

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor

GP : GlycoProtéines

HA : Hyaluronic Acid ou hyaluronan

HSC : hematopoietic Stem Cell

IL : InterLeukin

iPSC : Induced Pluripotent Stem Cell

JAK2 : JAnus Kinase 2

KO : Knock Down

LATS : LArge Tumor Suppressor kinase

Lin- : Lineage negatif

LINC : LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MAP3K10 : ou MST, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 10

MC : MethylCellulose

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MEP : Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor
MET : Microscopie Electronique à Transmission
MK : MegaKaryocytes
MKL1 : MegaKaryoblastic Leukemia factor 1
MPP : MultiPotent Progenitor
MSC : Mesenchymal Stem Cell
MVB : MultiVesicular Body
Myh9 : gène codant pour la myosine non musculaire IIA
Nesprin : Nuclear Envelope SPectrIN repeats
PACSN2 : Protein kinase c And CaSeIN kinase II
PBS : Phosphate Salin Buffer
PF4 : Platelet Factor 4
PFA : ParaFormAldéhyde
PI3K : PhosphoInositide-3-Kinase
PIP2 : PhosphatidyInositol 4,5-bisPhosphate
PRD : Proline/Arginine-Rich Domain
PSG : Pénicilline, Streptomycine, Glutamine
PZ : Zone Périphérique
RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G
RPEL : Arginine-Proline-Acide glutamique-Leucine
SDF-1: Stromal Derived Factor-1
SRF : Serum Response Factor
SVF : Serum de Veau Foetal
TAL1: T-cell Acute Lymphocytic Leukemia 1
TAZ : Transcriptional coActivator with PDZ-binding motif
TEAD : Transcriptional EnhAncer factor Domain
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TPO : ThromboPOïétine
vWF : von Willebrand Factor
YAP : Yes-Associated Protein

Préambule

Aujourd'hui, nous avons une vision globale des différentes étapes de la mégacaryopoïèse mais les mécanismes déclencheurs et régulateurs de ces étapes sont mal connus. Il est important de mieux comprendre la mégacaryopoïèse pour une meilleure connaissance des maladies plaquettaires, et à plus long terme pour améliorer la production de plaquettes *in vitro*. Au sein de notre équipe nous avons observé que les mégacaryocytes différenciés *in situ* et *in vitro* en milieu liquide présentent des différences morphologiques. Ces observations semblent indiquer une maturation différente dans l'environnement natif et en culture. Or au sein de la moelle, les mégacaryocytes sont en contact avec différents types cellulaires, des protéines de matrice extracellulaire, des facteurs chimiques. Mais le mégacaryocyte est également confiné, il est soumis à des contraintes locales : i) organisation tridimensionnelle des cellules adjacentes et des éléments de la matrice extracellulaire, ii) rigidité des cellules et des protéines de matrice extracellulaire, iii) pression des cellules environnantes en division ou migrantes. Notre hypothèse était que cet environnement influence la maturation du mégacaryocyte. Nous nous sommes donc focalisés plus particulièrement sur l'étude du rôle de la rigidité de l'environnement et des forces physiques appliquées sur le mégacaryocyte dans le processus de maturation.

Dans cette introduction seront présentés : i) la différenciation cellulaire au sein du tissu médullaire, la maturation du mégacaryocyte, la formation des plaquettes, ii) ensuite l'environnement médullaire et ses différentes composantes dont la composante rigide, iii) et dans les derniers chapitres seront abordées la mécanobiologie et les approches *in vitro* pour étudier la maturation cellulaire en trois dimensions.

Introduction – Synthèse bibliographique

1 La moelle osseuse, lieu de la mégacaryopoïèse

1.1 Les plaquettes et leur formation

Les plaquettes sanguines sont des petits éléments cellulaires (2-5 μm) anucléés du sang (Boneu and Cazenave, 1997). Ces fragments cellulaires proviennent de la différenciation et de la maturation du mégacaryocyte (MK), lui-même issu de la différenciation d'une cellule souche hématopoïétique (HSC)(Figure 1)(Tavassoli, 1980; Wright, 1906).

1.1.1 L'hématopoïèse

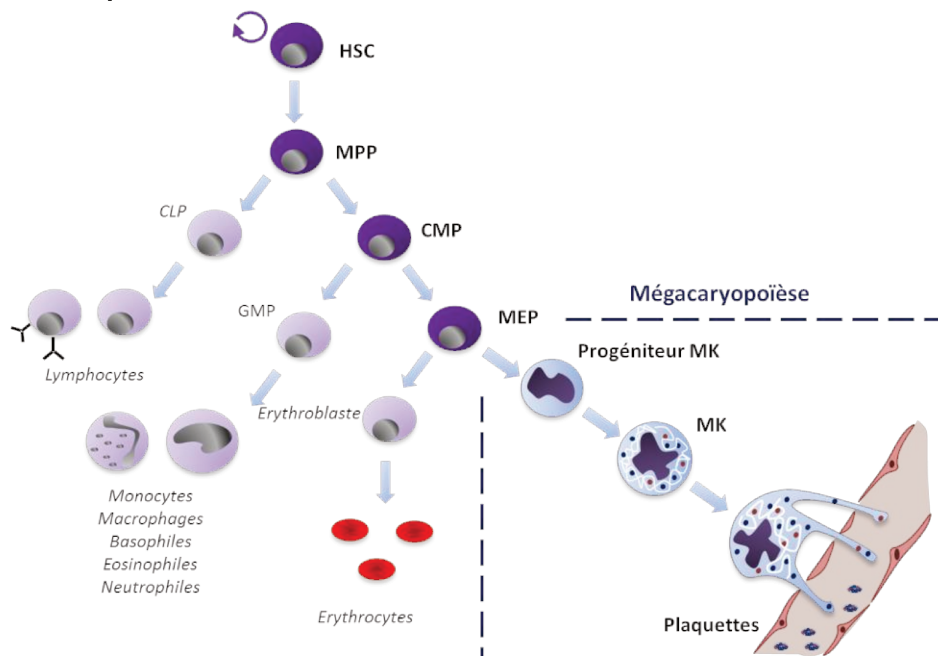


Figure 1 : L'hématopoïèse, de la cellule souche à la plaquette sanguine

La cellule souche hématopoïétique (HSC) est une cellule capable de proliférer et de se différencier pour donner toutes les cellules sanguines. Sous l'influence de différents facteurs environnementaux la cellule souche se différencie progressivement en progéniteurs de plus en plus orientés vers une lignée spécifique. La cellule souche se différencie tout d'abord en progéniteur multipotent (MPP) et perd sa capacité d'auto-renouvellement. Le MPP est capable de se différencier en progéniteur lymphoïde commun (CLP) puis en lymphocyte ou en progéniteur myéloïde commun (CMP) et continuer sa différenciation vers les différentes lignées myéloïdes. Le CMP est à l'origine de deux progéniteurs : le progéniteur granulocyte-monocyte (GMP) et le progéniteur mégacaryocyte-érythroïde (MEP). Les MEP donneront les érythrocytes et les mégacaryocytes (MK) puis les plaquettes sanguines.

La mégacaryopoïèse regroupe l'ensemble des mécanismes de différenciation du MEP en progéniteur mégacaryocytaire puis de maturation en MK jusqu'à la formation des plaquettes ou thrombopoïèse.

L'hématopoïèse est l'ensemble des voies de différenciation cellulaire menant une cellule souche hématopoïétique à la production de toutes les cellules sanguines et des plaquettes (Figure

1)(Metcalf et al., 1979; Spangrude et al., 1988). Les cellules souches sont rares et évoluent dans un environnement qui leur est propre, la niche hématopoïétique. Cet environnement favorise la quiescence de ces cellules, le maintien du pool de cellules souches et régule leur différenciation (Birbrair and Frenette, 2016; Weissman and Shizuru, 2008). Un mécanisme permet d'expliquer comment les cellules souches peuvent d'une part maintenir leur nombre et se différencier : la division asymétrique. Contrairement à la division symétrique qui permet à partir d'une cellule souche d'obtenir deux cellules souches identiques, la division asymétrique génère une cellule souche et un progéniteur orienté (Beckmann et al., 2007; Brummendorf et al., 1998; Calvi and Link, 2015; Lajtha et al., 1962). La preuve de cette division asymétrique a été montrée par différents travaux. En 2007, Beckmann et al ont observé que, *in vitro*, suite à la division de cellules souches hématopoïétiques humaines, certains marqueurs membranaires ne sont présents que sur une portion des cellules filles (environ 20%). Il semble donc qu'il y ait au sein d'une culture de HSC une majorité de cellules (80%) qui se divisent de manière symétrique pour maintenir le nombre de cellules souches, et une partie (20%) qui se divise de manière asymétrique pour donner les progéniteurs hématopoïétiques (Beckmann et al., 2007). L'origine de la division asymétrique est peu connue et les mécanismes peuvent être multiples. La stimulation peut être due à la présence des autres types cellulaires de la niche, des cytokines et facteurs de croissances sécrétés ou encore de la rigidité de l'environnement et des contraintes physiques appliquées sur les cellules. La cellule souche sous l'influence de ces différents facteurs, se différencie progressivement en progéniteurs de plus en plus orientés vers un lignage spécifique (Avecilla et al., 2004; Lee-Thedieck and Spatz, 2014; Nilsson et al., 2005).

La cellule souche se différencie tout d'abord en progéniteur multipotent (MPP) et perd sa capacité d'auto-renouvellement. Ensuite, Le MPP se différencie soit en progéniteur lymphoïde commun (CLP) puis en lymphocyte soit en progéniteur myéloïde commun (CMP) et continue sa différenciation vers les différentes lignées myéloïdes. Le CMP est à l'origine de deux progéniteurs : le progéniteur granulocyte-monocyte (GMP) et le progéniteur mégacaryocyte-érythroïde (MEP). Les MEP donneront les érythrocytes et les MKs, et ces derniers les plaquettes sanguines (Haas et al., 2015; Notta et al., 2015; Woolthuis and Park, 2016). Certaines études remettent en question cette hiérarchie et proposent une absence du CLP et une population CMP hétérogène capable de se différencier dans tous les progéniteurs unipotents sauf les progéniteurs mégacaryocytaires qui eux proviendraient directement d'un sous-type de cellules souches (Figure 2)(Notta et al., 2015; Sanjuan-Pla et al., 2013). Cette cellule souche pouvant directement se différencier en progéniteur MK aurait également été observé chez la souris (Nishikii et al., 2015). L'existence de cette voie « biaisée » de la mégacaryopoïèse pourrait permettre une production de plaquettes plus rapide (Haas et al., 2015). Chez l'Homme et la souris, la hiérarchie est la même mais les marqueurs permettant d'identifier ces cellules sont

différents. Ainsi chez l'Homme, les HSC sont actuellement définies par les marqueurs $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD90}^+ \text{CD45RA}^-$ et les MEP par les marqueurs $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}} \text{IL3R}\alpha^- \text{CD45RA}^-$ (Debili et al., 1996; Sanada et al., 2016; Weissman and Shizuru, 2008). Chez la souris, les HSC sont définies par les marqueurs $\text{Lin}^- \text{cKit}^+ \text{Sca1}^+ \text{Flk2}^- \text{CD34}^- \text{Slamf1}^+$ et les MEP par $\text{Lin}^- \text{cKit}^+ \text{Sca1}^- \text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^+$ (Weissman and Shizuru, 2008) ou encore selon d'autres auteurs par les marqueurs $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{cKit}^+ \text{CD34}^- \text{CD150}^+ \text{CD48}^-$ pour les HSC et $\text{Lin}^- \text{Sca1}^- \text{cKit}^+ \text{CD34}^+ \text{CD150}^+ \text{CD48}^+$ pour les MEP (Nishikii et al., 2015).

1.1.2 La mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse ou mégacaryocytopoïèse regroupe le processus de différenciation de la cellule souche hématopoïétique en progéniteurs MK ainsi que les différentes étapes de maturation du MK jusqu'à la libération des plaquettes. Les différentes étapes de ce processus sont contrôlées par l'action de cytokines et l'activation de facteurs de transcription.

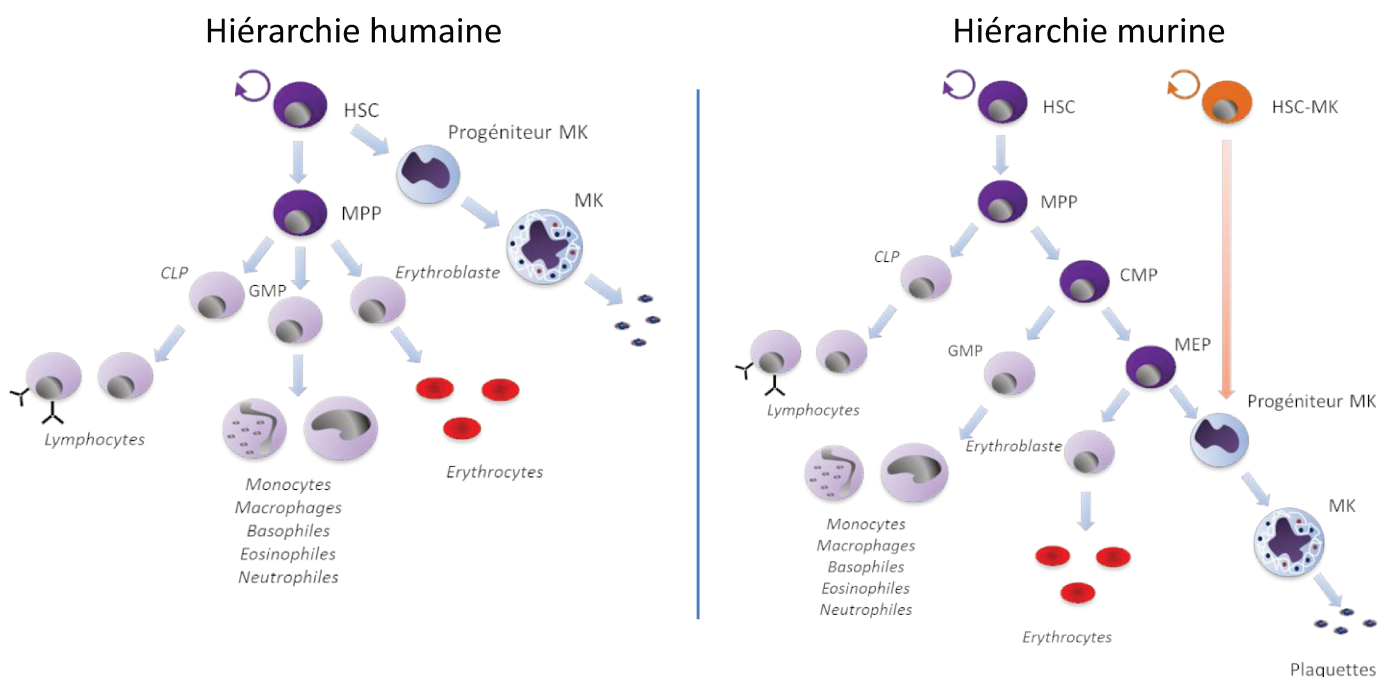


Figure 2 : Les voies biaisées de la mégacaryopoïèse

Lors de l'hématopoïèse humaine (gauche), une même cellule souche serait capable de générer un progéniteur unipotent mégacaryocytaire et un progéniteur multipotent (MPP) qui donnera à son tour les progéniteurs unipotents des différents types cellulaires hématopoïétiques. (schéma inspiré de l'article de Notta et al, 2015)

Chez la souris, l'hématopoïèse classique existe toujours mais à celle-ci s'ajoute l'existence d'une cellule souche hématopoïétique s'orientant préférentiellement dans la lignée MK sans passer par les progéniteurs multipotents (droite). (schéma inspiré des articles : Sanjuan-Pla et al, 2013; Nishikii et al, 2015; Haas et al, 2015)

1.1.2.1 Les cytokines

Un certain nombre de cytokines participent à la mégacaryopoïèse comme par exemple l'interleukine-3 (IL-3), le GM-CSF (Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor), IL-6, IL-11, le stem cell factor, l'EPO (erythropoïétine), le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le ligand de FLT (Bruno et al., 2003; Drayer et al., 2000; Kaushansky et al., 1994; Zhao et al., 2014). Ces cytokines agissent toutes en synergie avec la thrombopoïétine (TPO) et n'ont pas d'action notable seule sauf l'IL-3 capable d'induire la différenciation des HSC.

Comme l'EPO est la cytokine responsable de l'érythropoïèse, la TPO est la principale cytokine responsable de la mégacaryopoïèse. Son identification a permis très rapidement de montrer que la liaison de la TPO avec son récepteur, le c-Mpl est essentielle dans tout le processus de la mégacaryopoïèse (Bartley et al., 1994). La TPO favorise la différenciation des HSC en progéniteurs MK (Banu et al., 1995; Nichol et al., 1995), avec la formation *in vitro* de colonies mégacaryocytaires. Elle joue également un rôle dans les stades tardifs de la mégacaryopoïèse, c'est-à-dire dans la maturation du MK (Kaushansky et al., 1994; Wendling et al., 1994). La TPO est majoritairement produite dans le foie (de Sauvage et al., 1994), et sa concentration est inversement proportionnelle à la numération de plaquettes circulantes et de MKs (Nichol et al., 1995). Dans le foie, l'interaction entre les hépatocytes et les plaquettes âgées *via* le récepteur hépatique Ashwell-Morell contrôle l'expression et la sécrétion de la TPO (Grozovsky et al., 2015). Les plaquettes participent également à la diminution de la concentration plasmatique de la TPO, en la captant par l'interaction avec le récepteur c-Mpl, l'internalisant et la dégradant. L'interaction de la TPO avec le c-Mpl des cellules hématopoïétiques régule également la mégacaryopoïèse (Fielder et al., 1996; Kuter and Rosenberg, 1995). Au niveau intracellulaire, cette liaison induit l'activation de la voie JAK/STAT, les kinases JAK2 et TYK2 étant directement couplées au c-Mpl. L'activation de ces kinases conduit à l'activation de STAT3 et 5 puis à la phosphorylation en cascade de différentes voies de signalisation menant à la stimulation de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) et à la voie Raf-1/MAP kinase. L'activation de ces voies favorise la différenciation et la prolifération des progéniteurs MK (Besancenot et al., 2014; Deutsch and Tomer, 2006).

1.1.2.2 Les facteurs de transcription

Différents facteurs de transcription sont activés au cours de la mégacaryopoïèse, certains sont actifs et nécessaires tout au long du processus et d'autres spécifiques à certaines étapes de différenciation (Figure 3)(Tijssen and Ghevaert, 2013).

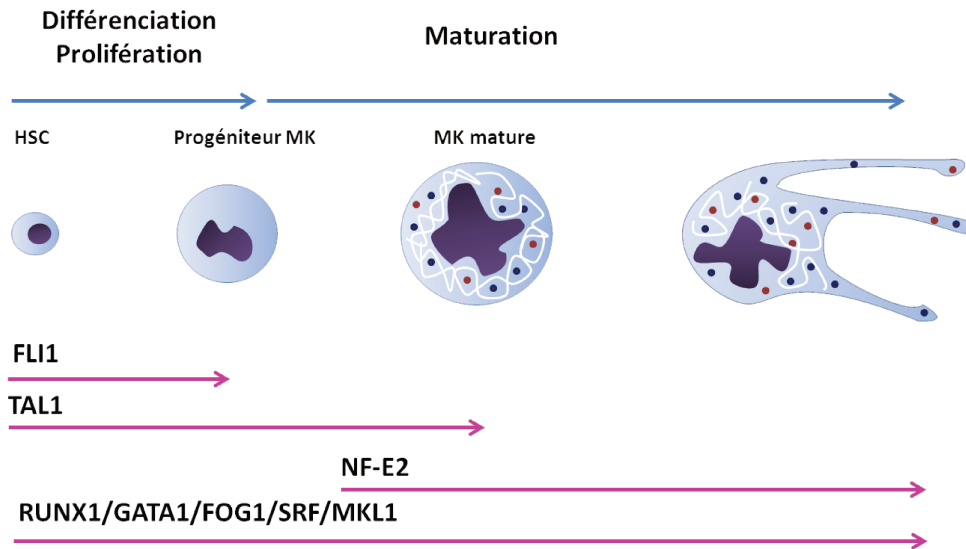


Figure 3 : Les facteurs de transcription de la mégacaryopoïèse

Au cours de la mégacaryopoïèse différents facteurs de transcription sont exprimés. Ces facteurs suivant leur cinétique d'expression favorisent soit les étapes précoces d'engagement et de prolifération des progéniteurs, soit la maturation des MKs et la production de plaquettes. (schéma inspiré de la revue de Tijssen et Ghevaert, 2013)

RUNX1 est l'un des facteurs essentiels dans toutes les étapes de la mégacaryopoïèse. En induisant une diméthylation asymétrique de l'histone H3 au niveau des gènes mégacaryocytaires (par exemple : *miR27a*, *CD41*, *CD42b*, *TSP-1*, *PU.1*, *NF-E2*) dans les cellules progénitrices, il maintient ces gènes dans un état dit intermédiaire, favorise la liaison à l'ADN d'autres facteurs de transcription et facilite la transcription ainsi que la différenciation des progéniteurs en MKs (Elagib et al., 2003; Herglotz et al., 2013). L'orientation des différents progéniteurs dans la voie mégacaryocytaire-érythrocytaire (MEP) est contrôlée par le facteur GATA1 (Noh et al., 2015). La différenciation du CMP en MEP ou GMP se fait suivant la balance d'expression de GATA1 et PU.1. Une surexpression de GATA1 entraîne la différenciation du CMP en MEP alors que la surexpression de PU.1 favorise la différenciation en GMP (Deutsch and Tomer, 2013). GATA1 et son co-activateur FOG1 (Friend of GATA1) interagissent avec deux facteurs de transcription : FLI1 et EKLF. Le cross-antagonisme de FL1 (Friend Leukemia virus Integration 1) et EKLF oriente la différenciation du MEP (Starck et al., 2003). FLI1 active l'expression de gènes mégacaryocytaires (*GPIX*, α IIb, *GPV*, *GPIB α*) et la différenciation du MEP en progéniteur MK, alors que EKLF oriente la différenciation vers la voie érythrocytaire (Hashimoto and Ware, 1995; Lepage et al., 1999; Starck et al., 2003; Wang et al., 2002). Le facteur SRF (Serum Response Factor) et son cofacteur MKL1 (MegaKaryoblastic Leukemia Factor 1) (également appelé MRTF-A ou MAL) sont activés par le sérum et induisent l'activation de la transcription de gènes codant pour les protéines du cytosquelette et des protéines régulatrices de l'organisation de celui-ci. De par le rôle du cytosquelette dans la croissance et la différenciation cellulaire, les facteurs MKL1 et SRF sont impliqués dans toutes

les étapes de la mégacaryopoïèse (Ragu et al., 2010; Tijssen and Ghevaert, 2013). Les souris déficientes pour le facteur MKL1 ont permis de mettre en évidence le rôle important de ce facteur dans la maturation du MK et la formation des plaquettes (Cheng et al., 2009). Le facteur TAL1 (T-cell Acute Lymphocytic Leukemia 1) est impliqué dans les mécanismes de prolifération des différents progéniteurs et dans la ploïdisation du MK (Tijssen and Ghevaert, 2013). Les étapes finales de la mégacaryopoïèse sont quant à elles régulées par le facteur de transcription NF-E2 (Lecine et al., 1998). Le rôle de NF-E2 sur la production de plaquettes s'explique en partie par le fait qu'il contrôle la transcription d'un isotype spécifique de la tubuline beta, la tubuline $\beta 1$, isoforme de tubuline majoritairement présent dans les plaquettes et responsable de leur formation (Lecine et al., 2000).

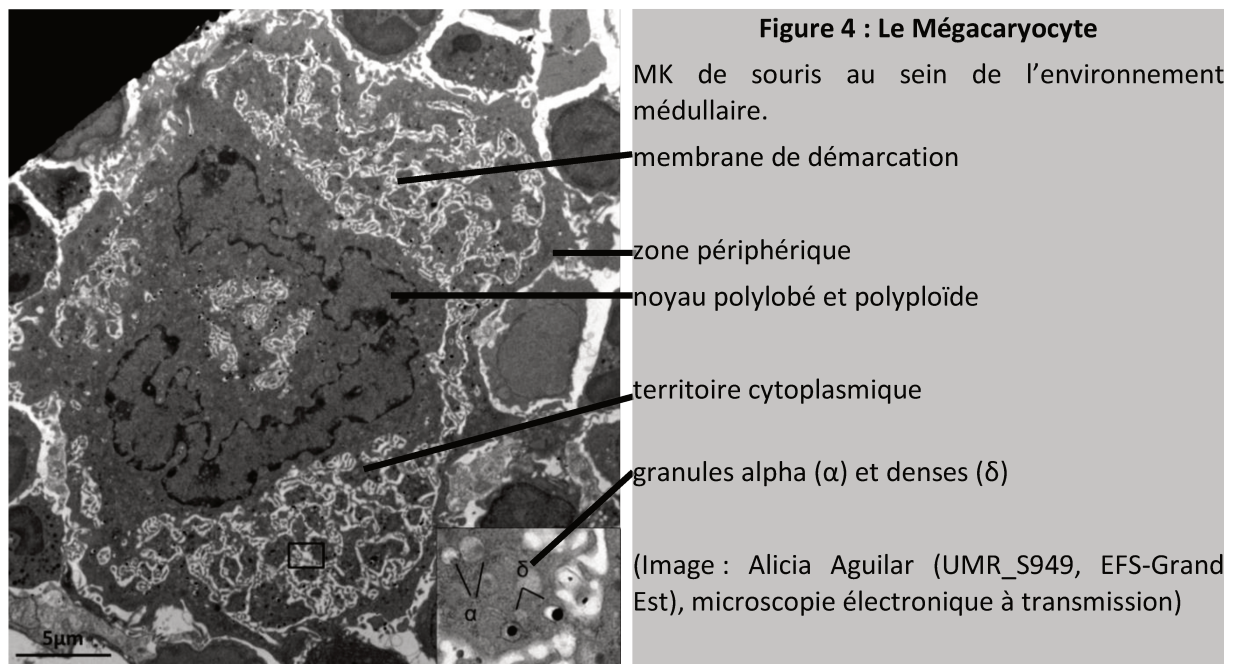
Dans le cadre de ma thèse je m'intéresse particulièrement aux phases finales de mégacaryopoïèse, c'est-à-dire à la maturation du MK, et la production de plaquettes (thrombopoïèse).

1.1.3 La maturation du mégacaryocyte

1.1.3.1 Le mégacaryocyte

Le MK est une cellule rare, avec une densité moyenne de 9 MKs/mm² de moelle (Schmitt et al., 2001), et classiquement le pourcentage de 0,01% est retrouvé dans la plupart des articles (Nakeff and Maat, 1974). Ces cellules sont facilement identifiables par leur taille (entre 30 et 100 μm) et leur ultrastructure spécifique observable en microscopie électronique (Figure 4)(Eckly et al., 2012; Pease, 1956). Elles possèdent un noyau polylobé, polyploïde, leur cytoplasme est rempli par un important réseau de membranes internes appelé système de démarcation membranaire (DMS) qui délimite des territoires cytoplasmiques contenant les granules plaquettaires et éventuellement leur précurseurs appelés corps multivésiculaires (MVB)(Blair and Flaumenhaft, 2009; McNicol and Israels, 1999; Yamada, 1957). En périphérie de la cellule se trouve une zone de cytoplasme dépourvue d'organelles mais riche en cytosquelette d'actine, désignée sous le terme de zone périphérique (pz)(Shaklai and Tavassoli, 1978; Zucker-Franklin et al., 1987). Il existe trois stades de maturation observables en microscopie électronique à transmission (Zucker-Franklin, 1996). Lorsque l'on quantifie tous les MKs d'une moelle, on compte moins de 5% de MKs de classe I, entre 20 et 30% de classe II et plus de 70% de classe III (Eckly et al., 2012; Strassel et al., 2009). Les MKs de stade I sont les plus immatures. Ils sont de petite taille 10 à 15 μm , possèdent un gros noyau qui remplit quasiment tout le cytoplasme et ne contiennent pas de granules ni de DMS. Les MKs de stade II ont une taille plus importante 15 à 30 μm , ils possèdent des granules immatures, surtout des MVBs, beaucoup de réticulum endoplasmique et un DMS peu important contrairement aux MKs de stade III ou MKs matures. Les MKs de stade III sont de très grosses cellules (diamètre >30 μm) avec un noyau important, un DMS très développé remplissant

quasiment tout le cytoplasme et délimitant des territoires cytoplasmiques ainsi que des granules matures.



1.1.3.2 L'endomitose

Le MK devient polyploïde par endomitoses successives (Trakala et al., 2015; Vitrat et al., 1998). La cellule entre en mitose et celle-ci s'effectue normalement jusqu'à la fin de l'anaphase. En revanche la cytokinèse n'a pas lieu, il n'y a pas séparation des cellules filles car l'anneau contractile métaphasique est défectueux. Cet anneau est formé par le cytosquelette d'actomyosine, la myosine est responsable de la contraction de l'anneau et de la séparation des cellules filles. Au cours du développement du MK, l'expression de l'isoforme IIB de la myosine diminue, inhibée par le facteur RUNX1. En absence de la myosine IIB, la contractilité est trop faible et la cytokinèse n'aboutit pas à la séparation des cellules filles (Lordier et al., 2012; Roy et al., 2016). L'ensemble des lots de chromosomes reste dans la même cellule aux pôles mitotiques et le noyau se reforme autour, d'où l'aspect polylobé (Ravid et al., 2002; Trakala et al., 2015; Vitrat et al., 1998). L'augmentation de la ploïdie est corrélée non seulement à une augmentation du volume de la cellule mais également au nombre de granules et de mitochondries. On peut supposer que l'augmentation de la ploïdie a pour but d'augmenter rapidement la production de protéines plaquettaires et de membranes pour alimenter les futurs granules ainsi que le réseau de membranes internes (Penington et al., 1976; Ravid et al., 2002).

1.1.3.3 La formation du système de démarcation membranaire

Le DMS est en continuité avec la membrane plasmique et se forme par l'invagination de celle-ci au cours des stades précoces de la maturation mégacaryocytaire. L'initiation de l'invagination de la membrane est réalisée par le complexe protéique PACSIN2 (protein kinase C and casein kinase II substrate 2)-Filamine A connu dans les phénomènes de tubulation membranaire (Jurak Begonja et al., 2015). La formation du DMS fait intervenir 3 éléments : la membrane plasmique, le Golgi et le noyau (Figure 5), la présence d'appareils de Golgi et de centrioles ayant été montrée à proximité du pré-DMS. De plus, après quantification une corrélation entre le nombre de connections du DMS à la membrane et le nombre de lobes du noyau a été montrée, ces deux éléments indiquant une relation possible entre la polyploïdisation et la formation du DMS (Eckly et al., 2014). En conclusion, le DMS proviendrait d'une invagination dirigée par le complexe PACSIN2-filamine A de la membrane vers la plaque équatoriale -là où normalement devrait se former le sillon de clivage de la cellule en division si la cytokinèse n'était pas avortée- alimenté par le système de Golgi (Chitu and Stanley, 2015; Jurak Begonja et al., 2015). Suivant cette hypothèse on peut imaginer qu'à chaque nouvelle mitose se crée une nouvelle invagination augmentant la masse centrale du DMS qui progressivement pousse les lobes du noyau vers la périphérie (Eckly et al., 2014) (Figure 5).

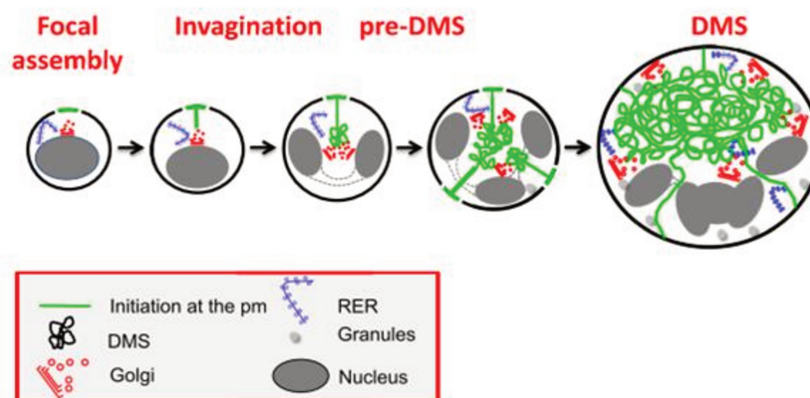


Figure 5 : Biogenèse et expansion du DMS

L'invagination de la membrane plasmique vers le noyau. Au cours de la maturation du MK et suite aux différents cycles d'endomitoses, d'autres invaginations se forment, le DMS est alimenté par l'apport membranaire provenant du Golgi et s'étend dans le cytoplasme cellulaire. (schéma tiré de l'article de Eckly et al., 2014 (copyright 2011 The American Society of Hematology)).

1.1.3.4 Formation des granules

La plus grande quantité de granules matures est observée dans les MKs de stade III prêts à libérer les plaquettes mais leur biogénèse commence bien plus tôt. Des structures granulaires sont observées dès l'apparition du DMS, entre les stades I et II, mais ceux-ci ne sont pas matures (King and Reed, 2002). Les mécanismes de la biogénèse des granules sont mal connus, néanmoins il est admis qu'ils proviennent de la maturation des MVBs. Ces structures sont à l'origine des trois granules plaquettaires : les granules alpha, les granules denses et les lysosomes (Heijnen et al., 1998; King and Reed, 2002; Youssefian and Cramer, 2000). Ce sont des structures que l'on observe particulièrement dans les MKs en culture, il y en a beaucoup moins dans les MKs différenciés *in situ* qui possèdent majoritairement des granules matures notamment plus de granules alpha. Les MVBs sont souvent localisés près du Golgi qui les alimente en protéines synthétisées par le MK (vWF, PF4, β -thromboglobuline...). Ces structures se chargent également en protéines provenant de l'extérieur (par exemple en fibrinogène endocyté via son interaction avec la GPIIb-IIIa) car le MK possède une forte activité d'endocytose (Handagama et al., 1990; Heijnen et al., 1998) (Figure 6).

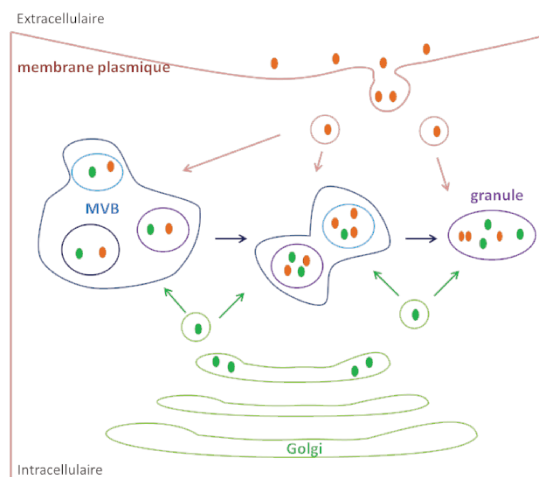


Figure 6 : La biogénèse des granules plaquettaires

La maturation du MVB se fait par l'apport de protéines via la voie de synthèse (Golgi) et la voie endocyttaire (membrane plasmique). Au cours de sa maturation il va se spécialiser pour devenir un granule alpha, dense ou un lysosome. (schéma inspiré de l'article de Blair and Flaumenhaft, 2009)

1.1.4 La thrombopoïèse

James Wright en 1906 est le premier à mettre en évidence le lien MK-plaquettes sur la base de similitudes morphologiques (granules, organisation des organites) observées sur des coupes histologiques de moelles et de rates (Wright, 1906, 1910). L'origine mégacaryocytaire des plaquettes sera contestée jusqu'aux premières vidéos de MKs formant des plaquettes en explants dans les années 1950 (Thiery and Bessis, 1956).

1.1.4.1 Les différentes théories de la formation des plaquettes

La première théorie propose que les plaquettes préformées soient libérées par fragmentation du cytoplasme en suivant les membranes de démarcation. Le MK est alors vu comme un « sac de billes » contenant les futures plaquettes totalement formées et fonctionnelles (Radley and Haller, 1982; Yamada, 1957). La seconde est celle du « gant retourné » ou du « tube de dentifrice », le DMS se débobine à l'extérieur du MK pour former des extensions cytoplasmiques, les proplaquettes (Schulze et al., 2006; Shaklai and Tavassoli, 1978). Une troisième théorie propose également l'extension de la membrane plasmique en proplaquettes non pas *via* le « débobinage » du DMS mais par l'apport de vésicules membranaires qui s'ajoutent au fur et à mesure à la membrane plasmique, le DMS est alors un réservoir membranaire (Cramer et al., 1997; Tablin et al., 1990). L'existence d'un transport actif des organelles vers les extrémités proplaquettaires, bien qu'observée uniquement *in vitro* jusqu'à présent, suggère fortement que les plaquettes ne sont pas « pré-existantes » au sein du MK mais se forment lors de l'extension cytoplasmique (Richardson et al., 2005).

1.1.4.2 La libération des plaquettes *in situ*

Observations de microscopie électronique

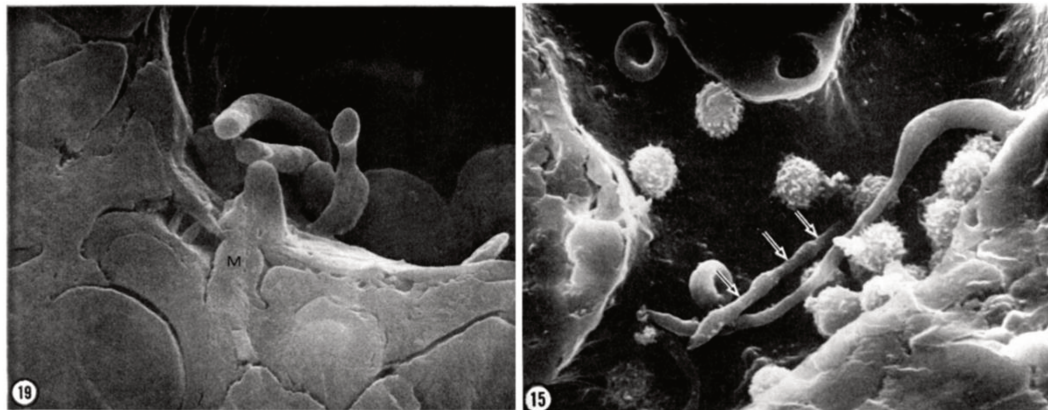


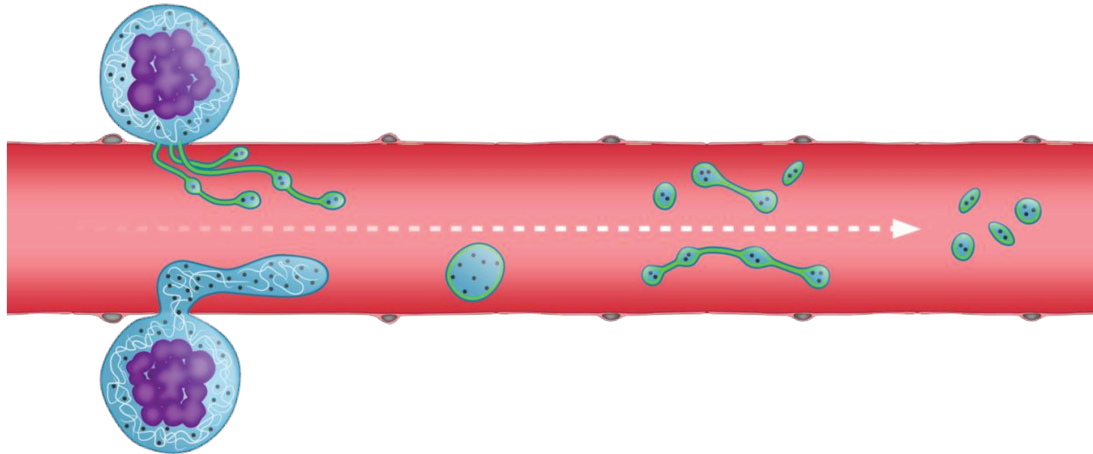
Figure 7 : Formation des proplaquettes *in situ*

MK (noté M) formant une protrusion cytoplasmique (à gauche), deux proplaquettes en formation dans un sinusoïde (droite). Les flèches indiquent les constriction, microscopie électronique à balayage. (Images : Becker and De Bruyn 1976, copyright 1976 Wiley-Liss, Inc)

A la fin des années 1970, Becker et De Bruyn font en microscopie électronique à balayage l'observation d'extensions cytoplasmiques d'origine mégacaryocytaire dans les sinusoides de la moelle (Figure 7). Ces observations suggèrent un passage actif du prolongement mégacaryocytaire à travers l'endothélium (Becker and De Bruyn, 1976). Les auteurs définissent les proplaquettes comme des structures « vermiformes » pouvant atteindre 120 μm de long avec une largeur comprise entre 1,5 et

3,5 μm et une constriction en partie distale. Ils supposent que la libération des plaquettes se fait par « pincement » de la proplaquette au niveau de la constriction (Becker and De Bruyn, 1976). En revanche, les observations de microscopie électronique à transmission, notamment faites au laboratoire, ne montrent pas de structures proplaquettaires fines mais plutôt des fragments de MK passant dans la circulation (Figure 8).

Génération de proplaquettes



Génération de fragments

Figure 8 : Deux voies pour produire les plaquettes

Il existe deux théories sur les mécanismes de production de plaquettes. Le premier et le seul observé *in vitro* est la formation de longues extensions cytoplasmiques (en haut). *In situ* la formation de proplaquettes a été observée mais également celle de gros fragments qui se morcellent par la suite pour donner plusieurs plaquettes (en bas). (schéma réalisé par Fabien Pertuy (UMR_S949, EFS-Grand Est)

La libération des plaquettes *in vitro*

Alors qu'*in situ*, il a été observé à la fois des proplaquettes relativement fines et allongées, pas ou peu ramifiées, ainsi que la présence de gros fragments, la situation est différente *in vitro*. En culture et à l'aide de la technique des explants, on observe la formation de proplaquettes longues et très fines, extrêmement ramifiées, présentant des renflements et dotées à leur extrémité d'un bouton plaquettaire (Becker and De Bruyn, 1976; Cramer et al., 1997; Tablin et al., 1990). La formation des proplaquettes telle qu'elle a lieu *in vitro* est un mécanisme complexe et dynamique (élongation de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$) faisant intervenir le cytosquelette de microtubules et celui d'actine dont l'importance dans la mobilité de ces structures a été montré entre autres en utilisant respectivement le nocodazole et la cytochalasine A (Italiano et al., 1999; Patel et al., 2005a; Tablin et al., 1990).

Le rôle du cytosquelette de microtubules

Les microtubules forment des rayons traversant toute la cellule, allant du noyau vers la zone périphérique (Patel et al., 2005b). Lors de l'initiation de la protrusion cytoplasmique, le cytosquelette de microtubules se réorganise, avec la formation de rails de microtubules sous la membrane plasmique, au niveau du site d'initiation. Pendant l'élongation, les microtubules s'allongent dans le prolongement proplaquettaire et forment des superenroulements à l'extrémité, formant le bouton plaquettaire. L'élongation de la protrusion en proplaquette est due en partie à la polymérisation des sous-unités de tubulines formant les rails de microtubules (phénomène 10 fois plus rapide que l'élongation de la proplaquette) et au glissement des rails de microtubules les uns contre les autres (comme une échelle coulissante). Le glissement des microtubules les uns par rapport aux autres est contrôlé par la présence de moteurs moléculaires, par exemple la dynéine (Patel et al., 2005a, 2005b; Tablin et al., 1990). Lorsque le prolongement devient une proplaquette avec un bouton plaquettaire, les microtubules forment des enroulements dans le bouton (entre 10 et 20) puis redescendent dans l'extension. Ces enroulements et ces rails de microtubules donnent sa structure particulière à la proplaquette et participent au transport des organelles et granules plaquettaires du MK à la future plaquette (Figure 9)(Italiano et al., 1999; Patel et al., 2005a; Richardson et al., 2005).

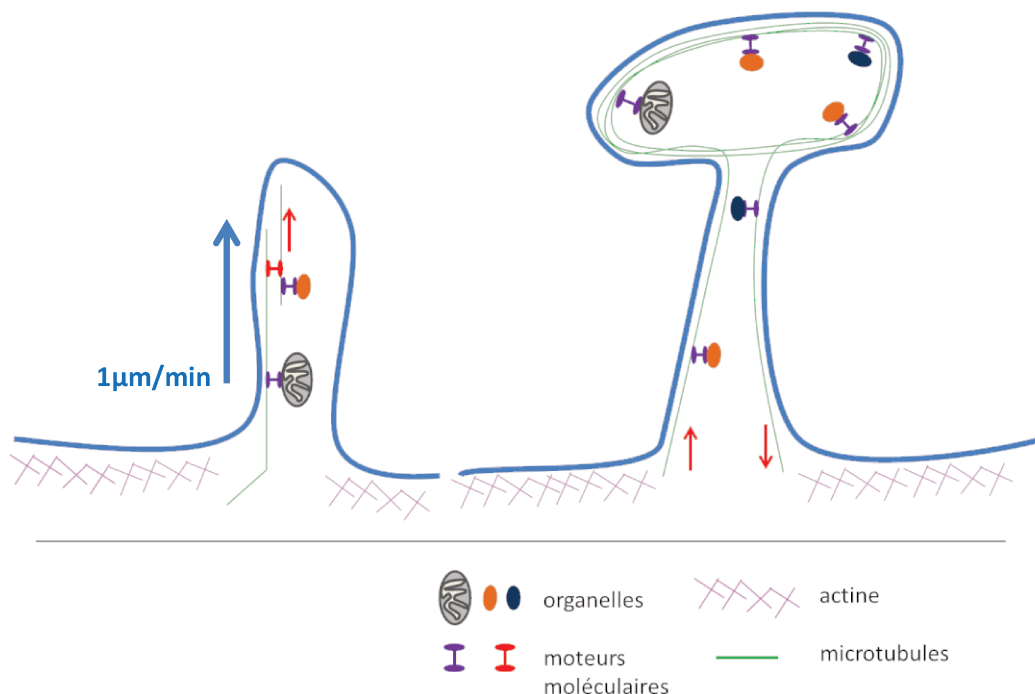


Figure 9 : Formation des proplaquettes et transport des organelles

La proplaquette se forme par la poussée du cytosquelette de microtubules sous la membrane après modification du cytosquelette d'actine. Les organelles utilisent les « rails » de microtubules pour entrer dans la proplaquette en formation. Une fois dans le bouton plaquettaire les organelles y sont retenues par des mécanismes encore inconnus.

Le rôle du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine est présent dans les proplaquettes (Patel-Hett et al., 2011)(observations faites au laboratoire). *In vitro* son rôle n'est pas clairement établi. Tablin et collaborateurs (Tablin et al., 1990) décrivent que l'inhibition par la cytochalasine D favoriserait la formation des extensions proplaquettaires, dans des conditions de culture sur collagène ou matrigel. A l'inverse, les travaux de l'équipe d'Italiano proposent que la cytochalasine D ou la latrunculine A diminue le nombre d'embranchements sur une même proplaquette (Italiano et al., 1999; Richardson et al., 2005). Nos observations vont également dans ce sens, avec malgré tout une diminution de la proportion de MKs formant des proplaquettes, et une modification de la morphologie des proplaquettes qui présentent peu/pas d'embranchements (voir Partie 2). Les différences observées dans ces diverses études pourraient être liées à la quantité d'actine filamentueuse résiduelle (dépendant de la concentration d'inhibiteur utilisée), ainsi que des conditions de culture, l'équipe de Tablin ayant utilisé des substrats de protéines de matrice pour visualiser la fragmentation des mégacaryocytes. Les conditions de culture, notamment l'adhésion à la matrice, pourraient en effet modifier la dynamique et/ou l'implication de l'actine dans le processus.

L'absence de certaines protéines régulatrices de l'actine dans des modèles murins suggère également un rôle de la régulation de la polymérisation de l'actine dans la formation des proplaquettes mais il est important de prendre en compte que dans les souris dont un gène est inactivé, l'ensemble des processus de maturation nécessitant le cytosquelette d'actine sont susceptibles de présenter des défauts, l'exemple le plus parlant étant la maturation du DMS (Antkowiak et al., 2016; Bender et al., 2010; Sui et al., 2016). Il est donc parfois difficile de distinguer l'effet de l'absence d'une protéine liée à l'actine sur la production des proplaquettes, de son effet sur la maturation cellulaire. Cette distinction a été bien documentée dans le cadre de la caractérisation des souris déficientes pour la myosine IIA. L'inactivation de myosine IIA pendant la maturation du MK affecte négativement la formation de proplaquettes en raison notamment d'un impact négatif sur le développement du DMS, alors que l'inhibition de la myosine IIA juste au moment de l'extension des proplaquettes favorise le processus (Eckly et al., 2009, 2010). Par ailleurs, les souris déficientes pour les gènes de la tropomoduline III, de la myosine IIA, de la cofiline ou encore de l' α -actinine présentent une macrothrombopénie, indiquant l'importance de l'organisation du cytosquelette d'actomyosine dans la régulation de la taille des plaquettes (Bender et al., 2010; Kunishima et al., 2013a; Sui et al., 2016).

Transport des organelles

En parallèle de l'extension cytoplasmique, il a été observé *in vitro* un transport actif des

différentes organelles, notamment les mitochondries et les granules de manière individuelle (40%) ou en tandem (60%) en empruntant le réseau de microtubules en formation (Figure 9)(Italiano et al., 1999; Patel et al., 2005a; Richardson et al., 2005). C'est un transport lent (0,13 à 0,26 $\mu\text{m}/\text{min}$) et bidirectionnel (en suivant la polarité des microtubules) qui se fait par l'intervention de moteurs moléculaires : soit la kinésine qui se déplace sur les microtubules et/ou la dynéine qui fait glisser des portions de microtubules les uns sur les autres pouvant eux-mêmes supporter des organelles. Une fois entrées dans la proplaquette, les organelles sont capturées ou retenues. Il a été montré que seul 3,5% des organelles ressortent des proplaquettes, peut-être du fait des enroulements de microtubules dans la proplaquette et de la vitesse particulièrement lente du trafic vésiculaire (environ 10 fois plus lente que la vitesse de formation de la proplaquette) mais ce mécanisme reste hypothétique (Richardson et al., 2005). Les mécanismes permettant aux organelles de se dissocier du support microtubulaire restent actuellement inconnus.

In vivo, le transport des organelles en temps réel n'a pas été décrit jusqu'à présent. Il est possible qu'il soit également dû à un transport actif le long des microtubules. Toutefois la présence de plaquettes présentant un contenu en granules hétérogène dans les souris déficientes pour un certain nombre de protéines associées au cytosquelette d'actine (tropomoduline III, myosine IIA, cofiline), ne permet pas de rejeter l'hypothèse d'un rôle de l'actine dans ce processus (Bender et al., 2010; Sui et al., 2016). Ce contenu hétérogène pourrait être dû à un défaut dans le transport des organelles au moment de la formation de l'extension cytoplasmique ou encore, dans l'hypothèse de la formation de gros fragments (majoritairement observés *in situ* au laboratoire, Figure 8), on peut envisager que l'actine est essentielle à la localisation ainsi qu'à la mobilité des granules dans le MK pendant sa maturation. Les granules n'étant pas bien localisés, cela entraînerait la libération de fragments soit vides, soit remplis de granules (Bender et al., 2010; Pertuy et al., 2013).

Observations en temps réel

In vivo, la formation des proplaquettes en temps réel a été filmée pour la première fois en 2007 (Junt et al., 2007). Les MKs sont observés au microscope biphotonique directement à travers l'os du crâne sur souris anesthésiée. Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle important de l'environnement vasculaire dans la régulation de la thrombopoïèse : i) l'environnement augmente la vitesse d'extension des proplaquettes qui passe de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ en culture à 4 $\mu\text{m}/\text{min}$, ii) les contraintes physiques de l'environnement notamment le diamètre du sinusoiide régule la taille des proplaquettes, iii) le flux facilite le détachement des proplaquettes. Les auteurs supposent que les proplaquettes libérées, qui ont un volume plus important que celles de culture, sont étirées et divisées en plaquettes définitives par le flux qui induit des forces de cisaillements (Junt et al., 2007)(Figure 8).

1.1.4.3 Les maladies plaquettaires

Les différents rôles des plaquettes font d'elles des éléments essentiels du sang. En effet, elles sont nécessaires à l'arrêt des saignements et participent également à la régénération tissulaire ainsi qu'à l'immunité. C'est pourquoi un défaut quantitatif (thrombopénies), ou qualitatif (thrombopathies) peut avoir de graves conséquences en termes de saignements et de risques hémorragiques.

Les thrombopathies

Les thrombopathies sont des maladies hémorragiques résultant d'un défaut fonctionnel des plaquettes. On distingue les thrombopathies constitutionnelles (héréditaires) des thrombopathies acquises. Ces dernières sont majoritairement d'origines médicamenteuses, en effet certains médicaments comme l'aspirine, les anti-inflammatoires et les antibiotiques à fortes doses inhibent la fonction plaquettaire (Capodanno et al., 2013; Gachet, 2015). Les thrombopathies constitutionnelles sont dues à des défauts de fonctionnement des plaquettes résultant de mutations affectant par exemple l'expression de protéines membranaires (syndrome de Bernard-Soulier, thrombasthénie de Glanzmann) ou de protéines contenues dans les granules (maladies du pool vide) (Nurden, 2005; Nurden and Nurden, 2013; Salles et al., 2008; Strassel et al., 2009; Yuan et al., 1999).

Les thrombopénies

Les thrombopénies sont caractérisées par une numération plaquettaire inférieure à 150.10^9 plaquettes/litre de sang (Johnson et al., 2016). Elles sont également séparées en deux catégories, acquises et héréditaires. Les thrombopénies acquises peuvent être : i) virales (rougeole, varicelle, VIH, hépatite B)(Ali et al., 2006; Kuter, 2009), ii) médicamenteuses, certains médicaments et notamment les traitements chimiothérapeutiques peuvent avoir une action myélosuppressive et induire une chute sévère des plaquettes qui nécessite de transfuser massivement les patients (Arnold et al., 2013; Xi et al., 2013), ou iii) auto-immunes, le patient développant des anticorps dirigés contre des glycoprotéines membranaires des plaquettes, ce qui induit leur élimination par les macrophages (Huang and Chang, 2012; Nishimoto et al., 2016). Les thrombopénies héréditaires sont causées par des mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans i) la mégacaryopoïèse (facteurs de transcription, effecteurs de voie de signalisation), les MKs sont alors moins nombreux, immatures et forment peu de plaquettes, ou ii) la production de plaquettes, lors de mutations sur les gènes des protéines du cytosquelette et des protéines associées, ce qui inhibe ou diminue fortement la production de plaquettes (Johnson et al., 2016; Kunishima et al., 2013b; Léon et al., 2007; Pecci and Balduini, 2014).

Les thrombocytoses

A l'inverse, on peut noter également des dysfonctionnements de la mégacaryopoïèse conduisant à une surproduction de plaquettes (thrombocytose). C'est le cas dans la thrombocytémie essentielle et la polyglobulie de Vaquez (ou polycythemia vera), résultant de mutations dans les gènes *Mpl*, *JAK2* ou *calreticuline*, effecteurs de la voie TPO/mpl induisant une prolifération importante des progéniteurs mégacaryocytaires (Bianchi et al., 2016). Dans ces cas, un phénotype paradoxal est observé. Dans les modèles de souris reproduisant ces pathologies le compte plaquettaire est entre 3 et 6 fois supérieur à la normale. Mais les temps de saignements sont augmentés, ce qui s'explique en partie par une consommation importante du facteur de von Willebrand (vWF) plasmatique (Besancenot et al., 2014; Strassel et al., 2015).

1.2 Structure de la moelle hématopoïétique

1.2.1 Localisation du tissu hématopoïétique

La moelle est un tissu mou et lâche contenu dans une structure solide, l'os. Dans ce tissu les cellules (hématopoïétique, stromales, mésenchymateuses, endothéliales, etc..) ainsi que les protéines de matrice extracellulaire (MEC) remplissent les trabécules osseuses. C'est un tissu qui évolue au cours du temps. Très productif au début du développement d'un individu, la moelle hématopoïétique est petit à petit remplacée par la moelle jaune, composée en grande majorité d'adipocytes (Hardouin et al., 2016; Kricun, 1985). A l'âge adulte, la moelle hématopoïétique représente environ 25% de la moelle totale et 2-5% de la masse de l'individu (Agool et al., 2011). Elle se situe principalement chez l'Homme dans les os courts et plats (sternum, côtes, crâne, bassin) ainsi que dans l'os trabéculaire des métaphyses de l'humérus et du fémur (Agool et al., 2011). Chez la souris, notre modèle d'étude, la formation de la moelle jaune est plus tardive et on retrouve encore une moelle hématopoïétique fortement active dans les os longs à l'âge adulte (Agool et al., 2011; Hardouin et al., 2016; Kricun, 1985).

1.2.2 Composante cellulaire

La composante cellulaire de la moelle est composée de différents types cellulaires : les cellules souches hématopoïétiques et leur descendance, les cellules mésenchymateuses, les cellules osseuses, les cellules endothéliales, périvasculaires, les fibres neuronales, les cellules réticulaires sécrétant le facteur SDF-1 dites cellules CAR (CXCL12 abundant reticular cell), les cellules immunitaires et les cellules stromales (Table 1)(Birbrair and Frenette, 2016; Reagan and Rosen, 2016; Shen and Nilsson,

2012). Ces cellules forment un continuum de microenvironnements locaux dont la composition influence le devenir des HSC et des progéniteurs présents au sein de ces environnements. En bordure de l'os, les ostéoblastes régulent la prolifération des HSC et leur nombre. Ce nombre augmente proportionnellement au nombre d'ostéoblastes (Bowers et al., 2015; Zhang et al., 2003). Cette liaison entre les HSC et les ostéoblastes explique certainement pourquoi on suppose depuis de nombreuses années que l'endoste puisse être la niche hématopoïétique. De plus, les ostéoblastes sécrètent de grandes quantités d'ostéopontine, cette glycoprotéine reconnue par de nombreux récepteurs (dont les intégrines) a un rôle dans le maintien des cellules souches au contact de l'os mais également comme régulateur négatif sur la différenciation des HSC (Nilsson et al., 2005). De nombreuses interactions cellulaires ont lieu au sein de la moelle et régulent la différenciation des cellules hématopoïétiques. Il a par exemple été montré que les macrophages et les MKs, *via* la sécrétion de G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) et de TGF- β (Transforming-Growth Factor), ont également un rôle protecteur de cette niche hématopoïétique (Winkler et al., 2010; Zhao et al., 2014). Alors que, le FGF, par exemple induirait leur différenciation (Avecilla et al., 2004; Zhao et al., 2014). Les différentes cellules capables de sécréter le facteur SDF-1 (notamment les cellules CAR et les cellules endothéliales) régularaient préférentiellement la différenciation de certains progéniteurs tout en maintenant les autres dans leur niche d'origine (Greenbaum et al., 2013; Lataillade et al., 2004), et les fibres nerveuses présentes dans la moelle induirait également la mobilisation et la maturation des progéniteurs immatures (Chen et al., 2015; Katayama et al., 2006; Spiegel et al., 2007). Les rôles des interactions cellulaires et chimiques au sein de ces différents environnements ne sont pour l'instant pas tous connus. De plus, il est difficile d'attribuer des fonctions précises à chaque environnement au vu de leur complexité (en terme de types cellulaires, protéines et facteurs sécrétés) et du fait qu'une grande partie des éléments présents ont un rôle différent selon qu'ils sont isolés ou en présence d'autres facteurs environnementaux (synergie, inhibition, balance). On peut notamment citer la balance SDF-1/TGF- β , le SDF-1 seul a un rôle chimioattractant et initiateur du cycle cellulaire, contrairement au TGF- β connu pour bloquer le cycle cellulaire. En culture, la balance SDF-1/TGF- β régule le cycle cellulaire, en régulant mutuellement l'expression des effecteurs de leur deux voies (Chabanon et al., 2008; Lataillade et al., 2000).

Cellules	Ostéocytes Ostéoclastes Ostéoblastes Cellules de Schwann Cellules perivasculaires Cellules CAR Cellules endothéliales Cellules mésenchymateuses Fibroblastes Adipocytes Cellules souches hématopoïétiques Progéniteurs hématopoïétiques Macrophages Mégacaryocytes
Matrice extracellulaire	Collagènes Laminines Fibronectine Ténascine-C Thrombospondine Ostéopontine Nidogène Vitronectine Fibuline Decorine Acide hyaluronique Héparan sulfate Dermatan sulfate Chondroïtine sulfate

Table 1 : Composition cellulaire et protéique de la moelle

D'après Lee-thedieck et Spatz, 2014; Nilsson et al., 2005 et 1998; Klein et al., 1994, 1995; Handel et al., 2005; Malara et al., 2011, 2013

1.2.3 Espace intercellulaire

1.2.3.1 Les protéines de la matrice extracellulaire

Les protéines de MEC sont synthétisées par les cellules de la moelle, les cellules stromales aussi bien que les cellules hématopoïétiques (Malara et al., 2013; Zuckerman and Wicha, 1983). La nature des fibres définit la rigidité du maillage : les fibres rigides (par exemple de collagène de type I) ont une structure régulière et sont fortement réticulées, le réseau est moins extensible et plus rigide qu'un réseau formé de fibres souples, avec une structure amorphe et peu de réticulations (fibronectine, élastine) (Guthold et al., 2007). Les protéines se lient entre-elles et s'organisent en trois dimensions (3D) pour former des fibres et un maillage sur lequel les cellules vont pouvoir s'ancrer (Reilly and Engler, 2010). Ces éléments jouent un rôle important dans la structure et la topographie de l'environnement mais également dans différentes fonctions cellulaires (migration, prolifération, différenciation, maturation).

Les protéines de MEC majoritaires dans le tissu médullaire sont les collagènes de type I, III et IV, la fibronectine et les laminines (Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998). La fibronectine a une

répartition plutôt homogène dans la moelle car elle est produite par de nombreuses cellules stromales mais également par les cellules hématopoïétiques comme les MKs (Malara et al., 2013; Nilsson et al., 1998; Zuckerman and Wicha, 1983). Les laminines sont retrouvées en grande quantité le long de la paroi vasculaire (Nilsson et al., 1998), mais absentes à proximité de l'os. Le collagène III est lui absent à proximité des vaisseaux, tandis que le collagène I est principalement localisé dans la zone endostéale et le collagène IV dans le stroma médullaire et autour des vaisseaux ((Nilsson et al., 1998) et observations réalisées au sein du laboratoire). Les cellules de la lignée mégacaryocytaire possèdent à leur surface un grand nombre de récepteurs dont les intégrines, récepteurs reconnaissant de nombreuses protéines de MEC. La fibronectine présente dans l'ensemble du tissu participerait à la prolifération des progéniteurs ainsi qu'à la formation des proplaquettes mais aurait un rôle inhibiteur sur la maturation, notamment sur la ploïdisation des MKs (Malara et al., 2013). Les laminines favoriseraient et accélèreraient la formation des proplaquettes alors que le collagène I l'inhiberait en favorisant l'adhésion du MK à l'environnement et la formation de fibres de stress d'actine au sein de la cellule (Balduini et al., 2008; Larson and Watson, 2006; Malara et al., 2013; Sabri et al., 2004). Cette inhibition serait nécessaire pour empêcher la formation de proplaquettes au contact de l'os (Malara et al., 2011, 2013). Toutefois, ces observations sont à modérer car observées *in vitro*, avec les protéines de matrice déposées sur une lamelle de verre ou en fond de puits dans un milieu liquide, et de ce fait elles perdent leur rôle structurel en trois dimensions. On peut facilement supposer qu'elles n'ont pas la conformation qu'elles auraient *in situ*, elles exposeraient plus de sites d'adhésions et donc n'auraient pas la même action sur les cellules (Cukierman et al., 2001; Reilly and Engler, 2010).

1.2.3.2 Les Glycosaminoglycans

Les glycosaminoglycans (GAGs) sont des sucres à longues chaînes composés de 1 à 25000 répétitions de disaccharides, non branchées et chargées négativement. A l'exception de l'acide hyaluronique (HA), tous les GAGs sont liés à un « core » protéique et sont sulfatés, ils sont alors appelés protéoglycans (Handel et al., 2005). Il existe 4 classes majoritaires de protéoglycans : l'héparan sulfate, le chondroïtine sulfate, le dermatan sulfate et le keratan sulfate. L'HA et les protéoglycans sont tous présents au sein de la moelle sauf le keratan sulfate (Klein, 1995). Les GAGs de par leur composition ont des propriétés d'hydratation et de rétention d'eau importante, ils gonflent et forment un gel en encapsulant différents facteurs cellulaires libérés par les cellules dans l'environnement. Le gel formé par les GAGs participe à l'organisation de la MEC, il régule la taille des pores, la malléabilité du réseau et sa rigidité (Toole, 2004). Dans la moelle le rôle des GAGs n'est pas encore bien connu. Globalement ces sucres ont un rôle architectural mais ils participent également à la régulation des fonctions cellulaires, par interaction directe (ligand-récepteur) ou par leur capacité de rétention de facteurs de

croissance. Par exemple, le perlecan (un héparan sulfate) présent dans la moelle a des propriétés anti-adhésives, cette action permet de moduler l'adhésion des cellules hématopoïétiques à la matrice en induisant leur migration plutôt que leur ancrage (Klein, 1995; Klein et al., 1994). Ce même sucre peut également influencer la différenciation cellulaire car il est capable de retenir préférentiellement certains facteurs de croissance comme le GM-CSF (mais pas le G-CSF). La séquestration de facteurs de croissance favorise ainsi la différenciation des progéniteurs et la formation de colonies (Klein et al., 1994).

1.3 La moelle osseuse, un environnement contraignant

La moelle est un environnement avec une structure tridimensionnelle. L'os qui l'entoure, le réseau de protéines de MEC et de GAGs ainsi que la concentration cellulaire et la présence de vaisseaux sanguins (sinusoïdes, artérioles) forme l'architecture de l'environnement et induisent des forces physiques : i) les cellules dans les vaisseaux et à leur contact sont soumises aux forces de cisaillement du flux sanguin, ii) les cellules dans le tissu à des forces de compression et d'étirement dues au confinement dans un environnement fortement concentré en cellules variées, iii) enfin, dans l'ensemble du tissu, les cellules sont soumises à la rigidité de l'environnement, celle-ci étant très forte au contact de l'os et beaucoup moins importante dans le tissu jusqu'à devenir quasiment nulle dans le flux sanguin. L'ensemble de ces forces agissent sur la morphologie cellulaire, avec des conséquences sur la prolifération, la migration et la différenciation (Abercrombie and Heaysman, 1954; Caiazzo et al., 2016; Charras and Sahai, 2014).

1.3.1 Le confinement

Quel que soit le tissu, le confinement (le fait d'être dans un espace restreint dans les 3 dimensions) est le résultat d'une part de l'architecture de l'environnement local de la cellule et d'autre part de la concentration cellulaire. La cellule confinée adapte sa morphologie aux pressions de l'environnement qu'elle subit sur sa surface (Liu et al., 2015). Elle ne peut s'étendre ou faire des protrusions et aura tendance soit à migrer (Jacobelli et al., 2010; Petrie and Yamada, 2016), soit à s'ancrer dans l'environnement et à se polariser en synthétisant des protéines de matrice et des cytokines, ce qui participe à la modification de l'architecture de son environnement local et de manière autocrine agit sur sa propre maturation (Cukierman et al., 2001; Doyle and Yamada, 2015). Au sein de l'environnement médullaire, l'impact du confinement sur la structure du tissu est observable après un traitement myélosuppresseur. Il a été observé que lors de la régénération du tissu, la moelle étant décellularisée, les vaisseaux soumis à des pressions moindres de la part de l'environnement cellulaire s'élargissent ce qui modifie également la vitesse du flux sanguin. La taille des MKs est elle aussi

augmentée sans qu'il ait été montré un lien direct entre la taille des MKs et la densité cellulaire. Avec l'augmentation de la concentration cellulaire, les vaisseaux à nouveau comprimés retrouvent leur volume et la microcirculation son flux normal (Radley and Scurfield, 1979; Weiss, 1961).

1.3.2 La rigidité

Chaque élément de l'environnement a sa propre rigidité et induit des contraintes sur les cellules qui l'entourent. Les cellules adjacentes ont la capacité de ressentir ces contraintes et de s'y adapter (Ghassemi et al., 2012) : i) morphologiquement en modulant leur cytosquelette (Bellas and Chen, 2014; Heisenberg and Bellaïche, 2013), ii) en migrant, c'est le phénomène appelé durotaxisme : les cellules migrent vers une surface plus rigide (Plotnikov et al., 2012), iii) ou en se différenciant, les cellules souches peuvent orienter leur différenciation vers des lignages très différents suivant la rigidité du milieu (Engler et al., 2006).

1.3.3 Les forces hémodynamiques

Les forces hémodynamiques du flux sanguin sont importantes dans la fonction plaquettaire notamment en modifiant la structure des protéines d'adhésion comme celle du vWF facilitant l'adhésion plaquettaire (Ruggeri et al., 2006). Le flux est aussi responsable de l'orientation des cellules endothéliales. L'utilisation de chambre de flux a en effet montré que le flux induit l'alignement des cellules liées par des jonctions serrées et, au niveau intracellulaire, l'alignement de leur cytosquelette dans la direction du flux (Galbraith et al., 1998; Kutys and Chen, 2016; Malek and Izumo, 1996). *In vitro*, la culture de MKs en chambre de flux accélère la libération des proplaquettes (Blin et al., 2016; Dunois-Lardé et al., 2009; Nakagawa et al., 2013). Les processus en œuvre font intervenir le cytosquelette, notamment celui de microtubules. Il a été montré que le flux modifie la vitesse d'extension des proplaquettes en modifiant la dynamique des microtubules, notamment en réduisant le nombre de phases de pauses. Cela pourrait être dû à une mobilisation accrue de dynéines en présence du flux qui facilitent le glissement des microtubules, responsables de l'élongation (Bender et al., 2015a). Le rôle du flux dans la libération des plaquettes a conduit à la mise au point de différents bioréacteurs en vue d'améliorer la libération des plaquettes *in vitro* (Karagiannis and Eto, 2015).

2 Rigidité et mesures

Lors de ma thèse je me suis focalisée sur l'impact du confinement cellulaire sur la maturation du MK. Le confinement induit non seulement des forces externes sur la cellule mais également une certaine rigidité au tissu.

2.1 Principe

En physique, la rigidité est la capacité d'un système à résister à la déformation. L'application d'une contrainte (ou stress) sur un objet entraîne son élongation ou sa compression, l'objet se déforme. En réalité, les molécules qui le composent changent momentanément de position et lorsque la contrainte ne s'applique plus, elles reprennent leur place et l'objet son aspect d'origine (Lamé, 1866). Cette capacité à résister à la déformation et à revenir à l'état initial est appelée élasticité, et la grandeur qui caractérise cette contrainte interne opposée à la déformation est le module de Young : $E = \sigma/\epsilon$ (force en fonction de la surface/allongement relatif) (Guthold et al., 2007; Leckie and Bello, 2009). Ce comportement purement élastique est spécifique des solides. Les solides sont des corps moléculaires dont les molécules occupent des espaces égaux et dont les distances mutuelles entre les molécules sont constantes en absence de forces extérieures (Lamé, 1866). A l'opposé, les liquides dont la cohésion entre les molécules est faible ne présentent pas d'élasticité, mais sont caractérisés par une dissipation d'énergie lors d'un écoulement. Lorsqu'un fluide s'écoule, son mouvement peut être décrit par un glissement entre les différentes couches de celui-ci. Ce glissement génère des forces de cisaillement qui se traduisent par un coefficient de transport appelé viscosité. Cette grandeur exprime la capacité du fluide à résister à l'écoulement (Barnes et al., 1989). De façon générale, il existe des objets qui se comportent à la fois comme des solides élastiques et des liquides visqueux, on dit qu'ils ont des propriétés viscoélastiques. Les propriétés viscoélastiques s'appliquent notamment aux solutions de polymères comme les gels utilisés lors de culture en 3D dont les propriétés viscoélastiques évoluent au cours du temps (Malkin et al., 2006). La moelle étant un tissu mou, elle a des caractéristiques biophysiques proches des gels et des liquides viscoélastiques. Etant également lâche et facilement dissociable, il est difficile de mesurer précisément la rigidité de ce tissu. Les rares données disponibles résultent de mesures obtenues par la technique de microscopie à force atomique ou AFM. Ces mesures définissent la moelle comme le tissu le plus mou de l'organisme, avec un module de Young E estimé inférieur à 300 Pa (Ivanovska et al., 2015).

2.2 Mesures

Il existe différents moyens de mesurer la rigidité selon le type de matériau. Certaines techniques

s'appliquent plus facilement aux tissus car elles permettent de maintenir leur intégrité comme la technique de microscopie à force atomique et d'autres permettent une connaissance plus approfondie des caractéristiques physiques du matériau étudié, comme l'étude des propriétés rhéologiques des hydrogels utilisés en culture.

2.2.1 La microscopie à force atomique

La technique d'AFM permet de topographier un échantillon (Baró and Reifenger, 2012; Ivanovska et al., 2015). C'est une technique qui permet d'estimer la rigidité d'une surface d'échantillons de petite taille et de très faible rigidité qui ont tendance à se dégrader par manque de structure lorsque l'on veut déterminer leur rigidité *via* une autre méthode, telle que la rigidité de la moelle osseuse (Shin et al., 2013a). La microscopie à force atomique (AFM) est une technique née au début des années 1980 (1982 Binning et Rohrer). Contrairement au microscope optique, la microscopie AFM permet de reconstruire une image à partir d'une sonde appelée « tip » qui mesure la rigidité de la surface. Le tip qui entre en contact avec la surface est une pointe dont la taille avoisine les 10 nm, fixée sur l'extrémité libre d'un cantilever. Les mouvements du cantilever sont détectés et amplifiés par l'utilisation d'un laser et les variations de positions sont transmises et analysées par ordinateur (Figure 10).

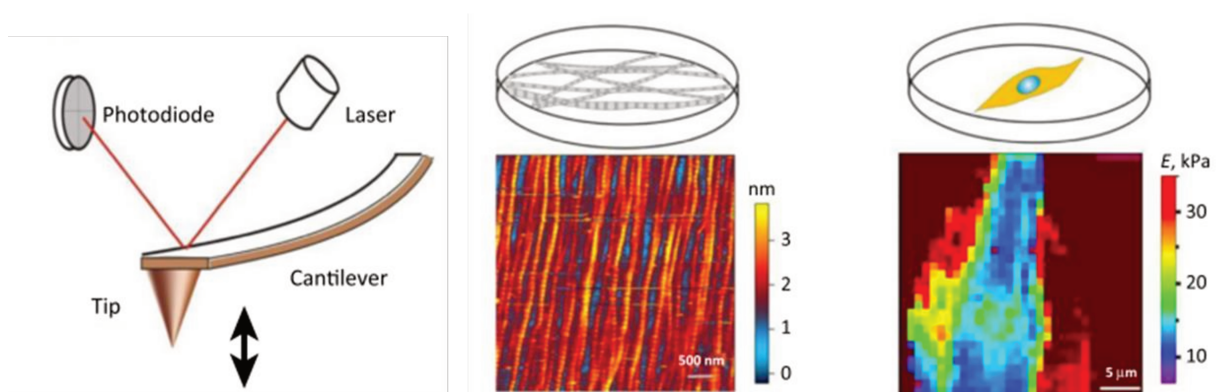


Figure 10 : La microscopie à force atomique, méthode et réponse

Le microscope est composé d'un bras mobile appelé cantilever sur lequel se trouve une pointe ou tip qui balaye l'échantillon. Lors du balayage la pointe va monter ou descendre suivant la topographie de l'échantillon (image du centre représentant la topographie de fibres de collagène) et suivant son élasticité (image de droite montrant l'élasticité d'une cellule mise en culture sur un film de collagène). Cette technique permet donc d'obtenir deux types d'information : la topographie et une carte d'élasticité de l'échantillon. (Figure tirée de la revue d'Ivanovska et al 2015 (copyright 2015 Elsevier Ltd).

2.2.2 La rhéologie

La rhéologie est considérée comme une science depuis les années 1930. Elle s'intéresse à la

réponse de matériaux soumis à des déformations élastiques ou à un écoulement. Cette réponse peut être de type élastique, de type visqueux ou les deux c'est-à-dire de type viscoélastique. Cette réponse dépend également de nombreux paramètres : amplitude de la déformation qui peut conduire à un changement de forme et d'état (liquide et solide), effet de la température ou du temps (les métaux, la peinture, l'asphalte...)(Barnes et al., 1989). Cette science démontre que les notions de « liquide » et de « solide », définies par les lois de Newton-Stokes (liquides) et Hooke (solides) (années 1680), ne sont pas suffisantes pour caractériser un objet car il peut posséder à la fois un comportement élastique et visqueux (Barnes et al., 1989; Malkin et al., 2006).

Aujourd'hui, les propriétés visqueuses des gels naturels et des polymères constituant les nouveaux milieux de culture cellulaire en 3D sont caractérisés à l'aide de dispositifs de rhéologie. Ces dispositifs de type rhéomètres à contrainte ou à déformation imposée fonctionnant en mode dynamique permettent de suivre l'évolution du module de cisaillement complexe de ces systèmes dans des conditions de pression, de température et de temps proches de celles appliquées en culture. Le rhéomètre à contrainte imposée équipée d'une cellule de mesure de type cône plan est utilisé pour étudier les liquides viscoélastiques. La fréquence d'oscillation ω du cône est comprise entre 10^{-3} à 10^3 s^{-1} . En mode dynamique, cet appareil permet de déterminer la partie réelle G' et la partie imaginaire

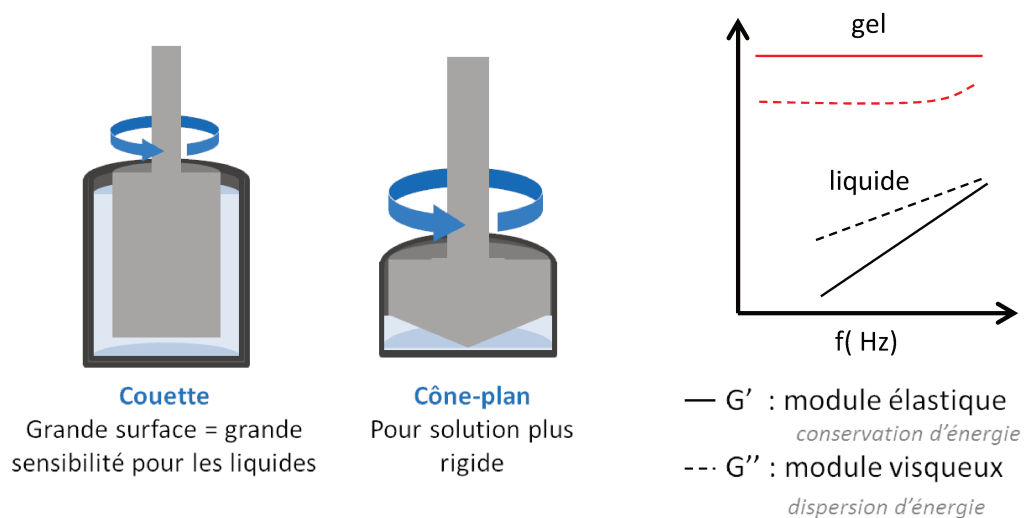


Figure 11 : Rhéologie, méthode et réponse

Cellule de Couette et cellule cône-plan (gauche). L'échantillon placé dans la chambre est cisailé par le cône qui va osciller à une fréquence donnée modulable (f) induisant des forces de cisaillement. L'appareil décompose la réponse (le module de cisaillement G^*) de l'objet en deux composantes G' et G'' , dont l'équation est $G^* = G' + iG''$. Lorsque G' est supérieure à G'' , le comportement est dominé par la composante solide du matériau. Lorsque G'' est supérieure à G' le comportement est dominé par le caractère visqueux de l'échantillon. (schéma modifié d'après Fabien Pertuy (UMR_S949, EFS-Grand Est))

G'' du module de cisaillement complexe G^* de l'échantillon, en accord avec l'équation suivante : $G^* = G' + iG''$ (Figure 11)(Barnes et al., 1989). Le module de Young peut être estimé à partir du module de cisaillement suivant le rapport : $E = 2(1+\nu)G$; ν étant le ratio de Poisson (contraction de la matière perpendiculairement à l'orientation de la force. Dans le cas des matériaux homogènes et isotropes, le coefficient de Poisson est estimé à 0,5).

3 La mécanobiologie

La mécanobiologie est l'étude du comportement d'une cellule face aux différents stimuli mécaniques de son environnement dont la rigidité et les contraintes physiques associées. La capacité d'une cellule à ressentir une modification physique de son environnement et à transmettre le signal au noyau est appelée mécanotransduction (Figure 12). Cette réponse cellulaire se fait en trois temps : i) la mécanoréception du signal environnemental par les mécanorécepteurs de la membrane plasmique (Gasparski and Beningo, 2015; Martinac, 2014), ii) la transmission au noyau *via* le cytosquelette et/ou l'activation de voies de mécanotransduction (Fedorchak et al., 2014; Huang et al., 2012), et iii) l'adaptation cellulaire. Cette réponse varie en fonction de la nature et de la force de la stimulation. Elle peut soit conduire à une modification de la morphologie de la cellule, soit à une modification du programme transcriptionnel favorisant ou inhibant certaines fonctions cellulaires (Mammoto et al., 2012; Neidlinger-Wilke et al., 2001).

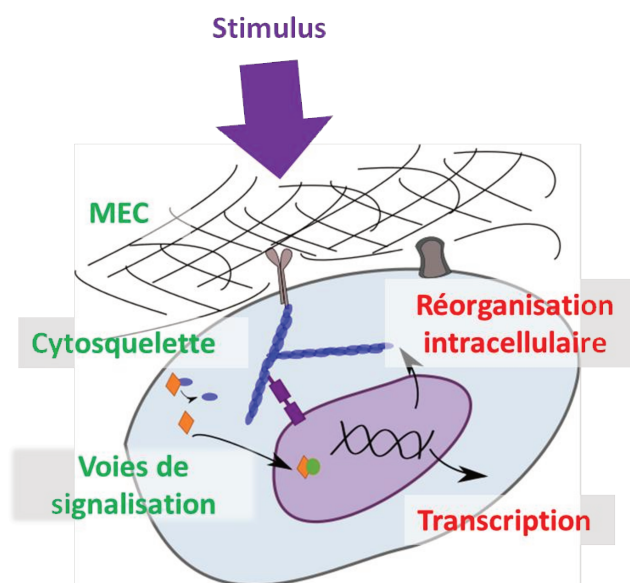


Figure 12 : Schéma global de la mécanotransduction

Lors d'un stimulus externe la cellule « sent » les modifications de son environnement par ses récepteurs membranaires. L'information mécanique est transmise au noyau directement *via* le cytosquelette (actine, microtubules) ou par l'intermédiaire de récepteurs membranaires formant des complexes protéiques sous membranaires liés au cytosquelette d'actine ou encore *via* l'activation de voies de signalisation. La stimulation nucléaire induit des modifications dans le programme transcriptionnel pour répondre au stress notamment en modifiant la tension intracellulaire et la croissance cellulaire.

3.1 Stimuli et mécanoréception

Dans l'environnement d'une cellule, il existe différents stimuli : « statiques » dépendant de la nature du substrat comme : ses propriétés adhésives, sa rigidité et sa résistance à l'étirement, et « dynamiques » dont l'origine est un mouvement du système dans lequel se trouve la cellule, par exemple la présence d'un flux, l'étirement/la contraction du substrat ou encore les modifications dans les trois dimensions de leur environnement comme dans le cas du confinement (Giulitti et al., 2016)(Figure 13). Ces stimuli font intervenir différents mécanorécepteurs et différentes réponses cellulaires en fonction de l'intensité de la stimulation, sa durée et sa fréquence (Cui et al., 2015). Bien que les mécanorécepteurs soient encore peu caractérisés contrairement aux chimiorécepteurs, un certain nombre de candidats ont été proposés. Le premier mécanorécepteur à avoir été identifié est un canal ionique (stretch activated channel) (Guharay and Sachs, 1984). Ancré au sein de la membrane, il change de conformation suivant l'état d'étirement ou de compression de celle-ci, cette propriété fait de lui l'un des meilleurs représentants du mécanorécepteur (Bukoreshtliev et al., 2013; Guharay and Sachs, 1984).

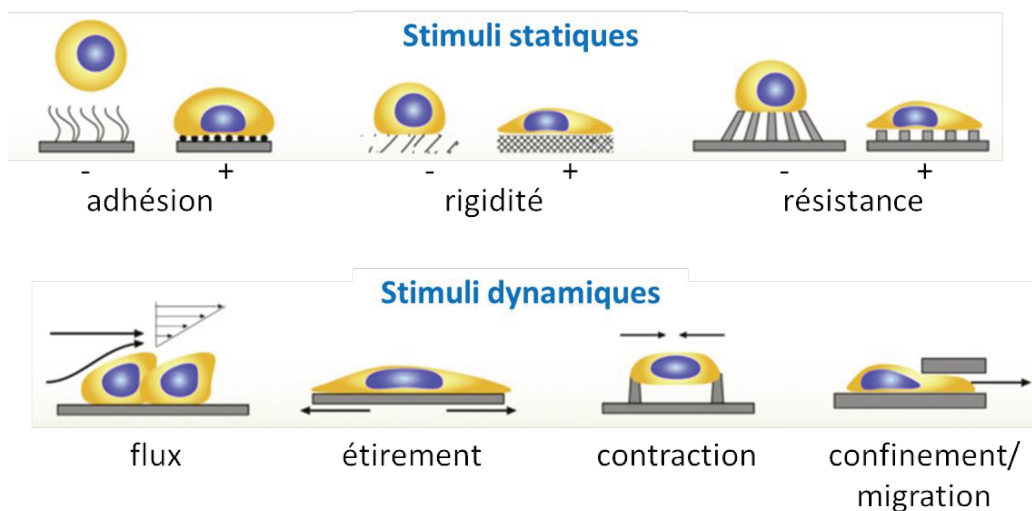


Figure 13 : Les différents stimuli de la mécanotransduction

Il existe deux groupes de stimuli, les stimuli statiques dépendants de la composition du substrat et les stimuli dynamiques à l'origine d'une déformation de la cellule. (schéma Giulitti et al., 2016 ; copyright 2016 Elsevier Ltd.)

Actuellement les mécanorécepteurs les plus étudiés sont les intégrines. Ce sont des récepteurs hétérodimériques composés d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta comportant chacune un domaine transmembranaire. Chez l'Homme, les 24 combinaisons obtenues à partir des 18 sous-unités alpha et des 8 sous-unités beta permettent de reconnaître un grand nombre de protéines de la matrice extracellulaire (Humphries et al., 2006). Les MKs et les plaquettes possèdent uniquement les sous-unités beta 1 et 3 et les sous-unités alpha 2, 4, 5, 6, V, IIb (Berthier et al., 1998; Burkhart et al., 2012).

Au niveau intracellulaire, les intégrines sont liées aux protéines d'adhésion focale dont certaines ont des propriétés mécanosensibles (Humphries et al., 2006). Lorsqu'une force est appliquée sur la membrane plasmique d'une cellule au niveau d'une adhésion focale, la taline liée à l'intégrine s'étire dans le sens de la force, ce qui déroule la structure et dévoile les sites de liaison à la vinculine qui peut alors s'y lier (Hirata et al., 2015; Del Rio et al., 2009). L'interaction taline-vinculine est un véritable mécanosenseur, il a été montré que la force appliquée au niveau d'une adhésion focale augmente le nombre de vinculines liées à l'adhésion focale certainement suite à l'étirement plus important de la taline et à l'exposition d'un plus grand nombre de sites de liaison (Galbraith et al., 2002; Del Rio et al., 2009). Il existe un deuxième mécanosenseur lié directement à l'intégrine, la protéine p130Cas. Cette protéine est étirée lorsque l'intégrine change de conformation et s'active. Cet étirement entraîne la révélation de sites de phosphorylation pour les kinases de la famille Src (Lee-Thedieck and Spatz, 2014).

Les deuxièmes mécanorécepteurs les plus étudiés sont les cadhérines. De par leur localisation au niveau des jonctions cellulaires, elles jouent un rôle important dans la mécanobiologie des tissus jointifs. Les cellules jointives possèdent d'importants complexes protéiques qui permettent de lier les cellules en induisant des forces de contraction qui vont modifier l'organisation intracellulaire de la cellule, notamment *via* l'alignement du cytosquelette. Ces modifications et la transmission de forces de contraction d'une cellule à l'autre permettent d'avoir un tissu jointif et rigide capable de résister aux pressions environnementales mais également de réguler la croissance de ce tissu (Charbonney et al., 2011; Huveneers and de Rooij, 2013; Mammoto et al., 2013). Les cadhérines sont liées au cytosquelette d'actine *via* la p120caténine, l' α et la β caténine et des protéines liées à l'actine comme la vinculine citée précédemment. Le rôle mécanosenseur des cadhérines est dû à une interaction similaire à l'interaction taline-vinculine des intégrines. Dans le complexe des cadhérines c'est l'interaction α -caténine-vinculine qui est responsable de la sensation des forces environnantes. L' α -caténine comme la taline s'étire sous l'effet des forces appliquées sur la membrane et découvre des sites de liaison à la vinculine, la liaison de celle-ci permettant de recruter le cytosquelette d'actine (Huveneers and de Rooij, 2013).

D'autres récepteurs sont moins connus et moins étudiés pour leurs fonctions mécanoréceptrices comme les récepteurs couplés à une protéine G (RCPG) et les récepteurs tyrosines kinases (Ghosh et al., 2013). Les RCPG sont connus pour s'activer suite à la liaison de leur ligand mais il a été montré qu'un étirement de la membrane peut activer certains RCPG sans la liaison du ligand (Zou et al., 2004). Récemment, il a été montré que le complexe GPIB-V-IX des plaquettes pourrait être un mécanorécepteur. La sous-unité GPIB- α posséderait un domaine mécanosensible qui, après la liaison du facteur willebrand sur le récepteur, changerait de conformation en fonction des forces de

cisaillement exercées par le flux induisant l'activation d'une signalisation intracellulaire favorisant la clairance des plaquettes (Deng et al., 2016).

3.2 Le rôle du cytosquelette dans la mécanotransduction

Le cytosquelette est l'acteur principal de la mécanotransduction. Il fait le lien entre la membrane et le noyau. Il participe aussi bien à la réponse cellulaire en modifiant la morphologie de la cellule suivant le stress subit (réponse rapide, quelques secondes), qu'à la transduction du signal menant à la modification du programme transcriptionnel de la cellule (réponse à long terme, plusieurs minutes à quelques heures pour la différenciation cellulaire)(Khalilgharibi et al., 2016).

3.2.1 Les différents types de cytosquelette

Le cytosquelette est composé de 3 types de filaments (Figure 14), de tailles et rigidités différentes qui forment un réseau de fibres dynamiques en constante polymérisation et dépolymérisation au sein de la cellule : i) les microtubules de tubulines sont les plus longs (quelques mm), les plus rigides et les moins compressibles (Fletcher and Mullins, 2010; Jansen et al., 2015). Ils participent majoritairement à la division cellulaire et aux transports des organelles (Bausch and Kroy, 2006). Leur rôle dans la mécanotransduction est mal connu, mais il est néanmoins possible qu'en synergie avec le cytosquelette d'actine et les filaments intermédiaires, les microtubules de par leur rigidité participent à la stabilité de la morphologie cellulaire (Brangwynne et al., 2006) ; ii) les filaments d'actine (jusqu'à 10 μm de longueur (Jansen et al., 2015; Tourte, 2003)), le plus souvent liés à la myosine, et iii) les filaments intermédiaires (0,5 μm de longueur (Jansen et al., 2015)), sont responsables du caractère viscoélastique de la cellule et principalement responsables de la

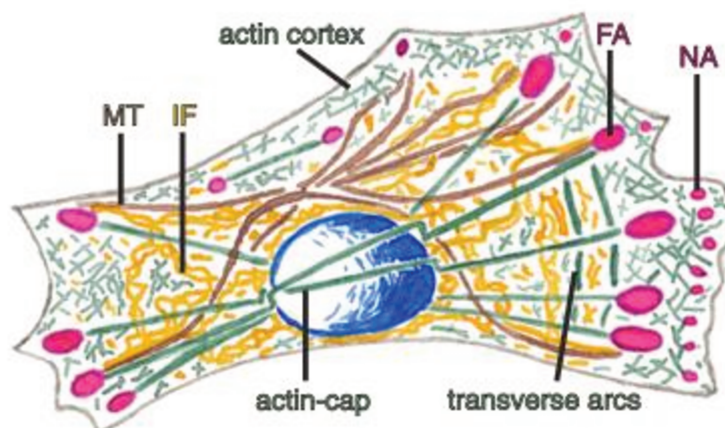


Figure 14 : Le cytosquelette

Schéma de l'organisation du cytosquelette d'une cellule adhérente. En brun les microtubules (MT), en vert l'actine, en jaune les filaments intermédiaires (IF), en rose les adhésions focales (FA) liées aux fibres de stress d'actine et les « nouvelles » adhésions (NA). (dessin tiré de la revue de Jansen et al 2015 (Copyright 2015, Elsevier))

morphologie, migration et adaptation cellulaire (Bausch and Kroy, 2006; Fletcher and Mullins, 2010; Wang and Stamenović, 2000).

3.2.2 Le cytosquelette d'actine

L'actine est l'élément majoritaire du cytosquelette. Elle est présente dans tout le cytoplasme et certaines structures spécifiques : i) de longues fibres d'actine rectilignes dites fibres de stress, composées de microfilaments d'actine antiparallèles liés à la myosine II, ce qui leur confère un rôle contractile. Elles sont divisées en quatre catégories : les fibres dorsales, ventrales, les arcs transverses et les fibres périnucléaires (Figure 14)(Jansen et al., 2015; Tojkander et al., 2012). Elles participent à l'adhésion cellulaire, la migration, ou encore la mécanotransduction; ii) des microfilaments servant de soutien membranaire dans l'ensemble de la cellule, formant un réseau appelé actine corticale (Morone et al., 2006); iii) des réseaux d'actine orthogonaux et branchés, formant notamment des protrusions membranaires larges et fines appelées lamellipodes, iv) l'actine participe également à la formation des points d'ancrage à la matrice extracellulaire formés de filaments parallèles locaux, ainsi qu'aux adhésions focales et aux podosomes (Small, 1988; Stricker et al., 2010; Tojkander et al., 2012). Ces structures jouent un rôle dans le changement de forme de la cellule, l'exploration de l'environnement, l'adhésion cellulaire et la migration.

Le cytosquelette d'actine a un rôle dans la mécanotransduction par sa présence dans les structures mécanosensibles de la cellule (Olson and Nordheim, 2010). L'interaction du cytosquelette d'actine avec les mécanorécepteurs et les différents mécanosenseurs cellulaires comme la taline et la vinculine en font une structure facilitant la propagation du message vers le noyau (Hirata et al., 2015; Huveneers and de Rooij, 2013). L'interaction actine-adhésion focale permet notamment à la cellule de ressentir la rigidité de la matrice extracellulaire et de transmettre le signal au noyau *via* les interactions du cytosquelette d'actine avec les protéines de la paroi nucléaire à travers le complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton). L'interaction directe cytosquelette-complexe LINC, permet de déplacer le noyau dans la cellule en cours de migration, ou encore de réguler l'expression génique de par son interaction avec la chromatine (*via* les lamines) (Lombardi and Lammerding, 2011; Lombardi et al., 2011) (voir ci-après). Enfin l'actine participe également à la mécanotransduction de la cellule en interagissant avec des facteurs de transcription dans le cytoplasme cellulaire. Le facteur MKL1 est ainsi séquestré dans le cytoplasme de la cellule par les monomères d'actine. L'augmentation de la rigidité du milieu extérieur entraîne le recrutement des monomères d'actine pour favoriser la polymérisation des filaments afin de permettre à la cellule d'adapter sa tension intracellulaire à la rigidité extracellulaire. La polymérisation de l'actine favorise ainsi la libération du facteur de transcription

MKL1 qui peut alors se relocaliser dans le noyau pour activer l'expression d'un certain nombre de gènes du cytosquelette (Huang et al., 2012; Smith et al., 2013). L'actine participe également à la réponse cellulaire au stress mécanique *via* les propriétés contractiles que lui donne son interaction avec des protéines motrices comme la myosine (Even-Ram et al., 2007).

3.2.3 La myosine

Les myosines sont des moteurs moléculaires assemblés sous forme de filaments bipolaires avec plusieurs têtes de chaque côté (entre 10 et 30 suivant le type de myosine) permettant l'attachement et le détachement rapide au filament d'actine *via* leur activité ATPasique. L'activité contractile de la myosine est régulée par la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Cette phosphorylation est essentielle pour le dépliement de la myosine et son activation, l'attachement à l'actine et la contraction du filament. Ce mouvement de liaison et de détachement génère un déplacement du filament d'actine qui génère une contraction (Hiraiwa and Salbreux, 2016; Maciver, 1996; Salbreux et al., 2012). Il existe 38 myosines différentes, certaines sont retrouvées exclusivement dans les cellules musculaires et d'autres, les myosines non musculaires, dans toutes les cellules (Greenberg et al., 2016).

La myosine non musculaire la plus étudiée dans les mécanismes mécanobiologiques est la myosine II. Elle est impliquée dans tous les mécanismes contractiles de la cellule (notamment la migration (Doyle et al., 2012; Even-Ram et al., 2007), l'adhésion (Vicente-Manzanares et al., 2011), la cytokinèse (Maciver, 1996)) et joue un rôle clé dans l'adaptation de la cellule aux forces mécaniques extracellulaires. De manière générale, les myosines ont une force de liaison à l'actine qui leur est propre. Il a été observé que les myosines ont un rôle mécanosenseur. Les myosines soumises à des forces croissantes sont capables de s'adapter en recrutant d'autres molécules de myosine pour résister, jusqu'à un certain point après lequel la force appliquée est trop forte et la myosine se détache (Fouchard et al., 2011; Greenberg et al., 2016). Cette capacité de la myosine à contrer la force de l'environnement est nécessaire au maintien de la morphologie cellulaire *in situ* comme le montre l'étude du phénotype des souris déficientes pour la myosine IIA. Les MKs de ces souris présentent une morphologie anormale sous la pression des cellules environnantes alors que les MKs de souris témoins avec une myosine capable de contracter l'actine résistent aux contraintes locales et maintiennent une morphologie sphérique (Eckly et al., 2009).

3.2.4 Les filaments intermédiaires

3.2.4.1 Cytoplasmiques

Les filaments intermédiaires peuvent résister à un étirement de 300% de leur longueur, ils sont donc moins rigides et plus flexibles que les filaments d'actine et les microtubules (Fletcher and Mullins, 2010; Goldman et al., 2008). Comme le cytosquelette d'actine, ils peuvent lier directement la membrane plasmique au noyau. Cette liaison directe permet, en cas de contrainte exercée sur la membrane, la transduction du signal directement vers le compartiment nucléaire. Ce n'est pas leur seul rôle, la répartition de ces filaments permet également l'ancrage des organelles dans le cytoplasme (Goldman et al., 2008). Au niveau hématopoïétique, la cellule souche et certains progéniteurs présentent un cytosquelette de vimentine cytoplasmique. Toutefois, la vimentine est de moins en moins exprimée au cours de la différenciation mégacaryocytaire jusqu'à disparaître des MKs (Dellagi et al., 1983). Les seuls filaments intermédiaires exprimés par les MKs sont les filaments intermédiaires nucléaires appartenant à la famille des lamines.

3.2.4.2 Nucléaires

Il existe un seul type de filaments intermédiaires nucléaires : les lamines (A, C, B1 et B2). Les lamines forment un réseau sous la membrane nucléaire et sont responsables de la stabilité (De vos et al., 2011) et de la rigidité du noyau, rigidité qui est corrélée avec celle de l'environnement (Lammerding et al., 2006; Pajerowski et al., 2007). En effet, les cellules issues de tissus rigides expriment plus de lamines que les cellules issues de tissus mous (Swift et al., 2013). Les lamines jouent un rôle essentiel dans la morphologie du noyau et régulent également sa rigidité (Lammerding et al., 2006). Elles forment des réseaux séparés mais interconnectés, les lamines B sont peu mobiles et donnent une structure rigide au noyau (Shimi et al., 2008). Les lamines A/C forment des interactions moins fortes et un réseau plus mobile. Ce réseau est responsable des variations de rigidité du noyau, les variations d'expression de la lamine facilitant la déformation du noyau et le phénomène de migration cellulaire (Harada et al., 2014). Mais le rôle de ces filaments n'est pas uniquement structural, il a été montré que les réseaux de lamines A et B régulent différemment la transcription des gènes. Il semblerait que la lamine B en formant une structure solide et fixe permette la transcription de régions pauvres en gènes (hétérochromatine) alors que le réseau de lamines A/C serait plutôt en interaction avec des régions riches en gènes (euchromatine). On peut imaginer que les interactions entre les réseaux de lamines B et A/C ne contrôlent pas uniquement la structure du noyau mais également l'expression génique (Shimi et al., 2008).

Dans la lignée mégacaryocytaire, les lamines A et B s'accumulent au cours des endomitoses avec une expression plus importante de la lamine A que de la lamine B, le MK mature ayant un ratio A/B de 1,8. Un rôle des lamines sur la ploïdie a été montré en culture, la surexpression des lamines A induit une augmentation de nombre de MKs de ploïdie supérieure à 16N alors que la surexpression de la lamine B induit une diminution de la proportion de cellules supérieure à 4N. (Shin et al., 2013b; Swift et al., 2013).

3.2.5 Le complexe LINC, lien physique entre cytosquelette cytoplasmique et nucléoplasmique

L'enveloppe nucléaire est une vraie barrière. Elle est composée de deux membranes espacées d'environ 50 nm. Pour permettre le passage de molécules dans le noyau, des canaux aqueux traversent ces deux membranes formant les pores nucléaires. Le complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton, identifié en 2006) est la seule structure connue permettant au noyau de ressentir directement le stress induit à la cellule (Crisp et al., 2006) (Figure 15). Ce complexe est formé des protéines SUN enchâssées dans l'enveloppe nucléaire, et des nesprines (Nuclear Envelope Spectrin repeats) insérées dans la membrane externe du noyau. Le complexe LINC est lié du côté intranucléaire au réseau de lamines (Kaminski et al., 2014). Les lamines sont directement liées aux protéines SUN (SUN 1, 2 et 3)(Lombardi et al., 2011). Les SUN font la liaison entre les lamines intranucléaires et les protéines nesprines interagissant avec le cytosquelette (Lombardi and Lammerding, 2011). Lors d'une stimulation mécanique de la cellule, l'étirement ou la contraction du cytosquelette peuvent alors être transmis au noyau *via* le complexe LINC et modifier la conformation des lamines intranucléaires liées à la chromatine et ainsi favoriser ou inhiber l'expression génique (Arsenovic et al., 2016; Chambliss et al., 2013). Lorsque cette interaction est perturbée, la cellule présente non seulement des défauts dans sa morphologie (structure du noyau, et localisation dans le cytoplasme) mais également dans la polarisation et la migration cellulaire (Lombardi et al., 2011). L'une des hypothèses est que la transduction du signal mécanique de la membrane à l'actine, puis au complexe LINC entraîne des forces (contraction, étirement) sur les lamines qui vont se détacher de la membrane nucléaire et ainsi rendre accessible les régions de chromatine qui leur sont liées (Fedorchak et al., 2014). Les protéines nesprines 1 et 2 liées aux filaments d'actine sont notamment sensibles à la contraction de la myosine et permettent la transduction directe du signal mécanique de la membrane plasmique au noyau (Arsenovic et al., 2016; Chambliss et al., 2013). Elles sont également en interaction avec des moteurs moléculaires comme la dynéine et la kinésine elles-mêmes liées aux microtubules, cette interaction permet à la cellule de déplacer le noyau dans le cytoplasme (Alam et al., 2014; Lombardi and Lammerding, 2011). La protéine nesprine 3 est, elle, liée à la plectine et aux filaments intermédiaires

cytosoliques, qui contrôlent également la morphologie et la localisation du noyau dans la cellule *via* des interactions croisées avec le cytosquelette d'actomyosine (Almeida et al., 2015).

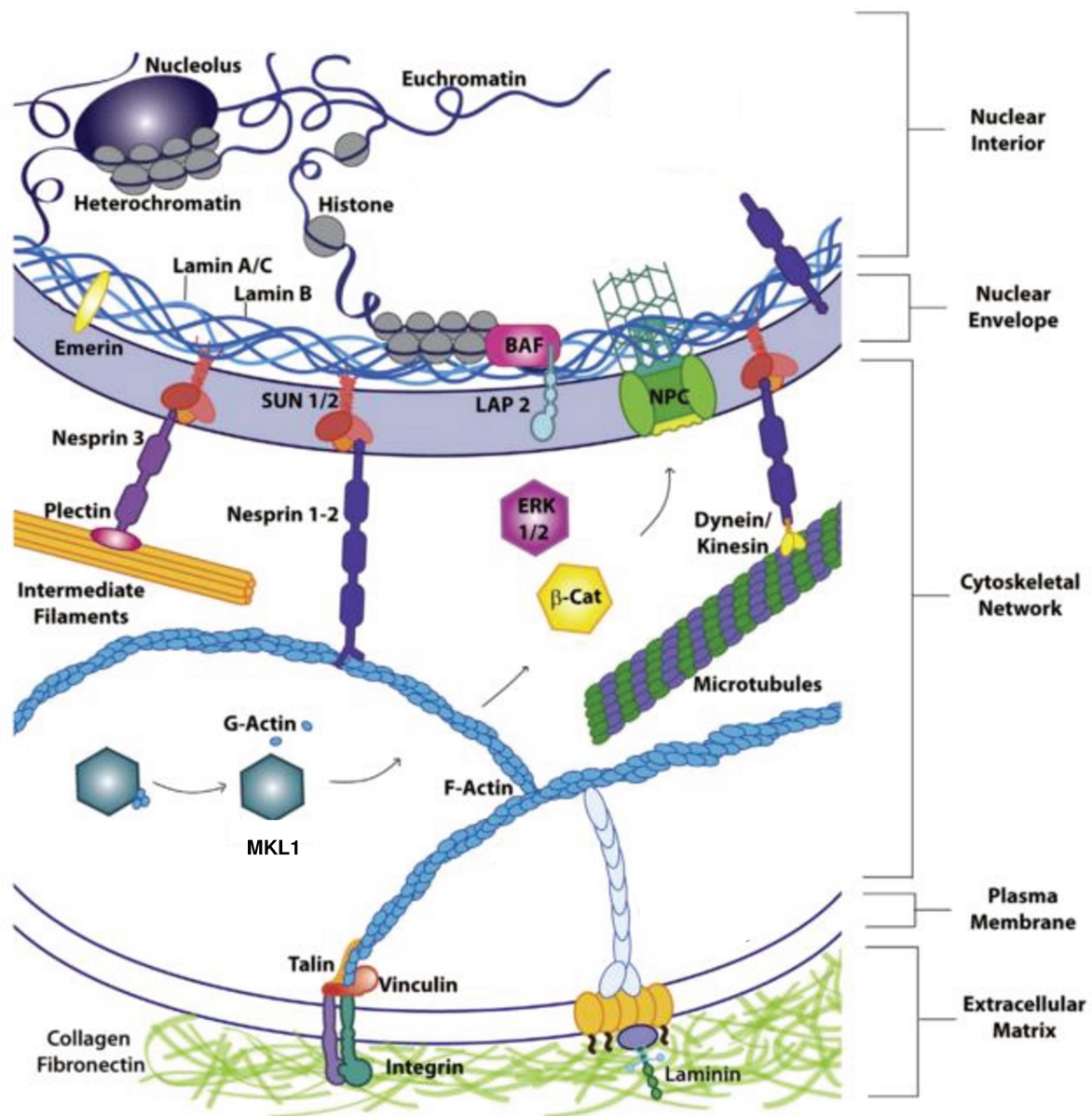


Figure 15 : Le complexe LINC et les voies de mécanotransduction

Représentation schématique de la membrane nucléaire avec les différents effecteurs protéiques et moléculaires de la mécanotransduction. (schéma modifié issu de la revue de Fedorchak et al, 2011 (Copyright 2014 Elsevier Ltd.))

La transduction du signal ne passe pas uniquement par une interaction directe entre le cytosquelette et le noyau, mais également par une interaction indirecte *via* l'activation de facteurs et cofacteurs de transcription impliqués dans la réponse aux stress mécaniques, qui vont migrer *via* les pores nucléaires dans le noyau (Fedorchak et al., 2014; Ho et al., 2013).

3.3 Les voies de mécanotransduction

Un certain nombre d'effecteurs de voies de signalisation (MAPK, Wnt, TGF- β) ont été montré comme jouant un rôle après une stimulation mécanique de la cellule, mais les mécanismes d'activation de ces voies et leur rôle propre dans la mécanotransduction ne sont pour l'instant pas bien renseignés. Actuellement seules les voies MKL1 et YAP/TAZ ont un rôle et un mécanisme relativement bien documenté en mécanobiologie.

3.3.1 La voie MKL1/SRF

Le facteur MKL1 (MegaKaryoblastic Leukemia factor 1 ou MRTFA ou MAL) est un cofacteur de transcription ubiquitaire retrouvé fortement exprimé dans le cœur, le foie, les poumons, les reins, les muscles, la rate et le cerveau (Scharenberg et al., 2010). Il joue également un rôle important dans la maturation des MKs, se manifestant par une augmentation de la ploïdisation et l'expression de certains marqueurs plaquettaires tels que la GPV et de facteurs de transcription spécifiques de la lignée mégacaryocytaire comme GATA1. Chez la souris déficiente pour MKL1, il a également été observé une diminution de la production de plaquettes (Cheng et al., 2009). MKL1 est un facteur cytosolique séquestré par les monomères d'actine (G-actin sur le schéma, Figure 15) via 3 domaines RPEL (Arginine-Proline-Acide glutamique-Leucine) situés en N-terminal du facteur (Miralles et al., 2003; Mizuguchi et al., 2014). De ce fait l'activité de MKL1 est fortement sensible à la dynamique de l'actine recrutée lors de stress mécaniques tels que, l'étirement, l'augmentation de la rigidité ou la contraction, entraînant la contraction du cytosquelette d'actine et sa polymérisation (Cui et al., 2015; Huang et al., 2012; Iyer et al., 2012). Lorsqu'il y a polymérisation de l'actine, la mobilisation des monomères d'actine entraîne la libération de MKL1 qui migre vers le noyau et se lie à son cofacteur SRF (Cheng et al., 2009; Miralles et al., 2003). Le facteur MKL1 dans le noyau active un grand nombre de gènes (environ 160 gènes), dont des gènes codant pour les protéines du cytosquelette (vinculine, actine, protéines liant l'actine...) mais également des gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration, la différenciation cellulaire, et dans le contrôle du cycle cellulaire (Lee et al., 2010; Pipes et al., 2006; Scharenberg et al., 2014).

MKL1 est l'un des facteurs les plus étudiés et les mieux connus de la mécanotransduction. De par sa relation avec l'actine on peut supposer que c'est l'une des premières voies activées. Zhao et collaborateurs en 2007 sont parmi les premiers à avoir montré une activation de MKL1 suite à un stimulus physique. Dans cette étude, l'application d'une force à la surface de myofibroblastes induit une inhibition de la GTPase RhoA, ainsi que le recrutement de l'actine monomérique induisant une augmentation constante de la translocation de MKL1 dans le noyau tout au long de la stimulation (Zhao

et al., 2007). D'autres stimulations ont montré une activation rapide de MKL1. Par exemple lorsque des fibroblastes sont mis en culture sur des surfaces présentant une topographie particulière comme des picots (pillars), ils s'étirent rapidement pour adhérer au substrat. En parallèle, la translocation de MKL1 dans le noyau se fait en moins de 2h alors que d'autres facteurs comme le facteur YAP (voir ci-après) migre vers le noyau plus tardivement (Cui et al., 2015). La rigidité influence également l'activation de MKL1. La culture de cellules fibroblastiques sur des surfaces de rigidités croissantes montre une translocation plus importante de MKL1 dans les cellules différenciées sur matrice rigide, et une expression plus importante de gènes impliqués dans la différenciation en cellules myofibroblastiques (α -SMA)(Huang et al., 2012). L'activation de MKL1 lors d'un stress mécanique n'a pas seulement un impact sur la cellule isolée mais également sur son environnement. Il a été montré que l'activation de MKL1 induit l'expression du gène de la ténascine C (protéine de la MEC)(Asparuhova et al., 2011). Cette surexpression est observable lors de la réparation tissulaire, processus entraînant des stimuli mécaniques mais également lors de la tumorigénèse. Le tissu tumoral étant plus rigide que le tissu sain, l'expression de protéines de MEC favorise la dissémination métastatique.

Pour l'instant le rôle de MKL1 dans la mécanobiologie des cellules hématopoïétiques n'a pas été étudié. On peut supposer que, au cours de l'hématopoïèse, la cellule souche, les progéniteurs puis le MK rencontrent différentes rigidités et contraintes. Au vu des expériences citées précédemment, nous avons émis l'hypothèse que ces éléments physiques puissent participer à l'activation de la voie MKL1 lors de la mégacaryopoïèse, ce que nous avons montré dans notre étude (Aguilar et al., 2016).

3.3.2 La signalisation YAP/TAZ

La voie de signalisation YAP/TAZ est la seconde voie la plus étudiée dans la mécanobiologie cellulaire. YAP (Yes-associated protein) et son orthologue TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) sont des coactivateurs de différents facteurs de transcription, notamment les facteurs de transcription à domaine TEAD (Transcriptional Enhancer factor Domain). YAP/TAZ sont des constituants de la voie Hippo, cascade d'activation de kinases impliquée dans la régulation du développement des organes (croissance cellulaire, prolifération, différenciation) en réponse à des stimuli mécaniques et aux contacts cellulaires (Mammoto et al., 2012; Morgan et al., 2013). Dans cette voie, l'accumulation de YAP/TAZ dans le noyau est régulée par deux kinases MST (ou MAP3K10 pour Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 10) et LATS (LArge Tumor Suppressor kinase)(Ivanovska et al., 2015)(voie Hippo). Ces kinases, en phosphorylant YAP et TAZ, participent à leur exclusion du noyau et leur rétention dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 où ils seront dirigés vers la voie de dégradation du protéasome (Moon et al., 2017).

YAP/TAZ sont régulés par la géométrie de la cellule mais également par la rigidité du substrat. En effet, la translocation de YAP/TAZ se fait préférentiellement dans les cellules qui peuvent s'étaler sur de grandes surfaces et sur des surfaces rigides (Aragona et al., 2013; Dupont et al., 2011; Halder et al., 2012). La culture sur surface rigide induit la formation de fibres de stress et l'étalement cellulaire, c'est pourquoi une hypothèse propose que l'actine puisse contrôler la régulation de la voie YAP/TAZ. L'ajout en culture de latrunculine A (inhibiteur de la polymérisation de l'actine) induit effectivement une diminution de moitié de la translocation de YAP/TAZ dans les cellules isolées mais pas dans les cellules formant un tapis dense. Il semblerait donc qu'il y ait deux voies de régulation de la voie YAP/TAZ, l'une dirigée par l'actine et l'autre par l'inhibition de contact cellulaire (voie Hippo), mais les mécanismes de ces voies de régulation restent pour l'instant peu connus (Das et al., 2016). Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent des interactions entre les différentes voies de mécanotransduction ce qui ajoute encore un degré de complexité supplémentaire (Charbonney et al., 2011; Speight et al., 2016). La voie Wnt et d'autres voies comme la voie TGF- β *via* son effecteur Smad3 ou la voie des MAP kinases influenceraient également la signalisation YAP/TAZ (Morgan et al., 2013). Cela montre bien la complexité et l'interdépendance des différentes voies de signalisation intracellulaire en réponse à la perception des forces mécaniques de l'environnement, indiquant ainsi l'importance pour la cellule d'être capable de ressentir les différentes modifications de son environnement et de pouvoir s'y adapter rapidement, donc le rôle majeur de l'environnement mécanique dans la biologie cellulaire.

4 Approches *in vitro* pour mimer l'environnement médullaire

La mécanobiologie contrôle en partie les grandes fonctions cellulaires (prolifération, différenciation, apoptose). En culture liquide classique, la part de la mécanobiologie dans le comportement cellulaire est moindre comparée à son influence *in situ*. C'est pourquoi aujourd'hui se développent de plus en plus de modèles de culture permettant l'étude de la cellule dans des conditions physiques mimant les propriétés de son environnement natif.

4.1 La dimensionnalité en culture

Les cellules *in situ* prolifèrent et se différencient dans des milieux (tissus) en 3D et cette notion de dimensionnalité joue un rôle important sur la morphologie de la cellule (par exemple sur l'organisation du cytosquelette) et ses fonctions (viabilité, différenciation) (Caliari et al., 2016; Choi and Harley, 2012). La cellule ensemencée en 2D sur une surface ne peut se déplacer qu'en x et y et aura tendance à s'étaler, particulièrement les cellules adhérentes, entraînant une polarisation non physiologique. Dans le cas des cellules non adhérentes, on ne peut exclure également un impact du contact de la cellule avec la surface sur sa morphologie (Figure 16). Ce changement de morphologie peut avoir des conséquences sur les fonctions cellulaires et aboutir à des observations artéfactuelles (Baker and Chen, 2012).

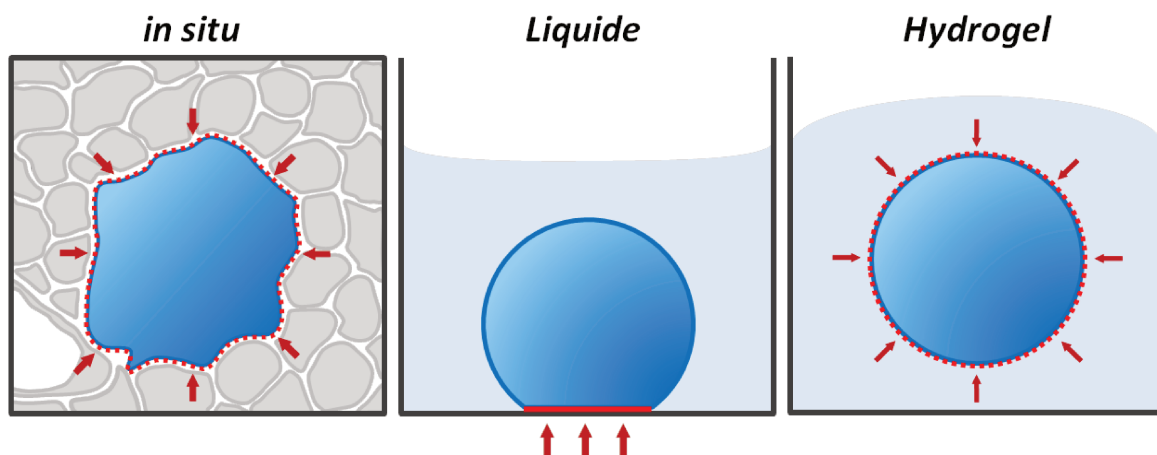


Figure 16 : La cellule dans ses différents environnements

Dans son environnement, la cellule *in situ* est entourée de différents types cellulaires qui exercent sur elle des contraintes physiques (gauche, flèches rouges). En milieu liquide, la cellule est isolée et sédimente en fond de puits ce qui peut induire une polarisation artificielle (centre). Dans l'hydrogel, la cellule est maintenue en suspension et supporte les contraintes physiques induites par la rigidité du gel (droite). (schéma : Fabien Pertuy (UMR_S949, EFS-Grand Est))

Le milieu en 3D ajoute une dimension de profondeur et peut, suivant la nature du milieu, permettre de confiner et de contraindre la cellule non seulement sur sa face « basale » mais sur toute

sa surface, sans polarisation. La cellule s'oriente et s'adapte à la topographie locale de son environnement à la manière d'une cellule dans son environnement natif (Doyle et al., 2015). Elle adopte un comportement bien plus complexe qu'en 2D, cette fois déterminé à la fois par la rigidité de l'environnement, sa composition (protéines de MEC ou environnement synthétique) et sa topologie (fibres ou gel, taille des pores, architecture)(Doyle and Yamada, 2015). La culture en 3D permet, en théorie, de recréer un environnement complexe, plus proche de l'environnement natif de la cellule et par la même occasion d'éliminer certains « artefacts » de culture. Il a été montré que la culture en 3D favorise la prolifération des cellules de type iPSC (induced Pluripotent Stem Cell), la formation de colonies et facilite les modifications du programme génétique (reprogramming)(Caiazzo et al., 2016). De même, la culture en 3D favorise une organisation de type tissulaire avec une spécialisation des cellules en fonction de leur localisation dans le tissu contrairement à la culture en 2D qui ne permet d'obtenir que des tapis de cellules indifférenciées. Ainsi, dans des hydrogels, il est possible de créer des structures tumorales appelées sphéroïdes (Asghar et al., 2015) mais également des tissus glandulaires complexes (Emerman and Pitelka, 1977) ou des organoïdes (Shamir and Ewald, 2014). La culture en 3D, en mimant le microenvironnement, met en évidence la complexité des mécanismes cellulaires *in situ*.

4.2 Les débuts de la culture en 3D

Les premières cultures en 3D ont été réalisées à l'aide de fibrine ou de plasma dilué (contenant de la fibrine) dans les années 1910, la fibrine formant un maillage sur lequel les cellules peuvent s'ancrer, proliférer et former un tissu (Baitsell, 1915; Harrison, 1914). Paul Weiss, dans les années 1950 a cultivé des fibroblastes dans des gels de plasma et dans les premiers gels de collagène et a émis l'hypothèse que la forme de la cellule est le résultat d'un comportement spécifique en réaction à son environnement (Weiss, 1959). Dans les années 1970 un certain nombre d'études ont critiqué la perte de différenciation tissulaire et la faible viabilité cellulaire en culture classique. Pour pallier à ces limites, les gels de collagène ont été développés, principalement des gels de collagène I car c'est un composant de la MEC de nombreux tissus dans lesquels il forme des fibres (Elsdale and Bard, 1972). Ces études ont montré que la rigidité et certainement les interactions cellules-collagène permettent : i) le maintien de la culture (3 semaines au lieu de 6 jours pour la culture d'hépatocytes)(Michalopoulos and Pitot, 1975), ii) une prolifération plus importante, avec dans certains cas une différenciation spécifique (tests clonogéniques)(Bradley and Metcalf, 1966), iii) différents types de morphologies (Elsdale and Bard, 1972) avec la mise en place de structures particulières uniquement visibles *in situ* (canalicules biliaires, structure glandulaire)(Emerman and Pitelka, 1977; Michalopoulos and Pitot, 1975), iv) les premières observations de contraction cellulaire (Bell et al., 1979). La culture en 3D est devenue au fil

du temps une alternative à la culture liquide pour étudier les grandes fonctions cellulaires. Depuis les années 1990, avec l'amélioration des techniques d'analyses de microscopie et la mise au point d'outils biotechnologiques, elle permet l'étude des interactions de la cellule avec son environnement ainsi que l'étude de la dynamique de la cellule : migration, durotaxisme, contraction/étirement de l'environnement et mécanotransduction.

4.3 Techniques et perspectives de la culture en 3D

La culture en 3D ne se limite pas à l'utilisation de gels (ou hydrogels). La régénération de tissus peut également se faire à l'aide de structure en 3D solides comme des structures d'hydroxyapatite (Scheufler et al., 2008) ou de polyuréthane (Jozaki et al., 2010). Une seconde technique relativement récente permet de créer des tissus morphologiquement très proches du tissu natif, c'est la bio-impression (bio-printing). Cette technique a été mise au point pour étudier la régénération et la formation des tissus ainsi que les interactions entre différents types cellulaires, mais aussi à plus long terme pour créer des greffons (Norotte et al., 2009). Une telle imprimante 3D utilise comme encre non pas une résine plastique mais des hydrogels encapsulant ou non des cellules. Il est possible d'alterner entre des couches avec cellules et sans (hydrogel ou matrice décellularisée), ou des couches de différents types cellulaires (Pati et al., 2014). L'impression crée une trame en 3D dans laquelle les cellules vont proliférer et se différencier en maintenant la forme imposée lors de l'impression.

4.4 La culture de cellules hématopoïétiques en 3D

Les premières cultures 3D de HSC datent de 1966 lors de la mise au point des tests clonogéniques (Bradley and Metcalf, 1966; Ichikawa et al., 1966). Ceux-ci ont été réalisés à l'aide de gels d'agar, mais la culture en agar génère des artéfacts, comme la présence de granules dans les cellules différenciées, c'est pourquoi l'agar a été remplacé par la méthylcellulose (Bradley and Metcalf, 1966; Chervenick and Boggs, 1970; Ichikawa et al., 1966; Johnson and Metcalf, 1977; Metcalf, 1970; Metcalf et al., 1979; Worton et al., 1969). En parallèle, d'autres types de tests clonogéniques ont été mis au point dans des gels de collagène car celui-ci est présent dans l'environnement naturel de la cellule et permet le maintien des cellules stromales (Lanotte et al., 1981). Les tests clonogéniques n'avaient pas pour but d'étudier l'impact de l'environnement 3D sur la différenciation mais d'isoler les cellules afin de compter les colonies et d'identifier les différents progéniteurs (obtenus après ajout de différentes cytokines). Entre 1989 et 2000, des premiers essais de cultures en 3D ont été réalisés dans le but d'améliorer la culture de HSC (Bagley et al., 1999; Banu et al., 2001; Li et al., 2001; Naughton and Naughton, 1989). La culture dans des structures solides et sur des réseaux de fibres a permis de mettre en évidence un rôle antagoniste de l'environnement 3D et de l'environnement chimique

(Bagley et al., 1999). La culture en 3D permet de diminuer significativement les concentrations de cytokines utilisées, mais également de maintenir les HSC et les différents progéniteurs hématopoïétiques (Banu et al., 2001; Li et al., 2001). Malgré ces résultats innovants la mise au point de système de culture de cellules hématopoïétiques en 3D a été peu explorée par la suite.

Ces dernières années, afin de mieux comprendre la mégacaryopoïèse et surtout la production de plaquettes, l'aspect tridimensionnel de l'environnement commence à être étudié, par exemple *via* l'utilisation d'hydrogels (pullulan-dextran, HA), ou de structures en soie formant des éponges et des tubes (Buduo et al., 2015; Demange et al., 2012; Pietrzyk-Nivau et al., 2015). Ces études montrent un rôle de la dimensionnalité sur la survie cellulaire, la différenciation et la production de plaquettes. Le travail de Di Buduo et collaborateurs présente la mise au point d'une structure en 3D avec deux rigidités différentes (mais largement supérieure à celle de la moelle (MPa)) et deux topographies différentes avec une éponge et un tube. Les progéniteurs se différencient en MKs dans la structure de type éponge, tandis que dans le tube des cellules endothéliales sont cultivées pour mimer le vaisseau. Cette partie est également perfusable avec du sang ou un substitut afin de faciliter la libération des plaquettes (Buduo et al., 2015) (Figure 17 A). Dans cette étude, les auteurs évoquent une influence de la topographie et de la rigidité sur la différenciation et la capacité des MKs à produire des proplaquettes. Mais la maturation du MK (morphologie, DMS, ploïdie) dans cette structure n'a pas été étudiée. A l'inverse, l'étude de Pietrzyk-Nivau et collaborateurs s'est focalisée sur l'impact de l'environnement tridimensionnel sur la différenciation et la maturation des MKs, avant de les sortir de cette structure pour étudier la libération des plaquettes (Pietrzyk-Nivau et al., 2015). Comme dans d'autres études réalisées dans des hydrogels, la culture de progéniteurs mégacaryocytaires humains de types CD34⁺ dans le gel de pullulan-dextran favorise le maintien du caractère souche de ces cellules (Figure 17 B)(Demange et al., 2012; Pietrzyk-Nivau et al., 2015). Dans cette étude, les auteurs montrent que le gel favorise la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires, ainsi que leur différenciation puisque, en fin de culture les MKs sont de plus grandes tailles, la ploïdie est augmentée ainsi que le nombre de MKs formant des proplaquettes, par comparaison avec le milieu liquide. Cette étude montre que l'environnement physique n'est pas une structure inerte, il participe à la différenciation, à la maturation des cellules ainsi qu'à la libération des plaquettes.

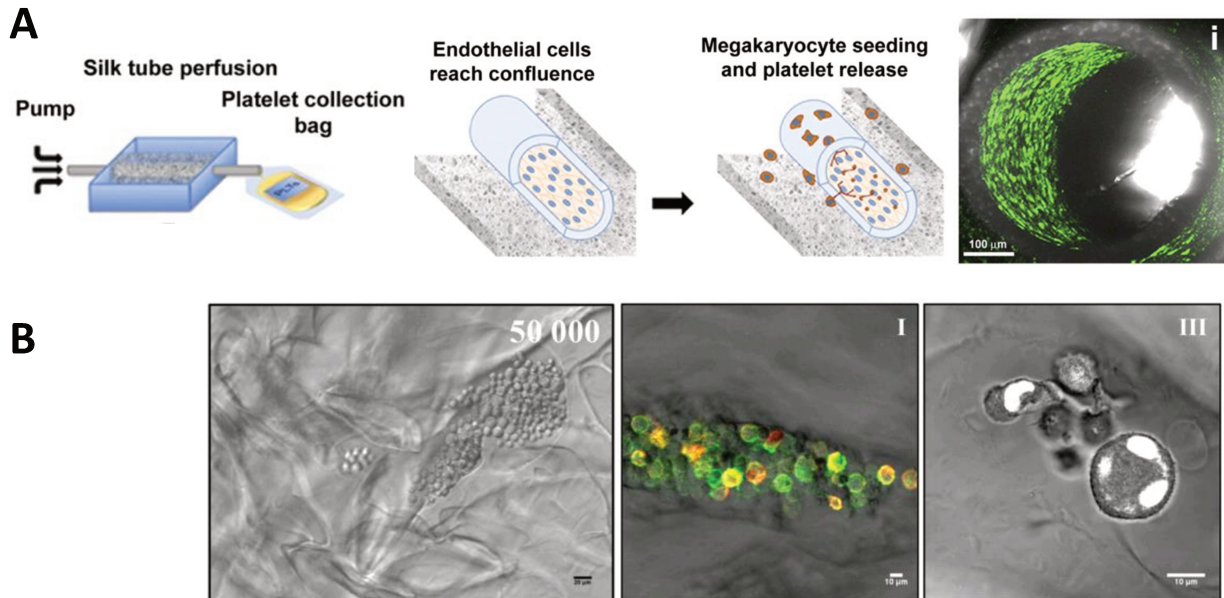


Figure 17 : La culture de cellules hématopoïétiques en 3D

A. Le tube de soie. Composé d'une éponge de soie entourant un tube de soie de rigidité plus importante. Les cellules endothéliales sont ensemencées dans le tube alors que les progéniteurs mégacaryocytaires sont ensemencés dans l'éponge. Les MKs matures à proximité du tube étendent dans la lumière du tube leur proplaquettes, l'application d'un flux dans le tube favorise leur libération. Illustrations tirées de l'article de Di Buduo et al, 2015 (copyright 2015 The American Society of Hematology).

B. L'hydrogel de pullulan-dextran. Les progéniteurs MKs ensemencés dans le gel se retrouvent piégés dans les pores. Images de microscopie à fond clair et à épifluorescence tirées de l'article de Pietrzyk-Nivau et al, 2015 (copyright 2015).

4.5 L'intérêt des hydrogels pour la culture 3D

4.5.1 La culture en hydrogel

Les hydrogels sont des réseaux en 3D composés de polymères qui ont la capacité d'absorber une grande quantité d'eau (plus de mille fois leur masse sèche), ce qui leur confère un comportement de liquide visqueux (Hoffman, 2002; Weiss et al., 2010). C'est cette particularité qui permet leur bio-application. Les hydrogels sont partout : dans nos laboratoires mais également dans la vie courante, ils composent notamment les lentilles de contact, ils entrent dans la composition des gels douches et produits cosmétiques, on les retrouve dans les médicaments (par exemple, gels cicatrisants, antidouleurs locaux) et même dans l'industrie agroalimentaire (épaississants, gélatine, agar...). Chaque hydrogel est différent et possède ses propres caractéristiques. Connaître ces caractéristiques est essentiel pour choisir l'hydrogel le mieux adapté à l'usage que l'on veut lui donner (Rolland, 2013).

4.5.2 Propriétés de l'hydrogel

Tout d'abord un hydrogel peut être naturel ou synthétique, c'est-à-dire formé de polymères

naturels. Ce sont par exemple l'acide hyaluronique, le chitosan, le collagène, la fibrine, l'agarose, le pullulan, le carraghenan, les dérivés de la cellulose, etc... A l'inverse ils peuvent être formés de polymères synthétiques : polyéthylène glycol (PEG), hydroxyethyl méthacrylate, polyacrylamide, polyvinyle, etc. (Hoffman, 2002). Certains polymères naturels sont reconnus par les cellules, c'est le cas des collagènes, de la fibrine et de l'acide hyaluronique pour lesquels les cellules possèdent des récepteurs. Cette interaction entre le gel et les cellules peut avoir des conséquences sur la différenciation cellulaire. Suivant les objectifs de l'étude il est préférable de choisir des gels non réactifs (non reconnus par les cellules) pour ne pas induire de biais supplémentaires dans la culture (Currao et al., 2015; Rape et al., 2015). Suivant la nature des chaînes des polymères, la réticulation ne sera pas la même. Les gels dits physiques forment des jonctions non covalentes *via* des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes, des interactions de van der Waals (Hoffman, 2002). Les chaînes se lient et forment un maillage qui piège l'eau et les différents composants du milieu (Joshi and Lam, 2006; Su et al., 2013). L'existence de jonctions temporaires dans les gels physiques permet au réseau de s'adapter aux forces locales exercées par les cellules au cours de leur différenciation et maturation, contrairement aux gels chimiques qui sont réticulés de manière covalente (agents pontants, crosslinking sous UV...) et forment des liaisons dites irréversibles (Jiang et al., 2014; Occhetta et al., 2013). Les gels physiques sont plus difficilement contrôlables dans le temps parce que les liaisons évoluent constamment mais ils sont réversibles, il est donc plus facile de récupérer les cellules que lorsque l'on utilise des gels chimiques qui demandent une digestion enzymatique ou mécanique pouvant abîmer les cellules. De plus, suivant le protocole de réticulation, la présence de produit chimique pontant ou l'utilisation d'UV peut être néfaste pour les cellules (Jiang et al., 2014). La nature du gel et de ses liaisons influencent la porosité du gel. Les gels physiques sont des gels encapsulants, formant des pores de l'ordre du nm. Dans le gel, les cellules sont contraintes par sa rigidité qui applique des forces plus ou moins fortes sur sa membrane, contrairement aux gels chimiques qui forment des pores macroscopiques. Ces derniers sont donc moins contraignants pour les cellules mais leur offrent plutôt une structure en 3D, rigide, dans laquelle adhérer (Demange et al., 2012; Huang et al., 2014). Dans ces deux cas, mais plus encore dans le premier, la rigidité du gel est un critère essentiel. Il faut également tenir compte du vieillissement du gel, les gels physiques en vieillissant peuvent devenir plus rigide, contrairement aux gels chimiques (Thirumala et al., 2013). Mais on ne peut exclure dans les deux cas que les gels puissent se dégrader seuls ou *via* l'action des cellules et former des composés toxiques dans la culture (Jiang et al., 2014; Lutolf et al., 2003).

4.6 Le choix de la méthylcellulose

La méthylcellulose (MC) fait sa première apparition en biologie en tant que substrat de

remplacement de l'agar pour les tests de détection de l'Herpès simplex virus (1963)(Tytell and Neuman, 1963), l'agar créant des artefacts empêchant la quantification des virions. Par la suite elle est utilisée dans la culture de cellules hématopoïétiques de foies fœtaux et de moelle où elle remplacera l'agar dans la mise au point des tests clonogéniques (Ichikawa et al., 1966; Worton et al., 1969), également pour sa qualité de gel « neutre », non réactif et donc moins générateur d'artefacts. Nous avons choisi de travailler avec des gels de MC pour différentes raisons : i) la raison qui a fait d'elle un bon milieu de remplacement de l'agar : elle n'interagit pas avec les cellules hématopoïétiques, ii) elle permet la différenciation des cellules souches (Worton et al., 1969), iii) et l'encapsulation des cellules ainsi que leur maintien « en suspension » (Figure 16), pas de contact avec le fond de la boîte et de polarisation artificielle, enfin iv) sa rigidité est modulable en augmentant sa concentration.

La méthylcellulose (MC) est un dérivé synthétique de la cellulose (Figure 18 gauche), chimiquement le squelette de la molécule est le même. C'est une longue chaîne linéaire formée d'une succession de cellobioses ($C_{12}H_{22}O_{11}$), c'est-à-dire de dimères de glucoses liés en $\beta 1,4$, dont certains groupements hydroxyl sont substitués par des groupements méthyl. On compte entre 0 et 3 substitutions par monomère de glucose. Cette substitution est obtenue en mélangeant mécaniquement la cellulose et un mélange d'hydroxyde de sodium et de méthyl chloride, la substitution est aléatoire et non homogène sur les chaînes (Kobayashi et al., 1999). La cellulose est un composé fortement hydrophobe et le remplacement des groupements hydroxyl par les groupements méthyl rend la molécule soluble dans l'eau. Ces groupements méthyl favorisent les interactions intermoléculaires, en interagissant de manière transitoire par des interactions hydrophobes avec les chaînes voisines, un maillage se forme et c'est pourquoi plus le degré de substitution est élevé, plus la gélification sera rapide et le réseau rigide. La longueur des chaînes tout comme la concentration en MC est un critère important qui permet de contrôler la rigidité et le temps de gélification, car plus les chaînes sont longues plus il y aura de substitutions et de possibilités d'interaction. De même (pour une même longueur de chaîne) plus la concentration est importante, plus l'encombrement stérique augmente ainsi que la probabilité des chaînes à entrer en contact (Jain et al., 2013; Lam et al., 2006). La masse molaire de la MC est directement proportionnelle à la longueur des chaînes, or celle-ci est fortement variable d'une MC commerciale à une autre et rarement donnée par le fournisseur, on peut trouver dans la littérature un ordre de grandeur pour la masse moléculaire allant de 10 000 à 500 000 Da et un degré de substitution moyen entre 1.3 et 2.6 (Arvidson et al., 2013; Jain et al., 2013).

La MC est un gel thermoréversible (Arvidson et al., 2013; Chevillard and Axelos, 1997; Desbrières et al., 2000). Les liaisons hydrophobes et hydrophiles sont sensibles à la température, les augmentations de température excitent les molécules d'eau favorisant les contacts entre les groupements hydrophobes formant des nœuds de manière hétérogène. Dans un premier temps, ces nœuds sont isolés et forment des agrégats puis, lorsque la température dépasse le point gel, les nœuds se lient pour former un maillage plus rigide et piéger les molécules d'eau (Figure 18 droite), formant un gel (Joshi and Lam, 2006; Kobayashi et al., 1999; Nasatto et al., 2015). Lorsque la température diminue, les molécules d'eau se stabilisent, le maillage se détend et le gel peut redevenir liquide.

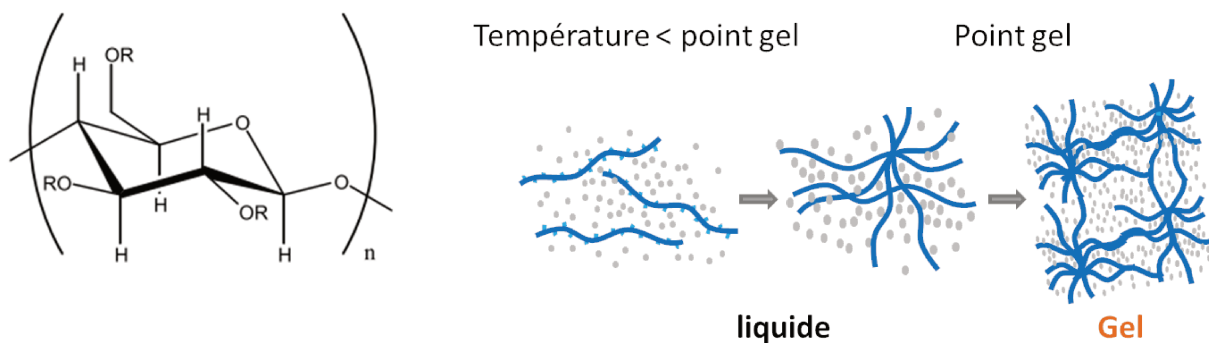


Figure 18 : La méthylcellulose, structure et formation du gel

Représentation d'un monomère de méthylcellulose, R correspondant soit à un hydrogène, soit à un groupement méthyl (CH₃) (représentation issue de l'article de Desbrières et al 2000 (copyright 1999 Elsevier Ltd.).

Schéma de la formation du gel, les chaînes de polymère de MC (chaînes bleues) ne forment pas de liaisons à température faible, quand la température augmente l'agitation des molécules favorise les interactions qui entraînent la formation de nœuds hydrophobes. En conditions adéquates de température et concentration, les nœuds se rejoignent et forment un maillage, entraînant la gélification de l'hydrogel. A concentration fixe, la température de gélification est appelée « point_gel ».

Travail de thèse

Le défaut de maturation des MKs en culture représente un frein pour d'une part mieux comprendre la mégacaryopoïèse et les maladies plaquettaire et d'autre part pour la production de plaquettes *in vitro*. C'est pourquoi ces dernières années différentes stratégies pour obtenir des MKs plus matures ont été mises en place : i) améliorer le milieu de culture, en ajustant les concentrations de cytokines ou en ajoutant des molécules activatrices ou inhibitrices de certains mécanismes cellulaires (Nakajima-Takagi et al., 2014; Pineault et al., 2011; Strassel et al., 2016), ii) réaliser des co-cultures, afin de déterminer le rôle de la composante cellulaire de l'environnement sur la mégacaryopoïèse, tel que des co-cultures de MKs et cellules stromales ou cellules endothéliales (Corselli et al., 2013), iii) appliquer un flux, même si le travail en condition de flux est plus particulièrement utilisé pour faciliter la libération des plaquettes plutôt que pour améliorer la maturation du MK (Nakagawa et al., 2013; Thon et al., 2014), iv) cultiver les cellules en 3D, on suppose que les hydrogels et supports solides forment un environnement plus proche en terme de topographie et de contraintes physiques que l'environnement liquide classique (Buduo et al., 2015; Demange et al., 2012; Pietrzyk-Nivau et al., 2015). De plus, Engler et collaborateurs en 2006 ont montré un rôle de la rigidité du milieu de culture dans le « choix » de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Engler et al., 2006).

1 Hypothèse de départ

Au sein de notre équipe nous avons observé que les MKs différenciés *in situ* et *in vitro* en milieu liquide présentent des différences morphologiques (Article 1, Figure 1). Le MK de stade III de moelle est polyploïde avec un DMS resserré délimitant des territoires cytoplasmiques contenant des granules plaquettaires matures. Le MK différencié en milieu liquide est également polyploïde, mais son DMS est dilaté et moins structuré, il ne délimite pas ou très peu de territoires cytoplasmiques, de plus dans le cytoplasme beaucoup de granules immatures sont observés. Ces observations semblent indiquer une maturation différente dans l'environnement natif et en culture. Au sein de la moelle, les MKs sont confinés, ils sont soumis à des contraintes locales : i) organisation tridimensionnelle des cellules adjacentes et des éléments de la MEC, ii) rigidité des cellules et des protéines de MEC, iii) pression des cellules environnantes en division ou migrantes (Figure 16). Notre hypothèse était que cet environnement influence la maturation du MK. Nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur l'étude du rôle de la rigidité de l'environnement et des forces physiques appliquées sur le MK dans le processus de maturation.

2 Objectifs du travail

L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer 1) si les forces physiques liées à la rigidité de l'environnement impactent la différenciation des MKs et leur capacité ultérieure à former des plaquettes, et 2) les voies de mécanotransduction mises en œuvre et les mécanismes impliqués dans l'adaptation des MKs aux contraintes extérieures.

Pour cela, nous avons choisi de recréer les contraintes physiques et la rigidité de l'environnement médullaire en travaillant avec un hydrogel de méthylcellulose. La MC est un hydrogel : i) non réactif, ii) permettant la différenciation et la maturation des MKs (tests clonogéniques), iii) dont la rigidité est facilement modulable, et iv) permettant l'encapsulation en 3D des cellules.

2.1 Partie 1

La première partie de ma thèse présente dans un article publié (partie 1, Article 1), les résultats de la caractérisation de l'hydrogel de MC, la caractérisation de la culture de progéniteurs mégacaryocytaires en MC et l'identification de mécanismes participant à la maturation du MK au sein du gel (Aguilar et al., 2016), et au travers d'un papier méthodes en préparation, la technique de mise en culture de progéniteurs hématopoïétiques murins en hydrogel de MC (Annexe 1).

2.2 Partie 2

La deuxième partie de ce manuscrit est la suite directe des observations de la partie 1. Les observations sur le remodelage du DMS en fonction de la rigidité du milieu extracellulaire ont orienté mon travail vers la recherche d'un mécanisme, notamment faisant le lien entre le DMS et la formation de proplaquettes.

Partie 1 : Importance de la rigidité de l'environnement sur la différenciation mégacaryocytaire et la formation des proplaquettes

1 L'environnement médullaire

On peut concevoir la moelle comme un agglomérat de cellules logées dans les logettes osseuses ou trabécules, traversée par de nombreux vaisseaux, le tout maintenu par un réseau de protéines et de sucres composant la matrice extracellulaire. La moelle est un tissu dynamique, en constant renouvellement dans lequel les différentes cellules en différenciation migrent constamment ce qui crée non seulement des interactions cellules-cellules mais également des forces physiques locales qui vont s'appliquer sur les cellules avoisinantes. De manière générale, l'environnement extracellulaire est multifactoriel, avec une composante cellulaire, une composante chimique (cytokines et facteurs de croissance), protéique (MEC) et physique. Cette dernière regroupe la dimensionnalité, la structure du tissu, sa rigidité et les forces/contraintes qui s'y appliquent. Contrairement à la composante cellulaire ou chimique, la composante physique est peu étudiée. Pourtant on ne peut ignorer qu'elle puisse avoir un impact sur la maturation cellulaire.

2 Un rôle de la composante physique dans la maturation cellulaire

Des différences morphologiques entre les MKs différenciés au sein de la moelle et les MKs différenciés en milieu liquide ont été observées et semblent indiquer un rôle de l'environnement dans l'organisation intracellulaire de la cellule. De plus, la morphologie des MKs issus de souris déficientes pour la myosine IIA, contraints par les cellules avoisinantes au point de se déformer alors qu'*in vitro* ces mêmes MKs différenciés en milieu liquide sont sphériques et de morphologie identique aux MKs de souris WT, laissent penser non seulement à un rôle global de l'environnement dans la maturation des MKs mais plus particulièrement un rôle de la composante physique et des contraintes locales exercées sur le MK par son environnement.

L'objectif de cette étude est de déterminer le rôle de la rigidité et des contraintes physiques dans la maturation du MK et la libération des proplaquettes.

3 Méthodes (Annexe 1)

Afin de mimer la rigidité et les contraintes physiques de l'environnement médullaire nous avons choisi comme modèle d'étude un système de culture en 3D, basé sur un hydrogel de MC.

La MC est utilisée depuis de nombreuses années dans les tests clonogéniques, elle n'est pas toxique et permet la différenciation des cellules hématopoïétiques dans tous les lignages y compris les MKs. Ce gel est thermoréversible, ce qui permet à l'état liquide d'encapsuler les cellules. Une fois à 37°C les interactions hydrophobes formant le gel se mettent en place autour des cellules, créant un gel contraignant, en contact avec toute la surface cellulaire donc induisant, comme *in situ*, des forces physiques locales sur toute la cellule (Figure 16). Les interactions hydrophobes étant des interactions faibles elles se défont facilement et n'inhibent pas la croissance cellulaire. En fin de culture, cette réticulation faible facilite la récupération des cellules, car il n'est pas nécessaire de digérer le gel comme ce serait le cas pour un gel chimique, il suffit de le diluer dans du liquide.

L'utilisation de cet hydrogel a nécessité la mise au point de différentes techniques qui sont détaillées dans l'Annexe 1, en préparation.

4 Résultats (Article 1)

4.1 Caractérisation des propriétés physiques de la méthylcellulose

Comme indiqué précédemment la MC est un gel physique composé de liaisons hydrophobes qui le rendent réversible. En collaboration avec un physicien, les propriétés viscoélastiques de solutions de concentrations croissantes de MC ont été caractérisées. Cette étude physique a permis de choisir les solutions de MC présentant une composante rigide, et dont les rigidités sont les plus proches de celles de la moelle pour réaliser nos cultures.

4.2 Caractérisation de la culture en hydrogel

La maturation des MKs différenciés en hydrogel a été comparée à celle des MKs différenciés en milieu liquide suivant certains critères de maturation spécifiques aux MKs : la ploïdie, l'expression de marqueurs plaquettaires, l'organisation du DMS et la capacité des MKs à former des proplaquettes. Dans cette partie, nous avons mis en évidence un impact de la rigidité sur la maturation du MK. Premièrement, un gel trop concentré avec un degré de réticulation important ne permet pas la différenciation des MKs. Deuxièmement, dans un environnement de faible rigidité, la maturation des MKs est favorisée, la ploïdie est augmentée, le DMS mieux organisé et la formation des proplaquettes plus importante. Ces observations nous ont conduits à émettre un certain nombre d'hypothèses quant au rôle des contraintes *in situ*, hypothèses qui font l'objet de la suite de ce travail (Partie 2).

4.3 Identification de mécanismes impliqués dans la maturation du MK en 3D

Dans la dernière partie de cette étude nous avons exploré les mécanismes mécanobiologiques mis en œuvre par la cellule pour s'adapter à son environnement. L'une des voies de mécanotransduction est la voie MKL1 (voir Introduction, partie 3), cette voie est impliquée dans la régulation de l'expression de gènes du cytosquelette mais est également connue pour jouer un rôle dans la maturation des MKs notamment dans la ploïdisation et la production de plaquettes (Cheng et al., 2009). Dans cette dernière partie, nous avons montré un rôle de MKL1 et du cytosquelette d'actomyosine dans la réponse du MK aux contraintes physiques. L'activation de la voie MKL1 et la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine favorise la maturation du MK et la formation des plaquettes.

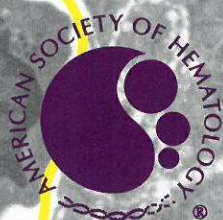
5 Conclusion

Cette étude montre qu'un environnement exerçant des contraintes physiques, présentant une rigidité faible, est cependant capable d'activer les voies de mécanotransduction du progéniteur MK en comparaison du milieu liquide. Ces voies de mécanotransduction ont un impact sur la différenciation, la maturation et finalement sur la capacité du MK mature à former des proplaquettes (suite du projet détaillé dans la Partie 2). La composante physique est donc bien plus qu'une structure tridimensionnelle de soutien mais un réel acteur de la biologie cellulaire.

Partie 1 : Importance de la rigidité de l'environnement sur la différenciation mégacaryocytaire et la formation des proplaquettes

Article 1 : Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation

[®]
blood



VOLUME 128
NUMBER 16
20 OCTOBER 2016

FVIII inhibitors recognizing a single HLA-restricted FVIII epitope (p 1999, p 2043)

IL-27 blockade increases Tregs and prevents lethal murine GVHD (p 2003, p 2068)

CME article: fecal microbiota transplantation in steroid-resistant acute gut GVHD (p 2004, p 2083, p 2107)

Review: implications of FVIII-VWF interaction for treatment of hemophilia A (p 2007)

ATMIN has multiple roles in hematopoiesis during hypoxic stress and aging (p 2017)

**Cover:
Bone marrow stiffness influences megakaryocyte proliferation and maturation (p 1997, p 2022)**

www.bloodjournal.org

PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation

Alicia Aguilar,^{1-4,*} Fabien Pertuy,^{1-4,*} Anita Eckly,¹⁻⁴ Catherine Strassel,¹⁻⁴ Dominique Collin,⁵ Christian Gachet,¹⁻⁴ François Lanza,¹⁻⁴ and Catherine Léon¹⁻⁴

¹INSERM, Unité Mixte de Recherche en Santé 949, Strasbourg, France; ²Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France; ³Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁴Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France; and ⁵Institut Charles Sadron, UPR 22, Strasbourg, France

Key Points

- Mimicking 3D BM stiffness improves MK maturation with in situ–like morphology and higher ploidy and proplatelet formation.
- The myosin IIA and MKL1 pathways contribute to 3D hydrogel medium-mediated increased proplatelet formation.

Megakaryocyte (MK) differentiation occurs within the bone marrow (BM), a complex 3-dimensional (3D) environment of low stiffness exerting local external constraints. To evaluate the influence of the 3D mechanical constraints that MKs may encounter in vivo, we differentiated mouse BM progenitors in methylcellulose (MC) hydrogels tuned to mimic BM stiffness. We found that MKs grown in a medium of 30- to 60-Pa stiffness more closely resembled those in the BM in terms of demarcation membrane system (DMS) morphological aspect and exhibited higher ploidy levels, as compared with MKs in liquid culture. Following resuspension in a liquid medium, MC-grown MKs displayed twice as much proplatelet formation as cells grown in liquid culture. Thus, the MC gel, by mimicking external constraints, appeared to positively influence MK differentiation. To determine whether MKs adapt to extracellular stiffness through mechanotransduction involving actomyosin-based modulation of the intracellular tension, myosin-deficient (*Myh9*^{-/-}) progenitors were grown in MC gels. Absence of myosin resulted in abnormal cell deformation and strongly decreased proplatelet formation, similarly to features

observed for *Myh9*^{-/-} MKs differentiated in situ but not in vitro. Moreover, megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1), a well-known actor in mechanotransduction, was found to be preferentially relocated within the nucleus of MC-differentiated MKs, whereas its inhibition prevented MC-mediated increased proplatelet formation. Altogether, these data show that a 3D medium mimicking BM stiffness contributes, through the myosin IIA and MKL1 pathways, to a more favorable in vitro environment for MK differentiation, which ultimately translates into increased proplatelet production. (*Blood*. 2016;128(16):2022-2032)

Introduction

Bone marrow (BM) is a highly cellular and dynamic tissue composed mostly of hematopoietic cells at all stages of differentiation, which are in constant renewal and undergo migration from the stem cell niche to the vascular sinusoids. Some stromal cells are also present, surrounded by a loose network of extracellular matrices composed essentially of fibrillar proteins and glycosaminoglycans, which form a physically elastic network to which cells can adhere.^{1,2} Within this complex environment, megakaryocytes (MKs) interact with other cells and protein matrices in a 3-dimensional (3D) configuration. They are exposed to a soft elastic medium with a Young's modulus estimated to lie between 15 and 300 Pa,^{3,4} well below that of muscle (≈ 10 kPa) or even brain (≤ 1 kPa).⁵⁻⁷ The relationship between substrate stiffness and cell differentiation has been studied in a number of cellular systems, and it is now thought that substrate elasticity, by converting mechanical inputs into intracellular signals, controls the development of stem cell fates, including hematopoietic stem cells (HSCs), during their proliferation and differentiation.^{3,8}

MKs are formed from HSCs through a complex and well-orchestrated process of differentiation and maturation. During this process, progenitors undergo several rounds of endomitoses, acquiring a large polyploid nucleus.⁹ In the late stages, the cytoplasm considerably enlarges simultaneously with the development of a broad network of intracellular membranes called demarcation membrane system (DMS).¹⁰ These membranes organize to form an intertwined tubular network that further flattens to form membrane sheets.¹¹ In the more mature stage III MKs observed in situ,¹² DMS membranes occupy most of the cytoplasm with the exception of perinuclear and peripheral zones. On transmission electron microscopy (TEM) sections, they appear to be closely apposed and delineate homogeneous cytoplasmic areas, initially called "platelet territories" because they were thought to be the preformed future platelets.¹³⁻¹⁶ It is now considered that platelets are not preformed within MKs, but that DMS membranes serve as a reservoir for the membrane of the future platelets. Platelets are produced at the end of proplatelets, long cytoplasmic protrusions of the MK, projected through the endothelial sinusoid

Submitted 12 February 2016; accepted 20 July 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 8 August 2016; DOI 10.1182/blood-2016-02-699959.

*A.A. and F.P. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

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

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

© 2016 by The American Society of Hematology

barrier.^{17,18} It is thought that the proplatelets then further remodel and release platelets into the blood circulation. However, recent findings have also revealed an alternative process without extension of long protrusions^{19,20}

We previously reported that in absence of myosin IIA, MKs paradoxically displayed either decreased or increased proplatelet formation, depending on whether they were differentiated in situ or in vitro, respectively.^{21,22} This finding suggested that the in situ environment where MKs differentiate contributes in some way to the final platelet production process through modulation of the actomyosin cytoskeleton, possibly through adaptation of cells to the environmental physical constraints. We thus hypothesized that mimicking in vitro these mechanical constraints, which the progenitors encounter in situ, could improve in vitro MK differentiation and maturation, with consequences for platelet formation. To mimic both the 3D aspect and the physical constraints, we used a 3D culture system based on a methylcellulose (MC) hydrogel known to be compatible with the development of colony-forming unit–MK.²³ We show here that in an MC gel with a defined stiffness in the range of that of the BM, MKs reach a higher ploidy than in liquid 2-dimensional culture and exhibit a DMS that more closely resembles that observed in vivo. Furthermore, MKs grown in MC gel have an increased capacity to form proplatelets. We propose that the external mechanical constraints activate the cellular mechanotransduction machinery and show that both myosin IIA and megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1) contribute to this MC-mediated increased proplatelet formation.

Materials and methods

Materials

Materials are described in the supplemental Methods section, available on the *Blood* Web site.

Mice

All mice had a C57BL/6 background and were 2 to 4 months old. Wild-type (WT) mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The floxed *Myh9* strain was crossed with PF4-Cre mice²⁴ to obtain animals with deletion of the *Myh9* exon 1 (*Myh9*^{-/-} mice) in the megakaryocytic lineage, as described previously.²⁵

Culture of mouse BM Lin⁻ progenitor cells

Mouse BM Lin⁻ cells (referred to as Lin⁻ cells) were cultured as described previously²⁶ (see supplemental Methods). In some experiments, E13.5–14.5 fetal Lin⁻ cells were also assayed. For culture in MC gels, cells were encapsulated in the gel at room temperature. In some cultures, the MKL1 inhibitor CCG-1423 (10 μM) was added to the medium at the time of encapsulation and after resuspension of the cells on day 3.

In vitro proplatelet formation

Cells were recovered from the gels after 3 days of culture by dilution of the MC gel and resuspension in complete liquid medium, and the proportion of MK forming proplatelets was determined at various time points (see supplemental Methods).

Rheological measurements

The mechanical properties of MC hydrogels were deduced by measurement of the complex shear modulus using a Haake, Mars III stress-controlled rheometer in the oscillatory mode (see supplemental Methods).

TEM

Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde directly in the culture wells to prevent morphological changes due to cell resuspension and processed for TEM (see supplemental Methods). To directly observe in situ MKs, BMs were flushed either directly in 2.5% glutaraldehyde or in collagenase (3 mg/mL) for isolation of the cells and resuspension before fixation (see supplemental Methods).

Confocal microscopy

On day 3 of culture, cells were fixed in 4% paraformaldehyde directly in gels. Following gel dilution and centrifugation, cells were cytopun and processed for immunolabeling. Plateletlike fragments were recovered and processed for analysis (see supplemental Methods). All confocal images were acquired in the equatorial plane. Fluorescence was quantified using ImageJ software as described by Burgess et al.²⁷ The circularity or shape factor was analyzed using ImageJ software, according to Khatau et al.²⁸

Flow cytometry

The ploidy level was determined using propidium iodide²² and analyzed using a BD LSRFortessa X20 flow cytometer and BD FACS Diva software (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France).

Results

Normal MK maturation requires the BM environment

Differentiation of HSCs in vitro has become an essential tool in the study of MK biology since the identification of thrombopoietin. However, when examining the ultrastructure of mouse MKs following Lin⁻ cell differentiation in liquid culture, major differences can be observed as compared with cells differentiated in their native environment (Figure 1). The most noticeable difference involves the DMS. In most cells, the membranes have the appearance of small round, oval, or elongated vesicles without delimitation of cytoplasmic territories (Figure 1 lower right). Whether this is due to abnormal or incomplete maturation is unclear, but 1 likely explanation is that it results from the absence of the BM environment. One component of this environment is the presence of surrounding local external mechanical forces. We therefore reasoned that growing progenitors in a 3D medium presenting a stiffness close to that of the BM could have an impact on MK maturation.

Mechanical characterization of MC hydrogels

MC was chosen to encapsulate Lin⁻ cells because it has long been used in clonogenic assays and for this reason is known to be compatible with hematopoietic progenitor growth. The results of shear measurements performed on aqueous MC solutions at various concentrations after annealing for 72 hours at 37°C are shown in Figure 2A. At a concentration of 0.8%, the elastic part G' and the viscous part G'' of the shear modulus exhibit the low-frequency terminal response characteristic of a liquid state given by $G' \sim f^2$ and $G'' \sim f$, where f is the frequency. At a concentration of 1.3%, classically used for clonogenic assays, the behavior of the G' and G'' parts of the modulus corresponds to the response of a solution with aggregates. In contrast, at concentrations of 2% and 2.5%, the elastic contribution dominates the viscous contribution and displays an elastic plateau at low frequency, characteristic of the gelled state. As expected for MC hydrogels, extending the annealing time increases the stiffness of the network, as shown by the evolution of the G' values.

At 2% MC, G' lay in the range 10 to 20 Pa after an annealing time of 72 hours (Figure 2B). An increase in MC concentration of only 0.5%

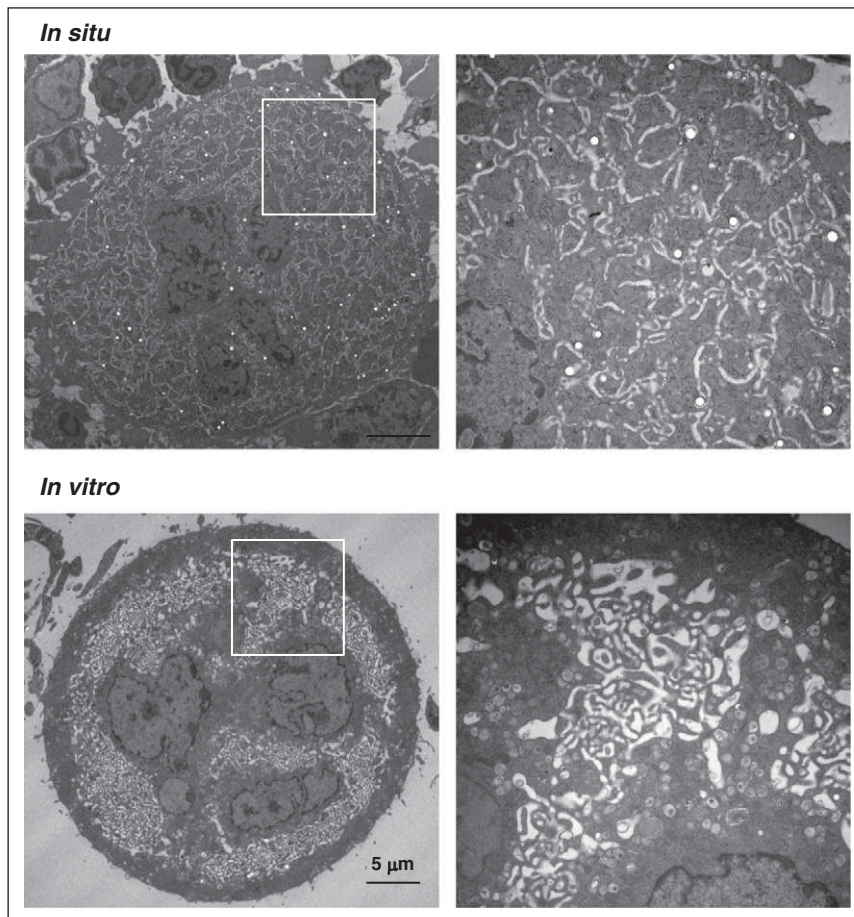


Figure 1. Different ultrastructures of mature MKs differentiated in situ or in vitro. Electron microscopy images of WT murine MKs differentiated in the BM (in situ, upper panel) or in liquid culture in vitro (lower panel). The images of whole cells (left) and close-up views (right) are representative of at least 4 different mouse BM samples (in situ) and 10 different liquid cultures.

led to a strong increase in the stiffness of the hydrogel (10-fold, G' of 100–200 Pa). Assuming a Poisson's ratio ν of 0.5, these G' values correspond to Young's modulus values in the ranges 30 to 60 and 300 to 600 Pa at 2% and 2.5% MC, respectively, and are of the same order as those reported for BM ($E_{\text{marrow}} = 15\text{--}300$ Pa).^{3,4} Thus, hydrogels with MC concentration of 2% or 2.5% were further tested as a 3D medium for MK differentiation.

In situ–like morphology of the DMS is dependent on medium stiffness

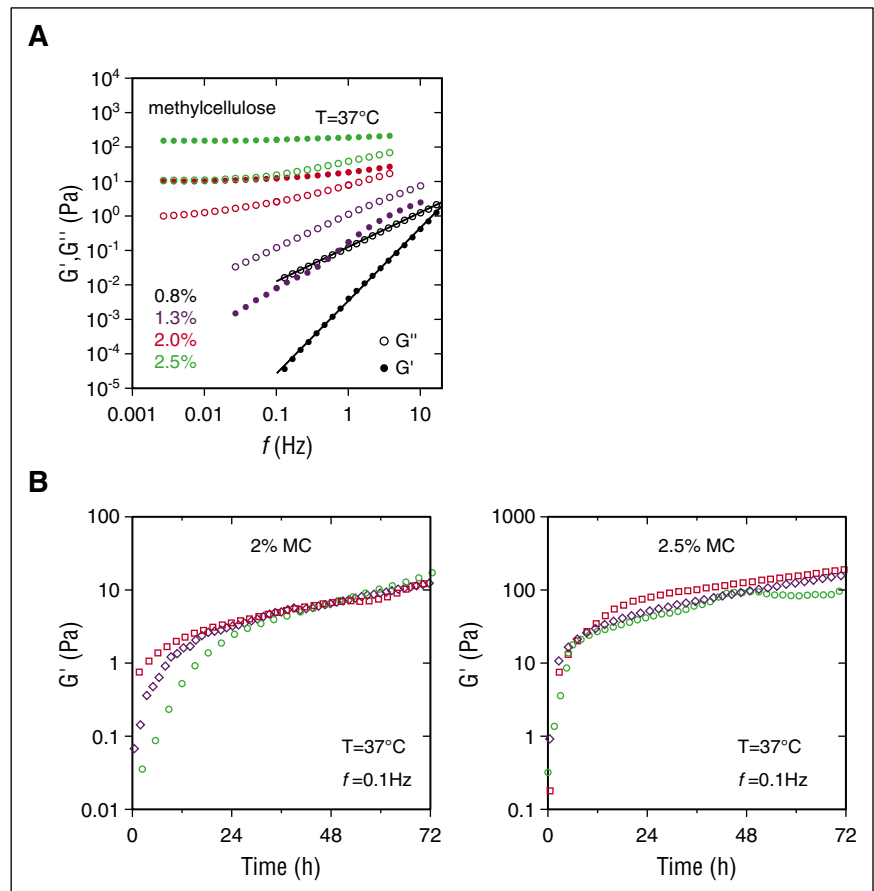
On day 0, Lin^- progenitors were either seeded in liquid medium or encapsulated in 2% or 2.5% MC. After 3 to 5 days, a similar viability and number of MKs was observed in liquid cultures and 2% MC, but the number of MKs was decreased 4-fold in 2.5% MC (supplemental Figure 1A–B). DMS amount was evaluated using anti-GPIIb β immunolabeling and fluorescence microscopy.¹¹ MKs with distinct amount and morphology of the DMS were classified according to the presence of a mainly peripheral DMS that does not delineate cytoplasmic territories (class 1), a cytoplasm filled with a DMS presenting cytoplasmic territories resembling that of in situ mature type III MKs (class 3) and class 2 cells, intermediate between classes 1 and 3 (Figure 3A). Increasing the MC concentration from 0.8% to 2% did not significantly modify the size of MKs (Figure 3B lower left). However, it shifted the development of the DMS toward the class 2 to 3, thus promoting an in situ–like morphology (Figure 3B lower right). In addition, the amount of DMS estimated from the GPIIb β immunofluorescence intensity was significantly increased in 2% MC gels as

compared with liquid cultures (Figure 3C). To examine whether the 3D confinement was absolutely required in addition to the stiffness of the substrate, we grew cells on top of 2% MC gels. Under these conditions, MKs adopted the morphology of liquid-grown cells, with a majority of class 1 MKs (supplemental Figure 2). Thus, the 3D environment, in addition to an MC concentration of 2%, appeared to confer optimal stiffness, and increasing the rigidity 10-fold (2.5% MC) significantly decreased MK size (Figure 3B) and DMS development.

A more precise insight into DMS aspect was obtained by TEM analyses. Contrary to that of cells in liquid culture, the DMS of class 3 MKs grown in 2% MC, delimiting cytoplasmic territories, had membranes that were closely apposed, as in MKs in situ (Figure 4A). In contrast, cells differentiated in 2.5% MC appeared to be mostly immature and contained very small amounts of DMS, in accordance with their smaller size (supplemental Figure 3). To determine whether our observations could be generalized to embryonic progenitors, we differentiated Lin^- cells from fetal liver. Similarly to adult progenitors, MKs from embryonic progenitors differentiated in an MC gel exhibited DMS membranes closely apposed that also may delineate cytoplasmic territories, again contrary to MKs grown in liquid medium (supplemental Figure S4A). Thus, growing cells in a soft 3D MC hydrogel with a low stiffness similar to that of BM favored the appearance of a natively like morphology of the DMS of MKs from both adult or embryonic origin.

To determine how MKs behave when local external constraints are relieved, cells grown in MC gel were resuspended in liquid medium for 2 hours before fixation for TEM. Interestingly, we found that the DMS membranes were remodeled and acquired a structure resembling that

Figure 2. Viscoelastic properties of MC. (A) Frequency sweep at 37°C for MC at different concentrations (0.8% to 2.5%). Curves are representative of 3 different samples for each concentration. G' (filled symbols) and G'' (unfilled symbols) represent the elastic and viscous parts, respectively, of the complex shear modulus and are both expressed in Pascals. (B) Evolution of the shear modulus over 3 days in 2% MC (left) and 2.5% MC (right) at a constant oscillatory frequency.



observed when MKs were continuously grown in liquid medium (Figure 4B, compare with Figures 1 and 4A). In particular, the DMS was mostly forming vacuoles or vesicles; its flattened aspect had disappeared, and it no longer delimited cytoplasmic territories. These surprising observations suggested that the DMS is highly dynamic and can rapidly remodel.

Interestingly, this was also the case when native MKs directly harvested from BM were resuspended in liquid medium for 2 hours. Remarkably, these cells lost the DMS morphology typical of in situ stage III MKs (see Figure 1 upper panel) and the DMS similarly adopted a vacuolated and noncontinuous aspect (Figure 4C). Conversely, we asked whether MKs grown in liquid medium would adopt an in situ–like morphology upon inclusion in MC gel. After 3 days of liquid culture followed by cell encapsulation for 4 or 24 hours, we observed a trend toward increased class 2 and 3 morphologies compared with liquid culture (supplemental Figure 5).

Altogether, these results indicate that the morphology of the DMS depends on the mechanical constraints of the environmental medium.

Culture in MC hydrogels improves MK differentiation and proplatelet formation

We next examined whether the progenitor culture in MC gel led to an overall increase in MK differentiation. The integrin α IIB β 3, GPIIb β , and GPV markers increased upon differentiation but had a similar expression pattern between liquid and MC cultures (Figure 5A). The ploidy of MKs $>4N$ was overall increased in cells cultured in MC gels, with a significant lower amount of 16 N and a higher amount of 64 and 128 N (Figure 5B).

We then looked at the capacity of MC-grown MKs to form proplatelets. As they do not extend proplatelets within the gel, this property was analyzed after resuspension of the cells in liquid medium. Proplatelet formation began 4 hours following resuspension and gradually increased (Figure 5C). MC-grown MKs extended more proplatelets than liquid-grown MKs as early as 10 hours and reached 42.2% after 24 hours compared with 22.6% for liquid-grown MKs ($P < .05$) (Figure 5C). A similar difference was also observed when fetal liver Lin⁻ cells were similarly processed (33.6 vs 63.5% MKs forming proplatelet for liquid vs MC culture after 24 hour resuspension) (supplemental Figure 4B).

The proplatelets, observed by light microscopy, adopted a similar morphology whether cells had been previously differentiated in liquid or MC medium, with thin shafts, branchings, and proplatelet buds at their extremities (Figure 5D). Following pipetting to release plateletlike elements, we observed the presence of barbell platelets as well as discoid platelets exhibiting a marginal band, and able to become activated and fully spread upon adhesion to fibrinogen (supplemental Figure 6). Overall, these data indicate that growing hematopoietic progenitors in an MC gel of low stiffness modifies the way MKs differentiate with positive consequences in proplatelet formation.

The MC-mediated increase in proplatelet formation depends on myosin IIA

Cells adapt to extracellular stiffness by regulating their intracellular tension in response to mechanotransduction signals, possibly through modulation of actomyosin contractility. To determine whether myosin was involved, we first looked at myosin IIA distribution within cells. As shown in Figure 6A, myosin

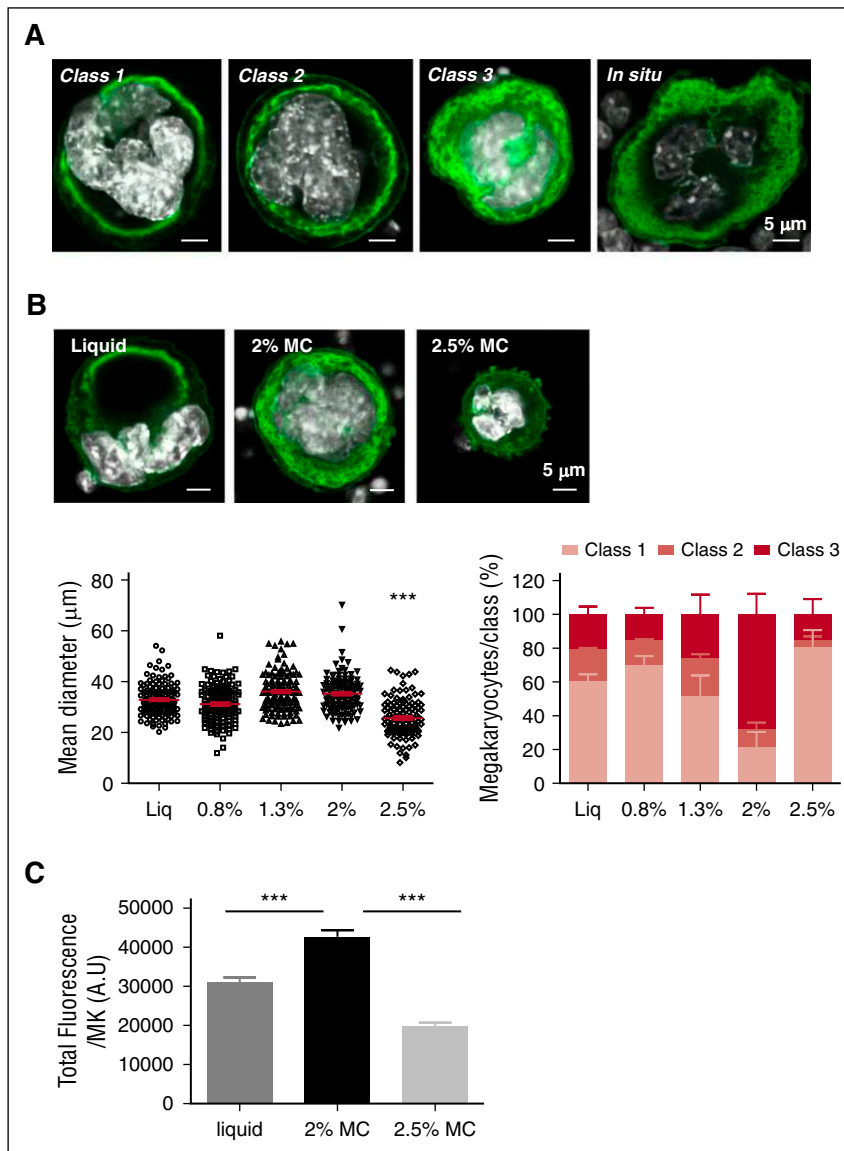


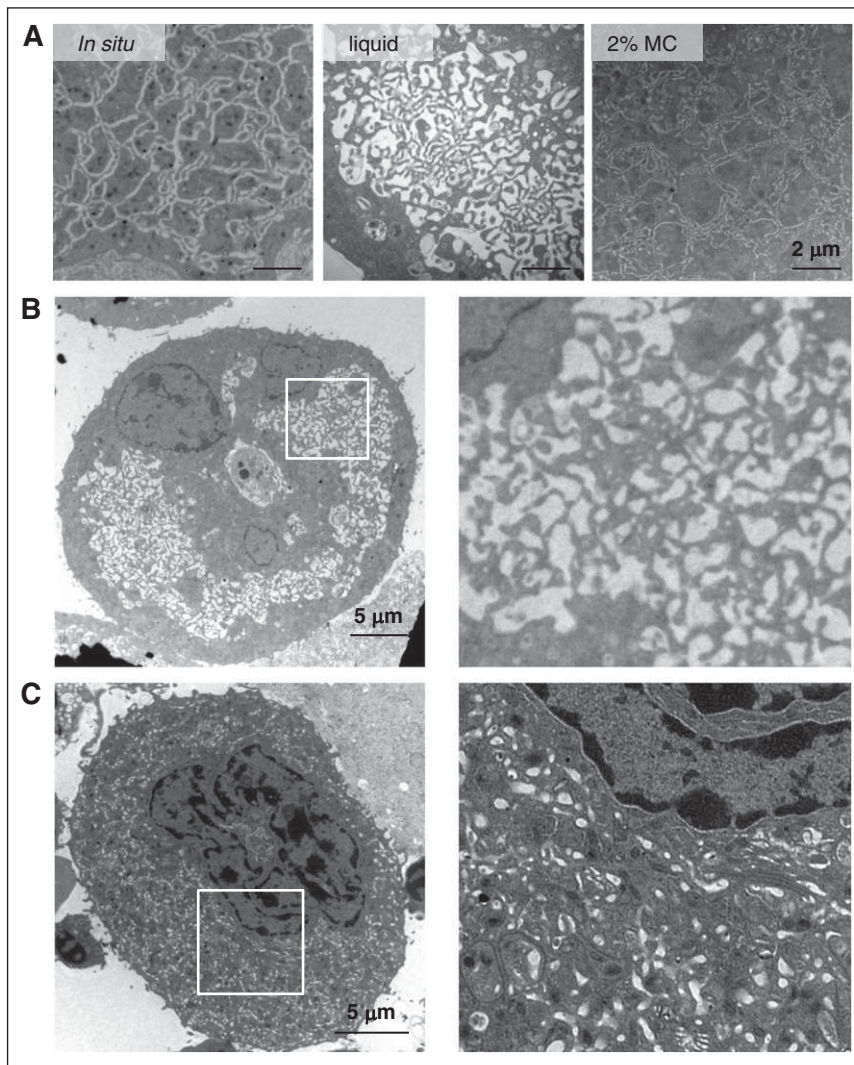
Figure 3. MC-cultured WT MKs display in situ-like DMS development and morphology. (A) Confocal microscopy images of MKs from either 3-day in vitro cultures or in situ BM section, showing the various morphologies of the DMS. The plasma membrane and DMS are labeled with an anti-GPIIb/IIIa antibody (green) and the nucleus with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; white). Images are representative of at least 3 different experiments. Scale bar = 5 μ m. (B) Impact of the MC medium on MK morphology following 3-day culture. In the upper panel, the DMS appears in green and the nucleus appears in white as in (A). Scale bar = 5 μ m. In the lower panel, the mean diameter of MKs (left) and their proportion in each class (right) are shown for liquid and MC hydrogel (0.8, 1.3, 2 and 2.5%) cultures. Results are expressed as the mean \pm SEM in 3 independent cultures, with a total of at least 100 MKs examined. *** P < .0001 using 1-way analysis of variance (ANOVA) with Bartlett's test comparing the 2.5% MC condition to all other conditions. (C) Bar graphs represent the total cell fluorescence for GPIIb/IIIa staining in liquid cultures and 2% or 2.5% MC hydrogels. Data are representative of 3 different cultures for each condition, with a total number of 137, 134, and 120 MKs analyzed for liquid cultures and 2% and 2.5% MC gels, respectively. Results are expressed as the mean \pm SEM: *** P < .0001 using a 1-way ANOVA analysis with a Newman-Keuls posttest.

appeared mostly localized at the cell cortex in all the MKs grown in liquid medium. By contrast, the cortical myosin IIA distribution became discontinuous in MC-grown MKs, and some myosin patches appeared within the cytoplasm. In addition, quantification of myosin labeling showed a slight but significant increase when MKs were grown in MC gel (mean \pm standard error of the mean [SEM]: 54 212 \pm 2505 a.u. for MKs differentiated in MC vs 46 595 \pm 2271 for MKs in liquid, P < 0.05). These data clearly pointed to a role of myosin IIA in cell adaptation to the extracellular medium, which we next investigated using myosin-deficient progenitors (*Myh9*^{-/-}). The absence of myosin had no significant impact on MC-mediated DMS aspect as observed by confocal microscopy, and the classification of DMS morphology was similar in *Myh9*^{-/-} and WT cultures (Figure 6B). However, we found that *Myh9*^{-/-} MKs grown in MC gel adopted an abnormal, noncircular morphology. TEM analyses after glutaraldehyde fixation to better preserve the cell shape showed cells having extensions or constricted areas. This morphology was never observed in the WT and was reminiscent of the "leaky" MK morphology present in situ in *Myh9*^{-/-} BM (Figure 6C).²² The

cell shape index was calculated as a measure of circularity and was found to be decreased by 33% in *Myh9*^{-/-} MKs grown in an MC hydrogel, reproducing the in situ picture (Figure 6C). By contrast, MKs grown in a liquid medium displayed almost perfect circularity whatever the genotype (Figure 6C and supplemental Figure 7). Interestingly, *Myh9*^{-/-} cells differentiated in liquid medium were also ultrastructurally very close to their WT counterparts (supplemental Figure 7). Altogether, these findings point to the involvement of myosin IIA in the mechanism of MK adaptation to medium stiffness.

Strikingly, we observed that the absence of myosin IIA abolished the increase in proplatelet formation observed in MKs grown in MC gels and even decreased proplatelet production, whereas it had no impact on cells in liquid culture (Figure 6D). These features are reminiscent of the previously described paradoxical phenotype of *Myh9*^{-/-} mice.^{22,29} Therefore, these data show that myosin IIA appeared to be dispensable for proplatelet formation in liquid culture. By contrast, the 3D MC medium re-creates some in vivo conditions that allow the recovery of the in situ *Myh9*^{-/-} impaired phenotype.

Figure 4. DMS morphology depends on the stiffness of the medium. (A) Electron microscopy images of stage III BM MKs (in situ) or MKs differentiated for 3 days in liquid or 2% MC cultures (class 3). Scale bar = 2 μ m. Images are representative of at least 4 mice (in situ) or 10 cultures. (B) Left, electron microscopy image of an MK differentiated for 3 days in 2% MC and resuspended in a liquid medium for 2 hours before fixation (representative of 3 independent experiments with >90 MKs examined). Right, close-up view of the cytoplasm of the MK. (C) Left, electron microscopy image of an MK from BM after dissociation and resuspension for 2 hours in a liquid medium (representative of 3 independent experiments with >90 MKs examined). Right, close-up view of the cytoplasm of the MK.



MC-mediated increased proplatelet formation is promoted by nuclear accumulation of MKL1

Among the effectors involved in mechanotransduction machinery, MKL1 appeared to be a likely candidate as a transducer of environmental stiffness³⁰⁻³² and is likewise implicated in megakaryocytic differentiation.³³⁻³⁵ In response to an increase in cell rigidity and tension created by the surrounding substrate, MKL1 is known to shuttle from the cytoplasm to the nucleus, where it accumulates.³³⁻³⁶ MKL1 immunolabeling revealed an increased accumulation within the nucleus in MKs differentiated in an MC gel as compared with liquid culture (Figure 7A), with a 33% gain in the ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence (Figure 7B).

To examine the functional importance of this MKL1 nuclear translocation, MKs were differentiated in the presence of a specific small molecule inhibitor of MKL1, CCG-1423.^{35,37} CCG-1423 had only a minor impact on the class distribution according to DMS morphology (Figure 7C). However, although CCG-1423 had no impact on proplatelet formation in liquid cultures, suggesting that under our liquid culture conditions, MKL1 does not play a major role (Figure 7D), it totally abolished MC-mediated increased proplatelet production. This observation suggests that the MKL1 nuclear relocation occurring during MK differentiation in a 2% MC medium has a functional

significance and contributes to the subsequent increase in proplatelet formation, as compared with MKs differentiated in a liquid medium.

Discussion

BM is a cohesive tissue forming a complex microenvironment consisting of cells and extracellular matrices organized in 3D.³⁸ Because hematopoietic cells undergo constant renewal and migration to the blood vessels, contact and adhesion generating interactions and forces between adjacent cells and the matrix are unavoidable. In this work, we investigated simultaneously the impact of the 3D aspect and that of medium stiffness to mimic BM constraints. We showed that growing cells in a simple 3D hydrogel was sufficient to significantly improve MK differentiation in comparison with liquid cultures, as evidenced by a higher cell ploidy and modification of their ultrastructure to approach that of mature MKs in situ. Ultimately, differentiation in MC gel led to an increase in the number of MKs forming proplatelets.

A number of studies have already reported a role of substrate elasticity in enhancing hematopoietic progenitor/stem cell viability and expansion, which suggests that these cells can sense and react to the physical signals provided by the environment.^{3,39-41} Recently,

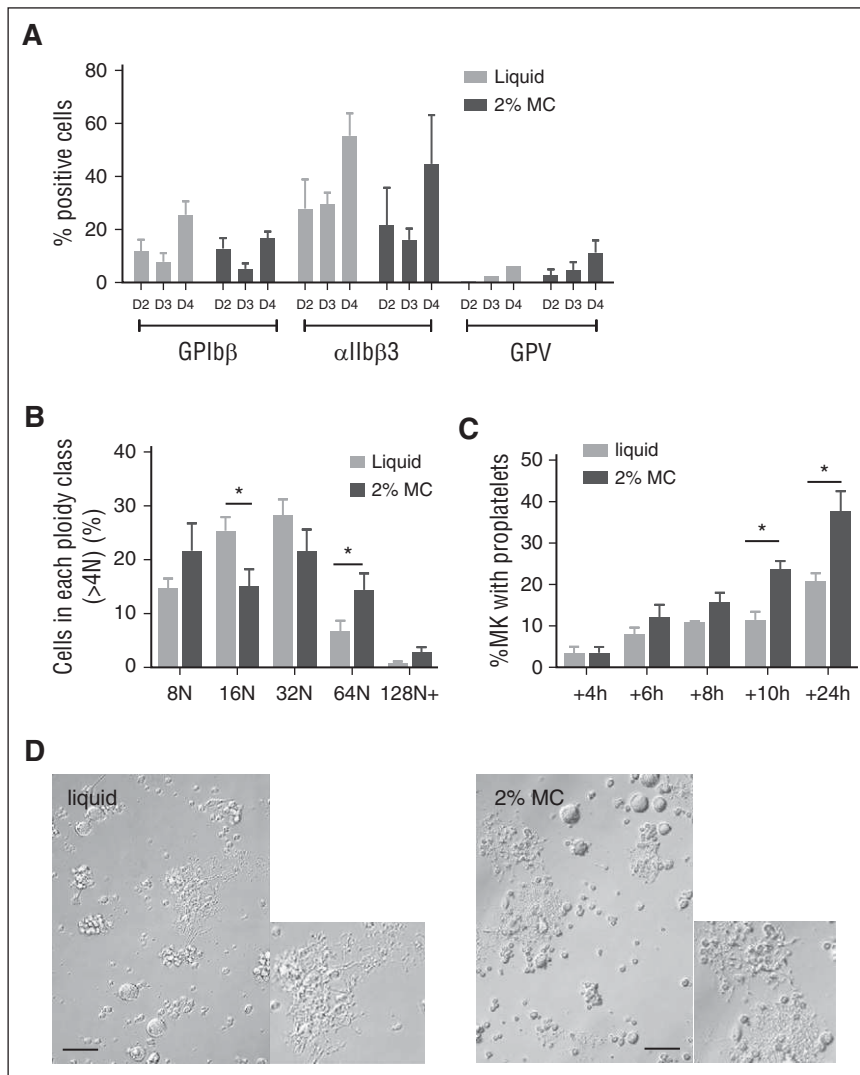


Figure 5. MC culture improves MK ploidy and proplatelet formation. (A) Expression of MK markers (α IIb β 3, GPIIb β , and GPV) on Lin⁻ cells after 2, 3, or 4 days in liquid or 2% MC culture (% of total viable cells). Bar graphs represent 3 different flow cytometric analyses of 3 independent cultures, and results are expressed as the mean \pm SEM. No significant difference observed between both culture conditions at each time point (2-way ANOVA). (B) Flow cytometric analysis of the percentage of MKs in each ploidy class at day 4 of differentiation, considering only cells of ploidy $>$ 4 N. Bar graphs are representative of 6 independent experiments. * $P < .05$ using Student t test. Mean ploidy \pm SEM: 33.18 \pm 3.55 N for MC cultures vs 25.58 \pm 2.20 N for liquid cultures ($n = 6$, $P = .09$). (C) Bar graphs represent the percentages of cells extending proplatelets in liquid and 2% MC cultures after 4, 6, 8, 10, or 24 hours following resuspension in liquid medium. A total of at least 300 MKs were examined in each kinetic. Results are the mean \pm SEM in 4 independent experiments; * $P < .05$ using Student t test. (D) Images of MKs bearing proplatelets after 3 days in liquid or 2% MC medium followed by 1 day resuspension in liquid medium.

Di Buduo et al found that a low stiffness supported higher proplatelet formation.⁴² However, these results were obtained after adhesion of MKs to silk having a stiffness in MPa range, far exceeding that of BM. A study by the group of Discher using a more physiological stiffness range showed that collagen I on soft gels promoted higher ploidy and proplatelets.⁴³ In our study, the gel formulation was tuned to mimic the mechanical characteristics of BM, whose stiffness has been estimated to range from 15 to 300 Pa.^{3,4} Relatively small incremental changes in MC concentration (from 2% to 2.5%) increased the elastic modulus 10-fold. We found that the softer gel (2%, 30-60 Pa) was the optimal substrate for MK differentiation, DMS development, and proplatelet formation. The dramatic difference in MK culture between 2% and 2.5% MC would point to a role of mechanical forces, although we cannot totally rule out an impact of interaction with matrix proteins as our medium contains serum which can provide fibrin, von Willebrand factor, and fibronectin. In addition, the observations that the DMS morphology can switch from in situ-like to liquidlike morphology, or conversely, depending on the external medium, clearly argue for a component of the matrix stiffness. Our data suggest that differentiation/maturation is favored when MKs are in a softer environment, like those they may encounter around sinusoid vessels, unlike the stiffer environments encountered by cells closer to the endosteum. These observations are in agreement with Malara et al,⁴⁴ who showed the presence in situ of a

gradient of maturing MKs, based on their size, from the endosteal niche (supposedly more rigid) to vascular compartments (supposedly less rigid).

The mechanisms through which environmental elasticity promotes a higher amount of DMS with in situ-like morphology remain to be established. DMS formation is initiated by plasma membrane invagination and fueled by Golgi complex- and endoplasmic reticulum-mediated lipid transfer.^{10,11,45} How this membrane network is organized and its structure is maintained within the cytoplasm is still not clear. A role of F-actin meshwork, assembled through the WASP-WAVE pathway at its cytoplasmic face, has been proposed.⁴⁵ Inactivation of genes related to actin dynamics during the maturation process leads to DMS abnormalities, as likewise freeing the filamin A-mediated membrane-to-cytoskeleton link.⁴⁶⁻⁵⁰ Moreover, ex vivo incubation of BM with cytochalasin D or latrunculin A results in strong vacuolization of the DMS (F.P. and C.L., unpublished data), again suggesting a key role of F-actin in maintenance of the membrane structure once it has developed. Spectrin, which forms a lattice underlying the DMS, also plays an important part as a cytoskeletal support for DMS development.⁴⁸ It is possible that the external forces exerted by the MC gel have an impact on interactions between F-actin, spectrin, and the DMS membranes, which are rapidly modified upon cell resuspension. Interestingly, we showed that MC-mediated in situ-like DMS morphology is independent of myosin IIA and MKL1, pointing to a role of other mechanosensing

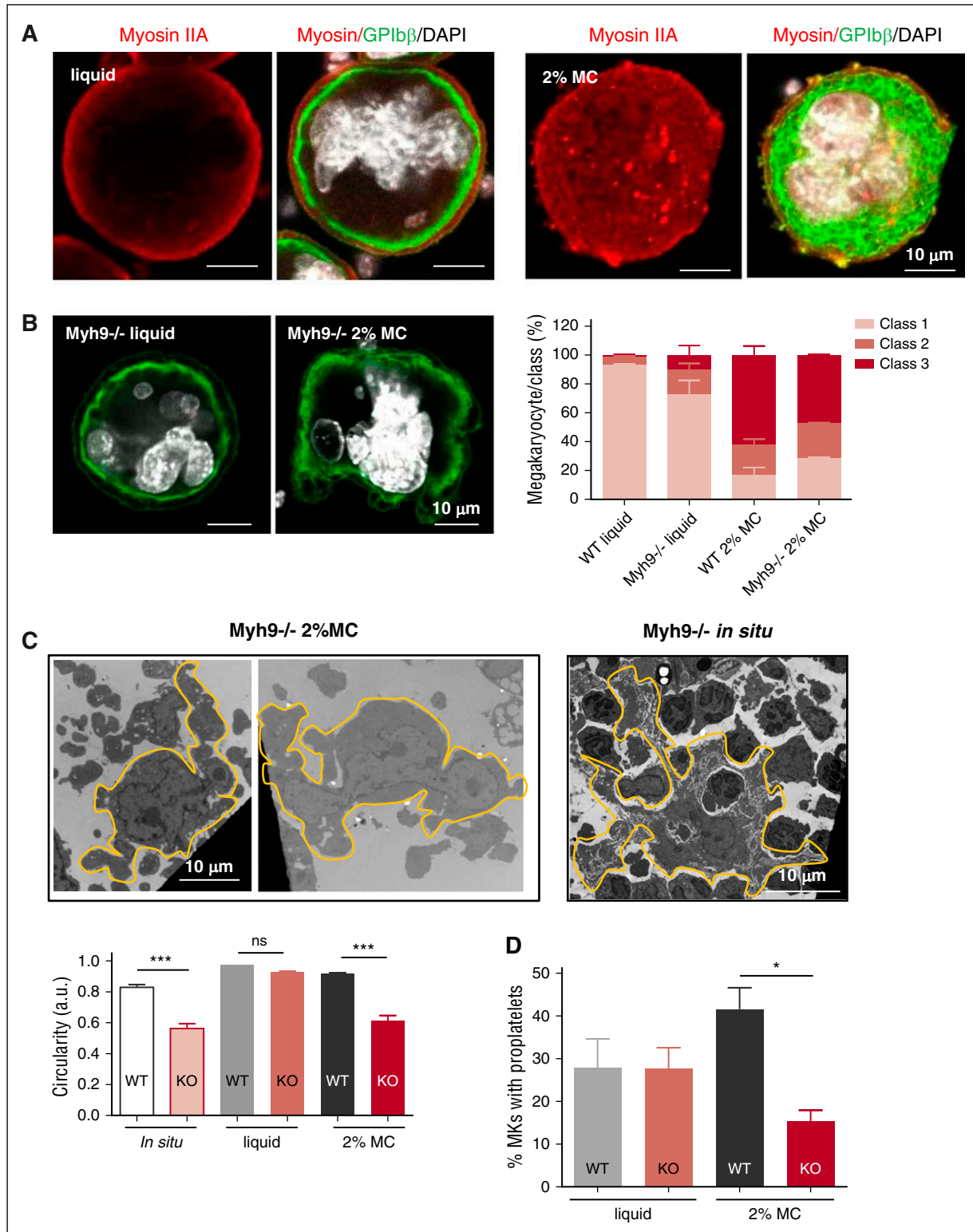


Figure 6. Differential involvement of myosin IIA in MC-mediated MK culture. (A) Myosin IIA immunolabeling (red) along with GPIIb/IIIa-positive membranes (green) and nucleus (DAPI, white). (B) Left, confocal microscopy images of *Myh9*^{-/-} MKs in liquid or 2% MC cultures. Right, bar graphs represent the proportions of *Myh9*^{-/-} cells in the different MK classes in liquid and 2% MC cultures, as compared with WT cells. Results are expressed as the mean \pm SEM and are from 3 independent experiments, with a total of 86-93 MKs examined per condition. (C) Upper panel, electron microscopy images of *Myh9*^{-/-} MKs in 2% MC cultures (left), as compared with in situ MKs (right). Images are representative of at least 6 different cultures and 4 different *Myh9*^{-/-} BMs. Lower panel, bar graphs of the circularity of WT and *Myh9*^{-/-} MKs in situ and in liquid and 2% MC media. Results are the mean \pm SEM in 3 independent experiments, with a total of 37-59 cells examined per condition. ****P* < .0001 using an ANOVA analysis and a Newman-Keuls posttest; ns, not significant. (D) Bar graphs represent the percentages of MKs bearing proplatelets in *Myh9*^{-/-} liquid and 2% MC cultures, as compared with WT cells. Results are the mean \pm SEM in 3 independent experiments, with a total of 428-557 MKs examined per condition. **P* < .05 using an ANOVA analysis and a Newman-Keuls posttest. KO, *Myh9* knockout.

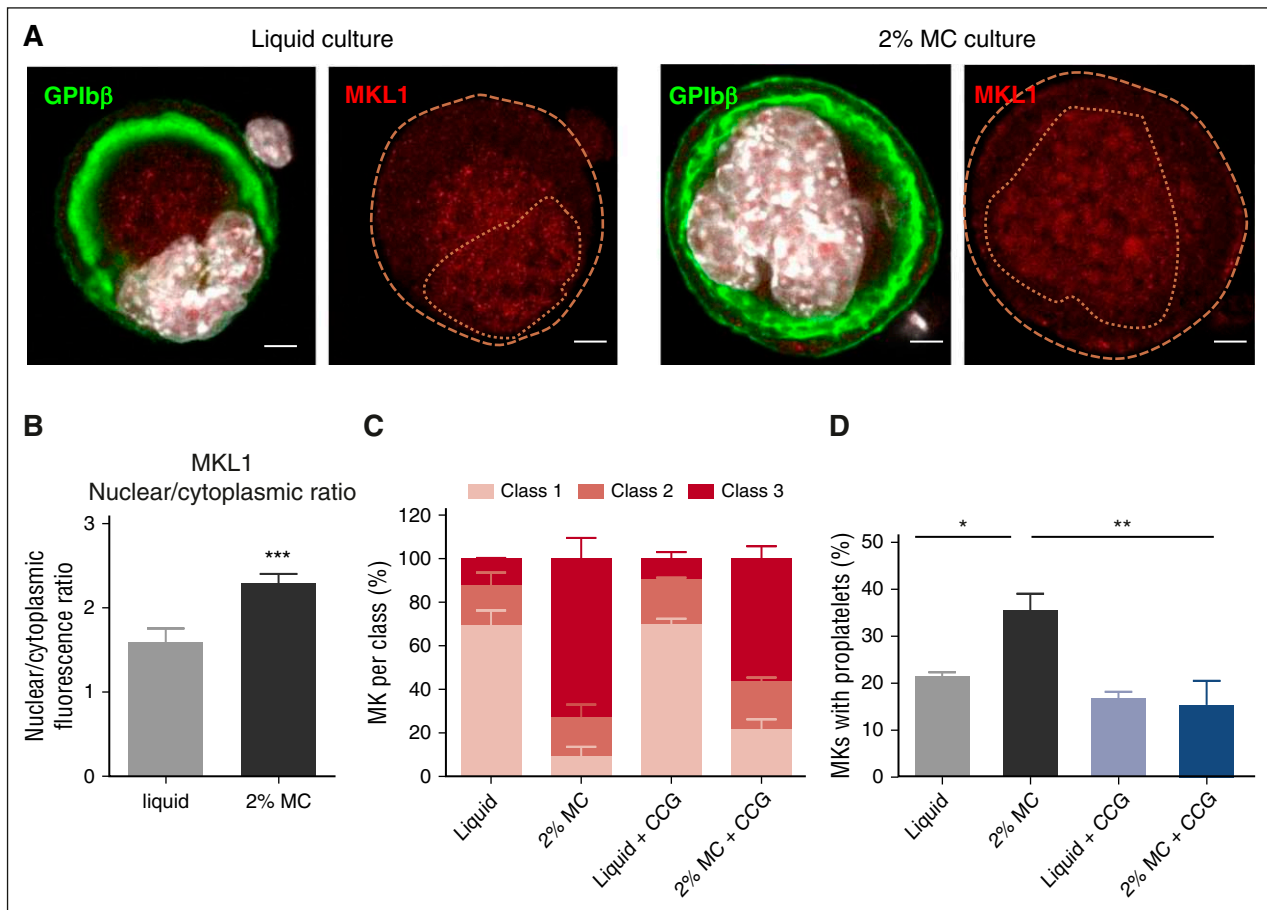


Figure 7. Proplatelet formation is promoted by nuclear accumulation of MKL1. (A) Confocal microscopy images of WT MKs after 3 days of culture in a liquid or 2% MC medium. The DMS and plasma membrane are visualized in green by immunolabeling with anti-GPIIb β ; MKL1 immunolabeling is depicted in red, and nuclei appear in white (DAPI staining). The dotted lines delineate cell and nuclear margins. Images are representative of 3 independent experiments. (B) Bar graphs represent the MKL1 fluorescence in the cytoplasm and nucleus and the nuclear/cytoplasmic ratio, in MKs in liquid and 2% MC cultures. Results are the mean \pm SEM in 3 cultures, with a total of 189-192 cells analyzed per condition. *** $P < .0001$ using Student *t* test. (C, D) Class distribution and proplatelet formation in MKs grown in a liquid or 2% MC medium, in the presence or absence of 10 μ M CCG-1423. Results are the mean \pm SEM in 3 independent cultures, with a total of 90-94 cells examined per condition (C), or in 4 independent cultures, with a total of 510-800 cells examined per condition (D). * $P < .05$, ** $P < .01$ using ANOVA analysis and a Newman-Keuls posttest.

elements such as microtubules or mechanosensitive channels, which could also be linked to actin dynamics.^{51,52}

Importantly, our data showing that both myosin and MKL1 contribute to MC-mediated increased proplatelet formation but not to DMS morphology would suggest that DMS intracellular organization and the initiation of proplatelet extension are not directly related and could be uncoupled. This finding is in agreement with observations that in liquid culture, where the DMS does not adopt its in situ configuration, MKs are still able to extend proplatelets. Furthermore, the DMS appears to be highly dynamic, and our finding that it reorganizes upon cell resuspension raises the hypothesis that this type of membrane rearrangement is a normal step before proplatelet extension, when the stiffness of the medium decreases. Such conditions could be present when MKs reach the sinusoid vessels, and above all when a cytoplasmic protrusion comes into contact with the liquid environment of the blood. Whether this membrane rearrangement involves the physical separation of the DMS from the plasma membrane is unclear.⁵³

It was shown a few years ago that the absence of myosin negatively affects the differentiation process and consequent proplatelet formation, provided that differentiation occurs in situ, where myosin is required to counteract unavoidable mechanical constraints.²² Here we show that myosin-deficient progenitors grown in an MC gel recover some features only observed in situ, especially a strong decrease in proplatelet

formation and their abnormal morphology.^{21,22} In situ, myosin is required during MK maturation to counterbalance external local forces exerted by surrounding migrating cells. In MC gels, hydrophilic and hydrophobic interactions promote physical crosslinks with a finite lifetime. These crosslinks are transient in nature and heterogeneously distributed.^{54,55} Somehow similarly to the in situ BM, myosin is likely required to counterbalance and remodel the constraints generated by these crosslinks. In accordance with this idea, we observed that myosin IIA was distributed at the periphery but also within the cytoplasm of MKs grown in MC gels, like in situ, contrary to liquid culture (Figure 6A). It appears that in liquid culture with no stiffness, myosin IIA is dispensable for late maturation because no gross morphological differences are observed as compared with the WT, with no negative repercussions in terms of proplatelet formation. Furthermore, decreasing the RhoA/Rho kinase/myosin pathway in fully mature MKs favors proplatelet extension^{21,56-58} probably by releasing cortical tension.^{43,59}

Among the mechanotransduction pathways recognized to date, MKL1 is well known to play a role in response to increasing substrate stiffness by regulating the transcription of a number of cytoskeletal genes.^{32,60} MKL1 nuclear relocation is also involved in MK differentiation.³⁵ We showed that the MC gel promotes a greater amount of MKL1 nuclear translocation as compared with liquid conditions. Our finding that CCG-1423 inhibits proplatelet formation only when MKs are grown

in an MC gel supports the hypothesis that MKL1 is relocated to the nucleus in response to the gel stiffness, where it will promote proplatelet formation. Although we have not investigated the sequence of events involved here, our data are in accordance with previous observations that MKL1 knockdown or inactivation decreases proplatelet and platelet formation,^{34,61} whereas MKL1 overexpression increases MK differentiation.³³

In conclusion, we show in this work that re-creating 3D physical constraints like those progenitor cells may encounter in BM improves in vitro MK differentiation and proplatelet formation, in part through adaptations involving myosin IIA and MKL1. Thus, hydrogel-based 3D culture represents a more relevant system than liquid culture for the study of cell behavior during MK differentiation. Extended to human CD34⁺ cells, it could be an alternative way to evaluate samples from patients with abnormal platelet biogenesis related to unrecognized cytoskeletal alterations.

Acknowledgments

The authors thank Josiane Weber, Fabienne Proamer, and Patricia Laeuffer for excellent technical assistance; Emeline Aguilar for

her help with data quantification; and Juliette Mulvihill for reviewing the English.

This study was supported by the Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique. F.P. was the recipient of a fellowship from the Société Française d'Hématologie, and A.A. was supported by a French government fellowship.

Authorship

Contribution: A.A. and F.P. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper; A.E., C.S., and D.C. performed and analyzed experiments; F.L. and C.G. discussed results and wrote the paper; and C.L. designed the research, analyzed data, and wrote the paper.

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

ORCID profiles: C.L., 0000-0002-8597-9929.

Correspondence: Catherine Léon, UMR_S949 INSERM-Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang, 10, Rue Spielmann, B.P. N°36, 67065 Strasbourg Cedex, France; e-mail: catherine.leon@efs.sante.fr.

References

- Long MW, Briddell R, Walter AW, Bruno E, Hoffman R. Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules. *J Clin Invest*. 1992;90(1):251-255.
- Currao M, Malara A, Di Buduo CA, Abbonante V, Tozzi L, Balduini A. Hyaluronan based hydrogels provide an improved model to study megakaryocyte-matrix interactions. *Exp Cell Res*. 2016;346(1):1-8.
- Choi JS, Harley BA. The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials*. 2012;33(18):4460-4468.
- Shin JW, Buxboim A, Spinler KR, et al. Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2014;14(1):81-93.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009;324(5935):1673-1677.
- Shen Y, Nilsson SK. Bone, microenvironment and hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(4):250-255.
- Shin JW, Swift J, Ivanovska I, Spinler KR, Buxboim A, Discher DE. Mechanobiology of bone marrow stem cells: from myosin-II forces to compliance of matrix and nucleus in cell forms and fates. *Differentiation*. 2013;86(3):77-86.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-689.
- Trakala M, Rodríguez-Acebes S, Maroto M, et al. Functional reprogramming of polyplodization in megakaryocytes. *Dev Cell*. 2015;32(2):155-167.
- Mahaut-Smith MP, Thomas D, Higham AB, et al. Properties of the demarcation membrane system in living rat megakaryocytes. *Biophys J*. 2003;84(4):2646-2654.
- Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood*. 2014;123(6):921-930.
- Zucker-Franklin D. Megakaryocytes and platelets. In: Zucker-Franklin D, Grossi CE, eds. Atlas of blood cells, vol. 2. Milan: edi.ermes; 2003:788-791.
- Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)*. 1957;29(3):267-290.
- Tavassoli M. Megakaryocyte-platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood*. 1980;55(4):537-545.
- Zucker-Franklin D, Kaushansky K. Effect of thrombopoietin on the development of megakaryocytes and platelets: an ultrastructural analysis. *Blood*. 1996;88(5):1632-1638.
- Ru YX, Zhao SX, Dong SX, Yang YQ, Eyden B. On the maturation of megakaryocytes: a review with original observations on human in vivo cells emphasizing morphology and ultrastructure. *Ultrastruct Pathol*. 2015;39(2):79-87.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317(5845):1767-1770.
- Italiano JE Jr. Unraveling mechanisms that control platelet production. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39(1):15-24.
- Pertuy F, Eckly A, Weber J, et al. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood*. 2014;123(8):1261-1269.
- Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, et al. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol*. 2015;209(3):453-466.
- Eckly A, Rinckel JY, Laeuffer P, et al. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2243-2251.
- Eckly A, Strassel C, Freund M, et al. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood*. 2009;113(14):3182-3189.
- Hara H, Ogawa M. Murine hemopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages, and megakaryocytes. *Am J Hematol*. 1978;4(1):23-34.
- Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*. 2007;109(4):1503-1506.
- Léon C, Eckly A, Hechler B, et al. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood*. 2007;110(9):3183-3191.
- Strassel C, Eckly A, Léon C, et al. Heparin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp Cell Res*. 2012;318(1):25-32.
- McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1400-1412.
- Khatao SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson PJ, et al. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(45):19017-19022.
- Eckly A, Strassel A, Cazenave J-P, Lanza F, Léon C, Gachet C. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol Biol*. 2012;788:175-192.
- Asparuhova MB, Gelman L, Chiquet M. Role of the actin cytoskeleton in tuning cellular responses to external mechanical stress. *Scand J Med Sci Sports*. 2009;19(4):490-499.
- Handorf AM, Zhou Y, Halanski MA, Li WJ. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis*. 2015;11(1):1-15.
- Huang X, Yang N, Fiore VF, et al. Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(3):340-348.
- Cheng EC, Luo Q, Bruscia EM, et al. Role for MKL1 in megakaryocytic maturation. *Blood*. 2009;113(12):2826-2834.
- Gilles L, Bluteau D, Boukour S, et al. MAL/SRF complex is involved in platelet formation and megakaryocyte migration by regulating MYL9

- (MLC2) and MMP9. *Blood*. 2009;114(19):4221-4232.
35. Smith EC, Teixeira AM, Chen RC, et al. Induction of megakaryocyte differentiation drives nuclear accumulation and transcriptional function of MKL1 via actin polymerization and RhoA activation. *Blood*. 2013;121(7):1094-1101.
 36. McGee KM, Vartiainen MK, Khaw PT, Treisman R, Bailly M. Nuclear transport of the serum response factor coactivator MRTF-A is downregulated at tensional homeostasis. *EMBO Rep*. 2011;12(9):963-970.
 37. Evelyn CR, Wade SM, Wang Q, et al. CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(8):2249-2260.
 38. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):93-106.
 39. Adamo L, Naveiras O, Wenzel PL, et al. Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature*. 2009;459(7250):1131-1135.
 40. Demange E, Kassim Y, Petit C, et al. Survival of cord blood haematopoietic stem cells in a hyaluronan hydrogel for ex vivo biomimicry. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(11):901-910.
 41. Holst J, Watson S, Lord MS, et al. Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1123-1128.
 42. Di Buduo CA, Wray LS, Tozzi L, et al. Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies. *Blood*. 2015;125(14):2254-2264.
 43. Shin JW, Swift J, Spinler KR, Discher DE. Myosin-II inhibition and soft 2D matrix maximize multinucleation and cellular projections typical of platelet-producing megakaryocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(28):11458-11463.
 44. Malara A, Currao M, Gruppi C, et al. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. *Stem Cells*. 2014;32(4):926-937.
 45. Schulze H, Korpál M, Hurov J, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*. 2006;107(10):3868-3875.
 46. Begonja AJ, Pluthero FG, Suphamungmee W, et al. FlnA binding to PACSIN2 F-BAR domain regulates membrane tubulation in megakaryocytes and platelets. *Blood*. 2015;126(1):80-88.
 47. Bender M, Eckly A, Hartwig JH, et al. ADF/cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. *Blood*. 2010;116(10):1767-1775.
 48. Patel-Hett S, Wang H, Begonja AJ, et al. The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation. *Blood*. 2011;118(6):1641-1652.
 49. Strassel C, Eckly A, Léon C, et al. Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica*. 2009;94(6):800-810.
 50. Sui Z, Nowak RB, Sanada C, Halene S, Krause DS, Fowler VM. Regulation of actin polymerization by tropomodulin-3 controls megakaryocyte actin organization and platelet biogenesis. *Blood*. 2015;126(4):520-530.
 51. Godbout C, Follonier Castella L, Smith EA, et al. The mechanical environment modulates intracellular calcium oscillation activities of myofibroblasts. *PLoS One*. 2013;8(5):e64560.
 52. Martinac B. The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(2):682-691.
 53. Osman S, Taylor KA, Allcock N, Rainbow RD, Mahaut-Smith MP. Detachment of surface membrane invagination systems by cationic amphiphilic drugs. *Sci Rep*. 2016;6:18536.
 54. Tanaka F, Edwards SF. Viscoelastic properties of physically crosslinked networks. 1. Transient network theory. *Macromolecules*. 1992;25:1516-1523.
 55. Winter HH, Mours M. Rheology of polymers near liquid-solid transition. Neutron spin echo spectroscopy viscoelasticity rheology, vol. 134. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1997:165-234.
 56. Balduini A, Malara A, Pecci A, et al. Proplatelet formation in heterozygous bernard-soulier syndrome type Bolzano. *J Thromb Haemost*. 2009;7(3):478-484.
 57. Chang Y, Auradé F, Larbret F, et al. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood*. 2007;109(10):4229-4236.
 58. Chen Z, Naveiras O, Balduini A, et al. The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood*. 2007;110(1):171-179.
 59. Spinler KR, Shin JW, Lambert MP, Discher DE. Myosin-II repression favors pre/proplatelets but shear activation generates platelets and fails in macrothrombocytopenia. *Blood*. 2015;125(3):525-533.
 60. Lee PS, Teaberry VS, Bland AE, et al. Elevated MAL expression is accompanied by promoter hypomethylation and platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2010;126(6):1378-1389.
 61. Ragu C, Boukour S, Elain G, et al. The serum response factor (SRF)/megakaryocytic acute leukemia (MAL) network participates in megakaryocyte development. *Leukemia*. 2010;24(6):1227-1230.



blood[®]

2016 128: 2022-2032

doi:10.1182/blood-2016-02-699959 originally published
online August 8, 2016

Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation

Alicia Aguilar, Fabien Pertuy, Anita Eckly, Catherine Strassel, Dominique Collin, Christian Gachet, François Lanza and Catherine Léon

Updated information and services can be found at:

<http://www.bloodjournal.org/content/128/16/2022.full.html>

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

[Platelets and Thrombopoiesis](#) (685 articles)

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

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

Information about ordering reprints may be found online at:

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

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

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

Supplemental Materials and Methods and Legends to supplemental figures

Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation.

Alicia Aguilar^{1,2,3,4,6}, Fabien Pertuy^{1,2,3,4,6}, Anita Eckly^{1,2,3,4}, Catherine Strassel^{1,2,3,4}, Dominique Collin⁵, Christian Gachet^{1,2,3,4}, François Lanza^{1,2,3,4}, Catherine Léon^{1,2,3,4*}

¹ INSERM, UMR_S949, Strasbourg, F-67065, France

² Etablissement Français du Sang, Strasbourg, F-67065, France

³ Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, F-67400, France

⁴ Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg

⁵ Institut Charles Sadron, UPR22, Strasbourg, F-67034, France

⁶ Both authors contributed equally

Short title: Medium stiffness and megakaryocyte maturation

Scientific category: platelet and thrombopoiesis

*Correspondence to: Catherine Léon, PhD
UMR_S949 INSERM-Université de Strasbourg
Etablissement Français du Sang (EFS)
10, rue Spielmann, B.P. N°36
67065 Strasbourg Cedex, France
Tel: (33) 388 21 25 25
Fax: (33) 388 21 25 21
E-mail: catherine.leon@efs.sante.fr

1.

Supplemental Materials and Methods and Legends to supplemental figures

Materials

Dapi, Permafluor, DMEM medium, penicillin, streptomycin and glutamine were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Recombinant human TPO (rhTPO), fetal bovine serum (FBS) and the mouse hematopoietic progenitor (Lin⁻) cell enrichment kit were purchased from Stem Cell Technologies (Vancouver, BC, Canada). Anti-MKL1 antibody was from Abcam (Paris, France), goat anti-rabbit immunoglobulin (Ig) conjugated Alexa Fluor 555 was from Thermo Fisher Scientific (Saint Aubin, France), goat anti-rat Ig conjugated cyanine 2 was from Jackson ImmunoResearch Labs (Suffolk, United Kingdom). Monoclonal antibody against mouse glycoprotein GPIIb β (RAM.1-488, RAM.1-647) and monoclonal antibody against mouse α IIb β 3 (RAM.2-555) were produced and labeled in our laboratory (Perrault et al., 2001). Propidium iodide and BSA were from Sigma-Aldrich (Rueil-Malmaison, France). Recombinant hirudin rHV2-Lys47 (r-hirudin) was kindly provided by Transgène (Strasbourg, France). Methylcellulose was from R&D (Minneapolis, Minnesota, USA). Round culture dishes coated or uncoated with ESS28kPa were from Ibidi (Martinsried, Germany). Silicon oil E7 was from Haake. The small inhibitor of MKL1, CCG-1423, was from Cayman Chemical (Michigan, USA).

Culture of mouse bone marrow Lin⁻ progenitor cells

Bone marrow cells were flushed from femurs and tibias from 8- to 12-week old male C57Bl/6 mice and successively passed through 21-, 23- and 25-gauge needles. The cells were spun down and nucleated cells were counted. Cells were pelleted at 300g for 7 min and resuspended at 1×10^8 cells/ml in PBS supplemented with 2% (v/v) FBS and 2 mM EDTA to perform the lineage (Lin) negative selection, according to the recommendations of the manufacturer (Stem Cell Technologies). The Lin⁻ population was adjusted to 2×10^6 cells/mL

in DMEM containing 2 mM l-glutamine, penicillin/streptomycin, 10% FBS, 50 ng/mL TPO and 100 U/mL hirudin (complete medium). Cultures were performed in 24-well tissue culture plates using 500 μ L of cell suspension in liquid medium or MC gel per well and were incubated at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere for up to 4 days.

***In vitro* proplatelet formation**

Cells were recovered from the gels after 3 days of culture by dilution of the MC gel in PBS (1:20) and centrifugation at 300g. The cell pellets were resuspended in twice the initial volume of complete liquid medium (1 mL/starting well) and re-seeded in 24-well plates (500 μ L/well). As a control, cells grown in liquid medium were recovered, resuspended and re-seeded in the same manner. After 4, 6, 8, 10 and 24h, the unfixed cells were examined under a light microscope and pictures of the wells were taken (obj. 20x, 10 fields per well, 2 wells per condition) to quantify the number of proplatelet-forming MKs. To evaluate whether the different conditions resulted in difference in MK number, the total MKs recorded in these 20 fields were enumerated. To examine whether proplatelet forming MK may release platelets, we manually detached platelets by pipetting 5 times in each well, in the presence of apyrase (0.02 U/mL) and PGI₂ (1 μ M). Cells were centrifuged at 1900g 1 minute. Pellets were resuspended in 2mL of Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.3) in the presence of albumin 0.37% and 0.02 U/mL apyrase and loaded onto in a 2-4% BSA gradient. "Resting platelet-like fragments" were fixed with PFA 4% and cytospun for immunolabeling with anti-GPIIb β and anti-tubulin β antibody (clone D66, Sigma). In another experiment, these platelet-like fragments were activated with 0.1 U/mL thrombin and adhered onto fibrinogen-coated coverslips for 1 hour, fixed in 4% PFA and immunolabeled with anti-GPIIb β antibody and phalloidin.

Rheological measurements

MC is a biopolymer well known to undergo gelation in water upon heating. This behaviour-property associated with phase separation^{1,2} is attributed to an increase with the temperature of intra and intermolecular hydrophobic interactions. Gelation leads to the formation of a network whose stiffness depends not only on the temperature and on the MC concentration but also on the time of annealing at a given temperature^{1,3}. The sample prepared beforehand to the desired concentration was degassed under primary vacuum for about ten minutes. This procedure, carried out in the liquid phase of the sample at a temperature of ~ 6 °C, was done to remove air dissolved in the sample, which could distort rheology measurements. At the end of degassing, it was verified that the initial mass of the sample had not changed to ensure that the concentration of water in the sample was not reduced. The sample was then gently placed in the rheometer maintained at a temperature of 6 °C. This one was then heated up to 37 °C and the gap of the cell adjusted. A silicone oil film of very low viscosity was placed around the sample to prevent evaporation of the water contained in the sample during the experiment. The measurement unit was of the cone-plate type (diameter 35 mm, tilt angle 2°) and the temperature was controlled with a precision of ± 0.05 °C. The sample was gently placed in the rheometer maintained at 6 °C, which was then heated to 37 °C. Measurements of the frequency (from a few mHz to 10 Hz) of the elastic part G' and the viscous part G'' of the complex shear modulus were recorded as a function of time over more than 72 h.

Transmission electron microscopy (TEM)

Cells embedded in Epon were classically processed. Thin sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a CM120 transmission electron microscope (TEM) (FEI, The Netherlands)⁴. Analyses were performed on ImageJ and siViewer Softwares.

Bone marrows were flushed either directly in 2.5% glutaraldehyde or in collagenase 3 mg/ml for cell isolation and resuspension. Resuspension was performed by incubation at 37 °C for 10 min followed by vortexing. Isolated cells were incubated a further 10 min in collagenase for complete cell isolation, centrifuged at 300g and resuspended in 1 mL of DMEM-0.4%FBS, and followed by 1h 30 incubation before fixation in 2.5% GA.

Confocal microscopy

At day 3, cultured megakaryocytes were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min. Following MC dilution and centrifugation, cells were cytopspun onto poly L-lysine-coated slides. The cells were then permeabilized with 0.1% triton-X100 in PBS containing 1% BSA followed by incubation with 10 µg/mL of AF488-labeled anti-GPIIbβ antibody. The nuclei were counterstained with DAPI. The slides were mounted in Permafluor for examination under a SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, France). The observations have been made by at least 2 observers and most of the observations and confocal image acquisitions were performed in a blinded manner.

Fluorescent quantifications (GPIIbβ, MKL1, Myosin) were performed using ImageJ software according to the total cell corrected fluorescence equation⁴. For the total cell or nucleus, the formula used was: Integrated density of selected cell-(cell area* mean gray values of background). To quantify the cytoplasmic fluorescence, the formula used was: Integrated density of cell – [(cell area – nuclear area)*mean gray values of background].

Circularity was performed with the ImageJ software from TEM images. The cell contour was cropped manually and the circularity was measured following the equation: $4\pi A/p^2$ where A is the area of the surface and p the perimeter. The circularity is a value comprised between 0 and 1, where 0 represents a polygonal shape and 1 a perfect circle⁵.

For MKL1 staining, permeabilized cells were first incubated with a MKL1 antibody (5 µg/mL), followed by incubation with goat anti-rabbit AF 555-labeled antibody before the GPIIbβ and nuclei staining.

Flow cytometry

Cultures for flow cytometry were performed in ESS-coated dishes to limit cell adhesion in a total volume of 2 mL. The ploidy level was evaluated at day 4 of culture using propidium iodide. Based on fluorescence intensity of the DNA intercalating agent, only the strictly > 4N (i.e. from 8 to 128N) were taken into consideration. MKs with intermediate ploidy (MKs in the process of DNA replication) were not considered here. Platelet marker appearance was observed at day 2, 3 and 4 after recovering cells from MC by dilution and centrifugation, then staining with antibodies against specific platelet glycoproteins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, GPIb β and GPV.

References

1. Chevillard C, Axelos MAV. Phase separation of aqueous solution of methylcellulose. *Colloid and Polymer Science*. 1997;275(6):537-545.
2. Kobayashi K, Huang CI, Lodge TP. Thermoreversible gelation of aqueous methylcellulose solutions. *Macromolecules*. 1999;32(21):7070-7077.
3. Arvidson SA, Lott JR, McAllister JW, et al. Interplay of Phase Separation and Thermoreversible Gelation in Aqueous Methylcellulose Solutions. *Macromolecules*. 2013;46(1):300-309.
4. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1400-1412.
5. Khatau SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson PJ, et al. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(45):19017-19022.

Legends to Supplemental figures

Figure S1. Viability and number of MKs according to the differentiation medium. (A) Flow cytometric analysis showing the percentages of 7AAD-negative and GPIIb β -positive MKs in liquid and 2% or 2.5% MC cultures after 3, 4 or 5 days. Results are the mean \pm sem in 3 independent experiments and no statistical differences were observed (Anova test). (B) Numbers of MKs after 4 days of culture. No differences were observed between 2% MC and liquid cultures. In contrast, MK differentiation significantly decreased in 2.5% MC hydrogels; *, $p < 0.05$ using an Anova analysis followed by a Newman-Keuls post-test.

Figure S2. MKs grown on top of 2% MC gel exhibit a liquid-like morphology. (A) Proportion of MK according to their DMS morphology. MKs were grown in liquid medium on top of 2% MC gel. Results are the mean of the proportion of MKs in each class, with a total of at least 30 MKs examined per condition. (B) Electron microscopy images of WT MKs differentiated on top of the MC gel, showing the liquid-like aspect of the DMS.

Figure S3. Ultrastructure of MKs differentiated in 2.5% MC hydrogels. Electron microscopy images of WT MKs differentiated in 2.5% MC hydrogels after 3 days of culture, showing the immature ultrastructure of the cells.

Figure S4. Differentiation of fetal liver Lin⁻ cells in liquid vs. MC medium. (A) Electron micrograph of WT MKs from fetal liver Lin⁻ cells differentiated in liquid or MC medium. The images of whole cells (upper panels) and close up views (lower panels) are representative of 2 independent liquid and MC cultures. (B) Bar graph representing the proportion of fetal-

derived MKs bearing proplatelets after 3 days of culture in liquid or MC medium and resuspension in liquid medium for 24h. Results are the mean \pm sem of the proportion of MKs with proplatelets in 2 independent cultures with a total of 500 MKs per condition, obtained from 2 independent cultures.

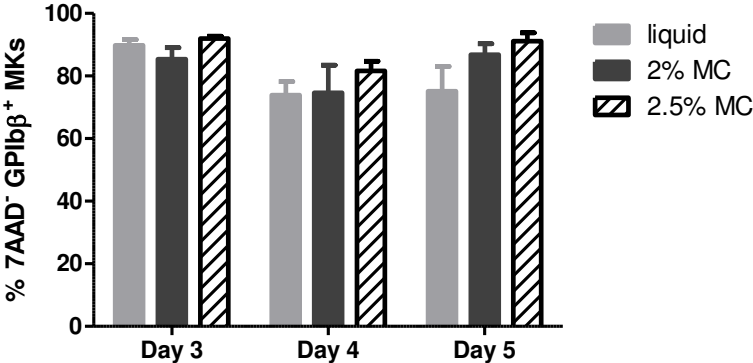
Figure S5. Effect of hydrogel encapsulation of MK grown in liquid medium. Proportion of MKs according to their DMS morphology. MKs were grown in liquid culture for 3 days followed by encapsulation in MC gel for 4 or 24 h, in comparison with culture performed only either in liquid or 2% MC (3 days plus 4 h). Results are the mean \pm sem of the proportion of MKs in each class in 4 independent cultures, with a total of at least 240 MKs examined per condition.

Figure S6. Platelet-like fragments recovered from liquid or MC-grown MKs. (A) Confocal images representative of “platelets” released from liquid and MC-grown MKs in 3 independent experiments. Green: GPIIb β , red: tubulin. (B) Confocal images of platelets adhered onto fibrinogen, showing the presence of stress fibers. Green: GPIIb β , red: phalloidin555.

Figure S7: Ultrastructure of WT and *Myh9*^{-/-} MKs differentiated in liquid culture. TEM images of WT and *Myh9*^{-/-} Lin⁻ cells differentiated for 3 days in a liquid medium. The *Myh9*^{-/-} cells display no gross morphological differences as compared to WT MKs.

Fig. S1: Viability and number of MKs according to the differentiation medium.

A



B

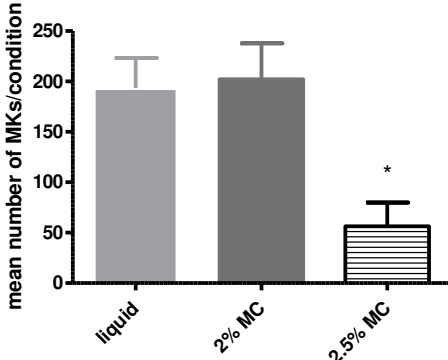


Fig. S2: MKs grown on top of 2% MC exhibit a liquid-like morphology

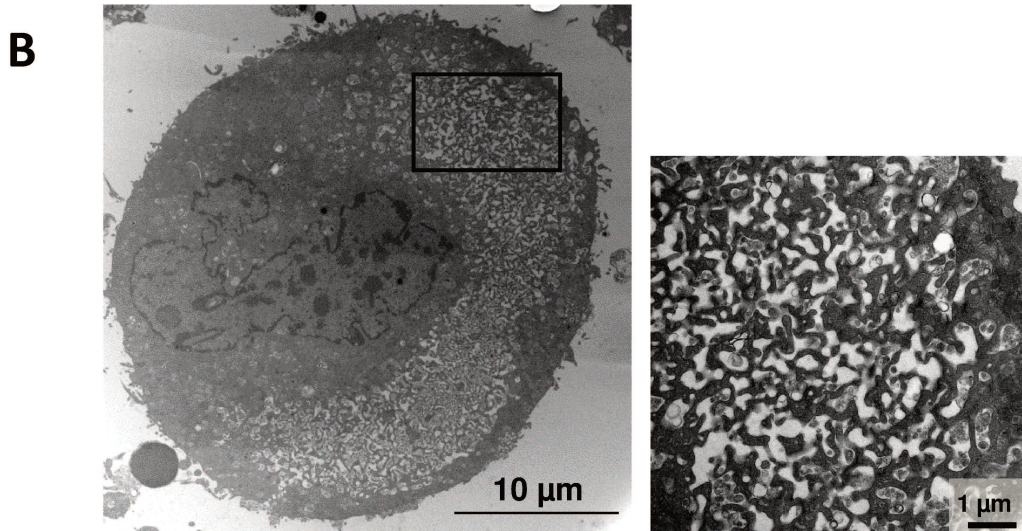
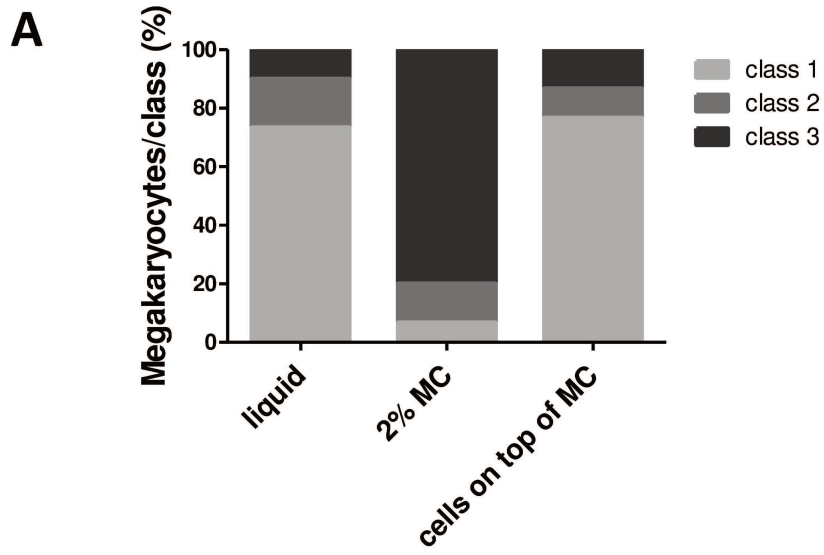


Fig. S3: Ultrastructure of MKs differentiated in 2.5% MC hydrogels.

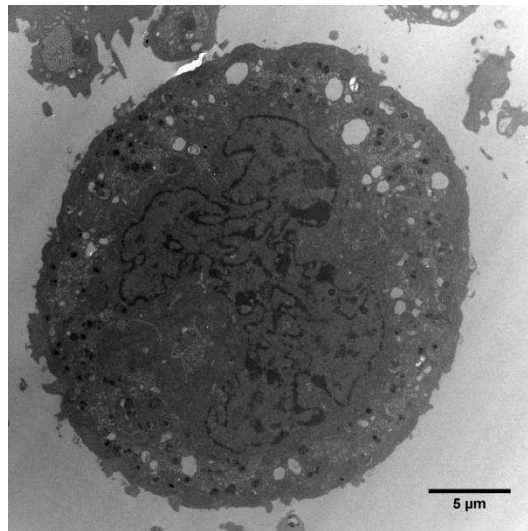
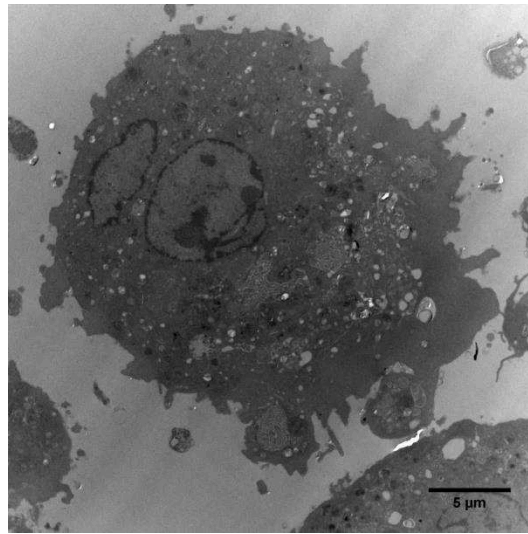


Fig.S4: Differentiation of fetal liver Lin- cells in liquid vs. MC medium

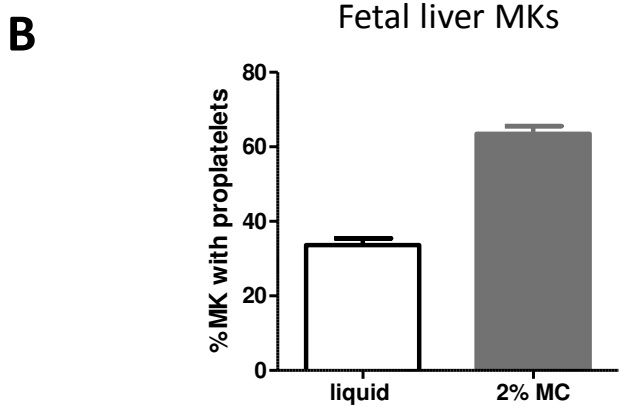
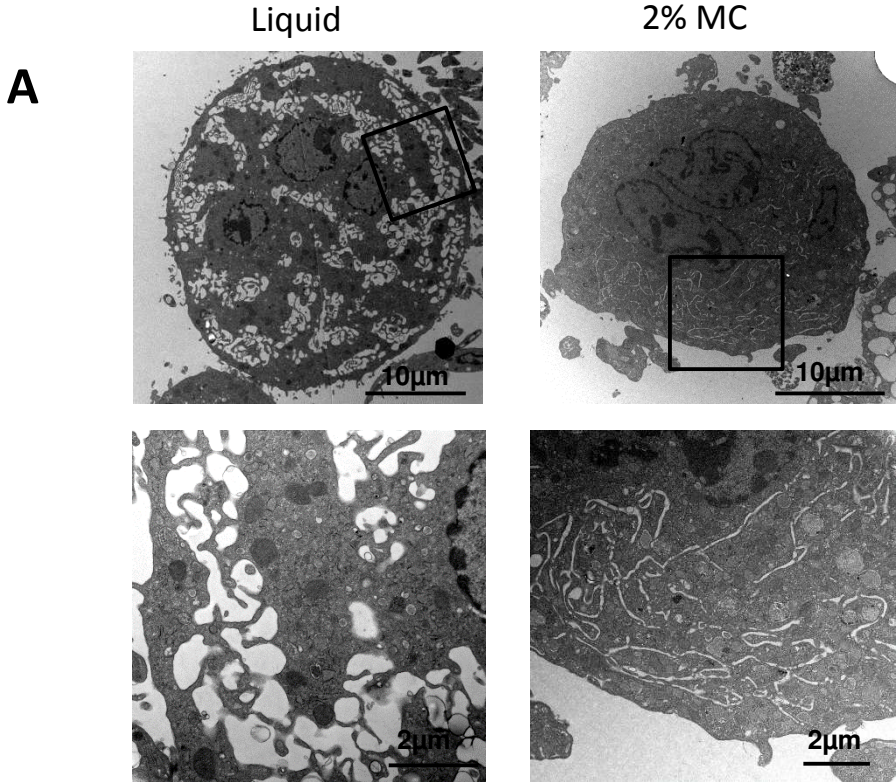


Fig.S5: Effect of hydrogel encapsulation of MKs grown in liquid medium.

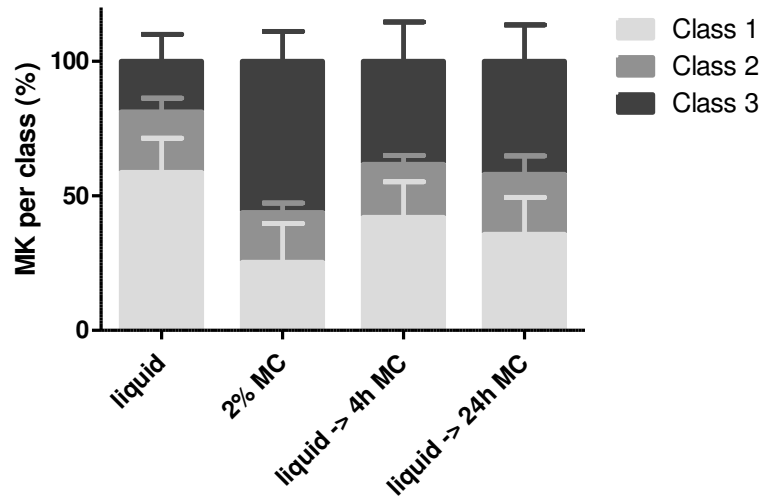


Fig.S6: No difference in platelet-like fragments recovered from liquid or MC-grown MKs

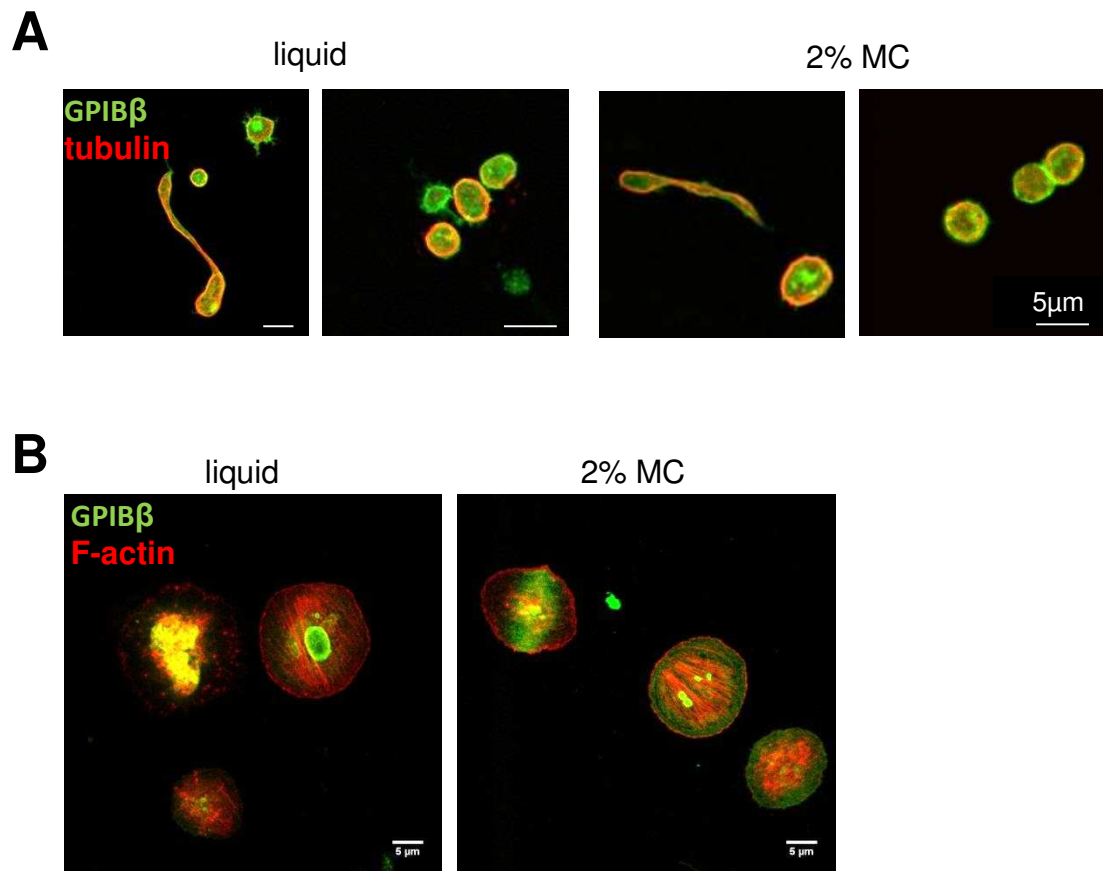
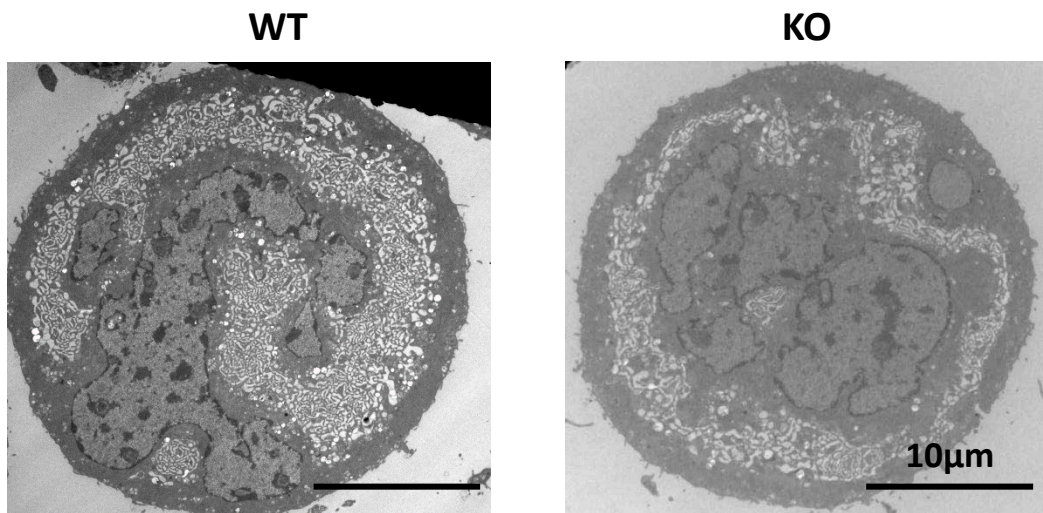


Fig. S7: Ultrastructure of WT and *Myh9*^{-/-} MKs differentiated in liquid culture.



6 Discussion

Nous avons montré que la culture en hydrogel de rigidité faible favorise la maturation et la morphologie du MK : la ploïdie est augmentée, le DMS mieux organisé et la capacité des MKs à produire des proplaquettes est augmentée. Nos observations suggèrent un rôle de la rigidité et des contraintes physiques locales dans la maturation du MK, avec une rigidité optimale située autour de 50 Pa. Une concentration de MC trop importante, de rigidité 10 fois supérieure, semble inhiber la croissance cellulaire. Nous avons également montré que les MKs sont sensibles aux modifications environnementales et capables d'activer des voies de mécanotransduction, comme la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine et la translocation de MKL1.

La MC est un gel physique formé d'interactions hydrophobes et temporaires. C'est cette caractéristique du gel physique qui permet aux MKs de se différencier et de grossir dans le gel. En effet, les liaisons étant temporaires, les forces appliquées par la croissance cellulaire modulent la structure du gel. Lorsque la concentration de MC est trop importante, et même si les interactions conservent leur caractère temporaire, elles sont trop nombreuses et la rigidité qu'elles induisent dans le milieu est plus importante que les forces appliquées par les cellules sur le gel. C'est vraisemblablement pourquoi, dans la condition de rigidité 300-600 Pa, nous observons des cellules plus petites et moins matures. La culture en MC de MKs issus de souris déficientes pour la myosine IIA illustre bien l'impact des contraintes locales exercées par le gel sur le MK. En effet, nous avons observé que ces MKs, tout comme *in situ*, présentent une morphologie dite « fuyante », ils ne sont plus ronds contrairement aux MKs différenciés en milieu liquide, ils ont une morphologie plus étirée avec parfois des zones de constriction, suggérant que la cellule n'exerce pas assez de forces sur l'environnement pour en modifier la structure.

La culture dans l'hydrogel de MC favorise la maturation des MKs, cela a été mis en évidence par l'augmentation de la proportion de MKs de fortes ploïdies ainsi que du nombre de MKs capables d'émettre des proplaquettes et une amélioration de l'organisation du DMS similaire à ce qu'on observe *in situ* dans la moelle. En se basant sur l'observation du DMS nous avons pu montrer que cette meilleure organisation n'est pas uniquement dépendante de la rigidité, car on ne l'observe pas en cultivant les MKs à la surface du gel. L'organisation du DMS est liée à l'encapsulation et à l'application de forces sur toute la surface cellulaire, montrant l'importance de la dimensionnalité (ici 3D) dans la maturation de la cellule. Nous avons observé que lorsque les MKs sont isolés du gel etensemencés en milieu liquide, rapidement (en moins d'une heure) l'organisation du DMS est modifiée, celui-ci n'est plus resserré mais dilaté et ne délimite plus de territoires cytoplasmiques. A contrario, l'expérience

inverse, à savoir l'encapsulation en MC de MKs déjà différenciés en milieu liquide montre une tendance à une réorganisation vers un DMS ayant une morphologie de type « *in situ* ».

L'adaptation de la cellule à son environnement se fait suite à l'activation de voie de mécanotransduction. Nous avons mis en évidence que l'activation de MKL1 induite par la culture en gel et la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine favorisent la génération des proplaquettes. Nous avons également observé une augmentation de la ploïdie lors de la culture en 3D. Celle-ci pourrait être liée à l'activation de MKL1 car il a été observé chez la souris déficiente pour MKL1 une diminution du nombre de MKs de fortes ploïdies et une accumulation de MK 2N (Cheng et al., 2009). Dans nos cultures, on observe même en milieu liquide la présence de MKL1 dans le noyau, bien qu'en quantité moindre que dans les MKs cultivés en gel. Ceci est probablement dû au fait que la voie MKL1/SRF est également activée par le sérum, présent dans notre milieu (10% de sérum). Toutefois dans nos conditions en milieu liquide, MKL1 ne semble pas jouer de rôle majeur puisque l'ajout d'inhibiteur de MKL1 (CCG-1423) n'a aucun retentissement dans la formation des proplaquettes.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un impact de la composante physique de l'environnement sur la maturation du MK mais également sur sa capacité à produire des proplaquettes. De plus, nous avons montré que le MK est une cellule mécanosensible dont l'activation des voies de mécanotransduction participe à sa maturation.

Partie 2 : Rigidité : cytosquelette, proplaquettes et DMS

1 Introduction

Nous avons montré dans la première partie de ma thèse que la rigidité et le confinement induisent des modifications dans l'organisation et la structure du DMS et que celles-ci sont directement liées aux variations de rigidités (Aguilar et al., 2016). Suite à ces observations nous avons émis l'hypothèse d'un remaniement possible du DMS lors de la génération des proplaquettes, remaniement qui serait induit par les changements de rigidité au cours du passage à travers le sinusoïde vers un environnement liquide.

Parmi les acteurs nécessaires à l'extension des proplaquettes, les plus étudiés sont les protéines du cytosquelette qui sont à l'origine des protrusions et les membranes de démarcation qui vont servir de réserve membranaire pour l'élongation des proplaquettes. Le rôle des microtubules dans la formation des proplaquettes est déjà en partie bien connu. Il a été montré en culture liquide (en 2D) que la tubuline participe à l'élongation des proplaquettes ainsi qu'à la formation du bouton plaquettaire. Le cytosquelette d'actine par contre a un rôle moins bien défini, les travaux de l'équipe d'Italiano évoquent la nécessité de l'actine pour former les embranchements proplaquettaires (Italiano et al., 1999; Machlus et al., 2016). Par la suite différents travaux ont montré un lien direct et indirect entre l'actine filamenteuse et le DMS (Eckly et al., 2009; Schulze et al., 2006). Récemment, il a été proposé que la GTPase Cdc42 associée à la polymérisation de l'actine jouerait un rôle dans l'organisation du DMS et la formation des proplaquettes. Cette GTPase a été observée associée aux filaments d'actine soutenant le DMS et son inhibition induirait non seulement une désorganisation du DMS mais également une thrombopoïèse défectueuse (Antkowiak et al., 2016). Cette GTPase ainsi que la GTPase Rac1 a précédemment été montrée comme jouant également un rôle important dans la dynamique des microtubules. En effet, les souris déficientes pour Rac1 et Cdc42 présentent une thrombopénie avec des plaquettes au contenu en granules anormal, associée à un défaut dans la dynamique des microtubules (Pleines et al., 2013).

Quant au DMS, sa biogénèse est en partie connue. Il provient d'une invagination de la membrane plasmique alimenté en lipide par le système de Golgi (Eckly et al., 2014; Jurak Begonja et al., 2015). S'il est admis que l'organisation du DMS dans le MK mature est sous la dépendance du cytosquelette (actomyosine, spectrine,...), on ne sait rien de la manière dont le DMS se comporte au moment de la génération des proplaquettes, et notamment s'il y a une évagination des membranes ou un remaniement, et les mécanismes en jeu ne sont pour l'instant pas connus.

2 Objectifs de l'étude

Dans cette étude en cours, nous voulons d'une part, clarifier le rôle du cytosquelette dans la structuration du DMS induite pas la rigidité du milieu environnant et d'autre part, étudier les mécanismes encore inconnus de sa réorganisation lors des modifications de rigidité, et les conséquences ultérieures sur la génération des proplaquettes.

3 Matériel et méthodes

3.1 Matériel

Le Dapi, le permafluor, le milieu DMEM, le tampon phosphate salin (PBS), et le cocktail d'antibiotiques : pénicilline, streptomycine et glutamine (PSG) proviennent d'Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). La TPO humaine recombinante, le sérum de veau fœtal (SVF), le kit d'enrichissement cellulaire en progéniteurs hématopoïétiques murins (Lin-) sont de Stem Cell Technologies (Vancouver, BC, Canada). L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre la glycoprotéine GPIIb β (Ram1-488 ; Ram1-647) est produit et couplé dans notre laboratoire. L'albumine de sérum bovin (BSA), le diméthylsulfoxyde (DMSO), et le paraformaldéhyde (PFA) proviennent de Sigma-Aldrich (Rueil-Malmaison, France). L'hirudine recombinante (rHV2-Lys47) est offerte par Transgène (Strasbourg, France). La méthylcellulose et la latrunculine A proviennent de R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA). La phalloïdine 555 provient de Cytoskeleton (Denver, Colorado, USA). Le triton X-100 provient de Merck-Millipore (Molsheim, France).

3.2 Souris

Toutes les souris utilisées sont sur fond génétique C57BL/6J. Elles ont entre 2 et 4 mois et proviennent du fournisseur Charles River (L'Arbresle, France). L'utilisation d'animaux dans cette étude a été effectuée dans le respect de la directive européenne 2010/63/UE.

3.3 Culture de progéniteurs mégacaryocytaires

Les fémurs et tibias d'une souris C57BL/6 sont isolés, rincés en alcool 70% et déposés dans un tube contenant du milieu DMEM préchauffé à 37°C. Toutes les manipulations se font ensuite sous hotte à flux laminaire. Après avoir coupé les épiphyses, la moelle est récupérée en faisant passer du milieu DMEM à travers la diaphyse, à l'aide d'une seringue. Les cellules de moelle sont ensuite dissociées par passages successifs du milieu dans des aiguilles 21, 23 puis 25 G. Après centrifugation à 300 g 7 minutes, les cellules sont triées à l'aide du kit de tri magnétique d'enrichissement en

progéniteurs hématopoïétiques (lineage négatif, lin⁻). A l'issue du tri, les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans du milieu : DMEM-PSG 1%, SVF 10%, TPO 50 ng/mL et hirudine 100 U/mL et ensemencées à une concentration de 2.10^6 cellules/mL.

L'ensemencement en MC 2% se fait en encapsulant les cellules dans l'hydrogel dans des seringues, 2.10^6 cellules/mL. Pour cela, la MC à 2% finale est prélevée à l'aide d'une aiguille 18 G. Un coupleur est ajouté sur la seringue. En parallèle, le culot cellulaire est repris dans le milieu de culture concentré (3% antibiotiques, 30% SVF, TPO 150 ng/mL, hirudine 300 U/mL). Les cellules dans le milieu concentré sont déposées dans le coupleur de la seringue, puis une seconde seringue est couplée à la première afin de mélanger et d'encapsuler de manière homogène les cellules dans la MC en réalisant des va-et-vient entre les deux seringues. Lorsque les cellules et la MC sont bien mélangées les deux seringues sont séparées et les cellules encapsulées dans le gel déposées dans le puits de culture, 500 μ L par puits, par simple pression sur le piston de la seringue.

3.4 Formation de proplaquettes *in vitro*

Les cellules ensemencées en MC et les cellules ensemencées en milieu liquide (puits de 500 μ L dans les deux conditions) sont reprises au jour 3 (J3) dans 10 mL de PBS pour diluer la MC. Les cellules sont culotées par centrifugation à 300 g pendant 7 minutes et le surnageant est éliminé. Le culot de cellules est repris dans 1 mL de milieu, ensemencé dans 2 puits de 500 μ L et incubé pour 24h supplémentaires. A J4, 10 plans par puits (fond de puits) sont pris en photos à l'objectif X20.

3.5 Culture en présence d'inhibiteurs du cytosquelette et des dynamines

Les inhibiteurs sont ajoutés à différents temps selon la question posée : i) le 3^{ème} jour de la culture pendant 12-14h, puis les cellules sont lavées et remises en culture en milieu liquide sans inhibiteur, afin de voir l'impact en fin de maturation des cellules mais sans inhibition au moment de l'extension des proplaquettes ; ii) au moment de la resuspension en milieu liquide, donc à partir du moment où les cellules vont étendre les proplaquettes. Les inhibiteurs sont additionnés au milieu liquide ou déposés à la surface de la MC (concentration finale 10 μ M pour la latrunculine A et 2 μ M pour l'inhibiteur des dynamines). Le solvant (DMSO 1/1000, concentration finale) est ajouté aux puits contrôles de la même manière.

3.6 Immunomarquages et microscopie confocale

Pour les cellules en culture liquide et en MC, les cellules sont fixées sous sorbonne, directement dans le puits avec du PFA 4% final (dilution volume/volume) pendant 20 minutes à température

ambiante. Elles sont ensuite récupérées dans 10 mL de PBS, centrifugées à 300 g pendant 7 minutes. Le culot est remis en suspension une nouvelle fois dans 10 mL de PBS et centrifugé à 300 g pendant 7 minutes pour éliminer toute la MC. Les cellules sont ensuite reprises dans 500 μ L de PBS et 100 μ L de suspension cellulaire sont cytospinés par lame pendant 5 minutes à 500 rpm, sur des lames en verre coatées poly-lysine. Les cellules sont perméabilisées pendant 20 minutes dans une solution de PBS-BSA 1%-Triton 0,1%, lavées en PBS, incubées en présence de l'anticorps primaire (concentration 5-10 μ g/mL dilué en PBS-BSA 1%) pendant 1h. Après 3 lavages en PBS, elles sont incubées en présence de l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome (AlexaFluor-555 ou-647) dilué au 1/400^{ème} dans du PBS-BSA 1%. Après 3 lavages supplémentaires en PBS, les cellules sont incubées en présence de l'anticorps anti-GPIIb β directement couplé au fluorochrome AlexaFluor-488 (concentration 10 μ g/mL) dilué en PBS-BSA 1% pendant 30 minutes, lavées 2 fois en PBS, incubées 5 minutes dans une solution de DAPI 1/36000^{ème}, lavées une fois en PBS, une fois en eau avant d'ajouter le milieu de montage (Permafluor). Les lames polymérisent une nuit à température ambiante et à l'abri de la lumière avant d'être stockées à 4°C. Elles sont ensuite observées au microscope confocal (Leica, SP8) et les images analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

3.7 Microscopie électronique à transmission (MET)

Les cellules sont directement fixées dans les puits en ajoutant du glutaraldéhyde (volume/volume) à une concentration finale de 2,5% pendant 1 heure. Elles sont récupérées dans 10 mL de tampon cacodylate et centrifugées deux fois à 300 g pendant 7 minutes (voir protocole Immunomarquages). Les cellules sont ensuite incluses en agarose « low melting » de concentration 2% finale puis le culot est coupé. Après 3 lavages en tampon cacodylate, les cellules sont contrastées pendant 1 heure au tetroxyde d'osmium à température ambiante, lavées une fois en tampon cacodylate puis deux fois en eau bidistillée avant d'être contrastées en acétate d'uranyl 4% pendant 1 heure à 4°C. Les échantillons sont lavés 3 fois en eau bidistillée puis déshydratés dans des bains d'alcools successifs de concentration croissante. Ils sont ensuite déshydratés à l'oxyde de propylène 2 fois 15 minutes avant d'être inclus en résine de type Epon. Les gélules d'Epon sont coupées en coupes ultrafines (100 nm), re-contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb puis observées à l'aide du microscope électronique à transmission CM120 (FEI, Pays-Bas). Les images sont analysées sur les logiciels siViewer et ImageJ.

Dans le cas des coupes de moelles, des fémurs sont isolés, coupés aux extrémités puis à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 21G remplie de glutaraldéhyde 2,5% dilué en tampon cacodylate, la moelle est expulsée de l'os par injection du fixateur. Le boudin de moelle est incubé dans le glutaraldéhyde pendant au moins 1 heure à température ambiante puis lavé en tampon cacodylate et

inclus à plat en agarose « low melting » 2% final. Le boudin de moelle inclus en agarose est ensuite contrasté en suivant le protocole précédent.

3.8 Microscopie électronique à balayage à faisceau d'ions focalisés (FIB-SEM)

Les échantillons sont préparés comme pour la microscopie électronique à transmission (paragraphe précédent) à l'exception d'une étape de contraste supplémentaire au ferrocyanide de potassium 1,5%. Les échantillons sont observés dans un microscope Helios NanoLab (FEI) et les reproductions en 3D sont réalisées à l'aide du logiciel Amira.

4 Résultats

4.1 Le cytosquelette d'actine participe à l'effet positif de la culture en 3D sur la formation des proplaquettes

Pour comprendre comment la rigidité participe à l'organisation du DMS et aux remaniements induits par les changements de rigidité du milieu, nous nous sommes tout d'abord intéressés au rôle du cytosquelette d'actine. Nous avons évalué son rôle lors des phases tardives de la maturation des MKs en milieu liquide et en hydrogel. Un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, la latrunculine A, a été ajouté de manière transitoire pendant 14h, puis les cellules remises en suspension et lavées avant le réensemencement en milieu liquide pour analyser la libération des proplaquettes. L'inhibition de la polymérisation d'actine dans les conditions où les MKs sont encore contraints par la rigidité du gel diminue la proportion de MKs formant des proplaquettes sans modifier leur morphologie (Figure II-1A). Ces observations suggèrent que l'actine joue un rôle dans les phases tardives de la maturation du MK en hydrogel, et on peut imaginer qu'elle est essentielle au maintien de l'organisation du DMS dans un milieu confiné. Une deuxième hypothèse, non exclusive, est que l'actine jouerait un rôle dans le remaniement des membranes, et que ce remaniement favoriserait ensuite l'extension des proplaquettes. En parallèle, nous avons voulu vérifier le rôle de l'actine au moment de l'extension des proplaquettes. Pour cela la latrunculine A a été ajoutée à J3, après le réensemencement en milieu liquide. Nous observons que l'inhibition de l'actine au moment de la formation des proplaquettes non seulement diminue le nombre de MKs formant des proplaquettes mais modifie également la morphologie des proplaquettes, notamment en empêchant la formation d'embranchements (Figure II-1B). Ces données confirment les observations précédentes de l'équipe d'Italiano (Italiano et al., 1999).

4.2 Les contraintes physiques influencent l'organisation du DMS *via* des mécanismes actifs

Nous avons montré précédemment que les contraintes locales exercées par le gel de MC sur les MKs induisent des modifications de l'organisation du DMS, avec une dilatation de l'espace inter-DMS en coupe ultrafine et observation TEM, associée à une perte des territoires cytoplasmiques. Ces modifications ne sont pas figées dans le temps mais évoluent et sont en partie réversible lors des changements de rigidités de l'environnement, et sont également observées lorsque des MKs matures de moelle sont sortis de leur environnement natif et incubés en milieu liquide (Aguilar et al., 2016). Ces observations pourraient résulter soit d'un phénomène actif avec un remaniement des membranes, soit d'un phénomène passif potentiellement lié à l'entrée massive de liquide dans l'espace inter-membranaire du DMS, car le DMS provenant d'une invagination de la membrane plasmique est toujours ouvert sur l'extérieur.

4.2.1 Le DMS se remanie en fonction de la rigidité du milieu

Pour vérifier cette dernière hypothèse, des progéniteurs mégacaryocytaires lin⁻ ont étéensemencés pendant 3 jours en milieu liquide ou en MC 2%. Le troisième jour, les propriétés viscoélastiques du gel de MC ont été perturbées 15 minutes avant fixation mais sans aucune dilution du milieu. Le maillage du réseau est soit perturbé mécaniquement par le mélange du gel à température ambiante, soit liquéfié par diminution de la température (mise sur glace pendant 10 minutes) ce qui entraîne une perte des nœuds d'interactions faibles formant le maillage, puis mélangé (Figure II-2). Les immunomarquages des cellules différenciées en milieu liquide et en MC 2% ont permis de différencier 3 classes de morphologies de DMS dans nos cultures (classes établies dans l'étude précédente (Aguilar et al., 2016)). Les MKs de classe 1 ont un DMS absent ou très peu développé, contrairement aux MKs de classe 3 présentant un DMS très développé et délimitant des territoires cytoplasmiques, les MKs de classe 2 présentent un phénotype intermédiaire. Nous retrouvons une majorité de MKs de classe 1 dans la condition liquide et une majorité de MKs de classes 2 et 3 dans la condition MC 2%, confirmant que la rigidité influence l'organisation du DMS. Pour les deux conditions dans lesquelles le maillage du réseau a été perturbé et donc les propriétés viscoélastiques, la proportion de MKs de classes 2 et 3 diminue au profit de la classe 1, indiquant une réorganisation du DMS. Sur cette première expérience, il ne semble pas y avoir de différences entre le mélange à température ambiante et le mélange sur glace. Il est important de noter qu'entre le moment où le puits est mélangé et la fixation, le temps écoulé est très court, maximum 15 minutes, ce qui indique que le remaniement des membranes du MK est un phénomène très rapide. Comme cité précédemment, des observations effectuées en

microscopie à transmission montrent un DMS dilaté et vacuolaire dans les MKs sortis d'un environnement rigide etensemencés en milieu liquide (Figure II-3, bas).

4.2.2 Le remaniement du DMS est un phénomène actif

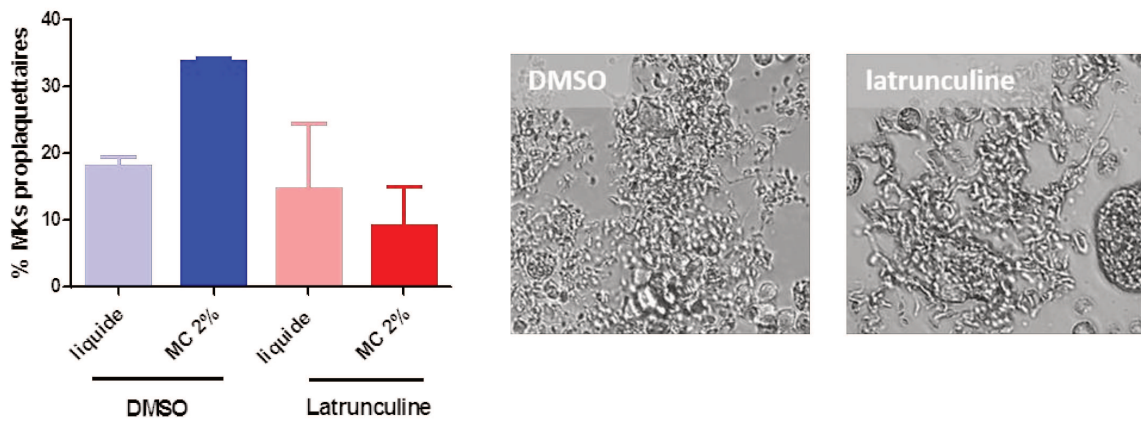
La question que nous nous sommes posés alors était de savoir si l'aspect vacuolaire observé en microscopie électronique résultait simplement de la dilatation de l'espace inter-DMS, ou bien si les changements de rigidité entraînaient des réorganisations complexes du réseau de membranes. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage à faisceau d'ions focalisés aussi appelée FIB-SEM qui nous permet d'étudier l'organisation tridimensionnelle du DMS. Comme précédemment décrit, nous observons que les MKs différenciés en culture, dans un milieu liquide (Figure II-3, haut), présentent un DMS dilaté et ne délimitant pas de territoires cytoplasmiques. Toutefois ce DMS est entièrement continu (imagé par une seule couleur). De manière similaire, les MKs différenciés au sein de la moelle (Figure II-3, milieu) présentent un DMS continu en totalité. En revanche, ce DMS est beaucoup plus resserré et délimite des territoires cytoplasmiques. Par contre, les MKs de moelle ayant été isolés de leur environnement et resuspendus en milieu liquide pendant 2h subissent un remaniement du DMS. Celui-ci apparait désorganisé en comparaison des MKs natifs. Outre le fait qu'il soit dilaté et ne délimite plus de territoires cytoplasmiques comme nous l'avions déjà décrit, le réseau de membrane n'est plus continu. On observe en effet différents réseaux de membranes indépendants, non connectés et figurés par des couleurs différentes (Figure II-3, bas). Ces observations indiquent l'existence de réels remaniements de membranes induits lorsqu'il y a modification de la rigidité du milieu.

4.2.3 Rôle des dynamines

Ces remaniements pourraient favoriser la génération des proplaquettes. En effet, le DMS passant d'un état où il est totalement continu à un état où il est discontinu laisse penser qu'il existerait des mécanismes de fission et de fusion membranaire permettant les changements d'organisation du DMS et l'alimentation de la membrane plasmique au moment de l'extension des proplaquettes. Parmi les candidats potentiels se trouvent les dynamines. Ce sont des protéines motrices impliquées dans les mécanismes de fission membranaire et notamment lors de la cytokinèse, de transports vésiculaires, lors de la phagocytose et dans la formation de structures motrices (podosomes, lamellipodes)(Bender et al., 2015b; Wang et al., 2011). Afin d'étudier le rôle des dynamines dans la formation des proplaquettes, un inhibiteur de dynamine (Dyngo4A) a été ajouté au moment de la remise en suspension à J3. Dans ces conditions, le nombre de MKs générant des proplaquettes est diminué de moitié à la fois dans la condition liquide et dans la condition MC 2% (Figure II-4). Ces résultats restent

pour l'instant préliminaires et il faudra les confirmer avec d'autres inhibiteurs, mais semblent néanmoins suggérer un rôle des dynamines dans la formation des proplaquettes, indépendamment d'un rôle dans le développement du DMS. Les dynamines pourraient participer aux mécanismes de remaniement du DMS et notamment à la formation de vésicules membranaires afin d'alimenter en membranes les proplaquettes en formation. Des travaux sont en cours pour tester ces différentes hypothèses.

A Incubation 14h en présence de latrunculine A puis lavage et remise en suspension



B Incubation 24h en présence latrunculine A au moment de la remise en suspension

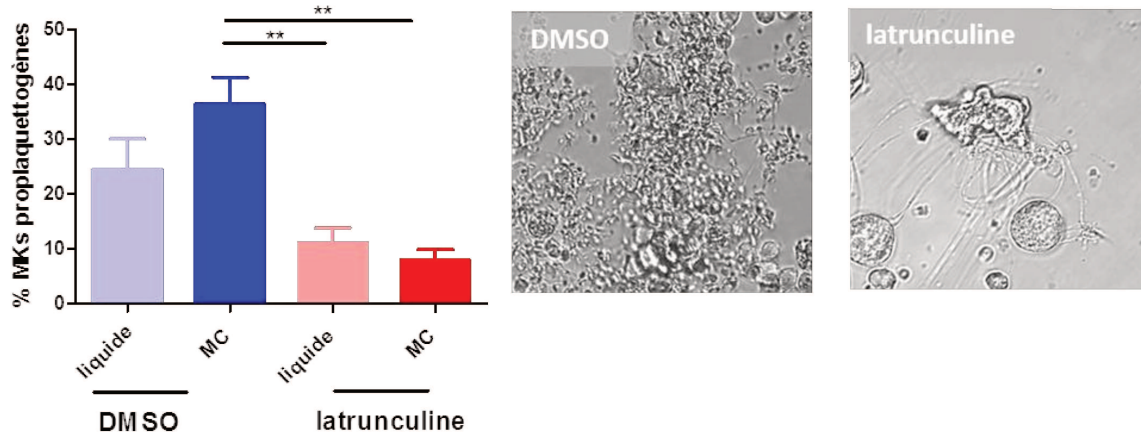


Figure II - 1 : Le cytosquelette d'actine, un acteur de la maturation des MKs et de la formation des proplaquettes

A. Proportion de MKs proplaquettaires dans les cultures liquides et MC 2% après une incubation de 14h en présence de latrunculine A, inhibiteur de la polymérisation de l'actine, puis un lavage et un réensemencement en milieu liquide pour toutes les conditions. L'ajout de l'inhibiteur en fin de maturation diminue fortement le nombre de MKs proplaquettaires mais ne semble pas avoir d'impact sur la morphologie des proplaquettes (n = 2). **B.** Proportion de MKs proplaquettaires dans les cultures liquides et MC 2%, 24h après ajout dans la culture à J3, au moment du réensemencement en milieu liquide, de latrunculine A. L'ajout de l'inhibiteur au moment de la génération des proplaquettes diminue le nombre de MKs proplaquettaires et modifie la morphologie des proplaquettes, celles-ci semblent peu nombreuses et non ramifiées (n=3).

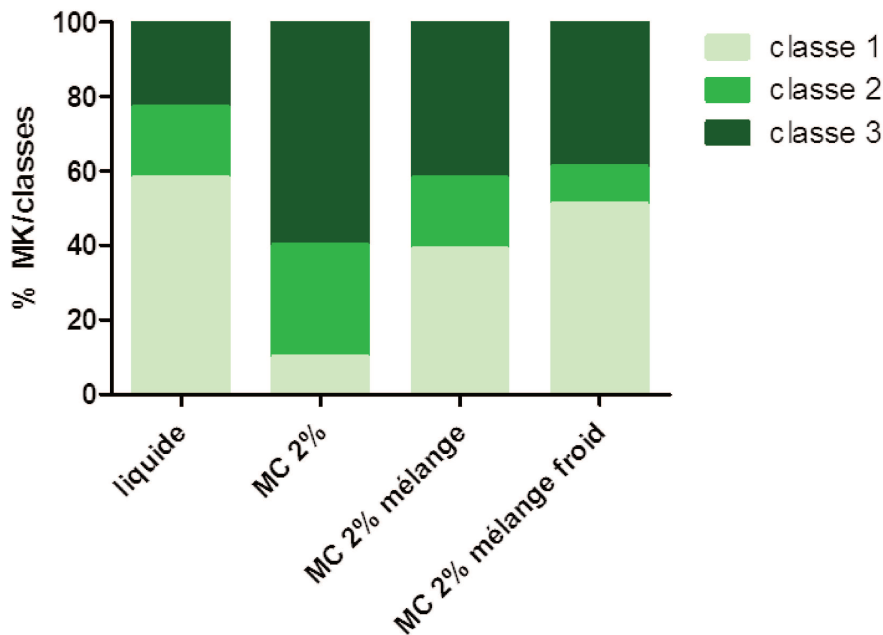
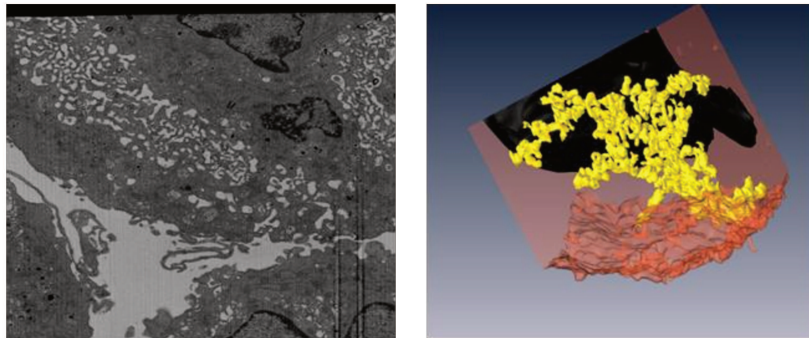


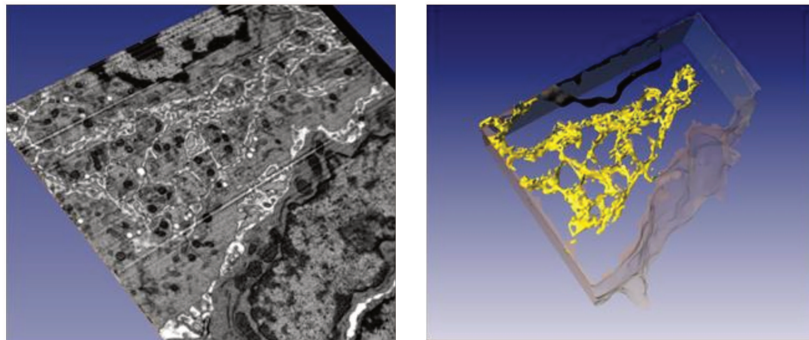
Figure II - 2 : Le DMS se remanie en fonction de la rigidité du milieu

Proportion de MKs présentant un DMS très développé et délimitant des territoires cytoplasmiques (Classe 3), très peu développés voire absents (classe 1) et intermédiaires (classe 2) dans les différentes conditions de culture. Les MKs ont étéensemencés en milieu liquide ou en hydrogel de MC. Dix minutes avant la fixation l'intégrité du gel de MC a été perturbée. Ils ont soit été fixés directement (MC 2%), soit la MC a été mélangée (MC 2% mélange), soit le puits MC a été mis sur glace 5 min pour faciliter la liquéfaction du gel puis mélangé (MC 2% mélange froid). En milieu liquide, il y a une plus grande proportion de MKs avec un DMS peu développé, contrairement à la condition MC 2% dans laquelle la majorité des MKs présentent un DMS de classe 3 ou 2. Le mélange de la MC 2% 10 minutes avant fixation induit une augmentation de la proportion de MK de classe 1 donc présentant un DMS peu développé alors qu'ils se sont différenciés 3 jours en MC 2%. Les résultats sont similaires dans la condition mélangée sur glace. N= 1

MK différencié en liquide



MK différencié *in situ*



MK de moelle resuspendue 2h

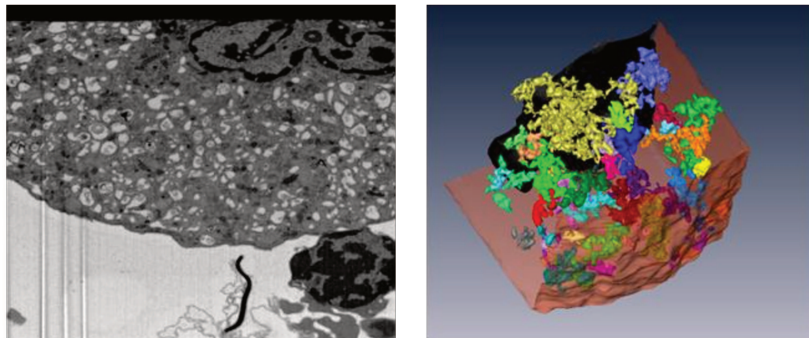


Figure II - 3 : Le réarrangement du DMS est un phénomène actif

Images de microscopie électronique à transmission et reconstruction en 3D obtenue par la technique FIBSEM de fragments de MK. Une partie seulement du DMS a été représentée pour ne pas gêner la compréhension de ces images. Le MK issu de culture liquide présente un DMS continu, dilaté et délimitant très peu de territoires cytoplasmiques, imagé par une seule couleur. Le DMS du MK mature au sein de la moelle est resserré, également continu (une seule couleur) et délimite des territoires cytoplasmiques. En revanche, le MK issue d'une moelle flushée et digérée dont les cellules isolées sont mises en culture pendant 2h, présente un DMS dilaté, ne délimitant plus de territoires cytoplasmiques et non continu (différentes couleurs représentant différents amas de DMS). N= 1 (reconstitutions effectuées par J-Y. Rinckel)

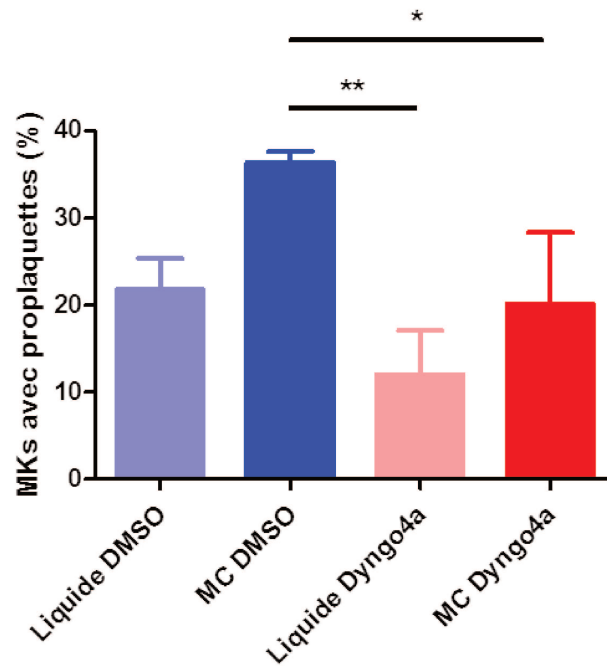


Figure II – 4 : les dynamines, importantes dans la formation des proplaquettes

Proportion de MKs proplaquettaires dans les cultures liquides et MC 2% après une incubation de 24h en présence de Dyngo4, inhibiteur des dynamines. L'ajout de l'inhibiteur à J3, diminue fortement le nombre de MKs proplaquettaires (n=3).

5 Discussion

Nous avons montré que les remaniements du DMS mis en évidence dans la Partie 1 sont des mécanismes non seulement rigidité-dépendants mais également actifs. Le DMS remanié ne forme plus une structure unique et continue mais un ensemble de structures tubulaires voire vésiculaires et dilatés. Des premières expériences semblent indiquer que les dynamines pourraient être impliquées dans les remaniements du DMS lors de la génération des proplaquettes.

D'autres part nous avons montré que le cytosquelette d'actine est certainement impliqué dans les étapes tardives de la maturation du MK en hydrogel mais également, comme l'avait déjà montré l'équipe d'Italiano, dans la morphologie et la formation des embranchements proplaquettaires. Le cytosquelette qui joue naturellement un rôle dans la morphologie du DMS en étant présent sous la membrane plasmique (cytosquelette d'actine majoritairement) (Antkowiak et al., 2016; Schulze et al., 2006) pourrait être un acteur important dans l'organisation et le remaniement de ce réseau membranaire selon la rigidité du milieu (observations effectuées au laboratoire). En effet, nous avons observé que la dépolymérisation de l'actine quelques heures avant que le MK ne commence à former des proplaquettes est sans effet en culture liquide mais annule l'effet positif de la culture en MC sur la capacité future des MKs à étendre des proplaquettes indépendamment de son rôle direct sur l'émission de proplaquettes. Il est possible que l'absence de polymérisation d'actine perturbe le développement final ou la structuration du DMS dans le gel, mais pas en milieu liquide où le DMS est d'emblée moins développé (Aguilar et al., 2016). Par ailleurs, on ne peut exclure également un rôle nécessaire de l'actine filamenteuse lors des mécanismes de remaniement du DMS. Des expériences sont en cours pour répondre à ces différentes questions. Par ailleurs nous avons également confirmé que l'actine filamenteuse est importante dans l'étape finale de formation des proplaquettes en ajoutant les inhibiteurs sur les MKs matures. Comme les travaux d'Italiano et collaborateurs l'ont montré auparavant, l'actine favoriserait l'extension des proplaquettes, ainsi que la formation des embranchements (Italiano et al., 1999).

Concernant les mécanismes de remaniement du DMS, nos premières données suggèrent un remaniement actif avec formation de réseaux membranaires indépendants, voire de vacuoles. Ces données sont en adéquation avec la théorie de Tablin et Cramer sur la formation des proplaquettes. Dans les années 1990, ces auteurs ont observés en microscopie électronique la présence de vésicules/vacuoles dans les MKs formant des proplaquettes. Ils ont alors proposé que, au moment de former les proplaquettes, le DMS se dilate et forme des vésicules qui vont par fusion avec la membrane plasmique alimenter l'extension proplaquettaire (Cramer et al., 1997; Tablin et al., 1990). Nos observations de MKs natifs mis en suspension en milieu liquide montrent qu'il est également remodelé

par rapport au DMS natif puisque formant des réseaux indépendants. Il faut toutefois mentionner que la limite de résolution du FIB-SEM en xyz est de 5x6x20 nm, ce qui ne permet pas d'exclure que l'on pourrait parfois conclure à tort une séparation de deux réseaux. Cependant quelques vacuoles et petits réseaux clairement isolés et individualisés des autres réseaux sont également visibles, suggérant globalement un remaniement actif et dynamique des membranes. Nos observations semblent ainsi définitivement rejeter la théorie du « gant retourné ». Nous pouvons imaginer que la réorganisation du DMS pourrait être induite par les modifications de rigidité de l'environnement au moment où le MK entre en contact avec le vaisseau et émet les premières protrusions cytoplasmiques à travers la barrière endothéliale vers un environnement liquide. Toutefois l'observation *in vivo* de ce phénomène est difficile notamment du fait de la rareté des événements et la nécessité d'avoir une résolution suffisante pour distinguer les remaniements de membranes et formation de vacuoles, peu envisageable en temps réel avec la résolution de la microscopie optique actuelle.

L'observation du DMS passant d'un état continu à un état discontinu laisse penser qu'il existerait des mécanismes de fission et de fusion membranaire permettant les changements d'organisation du DMS. Afin d'identifier les mécanismes de réorganisation nous avons testé un inhibiteur des dynamines, protéines impliquées dans les mécanismes de fissions membranaires. Ces protéines comprennent des domaines leur permettant d'interagir avec de nombreux composants cellulaires : un domaine GTPase favorisant son interaction avec l'actine, un domaine PRD (proline/arginine-rich domain) à l'extrémité carboxy-terminale interagissant avec les domaines SH3 des protéines associées à l'actine et un domaine d'homologie de la pleckstrine liant les lipides membranaires (Dar and Pucadyil, 2017). Les dynamines polymérisent en formant des hélices autour de la membrane cible, leur activité GTPasique leur fournit l'énergie nécessaire pour déformer la membrane cible jusqu'au point de rupture (fission)(McDargh et al., 2016). Les trois dynamines sont exprimées par le MK mais les dynamines ayant été étudiées dans la mégacaryopoïèse sont les dynamines 2 et 3 (Bender et al., 2015b; Wang et al., 2011). La dynamine 3 est localisée au contact du DMS associée à la myosine IIA suggérant un rôle de la dynamine en synergie avec la myosine dans les remaniements membranaires du DMS et l'adressage des membranes à la membrane plasmique. La dynamine 3 interagit avec le PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) phosphatidylinositol retrouvé principalement au niveau de la membrane plasmique, mais également au niveau du DMS. De manière générale le PIP2 aurait un rôle dans le recrutement de protéines associées aux vésicules de clathrine dans les mécanismes d'endocytose (Wang et al., 2011). On peut alors imaginer que les dynamines et notamment la dynamine 3 en interagissant avec le PIP2 favorise le remaniement des membranes du DMS et la formation de vésicules pour alimenter la membrane plasmique. Les premières expériences de génération de proplaquettes en présence d'un inhibiteur des dynamines

(Dyngo4A), uniquement au moment de l'extension proplaquettaire, montrent une diminution de la génération de proplaquettes. Dyngo4A, bien qu'étant un inhibiteur très efficace des dynamines, présente malgré tout des effets non spécifiques (Park et al., 2013) et nos premières observations seront à confirmer avec une combinaison d'autres inhibiteurs.

Globalement l'ensemble de ces premières données suggèrent un remaniement actif des membranes avec mécanisme de fission membranaire au moment de l'émission des proplaquettes. En conclusion, cette étude permettra de mieux comprendre la génération des proplaquettes *in situ* et notamment comment le DMS maintient son organisation et se remanie pour assurer de manière la plus efficace possible son rôle de réservoir membranaire.

Discussion Générale

Ce projet a débuté suite à l'observation de différences morphologiques entre les MKs différenciés au sein du tissu médullaire et ceux différenciés en culture en milieu liquide. La différence la plus importante est celle de l'organisation du DMS, plus serré et délimitant des territoires cytoplasmiques *in situ*, absents *in vitro*, suggérant une maturation inégale entre la condition native et la condition *in vitro* (Partie 1, Article 1 Figure 1). L'observation de MKs issus de souris déficientes pour la myosine IIA différenciés *in situ* et en culture nous a permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle de l'environnement en tant que structure physique et rigide sur la maturation des MKs. En effet, ces cellules différenciées en milieu liquide sont parfaitement rondes comme les MKs issus des souris contrôles alors qu'*in situ*, dû à l'absence de myosine IIA, un défaut de circularité important est observé (Partie 1, Article 1 Figure 6). Notre conclusion face à ces observations est que l'environnement, par sa composition, est rigide et induit des pressions sur la cellule. Dans le cas du MK déficient pour la myosine IIA, la diminution de la tension membranaire de la cellule résultant d'un défaut du cytosquelette cortical d'actomyosine amplifie l'impact de ces pressions sur la cellule, les rendant visible par la déformation cellulaire, phénomène non visible dans la culture liquide car le milieu n'applique que peu de forces sur la membrane cellulaire.

La rigidité est un élément clé de l'environnement, c'est une notion évidente et pourtant rarement prise en compte. La rigidité de la moelle n'est pas facile à estimer. C'est un tissu mou, dynamique, hétérogène, dans lequel chaque composant possède une rigidité propre : l'os, les vaisseaux, les cellules, les protéines de matrices formant des fibres et les GAGs formant un gel. De plus, la dynamique du tissu médullaire est importante, avec un nombre important de cellules en prolifération, différenciation, migration, ce qui induit des variations de rigidité et de contraintes physiques au sein du tissu. Des mesures réalisées en AFM ont estimé une rigidité entre 15 et 300 Pa, ce qui en fait l'un des tissus les plus mous de l'organisme, pris dans son ensemble (Choi and Harley, 2012). Pour recréer la dimensionnalité de la moelle, sa rigidité et les contraintes physiques locales, nous avons choisi de travailler avec un hydrogel de MC. Nous avons montré que la rigidité optimale de l'hydrogel de MC pour la culture de progéniteurs mégacaryocytaires murins est située entre 30-60 Pa, donc dans la gamme de rigidité de la moelle (Partie 1, Article 1 Figure 2). De plus, à cette rigidité les cellules sont capables de se différencier dans des conditions de contraintes physiques proches de celles de la moelle. En effet, nous avons observés, en cultivant des MKs déficients pour la myosine IIA dans cet hydrogel une morphologie anormale et un indice de circularité proche de celui calculé *in situ* (Partie 1, Article 2 Figure 6). Le gel de MC à 2% est donc un bon modèle de culture en 3D, en mimant la rigidité et les contraintes physiques subies par les cellules au sein du tissu médullaire. Il permet ainsi l'étude

de la maturation des MKs issus de modèles de souris présentant un phénotype morphologique anormale (par exemple, déficit en protéines associées au cytosquelette), contrairement à la culture liquide.

Nous avons montré dans la première partie de cette thèse que la culture en 3D n'a pas uniquement un impact morphologique. La culture en hydrogel s'accompagne d'une meilleure maturation des MKs en termes de ploïdie, d'ultrastructure et de génération de proplaquettes. Or la culture en milieu rigide va permettre l'activation de voies de mécanotransduction, et nous avons montré que la voie MKL1 est impliquée. MKL1 est une voie qui permet la transmission d'un signal mécanique en signal biologique *via* la translocation du facteur de transcription MKL1 dans le noyau (Partie 1, Article 1 Figure 7). Cette voie permet d'adapter le programme transcriptionnel de la cellule aux contraintes physiques locales s'appliquant sur la cellule. Les voies de mécanotransduction sont capables non seulement de favoriser la transcription de gènes de protéines du cytosquelette mais également de gènes impliqués dans les processus de différenciation et de maturation. En particulier dans le cas de la voie MKL1, il est possible que la translocation nucléaire et l'activation de ce facteur favorise certains mécanismes de maturation cellulaire comme la ploïdisation (Cheng et al., 2009). La voie MKL1 n'est certainement pas la seule voie activée, et il existe de nombreuses voies de mécanotransduction qui s'entrecroisent, notamment les voies MKL1 et TGF- β (Scharenberg et al., 2014). Les cofacteurs YAP/TAZ sont également connus pour être activés par de nombreux effecteurs des autres voies de mécanotransduction (Dupont et al., 2011; Morgan et al., 2013).

L'observation d'un remaniement du DMS rigidité-dépendant dans la partie 1 a été le déclencheur de la deuxième partie de mon projet de thèse (Partie 1, Article 1 Figure 4). Dans un premier temps, nous avons montré que le cytosquelette d'actomyosine serait impliqué dans les étapes tardives de la maturation du MK dans la culture en hydrogel, avec un retentissement sur la capacité ultérieure à former des proplaquettes. Il nous reste à déterminer si ce retentissement est lié ou non à l'organisation du DMS en territoires cytoplasmiques (Partie 2, Figure II-4). Indépendamment d'un rôle dans l'organisation du DMS, et comme l'avait déjà montré l'équipe d'Italiano, nous avons également observé un rôle de l'actine filamenteuse dans la formation des embranchements proplaquettaires (Italiano et al., 1999). Nous nous sommes intéressés particulièrement à ce cytosquelette car il a été décrit comme étant impliqué dans la morphologie du DMS en étant présent sous la membrane (Antkowiak et al., 2016; Junt et al., 2007; Schulze et al., 2006). Nous supposons que par cette position particulière il pourrait également participer aux remaniements membranaires observés après le passage des MKs d'un milieu rigide à un milieu liquide.

Nous avons en effet montré que l'organisation du DMS caractéristique du MK différencié *in*

situ est spécifique d'un environnement rigide. Rapidement après la sortie des MKs de l'hydrogel de MC (15 min), nous avons observé une dilatation du DMS. Pour les MKs issues de moelle nous avons montré *via* la technique du FIB-SEM, la formation d'un DMS qui n'est plus continu mais semble vésiculaire (Partie 2, Figure II-3). Ce type de structures vésiculaires a déjà été observé en microscopie électronique dans les années 1990 par Tablin et Cramer, sans que les auteurs fassent un rapprochement avec les contraintes physiques environnementales (Cramer et al., 1997; Tablin et al., 1990). Nous avons montré que ce remaniement est un mécanisme actif et non pas le résultat, lors du passage en milieu liquide, de l'entrée massive de milieu entre les membranes du DMS. Nous supposons que le remaniement du DMS nécessite l'action de protéines essentielles dans les mécanismes de fissions membranaires et dans l'ensemble des mécanismes cellulaires impliquant des transports membranaires. La dynamine est l'un des candidats qui nous intéresse, d'autant plus qu'un rôle de la dynamine 3 et 2 dans l'organisation du DMS a été observé (Bender et al., 2015b; Wang et al., 2011) et nos premières expériences semblent impliquer les dynamines dans la génération des proplaquettes (Partie 2, Figure II-4). Ces premiers résultats et les observations en FIB-SEM pourraient valider l'hypothèse de Tablin et collaborateurs de 1990 qui proposaient, lors de la formation des proplaquettes, une alimentation de la membrane plasmique par le DMS sous forme de vésicules. Dans leur hypothèse, un remaniement préalable du DMS est nécessaire, avec une dilatation de celui-ci puis la formation de vésicules dirigées vers la membrane plasmique (Tablin et al., 1990).

La première partie de mon travail a abouti à la publication d'un article sur l'importance de la rigidité de l'environnement sur la maturation des MKs et la production de proplaquettes, accepté dans le journal *Blood*, qui a fait l'objet d'un commentaire et de la couverture du journal (Article 1 et Annexe 2). J'ai également contribué à l'écriture d'un chapitre méthodologique sur la culture de progéniteurs mégacaryocytaires en hydrogel de MC qui paraîtra dans le livre *Platelets and Megakaryocytes Volume 4 ; advanced Protocols and Perspectives* (Annexe 1). Au début de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de participer à la caractérisation de la souris *Pf4-cre*, souris utilisée pour obtenir des lignées spécifiquement déficiente pour un gène cible dans la lignée plaquettaire, dont la lignée de souris *Myh9* utilisée dans l'Article 1, ces travaux ont été publiés dans le journal *Journal of Thrombosis and Haemostasis* en 2014 (Annexe 3).

Les perspectives de ce travail sont d'une part fondamentales en permettant, en effet, de mieux comprendre la mégacaryopoïèse et le rôle de la composante physique de l'environnement dans les mécanismes de la mégacaryopoïèse. La mise en évidence du caractère mécanosensible des MKs et l'impact de l'activation des voies de mécanotransduction sur leur maturation, notamment sur la maturation et l'organisation du DMS, pourrait être un point clé dans la compréhension des

mécanismes de la thrombopoïèse. On peut imaginer que le MK lorsqu'il est au contact du vaisseau sinusoïde ressentirait *via* des mécanosenseurs (cytosquelettes, mécanorécepteurs, etc.) la perte de rigidité de l'environnement. Cette diminution de la rigidité environnementale pourrait activer des voies de mécanotransduction et des mécanismes de remaniements membranaires favorisant le remaniement du DMS sous forme de petits réseaux indépendants, voire de vésicules. Ceci permettrait, après transport vers la membrane plasmique, d'alimenter plus rapidement la membrane plasmique afin de permettre l'extension des proplaquettes de manière optimale.

Enfin, à plus long terme nous pouvons imaginer que ces connaissances nous permettront d'améliorer nos systèmes de culture et de les adapter pour pouvoir produire des MKs plus matures, plus proches des MKs différenciés *in situ* et capables de former de nombreuses plaquettes fonctionnelles et transfusables.

Annexe 1 : Three dimensional culture in methylcellulose-based hydrogel to improve megakaryocyte differentiation

Annexe 1 : Three dimensional culture in methylcellulose-based hydrogel to improve megakaryocyte differentiation

Three dimensional culture in methylcellulose-based hydrogel to improve megakaryocyte differentiation (In preparation)

Abstract

Differentiation and maturation of megakaryocytes (MKs) occur in a 3D environment where cells must constantly adapt to the external physical and mechanical constraints upon differentiation and migration towards sinusoid vessels. In this chapter, we will present methods applied to mouse bone marrow hematopoietic progenitor cells on 1) how to grow megakaryocytes in a 3D environment with a stiffness mimicking that of bone marrow and 2) how to recover the cells for analyzing the differentiation and maturation state through transmission electron microscopy, immunofluorescence, flow cytometry and proplatelet formation. This approach allows to achieve megakaryocytes differentiation whose morphology better resemble those from in vivo with higher capacity to extend proplatelets. In addition, this 3D medium may allow to recover megakaryocyte phenotypes sometimes observed in vivo but absent from classic liquid culture.

Key Words: Megakaryocyte, Lin- bone marrow progenitors, 3D hydrogel culture, proplatelets

1. Introduction

The importance of substrate stiffness for cell differentiation has been increasingly recognized since the seminal study from Engler and co-workers¹, as well as the ability of cells to sense the three-dimensional (3D) topology of their environment². Like other tissues, bone marrow is a 3D structure and despite being one of the softest tissue of the organism, its stiffness has been estimated between 15 to 300 Pa^{3,4}. Cells are in close contact with one another and most of them are migrating towards sinusoid vessels to enter the blood circulation. This inevitably generates additional external constraints on adjacent cells which must cope with these forces. It is now admitted that cells respond to external forces by modulating their cytoskeleton and transcriptional program to adapt their physical environment. Thus, growing hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in traditional

liquid culture appears as a reductionist approach as clearly evidenced by the different ultrastructural morphology developed by megakaryocyte from in vitro culture compared to that of in situ (**Figure 1a-b**). To better mimic the physical constraints of the native environment, we adapted a 3D culture model using methylcellulose-based hydrogel. Hydrogels have been used in the hematological field for several decades. Derived from cellulose by replacement of some hydroxyl residues (-OH) by methoxide (-OCH₃) groups, methylcellulose forms a non-reactive physical gel that tends to gel when increasing temperature, depending on its concentration and degree of methyl substitution. This hydrogel has been widely used to grow hematopoietic cells for colony forming assay in order to quantify the number of hematopoietic progenitors. Despite this historical use, the biological significance of the mechanical impact of hydrogel in cell culture has only been appreciated recently and its use to improve and understand the hematopoietic lineage differentiation is still in its infancy.

Here we describe a method for growing mouse Lin⁻ HSCs in 3D methylcellulose hydrogel in order to improve megakaryocyte differentiation. We have shown that a gel stiffness with a Young modulus in the 30-60 Pa range is optimal for megakaryocyte growth, increase their polyploidization, and improve the demarcation membrane system development and structuration (**Figure 1c**) as well as their further capacity to extend proplatelets once resuspended in liquid medium⁵. In addition, by recreating the mechanical constraints cells may encounter in the bone marrow, we showed that it could help reveal the abnormal phenotype of Myh9 knockout mice present in situ (“leaky” morphology, decreased proplatelet formation) but otherwise not observed in classic liquid culture⁵⁻⁷.

The methods present the isolation of mouse bone marrow Lin⁻ cells, their embedding within MC hydrogel for 3D culture, and the recovery of megakaryocytes for analysis by confocal and transmission electron microscopy, flow cytometry and proplatelet formation capacity.

2. Materials

2.1. General equipment

1. A laminar flow hood
2. Centrifuge (Megafuge 1.0, Heraeus) or equivalent
3. Transfer pipettes
4. Micropipettes P2, P10, P200 and P1000

5. Fume hood and protection equipment for fixative
6. CO₂ cell culture incubator

2.1. Removal of bone marrow and dissociation

1. Dissection instruments.
2. DMEM 1X (#41 966-029, Gibco, LifeTechnologies), supplemented with penicillin, streptomycin and glutamine (PSG) (#1037-016, Gibco, LifeTechnologies)
2. 5-mL syringes (#SS+05S1, Terumo) with 21-gauge needles (#301155, BD Microlance 3) and 50 mL plastic tube for flushing of femurs.
3. 23- (#AN*2332R1, Terumo) and 25- (#300400, BD Microlance 3) gauge needles, and round bottom 10-mL tubes (#184 261 Greiner Bio-one) for marrow dissociation
4. ADAM Automated cell counter, slides (AccuChip 2x: Digital Bio) and AccuStain solutions T and N (Digital Bio). Alternatively, Thoma cell counting chamber and trypan blue to count viable cells.
5. Transfer pipettes

2.2. Lin- magnetic sorting

1. Polystyrene round bottom 5 mL tubes (#352054, Falcon).
2. DPBS 1X (#14 190-094), FBS (#SH30071.01, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), EDTA (#15575-020, Invitrogen), normal rat serum (#13551, Stem Cell Technologies)
3. EasySep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Kit isolation (#19856A, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada).
4. Magnet (#18000, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada).
5. Transfer pipette

2.3. Methylcellulose encapsulation

1. Complete culture medium: DMEM 1X (#41 966-029, Gibco, LifeTechnologies), supplemented with penicillin, streptomycin and glutamine (PSG) (#1037-016, Gibco, LifeTechnologies), TPO (rhTPO, #02822, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and r-hirudin (rHV2-Lys47) (Transgène, Strasbourg, France), FBS.
2. 3% methylcellulose stock solution in IMDM medium (#HSC001, R&D Minneapolis, Minnesota, USA) (**See Note 1**).
3. 1.2-mL Cryotubes (#39 0700, ClearLine, Biosigma,).
4. Aliquot methylcellulose into 1-mL cryotubes and keep at -20°C.

3. 1-mL luer lock syringes (#Z551546-100EA, Sigma-Aldrich) equipped with 18 gauge needle (#1001735825, Sigma-Aldrich) to collect methylcellulose.
4. Luer lock syringe connectors (#11891120, Fisher Scientific).
5. 4-well dish (#144444, thermoScientific)

2.4. Cell resuspension

1. 15-mL plastic tubes.
2. PBS to dilute methylcellulose.
3. Complete DMEM culture medium for cell resuspension in 4-well plates.

2.5. Cell fixation for electron microscopy observation

1. Glutaraldehyde (25% aqueous solution #16110 Electron Microscopy Sciences-EMS, USA), stored at +4°C.
2. Cacodylate buffer: dissolve 21.4g dimethylarsinic acid sodium salt trihydrate (Merck, Germany) and 20 g sucrose (Merck, Germany) in 1L H₂O. Under constant agitation add 1mL of 1M CaCl₂ (Merck, Germany) and 1 mL of 1M MgCl₂ (Merck, Germany). The pH is adjusted to 7.3 and the osmolarity to 306 mOsm/L with an approximate equal amount (13mL) of 1M MgCl₂ and 1M CaCl₂. The final solution is clear and once filtrated (0.2µm filter) is stable at +4°C for up to several weeks.
3. Fixative: 5 % glutaraldehyde final concentration in cacodylate buffer. Warning: fixative vapors and projections are very harmful to the eyes, nose and throat and must be handled into a chemical hood, wearing protective equipment.
4. Agarose type LM-3 Low Melting Point Agar (Electron Microscopy Sciences, USA)
5. A heated centrifuge (2 -16 KCH, Sigma, France)
6. Razor blades
7. A water bath.

2.6. Cell fixation, cytospinning and megakaryocyte membrane immunolabeling

1. Cytocentrifuge, equipped with cytofunnels, filter cards and cytoclips.
2. Paraformaldehyde (#15714, Electron Microscopy Sciences-EMS, USA), stored protected from light.
3. Polysine slides (#J2800AMNZ, ThermoScientific), Cytospin centrifuge (Cytospin 4, ThermoScientific), cytoclips and cytofunnels (#F/CLIPSH and #F/JC304, Microm Microtech).

4. Dakopen (#S2002, Dako) to delimitate cell area.

3. Methods

3.1. Femur and tibia bone marrow cell dissociation

1. Before starting, add 15 mL of DMEM media containing 1% PSG antibiotics into a 50 mL tube to collect bones (**see Note 2**).
2. Disinfect all instruments in 70% (v/v) ethanol to avoid microbial contamination. Use cervical dislocation to euthanize mice and immerse the mouse body in 70% ethanol before removing femurs and tibia under aseptic conditions. Rapidly dissect out the femur and remove adherent tissue. Gently cut away the epiphyses using a sharp scalpel, and briefly immerse bones in 70% ethanol before immersion in DMEM (**see Note 3**).
3. Under the culture laminar flow hood, rinse bones twice in PBS before starting to remove marrow cells. While holding the femur with forceps, flush the marrow into a 50 mL tube using a 5-mL syringe filled with DMEM media containing 1% PSG and equipped with a 21-gauge needle. To achieve this, the extremity of the needle (just the bevel) is introduced into the opening of the bone. Press the plunger with a quick and frank gesture until the marrow has been extracted. Provide 1 mL per tibia and reuse the medium for femurs.
4. Divide the total volume into round bottom 10-mL tubes. Dissociate marrow cells by passing 3 times the flushed marrows through a 21-gauge needle, followed by 3 passages through a 23-gauge needle and finally a single passage through a 25-gauge needle, transferring the cell suspension into 15-mL tubes (**see note 4**).
5. Measure the cell concentration and viability using an automated cell counter (**see note 5**).
6. Prepare M-medium (PBS-FCS 2%, EDTA 1mM).
7. Centrifuge the 15-mL tubes for 7 minutes at 300g. Discard the supernatant and following instructions of the EasySep™ Mouse Hematopoietic Cell Kit isolation resuspend the cellular pellet in M medium to a concentration of 1×10^8 cells/mL. Place the cells in a 5-mL polystyrene round bottom tube, to a maximum volume of 2 mL.
8. Isolate stem and progenitor cells by immunomagnetic negative selection. Add blocking normal rat serum (50 μ L/mL) and label non-hematopoietic stem cells and non-progenitor cells with biotinylated antibodies (CD5, CD11b, CD19, CD45R/B220,

- Ly6G/C(Gr-1), TER119, 7-4) (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Incubate cells on ice for 15 min. Add streptavidin-coated magnetic beads (75 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and incubate on ice for 10 min. If necessary, adjust volume to 2.5 mL with M-medium. Place the tube without its cap inside the EasySep™ magnet. Incubate for 3 min. Without taking the initial tube out of the magnet, transfer its content into a new 5-mL polystyrene round bottom tube. Discard the initial tube and place the new tube, without cap, in the magnet for 3 min. Without taking the tube out of the magnet, transfer the isolated Lin⁻ cells in a new 15-mL tube
9. Prepare complete cell culture medium by adding PSG 1%, FCS 10%, TPO 50 ng/mL hirudin 100 U/mL to DMEM.
 10. Measure the Lin⁻ cell concentration and viability.
 11. Lin⁻ cells are grown at a final $2 \cdot 10^6$ cells/mL in both liquid and methylcellulose conditions. Calculate the required cell suspension volume to achieve the final concentration ($1 \cdot 10^6$ cells per 500 μL -well). Centrifuge cells at 300 g for 7 minutes. For liquid cultures, discard the supernatant and resuspend the cell pellet in complete culture medium. Incubate cells at 37°C with 5% CO₂ in 4-well culture plates in 500 μL per well.

3.2. Cell embedding within MC hydrogel

1. Prepare the methylcellulose.
2. Thaw two 1-mL methylcellulose tubes (1 mL for syringe coating and 1 mL for cell encapsulation) (see **Note 6**).
3. Draw 1 mL methylcellulose into a luer lock 1-mL syringe equipped with an 18-gauge needle to coat the syringe's walls (**Figure 2a**). Totally expel the methylcellulose.
4. Using the same syringe and needle, aspirate the appropriate volume of methylcellulose (333 μL per 500- μL well to have a final concentration of 2%).
5. Remove the needle, place a luer lock syringe connector at the end of the syringe (**Figure 2b**) and attach a second luer lock 1-mL syringe to the first one (**Figure 2c**).
6. Distribute equally the methylcellulose volume between the two syringes and disconnect them.
7. Prepare the cell resuspension medium. The cell resuspension medium volume is calculated so as to achieve a final methylcellulose concentration of 2% (corresponding to a 1.5 fold dilution of the initial 3% methylcellulose concentration).

8. Prepare DMEM containing, for a final volume of 500 μL at 2% of methylcellulose; 50 μL SVF 100%, 5 μL TPO 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 μL hirudin 10 000 U/mL and 5 μL PSG 100%.
9. Prepare the cells suspension.
10. Calculate the required cell suspension volume to achieve the final concentration ($2 \cdot 10^6$ cell/mL). Centrifuge cells at 300 g for 7 minutes. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in complete DMEM medium prepared above so as to achieve an initial cell concentration of $6 \cdot 10^6$ cell/mL (see **Note 7**).
11. Very carefully add 167 μL cell suspension directly through the connector (**Figure 2d**) and reconnect the two syringes (see **Notes 8**).
12. Homogenize the cells by mixing the methylcellulose medium and the cell suspension together with back-and-forth movements between the two syringes (**Figure 2e**) (see **Notes 9**).
13. Recover the cells and medium into one syringe and disconnect the 2 syringes, leaving the connector to the empty syringe. Carefully expel the syringe content (methylcellulose medium and cells) into one well of a 4-well plate (**Figure 2f**).
14. Incubate at 37°C with 5% CO_2 .

3.3. Cell analysis

3.3.1. In situ cell fixation and recovery for electron microscopy observation

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

1. Fix cells directly into the hydrogel by gently adding 1 volume of 5% glutaraldehyde in cacodylate buffer on top of the gel (2.5% glutaraldehyde final concentration), without disrupting the hydrogel. Incubate for 1h at room temperature. Pre-heat the fixative at 37°C .
2. Using a transfer pipette, dilute the hydrogel in 10 mL of cacodylate buffer and place in 15-mL tubes. Proceed carefully with several up-and-down pipettings so as to homogeneously dilute the methylcellulose gel without being harmful to the cells.
3. Centrifuge cells at 300 g 7 minutes then proceed to the electron microscopy procedure or keep cells at 4°C .
4. Discard the supernatant, add 1 mL of cacodylate buffer and transfer the cell suspension in a 1.5 mL Eppendorf tube

5. Wash 3 times the cell pellet by centrifugation in cacodylate buffer and incubate samples in waterbath at 43°C
6. Weight and dilute agarose “low melting” in cacodylate buffer at 2% final concentration
7. Add agarose 2% on the cell pellet and resuspend cells in the hot agarose with a transfer pipette
8. Centrifuge cells in agarose at 37°C 2 min 16000g
9. Put tubes on ice to solidify the agarose
10. With a razor blade cut the tube above the cell pellet, then cut the cell pellet in 4 pieces
11. In small bottle filled with cacodylate buffer add the pellet pieces.
12. Proceed for inclusion in Epon resin. Detailed description of Epon inclusion and sectioning are found in Methods in Molecular Biology, Volume 3, Chapter 13 “Characterization of Megakaryocyte Development in the Native Bone Marrow Environment”.

3.3.2. In situ cell fixation and recovery for immunolabeling

1. Under a fume hood, fix cells directly into the hydrogel by gently adding on top of the gel 1 volume (500 µL/well) of 8% paraformaldehyde (4% paraformaldehyde final concentration, pre-heat the fixative at 37°C.), without disrupting the hydrogel. Incubate for 20 minutes at room temperature.
2. Using a transfer pipette, dilute the hydrogel (one well, 500 µL) in 10 mL PBS and place in 15-mL tubes. Proceed carefully with several up-and-down pipettings so as to homogeneously dilute the methylcellulose gel without being harmful to the cells. Centrifuge cells at 300 g 7 minutes.
3. Discard the supernatant and resuspend cell pellet in 10 mL PBS (**see Note 10**). Centrifuge cells again at 300 g 7 minutes.
4. Discard the supernatant and resuspend in PBS in the initial gel volume (in our case 500 µL per culture well).
5. Prepare the cytofunnels. Attach the cytofunnels to appropriately annotated slides and a filter card with cytoclips and insert into the cytospin (**Figure 3a-c**).
6. Carefully homogenize the cell suspension. Pipette 100 µL cell suspension into each cytofunnel, so that 4-5 slides are obtained per 500 µL well culture. Cytospin at 500 rpm for 5 minutes. Discard cytofunnels and recover the slides (**Figure 3d**). Using a marker, immediately surround the cell spot at the back of the slide, and with the dakopen around

the spot and immerse the slide in PBS (see Note 10). Proceed for the immunolabeling or keep slides at 4°C immersed in PBS for up to a few days.

3.3.3. Cell recovery for flow cytometry analysis

1. Perform control liquid cultures in 28kPa ESS-coated dishes to limit cell adhesion and recover all the cells (**see Note 12**). These dishes accommodate a total volume of 2 mL (**see Note 13**). Methylcellulose cultures are performed in classic 4- or 24-well culture dishes in a volume of 500 μ L.
2. Using a transfer pipette, dilute the hydrogel (one well, 500 μ L) in 10 mL PBS and place in 15-mL tubes. Proceed carefully with several up-and-down pipettings so as to homogeneously dilute the methylcellulose gel without being harmful to the cells. Centrifuge cells at 300 g 7 minutes.
3. Discard the supernatant and resuspend cell pellet in 10 mL PBS (**see Note 14**). Centrifuge cells at 300 g 7 minutes
4. Resuspend cell pellet in appropriate volume to perform your immunolabeling.

3.3.4. Cell resuspension for proplatelet analysis

The physical constraints exerted by the methylcellulose hydrogel inhibit the extension of proplatelets. In order to analyze proplatelet formation, the cells have to be re-seeded in liquid medium. The cells are resuspended at day 3, when control cells in liquid medium have not yet extended proplatelets, otherwise centrifugation may alter already extended proplatelets and bias the final results. Accordingly, make sure to proceed exactly the same with all samples, including the cells from the control liquid wells, so as to have real comparable controls. All the procedure is performed under sterile conditions using a laminar flow hood.

1. Pre-warm culture medium (DMEM-PSG 1%, SVF 10%, TPO 50 ng/mL hirudin 100 U/mL).
2. Prepare 10 mL of PBS at 37°C in a 15 mL tube for each 500 μ L well to re-seed.
3. Very gently resuspend each well in the 10-mL PBS. Several up-and-down movements are necessary to dilute the methylcellulose.
4. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 300g.
5. Discard the supernatant and resuspend each pellet in 1 mL culture medium so as to obtain a final cell concentration of $1 \cdot 10^6$ cells/mL (**see Note 13**).

6. Re-seed 500 μ L per well and incubate cells at 37°C, 5% CO₂. (2 wells/condition)
7. At day 4, randomly acquire images from the bottom of the well using bright field microscopy and the 20X objective (**Figure 4**). Usually 10 fields are acquired, representing approximately 150 to 300 megakaryocytes per condition (2 wells). The proportion of megakaryocytes extending proplatelets is enumerated on the photographs.

4. Conclusion

Recreating the 3D bone marrow environment with appropriate stiffness is essential for evaluating in vitro the megakaryocyte differentiation processes as close as possible to the native ones. In this chapter, we have described a 3D culture model using methylcellulose-based hydrogel which represents a more relevant system than liquid culture for the study of cell behavior during megakaryocyte differentiation. Of interest, this culture model, by mimicking the stiffness of the bone marrow, forces the cells to adapt to these external forces through modulation of their cytoskeleton and mechanotransduction pathways. As a consequence, anomalies of the cytoskeleton that could go unnoticed in liquid culture are revealed in a constraint environment, such as observed for Myh9^{-/-} megakaryocytes⁵. Extended to human hematopoietic progenitor cells, it could be an alternative way to evaluate samples from patients with abnormal platelet biogenesis related to unrecognized cytoskeletal alterations.

5. Notes

1. Methylcellulose viscoelastic properties, and hence stiffness, vary according to the degree of substitution of hydroxyl residues by methyl residues, the length of the polymer chains, the concentration of the polymer and the temperature. We characterized the viscoelastic properties of the methylcellulose from R&D and found that at 37°C with the optimal concentration of 2%, the Young Modulus was in the 30-60 Pa range. These properties may vary with a methylcellulose from another distributor and should be checked.
2. It is better to warm your medium at 37°C before the experiment.
3. Don't need to cut all epiphyses. To facilitate marrow flushing, cut only epiphyses of the ankle side for the tibia and of the hip side for the femur. This will allow the

needle to be retained by epiphysis of the knee side of each bones and it will decrease the risk to eject your bone from the needle during the flush.

4. Place the end of the needle on the tube wall while dissociating the flushed marrow to avoid formation of air bubbles and thus shear stress.
5. An ADAM Automated cell counter is used with AccuChips and AccuStain solutions T and N to count viable cells. Alternatively, a Thoma cell counting chamber and trypan blue can be used to count viable cells.
6. Use two different aliquots of methylcellulose, one for the coating and one for the filling of the syringe because the methylcellulose used for the coating contains undesirable bubbles after the ejection.
7. Make sure to discard all the supernatant because the volume of liquid added to methylcellulose change its concentration. For an optimal concentration of 2% with the methylcellulose from R&D Systems (ref HSC001), the volume of liquid to add (medium, antibiotics and cytokines included) is 167 μL in 333 μL of methylcellulose (solution stock 3%) to obtain 500 μL at 2% and a final cell concentration of 1.10^6 cells/mL.
8. Make sure not to introduce air bubbles in the syringe when adding the cell suspension. Carefully reconnect the syringes without losing methylcellulose or cell suspension in the screw thread.
9. Mix back-and-forth about ten times to homogenize. Do not mix too vigorously as it would create undesirable small air bubbles.
10. Don't discard all the supernatant. Some hydrogel may not be fully diluted or may remain on the bottom walls of the tube and be pelleted during centrifugation. Discard the liquid above the cell and methylcellulose pellet (leave about 2 mL so as not to lose cells). Add a further 10 mL PBS to resuspend cells and dilute and eliminate all methylcellulose.
11. Add PBS to prevent dehydration and to maintain the cell structure
12. In classic dishes adherent cells will stay attached on the plastic whereas in methylcellulose condition all cells are recovered. To recover all cells from the control liquid condition, so as to be comparable with the methylcellulose condition, we use ESS coated dishes to prevent cells to adhere.
13. In ESS coated dishes, cells are seeded at 2.10^6 cells/mL as in classic liquid condition, but the seeding volume is 2 mL because of the dish surface larger than a well in a 4-well dish

14. Don't discard all the supernatant if some hydrogel is not fully diluted and pellet during centrifugation. Discard the liquid above the cell and methylcellulose pellet (leave about 2 mL so as not to lose cells). Add a further 10 mL PBS to resuspend cells and to dilute and eliminate all methylcellulose.

Acknowledgments

The authors wish to thank Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript. This work was supported by INSERM, EFS Grand-Est and the Société Française d'Hématologie.

Disclosure of Conflict of Interests: The authors have no conflict of interests.

References

1. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-689.
2. Jansen KA, Donato DM, Balcioglu HE, Schmidt T, Danen EH, Koenderink GH. A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(11 Pt B):3043-3052.
3. Choi JS, Harley BA. The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials*. 2012;33(18):4460-4468.
4. Shin JW, Buxboim A, Spinler KR, et al. Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2014;14(1):81-93.
5. Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, et al. Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood*. 2016.
6. Eckly A, Rinckel JY, Laeuffer P, et al. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2243-2251.
7. Eckly A, Strassel C, Freund M, et al. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood*. 2009;113(14):3182-3189.

Legend to figures.

Figure 1. Importance of the extracellular medium stiffness for optimal DMS development and organization.

TEM images showing the ultrastructure of whole megakaryocytes (left) and close up view of the cytoplasm containing the DMS (right). a) In situ mature megakaryocytes presenting an extensively developed DMS with tightly apposed membranes that delineate cytoplasmic territories. b) Megakaryocyte grown in liquid culture, presenting with a dilated inter-DMS space and few cytoplasmic territories. c) Megakaryocyte grown in methylcellulose hydrogel, presenting with a closely apposed DMS delineating cytoplasmic territories, resembling the in situ ones.

Figure 2. Cell embedding in methylcellulose hydrogel.

a) Coat a luer lock syringe with methylcellulose hydrogel and fill the syringe with methylcellulose medium. b and c) After removing the needle, add the connector. d) Connect a second empty syringe to the first one containing methylcellulose hydrogel and distribute equally between the 2 syringes, then disconnect. e) Add the cell suspension into the connector before connecting again the 2 syringes to homogenize the cells in the methylcellulose. f) Seed the cells embedded in methylcellulose into a well of 4-well (or 24-well) plate.

Figure 3. Cell cytopinning.

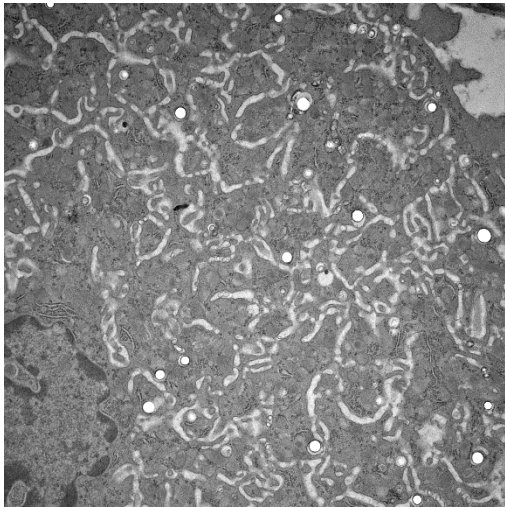
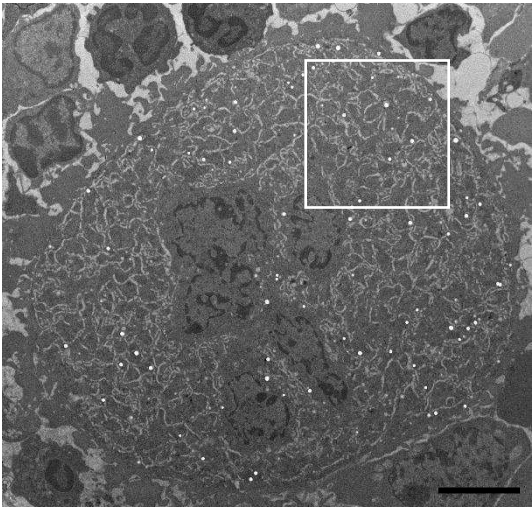
a) Use a cytopin centrifuge to deposit a monolayer of cells on a slide. b and c) The sample chambers are assembled by placing a disposable cytofunnel onto a slide, attached with a reusable cytoclip. d) Place the sample chambers into the rotor and add the cell suspension into the funnels. e) When recovering the slides, mark the cell spot area with a marker.

Figure 4. Proplatelet observation.

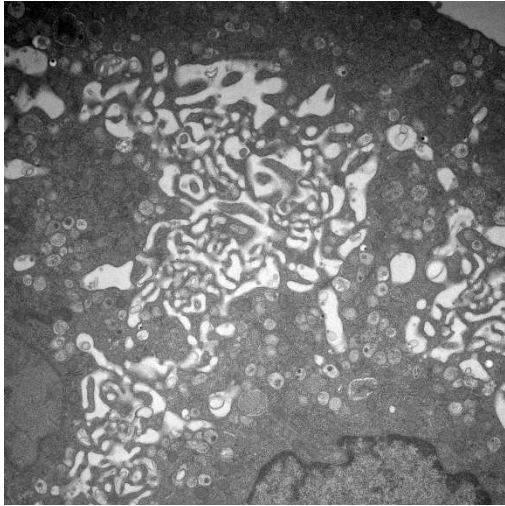
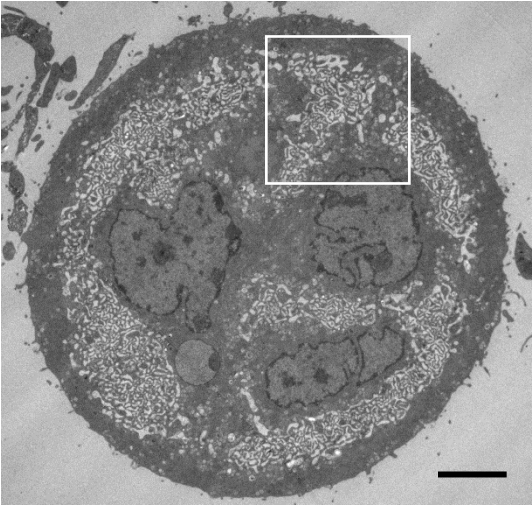
Pictures of the bottom of the well taken 24h following resuspension of the cells into liquid medium.

Figure 1

a *In situ*



b *In vitro* liquid culture



c *In vitro* methylcellulose culture

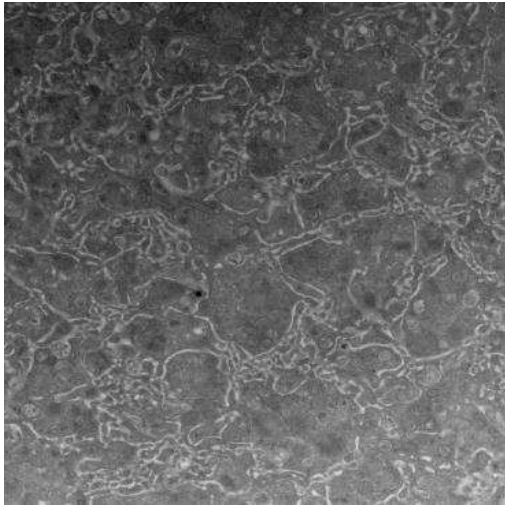
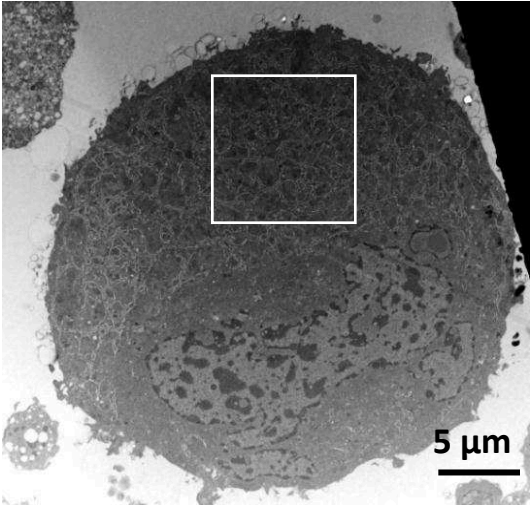


Figure 2

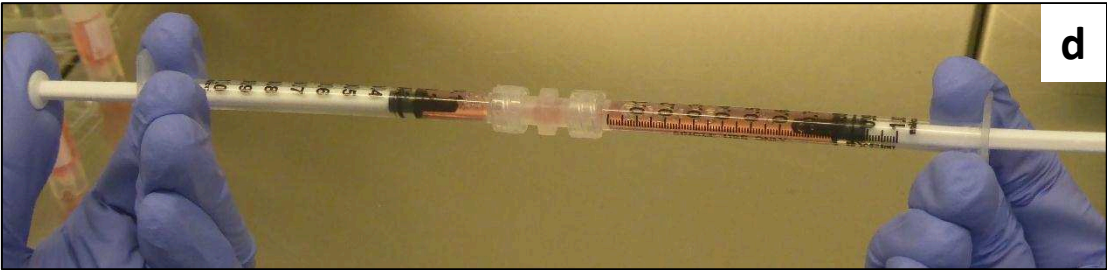
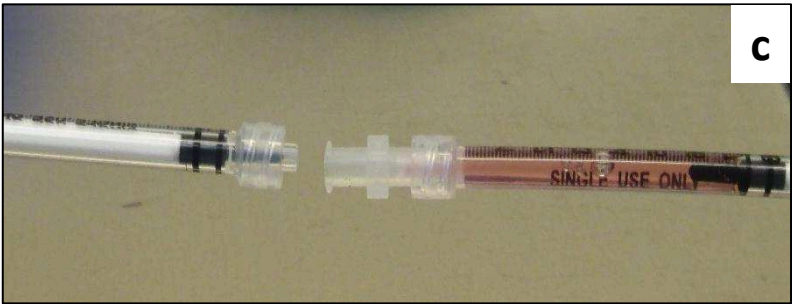
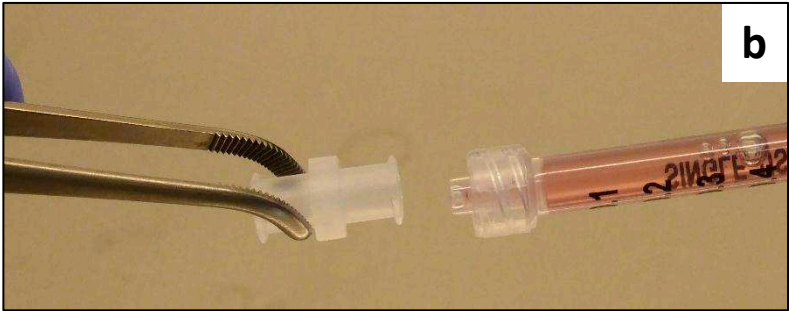


Figure 3

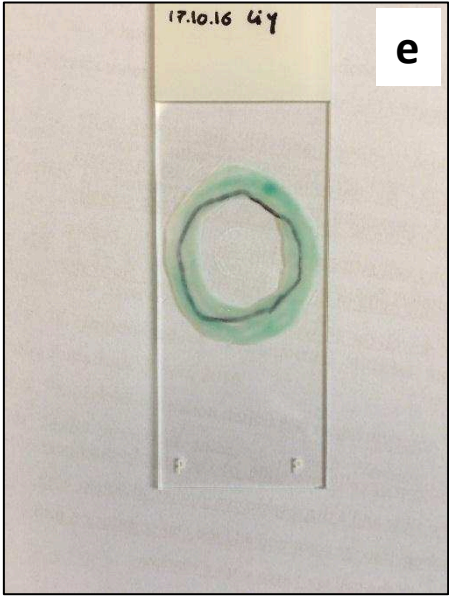
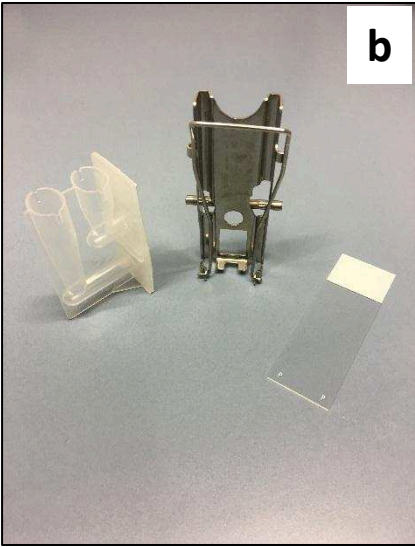
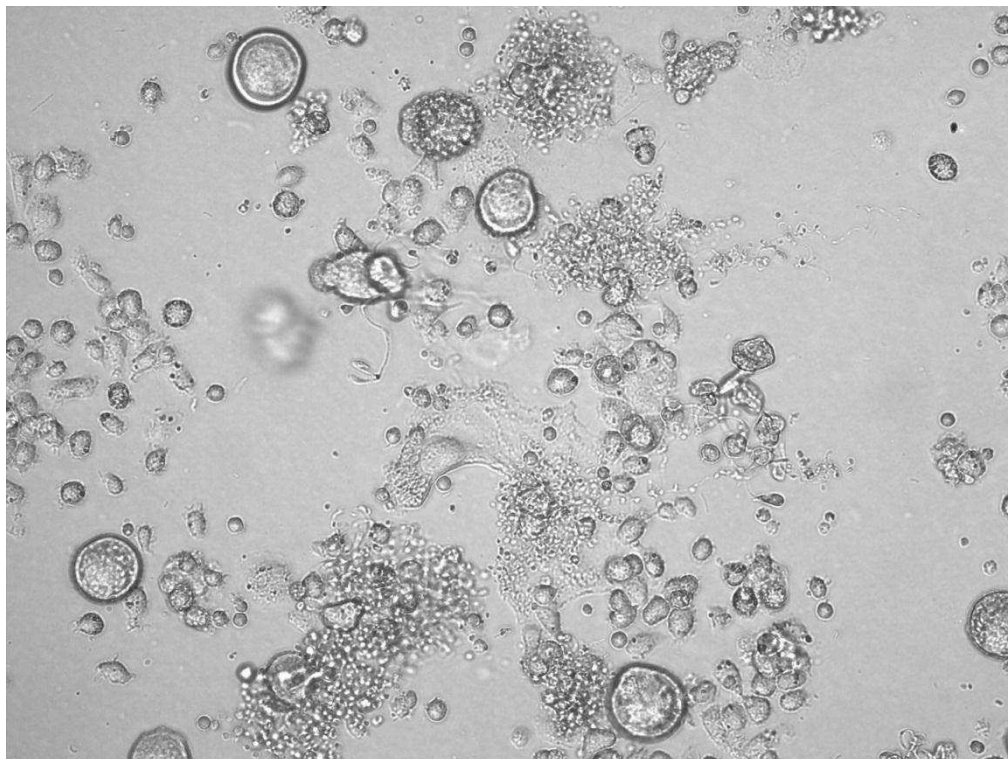


Figure 4

Megakaryocytes differentiated in 2%MC for 3 days, followed by resuspension into liquid medium for 24h



Annexe 2 : Commentaire de l'article Aguilar et al, Blood 2016

inside **blood** commentary

20 OCTOBER 2016 | VOLUME 128, NUMBER 16

● ● ● PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Comment on Aguilar et al, page 2022

Tense your megas! Structural rigidity is key

Bethan Psaila UNIVERSITY OF OXFORD; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH

In this issue of *Blood*, Aguilar et al demonstrate that megakaryocytes adapt to the “stiffness” of their microenvironment and that re-creating the physical constraints encountered in native bone marrow dramatically improves in vitro megakaryocyte differentiation and proplatelet formation.¹

Megakaryocytes are one of the rarest cell types in bone marrow and yet collectively generate $\sim 10^{11}$ platelets each day.² One platelet transfusion unit contains ~ 3 to 4×10^{11} platelets, and significant advances have been made in the large-scale production of megakaryocytes and platelets from human pluripotent stem cells.³ Despite the incredible physiological capacity for platelet production, ex vivo platelet biogenesis from megakaryocytes differentiated in standard liquid culture systems from hematopoietic progenitors remains inefficient. One explanation for this is that key environmental components and/or mechanical forces encountered in native bone marrow are lacking in standard “2-dimensional” liquid culture systems.

In addition to secreted factors, metabolic components, and extracellular matrix factors, bone marrow provides a mechanical environment that is shaped by local hydrostatic pressure, shear stress and viscosity (see figure).⁴ The structural scaffolds provided by specific bone marrow “niches”⁵ regulate the differentiation of all blood cell lineages and are especially important for megakaryopoiesis and thrombopoiesis. Developing megakaryocytes migrate from the bone lining to be close to specialized

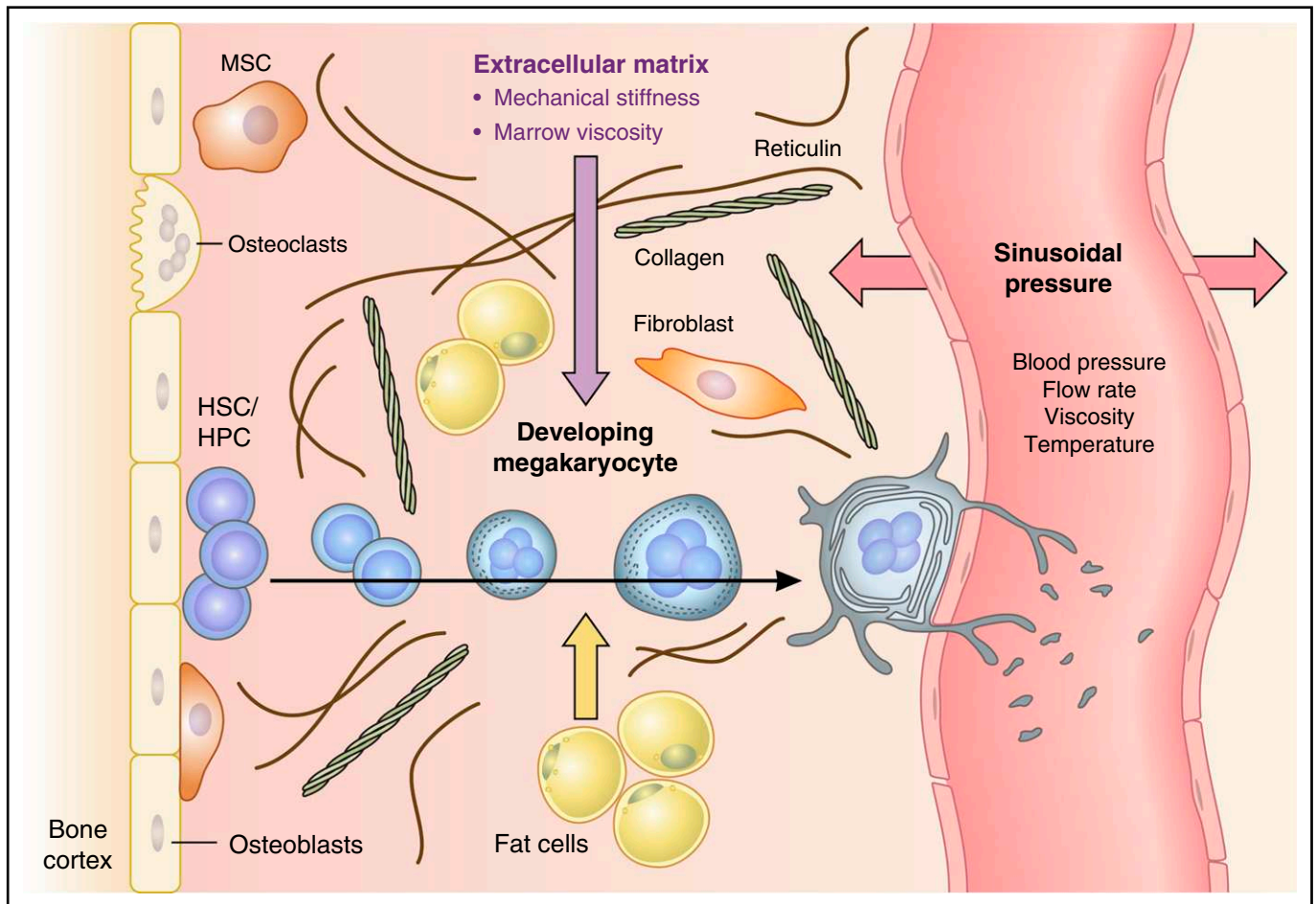
marrow sinusoids, where they reach “proplatelet” extensions through the vessel wall and release platelets into the circulation in response to hydrodynamic shear.^{6,7} As megakaryocytes mature in vivo, they massively increase their cell size and nuclear content by endomitosis and polyploidization.² A distinct network of cytoplasmic intracellular membranes termed the demarcation membrane system (DMS) develops, from which cytoplasmic territories and subsequently proplatelet extensions and platelet buds are eventually formed. Low-ploidy megakaryocytes (2N-4N) generate fewer platelets than higher-ploidy megakaryocytes (32N-64N). Megakaryocytes cultured in vitro fail to achieve the high ploidy levels observed in vivo and do not efficiently generate platelets, suggesting that the mechanical forces of the environment in which megakaryocytes differentiate are important for megakaryocyte maturation.

Previous attempts to design 3-dimensional (3D) in vitro systems mimicking the native environment in which megakaryocytes mature and produce platelets have incorporated artificial scaffolds and shear forces in addition to cytokines, matrix components and/or endothelial cells.^{8,9} For example, Balduini’s

group developed a 3D bioreactor using silk-based vascular tubes.⁹ Italiano et al designed a microfluidic bioreactor incorporating shear forces, matrix interactions, and simulating bone marrow stiffness that also enabled high-resolution live-cell microscopy.⁸ In the current study, Aguilar et al compared murine megakaryocytes differentiated in vitro in liquid medium and in methylcellulose (MC) hydrogels with megakaryocytes harvested directly from mouse bone marrow.¹ They tested hydrogels consisting of 2% and 2.5% MC, as these concentrations had a mechanical stiffness similar to that estimated for bone marrow (15-300 Pa), although the stiffness of 2.5% MC was 10-fold higher than 2% MC (300-600 Pa vs 30-60 Pa, respectively).

Electron microscopy showed that while liquid-cultured megakaryocytes had an abnormally developed DMS with poor demarcation of cytoplasmic territories, those grown in 2% MC developed a DMS that closely resembled that seen in megakaryocytes isolated from bone marrow. Fourfold fewer megakaryocytes grew in 2.5% MC gels than in 2% MC gels, and 2.5% MC gel-derived megakaryocytes were smaller with a poorly developed DMS, indicating that megakaryocytes are highly sensitive to the specific viscoelastic properties of their microenvironment. Cells cultured in 2% MC also achieved higher ploidy, and importantly, the percentage of cells extending proplatelets was almost doubled in 2% MC as compared with liquid cultures.

Remarkably, the DMS rapidly disordered and cytoplasmic territories were lost within 2 hours when megakaryocytes were removed from MC hydrogels and resuspended in liquid culture. Two interesting hypotheses are raised by these observations. Firstly, differences in the mechanical stiffness between regions of bone marrow (eg, perivascular vs endosteal niches) may



Elements that influence the structural rigidity of the bone marrow microenvironment. Model shows a developing megakaryocyte migrating from the endosteal bone lining to a bone marrow sinusoid. Cellular expansion, polyploidization, and development of the intracellular demarcation membrane system (DMS) are shown, with shedding of platelets from proplatelet extensions within the vessel lumen. Factors that may influence the mechanical forces (block arrows) within bone marrow include marrow fat content, extracellular matrix components (eg, collagen, fibronectin, and vitronectin), and the hydrostatic pressure of sinusoids, which in turn is determined by blood pressure, flow rate, blood viscosity, and temperature. HPC, hematopoietic progenitor cell; HSC, hematopoietic stem cell; MSC, mesenchymal stem cell.

create areas that are more or less conducive to platelet production *in vivo*. Secondly, the rapid changes observed when megakaryocytes were switched from liquid culture to 2% MC hydrogels may occur physiologically, with dynamic remodelling of the DMS occurring as megakaryocytes experience fluctuations in extracellular tension and mechanical forces.

What is the relevance of these findings for patients with platelet disorders? A group of inherited thrombocytopenias are caused by mutations in the gene encoding myosin heavy chain 9 (MYH9), a cytoskeletal contractile protein, leading to defects in platelet production as well as characteristic inclusion bodies in leukocytes and renal and hearing abnormalities. Paradoxically, while *Myh9*^{-/-} megakaryocytes show impaired proplatelet formation within bone marrow, *in vitro* cultured

MYH9-deficient megakaryocytes show an *increased* capacity for proplatelet formation,¹⁰ suggesting that the defect caused by myosin deficiency is masked by *in vitro* liquid culture conditions. Aguilar et al found that myosin expression was absent from the cytoplasm in liquid-cultured megakaryocytes, and *Myh9*^{-/-} murine megakaryocytes did not increase proplatelet formation in response to 2% MC gels as did wild-type megakaryocytes,¹ indicating that myosin is required for megakaryocytes to adapt to the stiffness of their microenvironment. Further, nuclear accumulation of the transcription factor MKL1 occurred in response to culture in 2% MC, and treatment with an MKL1 inhibitor completely eliminated the increased proplatelet formation observed in the MC gels,¹ suggesting a role for the MKL1 pathway.

Bone marrow is a unique and dynamic mechanical environment: a viscous organ confined by solid bone. Mechanical forces exerted on differentiating hematopoietic cells are likely to be dynamic, changing in response to blood flow rates and volume and therefore factors such as physical activity and temperature (see figure). This study emphasizes the importance of considering the viscoelastic properties of any *in vitro* culture system. This may be especially relevant for the study of megakaryocyte and platelet disorders due to abnormal cytoskeletal proteins. Further, it highlights interesting questions regarding how physiological fluctuations, as well as pathologies such as myelofibrosis, alter physical forces within bone marrow and thereby may influence hematopoiesis.

Conflict-of-interest disclosure: The author declares no competing financial interests. ■

REFERENCES

1. Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, et al. Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood*. 2016;128(16):2022-2032.
2. Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 2013;201(6):785-796.
3. Moreau T, Evans AL, Vasquez L, et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat Commun*. 2016;7:11208.
4. Gurkan UA, Akkus O. The mechanical environment of bone marrow: a review. *Ann Biomed Eng*. 2008;36(12):1978-1991.
5. Haylock DN, Nilsson SK. Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle*. 2005;4(10):1353-1355.

6. 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.
7. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317(5845):1767-1770.
8. Thon JN, Mazutis L, Wu S, et al. Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood*. 2014;124(12):1857-1867.
9. Di Buduo CA, Wray LS, Tozzi L, et al. Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies. *Blood*. 2015;125(14):2254-2264.
10. Eckly A, Rinckel JY, Lacuffer P, et al. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2243-2251.

DOI 10.1182/blood-2016-09-734509

● ● ● THROMBOSIS AND HEMOSTASIS

Comment on Ettinger et al, page 2043

Monoepitopic anti-FVIII T-cell response

Sebastien Lacroix-Desmazes¹ and Bernard Maillere² ¹CENTRE DE RECHERCHE DES CORDELIERS; ²ALTERNATIVE ENERGIES AND ATOMIC ENERGY COMMISSION-SACLAY INSTITUTE OF BIOLOGY AND TECHNOLOGIES

In this issue of *Blood*, Ettinger et al show that the T-cell response to therapeutic factor VIII (FVIII) in a patient with severe hemophilia A due to a multi-exon *F8* deletion was oligoclonal and directed against a single epitope located in the C2 domain of the molecule. They further demonstrated that the *HLA-DRB1*01:01*-restricted T-cell epitope was recognized by the T cells of 2 other hemophilia A patients with the A2201P missense mutation.¹

The involvement of CD4⁺ T cells in the initiation and persistence of the anti-FVIII immune response has long been suspected based on clinical observations and studies in preclinical models of hemophilia A. Patients with a history of high-titer inhibitors experienced a loss of FVIII inhibitors after infection with HIV; the loss was associated with the drop in CD4⁺ T-cell counts and absence of an anamnestic immune response upon rechallenge using FVIII concentrates. In FVIII-deficient mice, abrogation of the cross-talk between T cells and antigen-presenting cells (APCs) using antibodies to CD40 ligand (CD154), CD80, or CD86, or using CTLA4-Ig constructs, prevents the formation of inhibitors to FVIII.

The large size of FVIII, however, has hampered studies on the specificity of the

immune response to FVIII. The molecule encompasses 2332 amino acids (1383 amino acids in its activated form), providing multiple potential T-cell epitopes. Indeed, >1704 FVIII-derived peptides are predicted as core binding peptides for at least one of the 10 most common HLA-DRB1 alleles (Anastas Pashov, Bulgarian Academy of Science, Sofia, e-mail, 10 August 2016). Early work studied the proliferation and cytokine secretion profiles of CD4⁺ T lymphocytes from patients and healthy donors stimulated in vitro with FVIII or FVIII-derived peptides.² Strikingly, no clear difference was found in T-cell responses among healthy individuals, hemophilia A patients with neutralizing antibodies (Nab), or hemophilia A patients without Nab. Moreover, proliferation was found against synthetic peptides from all domains of FVIII. This finding was

at odds with the expected role of CD4⁺ T lymphocytes in the anti-FVIII immune response and meant that future studies should also take into account the enormous diversity of hemophilia-causing genetic abnormalities (large/small deletions, intron inversions, missense/nonsense mutations, small deletions/insertions, splice site mutations).

In keeping with the seminal work by Jacquemin et al,³ the initial characterization of FVIII T-cell epitopes performed by the Pratt laboratory focused on hemophilia A patients with missense mutations with Nab. In such patients, the immune response, at least in its early phase, is directed against the epitope of wild-type therapeutic FVIII that corresponds to the mutated epitope of the patient's endogenous FVIII. Using major histocompatibility complex II (MHCII) tetramer-guided epitope mapping, Pratt and colleagues isolated and characterized FVIII-specific T-cell clones from patients with the R593C or A2201P mutations⁴: the C2 domain-derived peptide 2194-2213 was identified as a dominant *HLA-DRB1*01:01*-restricted T-cell epitope in 2 brothers with the A2201P mutation.

In the present work, Pratt's group studied a severe hemophilia A patient with the *HLADRB1*01:01/10:10* haplotype and with no trace of circulating endogenous FVIII antigen, who developed anti-FVIII Nab following replacement therapy with exogenous FVIII and failed immune tolerance induction (ITI) protocols (ie, desensitization of the patients with high-dose FVIII). In such patients, the T-cell immune response would be expected to target multiple FVIII epitopes and to involve different T-cell clones (ie, polyclonal). This supposition derives from the large number of predicted T-cell epitopes in therapeutic FVIII (175 in the case of DRB1*01:01), by experiments on HLA-DR transgenic mice⁵ and by MHC-associated peptide proteomics on FVIII-loaded human monocyte-derived dendritic cells.⁶ Surprisingly, the FVIII₂₁₉₄₋₂₂₁₃ peptide presented on DRB1*01:01 was identified as the unique T-cell epitope in the patient, and the repertoire of FVIII₂₁₉₄₋₂₂₁₃ peptide-specific T cells was extremely restricted in terms of usage of TCRB-encoding genes.



blood[®]

2016 128: 1997-1999
doi:10.1182/blood-2016-09-734509

Tense your megas! Structural rigidity is key

Bethan Psaila

Updated information and services can be found at:
<http://www.bloodjournal.org/content/128/16/1997.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Free Research Articles](#) (4111 articles)

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

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

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

Annexe 3 : Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage

Annexe 3 : Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage

ORIGINAL ARTICLE

Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage

F. PERTUY, *†‡§ A. AGUILAR, *†‡§ C. STRASSEL, *†‡§ A. ECKLY, *†‡§ J.-N. FREUND, ‡§¶
I. DULUC, ‡§¶ C. GACHET, *†‡§ F. LANZA*†‡§ and C. LÉON*†‡§

*INSERM, UMR_S949; †Etablissement Français du Sang-Alsace; ‡Faculté de Médecine, Université de Strasbourg; §Fédération de Médecine Translotionnelle; and ¶INSERM, UMR_S1113, Strasbourg, France

To cite this article: Pertuy F, Aguilar A, Strassel C, Eckly A, Freund JN, Duluc I, Gachet C, Lanza F, Léon C. Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage. *J Thromb Haemost* 2015; **13**: 115–25.

Summary. *Background:* Transgenic mice expressing cre recombinase under the control of the platelet factor 4 (*Pf4*) promoter, in the context of a 100-kb bacterial artificial chromosome, have become a valuable tool with which to study genetic modifications in the platelet lineage. However, the specificity of cre expression has recently been questioned, and the time of its onset during megakaryopoiesis remains unknown. *Objectives/Methods:* To characterize the expression of this transgene, we used double-fluorescent cre reporter mice. *Results:* In the bone marrow, *Pf4-cre*-mediated recombination had occurred in all CD42-positive megakaryocytes as early as stage I of maturation, and in rare CD42-negative cells. In circulating blood, all platelets had recombined, along with only a minor fraction of CD45-positive cells. However, we found that all tissues contained recombined cells of monocyte/macrophage origin. When recombined, these cells might potentially modify the function of the tissues under particular conditions, especially inflammatory conditions, which further increase recombination in immune cells. Unexpectedly, a subset of epithelial cells from the distal colon showed signs of recombination resulting from endogenous *Pf4-cre* expression. This is probably the basis of the unexplained colon tumors developed by *Apc^{fllox/fllox}; Pf4-cre* mice, generated in a separate study on the role of *Apc* in platelet formation. *Conclusion:* Altogether, our results indicate early recombination with full penetrance in megakaryopoiesis, and confirm the value of *Pf4-cre* mice for the genetic engineering of megakaryocytes and platelets. However, care must be taken when investigating

the role of platelets in processes outside hemostasis, especially when immune cells might be involved.

Keywords: blood platelets; cre recombinase; genetic engineering; megakaryocyte; platelet factor 4.

Introduction

The availability of mouse strains allowing inactivation of target genes in specific cells or tissues has greatly facilitated the study of genes that are ubiquitously expressed or lethal at the embryonic stage. Targeting of the megakaryocyte lineage can be achieved through the use of platelet-specific promoters, of which the platelet factor 4 (*Pf4*, also known as *Cxcl4*) short promoter (1.1 kb) proved to be specific for this lineage [1]. As short promoters may lead to silencing or position effect variegation, Tiedt *et al.* [2] employed a 100-kb bacterial artificial chromosome (BAC) to target the cre recombinase in the megakaryocyte lineage. The BAC construct encompasses five chemokine genes, including *Pf4*, where the first exon was replaced by the cre recombinase cDNA. This '*Pf4-cre*' strain has become extremely popular for testing the role of genes in the platelet lineage, and has been used in > 70 studies to date (Table S1).

However, a number of studies have raised questions concerning the cell specificity, and hence reliability, of the *Pf4-cre* strain for specific megakaryocyte-restricted recombination. First, *Pf4* expression has been reported in non-megakaryocyte hematopoietic cells such as monocytes [3], dendritic cells [4], and macrophages [5,6]. Second, 15–60% recombination has been recently reported in other myeloid and lymphoid lineages and in adult hematopoietic stem and progenitor cells with the same *Pf4-cre* strain [7]. Another point that has not yet been fully explored concerns the onset of expression of the *Pf4-cre* transgene during megakaryopoiesis and the suitability of inactivating genes at the earliest steps of megakaryocyte maturation.

Correspondence: Catherine Léon, UMR_S949 INSERM-Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), 10, rue Spielmann, B.P. No. 36, 67065 Strasbourg Cedex, France.
Tel.: +33 388 21 25 25; fax: +33 388 21 25 21.
E-mail: catherine.leon@efs-alsace.fr

Received 22 April 2014

Manuscript handled by: W. Ruf

Final decision: P. H. Reitsma, 1 November 2014

In this study, we addressed questions relating to *Pf4-cre*-mediated recombination in non-megakaryocyte hematopoietic cells and, more broadly, in various embryonic and adult mouse organs, and the onset of the *Pf4-cre* expression during megakaryocyte maturation. This was performed in a double-fluorescent *cre* reporter mouse line crossed with the *Pf4-cre* line. This reporter mouse constitutively expresses red fluorescence (tandem dimer Tomato [tdTomato]). The gene encoding tdTomato is excised in cells expressing *cre* recombinase, allowing enhanced green fluorescent protein (EGFP) labeling in cells and their progeny. In contrast to β -galactosidase-expressing reporter mice, which require the addition of an exogenous enzymatic substrate for labeling, the double-fluorescent mice have the advantage of being compatible with multicolor microscopy and flow cytometry. We show that *Pf4-cre*-mediated recombination occurs as early as stage I of megakaryocyte development. We observed that only a small subset of monocytes/macrophages recombined, but that a larger fraction of immune cells can recombine upon stimulation. More surprisingly, we found evidence for endogenous recombination in a subset of distal intestinal epithelial cells, which could lead to an unexpected phenotype in this particular tissue.

Materials and methods

Materials

The materials are given in Data S1.

Animals

Reporter mice (B6.129[Cg]-*Gt[ROSA]26Sor^{tm4[ACTB-tdTomato,-EGFP]Luo/J}*), hereafter called *mT/mG* mice [8], were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). This transgenic mouse strain contains a cassette inserted at the *rosa26* locus, composed of a floxed gene encoding a membrane-targeted tdTomato (a red fluorescent protein variant) (*mT*), followed by a gene encoding a membrane-targeted EGFP (*mG*). Recombination with *cre* recombinase leads to excision of the tdTomato gene (loss of red fluorescence) and expression of EGFP (appearance of green fluorescence). Double-heterozygous *mT/mG;Pf4-cre* mice were generated by crossing *mT/mG* mice with *Pf4-cre* mice. Both male and female mice were analyzed. *Apc^{fllox/flox}* mice carrying a conditionally targeted allele of *Apc* were generously provided by B. O. Williams [9], and *Apc^{fllox/flox};Pf4-cre* mice were generated by crossing *Apc^{fllox/flox}* mice with *Pf4-Cre* mice. For the graft experiments, 6-week-old female nude (NMRI-Nu) mice were purchased from Janvier Labs (LeGenest St Isle, France).

Graft experiments

For bone marrow grafts, 8-week-old female *mT/mG* mice were exposed to lethal irradiation (9 Gy) and

intravenously injected with 3×10^6 bone marrow cells from 8–12-week-old male *Pf4-cre* donor mice. Engraftment was confirmed by complete recovery of the platelet count 8 weeks after grafts were performed, and cytometry analysis confirmed 99% platelet engraftment for all studied mice. Histologic studies on recipient mice were performed 8 weeks and 12 weeks after grafting.

For embryonic intestinal grafts, female *Pf4-cre* mice were crossed with male *mT/mG* mice. Embryos (12.5 days postcoitum [dpc]) were dissected, and segments corresponding to the presumptive colon of these embryos were implanted under the back skin of nude mice as previously described [10]. The engrafted tissues were removed 6 weeks later, and analyzed for the presence of recombined EGFP-positive cells.

In vitro leukocyte activation

Spleens from adult *mT/mG;Pf4-cre* mice were dissociated in phosphate-buffered saline (PBS)–EDTA (5 mM) under sterile conditions. The cell suspension was diluted (1 : 10) in AcK buffer (150 mM ammonium chloride, 10 mM potassium bicarbonate, 0.1 mM EDTA) and incubated for 5 min for red blood cell lysis. Cells were washed, resuspended in RPMI-1640 containing 20% bovine serum albumin–insulin–transferrin at 2×10^6 cells mL⁻¹, and seeded at 500 μ L per well in 24-well plates. Cells were activated by incubation with phytohemagglutinin (PHA) (5 μ g mL⁻¹) or phorbol myristate acetate (PMA) (15 nM) plus ionophore A23187 (100 μ M), or PBS for the control condition. Cells were incubated for 3 days at 37 °C/5% CO₂, and processed for flow cytometry.

Flow cytometry

Whole blood was drawn (1 : 1) into 2 \times buffer A (PBS containing citrate–theophylline–adenine–dipyridamol [1 : 9] and hirudin [100 U mL⁻¹] as anticoagulants, human albumin [0.35%], and apyrase [0.014 U mL⁻¹]). Red blood cell lysis was induced by diluting the blood (1 : 19) in AcK buffer. The remaining blood cells were concentrated by centrifugation (175 \times g, 5 min), and resuspended in buffer A. The cells were then incubated with anti-CD42–biotin, anti-Ter119–PerCP/Cy5.5 and anti-CD45–AF647 antibodies for 30 min, washed in buffer A, incubated with streptavidin–phycoerythrin/Cy7 for 30 min, centrifuged (175 \times g, 5 min), and resuspended in buffer A containing 7AAD viability dye. Measurements were performed on a six-color Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) equipped with 488-nm and 633-nm lasers. Cell doublets were eliminated by sequential use of the side scatter pulse width/height, forward scatter pulse width/height and forward scatter pulse area/height methods. Viable cells were gated accord-

ing to their 7AAD negative staining, and leukocytes according to their side scatter and CD45 positive signal. Leukocyte–platelet aggregates were eliminated through their CD45/CD42 double-positive signal. The remaining CD45/EGFP double-positive events were considered to be recombined leukocytes. Platelets were gated according to their forward scatter and CD42 positive signal. For *in vitro* activation, spleen cells were resuspended in PBS–EDTA (5 mM), dissociated by successive passages through 21G, 23G and 25G needles, and labeled with RAM.1–AF647 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 30 min.

Confocal microscopy

Adult mouse tissues were fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in sucrose, and frozen for cryosection. Embryos were harvested at 14.5 dpc, fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected, and frozen in gelatin for cryosectioning. Sections ($6 \mu\text{m}$) were cut and mounted unlabeled or immunolabeled. The leukocyte fraction was separated from whole blood on a Ficoll gradient, fixed in 4% paraformaldehyde, and cytospun onto poly-L-lysine-coated microscopy slides. Immunolabeling was performed with anti-CD42–AF647, anti-CD45–AF647 or anti-F4/80–AF647 antibodies, and nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Samples were examined under a TCS SP5 confocal microscope with Leica Application Suite Advanced Fluorescence software (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

Immunogold transmission electron microscopy (TEM)

For immunogold labeling, *mT/mG;Pf4-cre* mouse bone marrows were fixed in 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde, infiltrated with 2.3 M sucrose, and frozen in liquid nitrogen. Ultrathin sections (70 nm) were incubated with anti-green fluorescent protein (GFP) or irrelevant antibodies ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), followed by 10 nm gold-conjugated protein A, and then stained with 1.8% uranyl acetate/0.2% methylcellulose. Samples were examined under a CM120 transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands).

Immunohistochemistry

Tissue fragments taken from the colon, colonic tumors and grafts were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections ($6 \mu\text{m}$) were deparaffinized and heated in 10 mM citrate buffer (pH 6.2) in a pressure cooker for antigen retrieval.

Immunohistochemistry was performed with the appropriate primary antibodies, which were revealed with biotinylated secondary antibodies after amplification with a Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Clinisciences SAS, Nanterre, France), as recommended by the supplier.

Results

Early expression of Pf4-cre in all megakaryocytes

Pf4-cre mice are widely used to inactivate genes in the megakaryocyte lineage. An important point to consider with this strain was our observation of a small but constant and significant 15% decrease in the number of circulating platelets in *Pf4-cre* mice as compared with control littermate wild-type (WT) mice (C57BL/6J genetic background) ($[975 \pm 29] \times 10^3 \text{ platelets } \mu\text{L}^{-1}$ and $[1144 \pm 29] \times 10^3 \text{ platelets } \mu\text{L}^{-1}$, respectively; $P < 0.0001$; $n \geq 45$ mice per group). We crossed *Pf4-cre* mice with *mT/mG* reporter mice to investigate the specificity of recombination and the time at which it occurs during megakaryocyte differentiation. *Cre*-mediated recombination, as shown by the expression of EGFP, was analyzed in the bone marrow by confocal microscopy. We found that all CD42-positive megakaryocytes had recombined (Fig. 1A, arrowheads).

To identify more precisely the stage at which recombination takes place, we performed immunogold labeling with an anti-GFP antibody and TEM. Megakaryocytes showed gold labeling with a membranous distribution in various structures (granules, plasma membrane, and endoplasmic reticulum) (Fig. 1B–E). Stage I megakaryocytes (Fig. 1B), identified as cells of diameter $10\text{--}15 \mu\text{m}$ with a large nucleus/cytoplasm ratio and only a few granules [11], were already gold-labeled (Fig. 1C). At this stage, the cells already express CD41 and CD42b [12]. In stage III mature megakaryocytes (Fig. 1D), gold immunolabeling was also visualized at the plasma membrane and membranes of organelles throughout the cytoplasm (Fig. 1E). Overall, these results show that recombination had already occurred in the earliest morphologically identifiable megakaryocytes, and thus affects the entire mature megakaryocyte population.

Pf4-cre recombination is a rare event in circulating leukocytes

Some small CD42-negative EGFP-positive nucleated cells were also observed in the bone marrow of *mT/mG;Pf4-cre* mice (Fig. 1A, arrows), in addition to recombined megakaryocytes. These could represent CD42-negative early megakaryocyte progenitors, or recombined cells from other hematopoietic lineages. To test for this second possibility, whole blood was analyzed by flow cytometry to check for recombined cells outside the platelet lineage by labeling with the pan-leukocyte marker CD45. To reduce leukocyte–platelet aggregates, we optimized the anticoagulants and inhibitors used for blood sampling, and excluded all remaining aggregates from the analysis ($\sim 5\%$ of total leukocytes). As expected in whole blood, we observed that all platelets had recombined (Fig. 2A) ($99.14\% \pm 0.18\%$ EGFP-positive cells, as compared with a background signal of

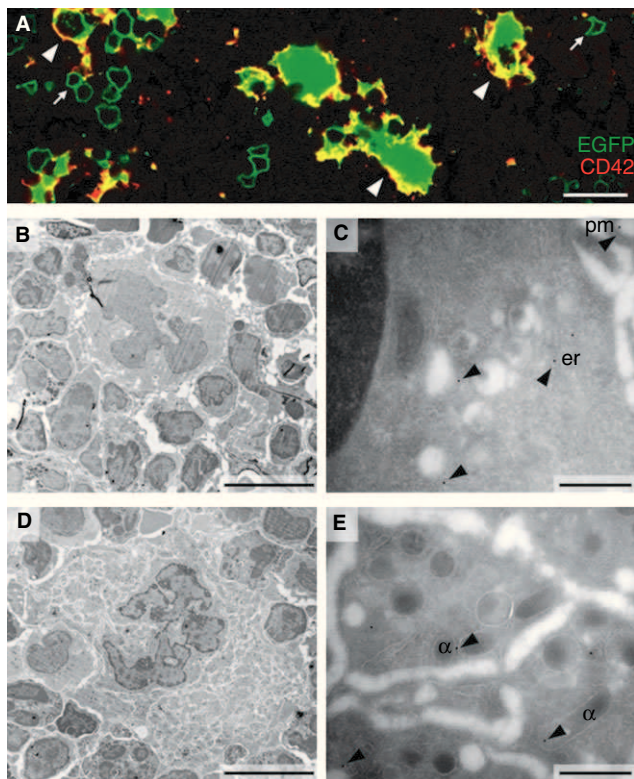


Fig. 1. *Pf4-cre*-mediated recombination occurs early in megakaryopoiesis. (A) Confocal imaging of *mT/mG;Pf4-cre* mouse bone marrow. *Cre*-mediated recombination is visualized by enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression (green). Megakaryocytes are labeled with anti-CD42 (red), and coexpression of CD42 and EGFP appears yellow (arrowheads). Some smaller CD42-negative cells also show recombination (arrows). The image is representative of at least three mouse bone marrows. (B–E) Electron microscopy images of anti-green fluorescent protein immunogold labeling of *mT/mG;Pf4-cre* bone marrow cryosections. Images are representative of at least three sections from one male and one female mouse bone marrow. (B, C) Immature stage I–II megakaryocyte. Such cells display gold beads (arrowheads [C]) at the surface of forming granules, the plasma membrane (pm), or the endoplasmic reticulum (er). (D, E) Mature stage III megakaryocyte displaying gold beads (arrowheads) at the surface of α -granule membranes (α) (E). (A) Scale bar: 25 μ m. (B, D) Scale bar: 10 μ m. (C, E) Scale bar: 500 nm.

0.11% \pm 0.02% in C57BL/6 control mice; mean \pm standard error of the mean [SEM], $n \geq 10$). In the leukocyte population, only 0.31% \pm 0.09% (mean \pm SEM, $n = 3$) of the CD45-positive cells were EGFP-positive in the reporter mice, as compared with a background signal of 0.02% \pm 0.01% in C57BL/6 control mice (Fig. 2B). Confocal microscopic observation of the leukocyte fraction isolated from whole blood confirmed that EGFP-positive nucleated cells were rarely present (Fig. 2C). Such cells showed both a membranous EGFP signal and CD45 labeling, which distinguished them from platelet–leukocyte aggregates (Fig. 2D–E). These findings demonstrate that *Pf4-cre* expression does occur in the hematopoietic population outside the megakaryocyte lineage, but in only a very small proportion of circulating leukocytes.

Infiltrated recombined cells are present in all embryonic and adult mouse organs

The presence of EGFP-positive cells outside the megakaryocyte lineage led us to explore other tissues. To screen several tissues at once, we examined whole 14.5 dpc embryo cryosections by confocal microscopy. Large EGFP-positive cells with multilobed nuclei were identified as megakaryocytes in the fetal liver, confirming that recombination occurs in this lineage even at the embryonic stage (Fig. 3A,B). Small EGFP-positive CD42-negative cells were also observed in clusters in the fetal liver (Fig. 3C) and in several other organs throughout the embryo (Fig. 3D,E; Fig. S1). Some of these cells appeared to infiltrate the non-hematopoietic tissues, and were positive for F4/80 labeling (Fig. 3E), indicating a monocyte/macrophage origin.

In adult mice, all organs examined (lungs, kidney, heart, brain, liver, and stomach) contained EGFP-positive recombined infiltrated cells (Fig. 4A, arrows). The vast majority of these recombined cells were positive for F4/80 labeling (Fig. 4B, arrowheads). However, not all F4/80-positive cells were EGFP-positive, suggesting that recombination is restricted to a subpopulation of these macrophages (Fig. 4B, arrows). We investigated whether the recombined non-F4/80 cells could be dendritic cells, as these have been reported to express *Pf4* in some cases. Among all of the tissues examined, no recombined cells expressed CD11c antibody, a marker of dendritic cells, except in the small intestine (not shown). As intestinal macrophages are known to also express CD11c [13,14], whether these cells are true dendritic cells or macrophages is unclear. Altogether, these results indicate the presence of infiltrated recombined monocytes/macrophages in a wide variety of tissues.

The number of recombined immune cells increases following activation

Pf4 expression has been reported in a number of immune cells under inflammatory conditions. Thus, we sought to evaluate in our model whether *cre*-mediated recombination is increased in the spleen, which is enriched in immune cells. Spleen cells from *mT/mG;Pf4-cre* mice were incubated in the presence or absence of PMA plus A23187 or PHA. After 72 h, we observed an increased proportion of EGFP-positive cells in the stimulated conditions (19% recombination for control cells as compared with 38% and 31% after PHA and PMA + A23187 treatment, respectively) (Fig. 4C). Thus, these data suggest that, under inflammatory conditions, the proportion of recombined cells can increase.

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

In the intestine of adult mice, infiltrated cells were observed similarly as in other tissues (Fig. 5A–E).

Unexpectedly, we also detected the presence of recombined epithelial cells, these cells being restricted to the distal colon (Fig. 5D–F). Recombination appeared in dispersed glands throughout the epithelium, leading to a mosaic pattern. Frequently, only a part of the gland was EGFP-positive (Fig. 5F), suggesting that recombination

had taken place in only one or a few progenitor cells. Recombination was not observed in the intestine of 14.5 dpc *mT/mG;Pf4-cre* embryos (Fig. S1) or newborn mice (data not shown). This indicates that epithelial recombination takes place after birth, a period in which the gastrointestinal tract undergoes marked structural and functional maturation until weaning [15–17]. These data shed new light on defects observed in the intestine of mice that we recently obtained by crossing *Pf4-cre* and *Apc^{fllox/fllox}* mice. This strain was originally developed to evaluate the role of adenomatous polyposis coli (APC), a microtubule-binding protein and Wnt pathway regulator, in the platelet lineage. Unexpectedly, 80% of *Apc^{fllox/fllox};Pf4-cre* mice developed rectal prolapses (Fig. 6A) and showed an abnormal mortality rate, dying around the age of 80 days. Histologic analysis of the intestinal tract revealed colon adenocarcinomas (Fig. 6B). Immunostaining of β -catenin showed cytoplasmic and nuclear accumulation of this protein in carcinomatous areas, in contrast to its sub-membranous accumulation in normal glands and in the adenomatous areas of lesions (Fig. 6C,D). Such β -catenin translocation is characteristic of tumor cells lacking the tumor suppressor APC [18,19].

Pf4-cre expression is endogenous in the distal intestine

The mosaic recombination pattern observed in the distal intestine of *mT/mG;Pf4-cre* mice might indicate direct expression of *Pf4-cre* in a population of stem or progenitor intestinal cells, or fusion of recombined monocytes/macrophages with stem or progenitor intestinal cells.

The possibility of cell fusion events was examined by performing bone marrow graft experiments. We engrafted lethally irradiated recipient *mT/mG* mice with bone marrow cells from *Pf4-cre* mice. After 8–12 weeks, the recipient mice had a normal platelet count restored, with a proportion of platelets from donor mice (percentage of platelets devoid of red fluorescence) of 99.01%. Histologic analysis of five mouse intestines did not reveal any recombined

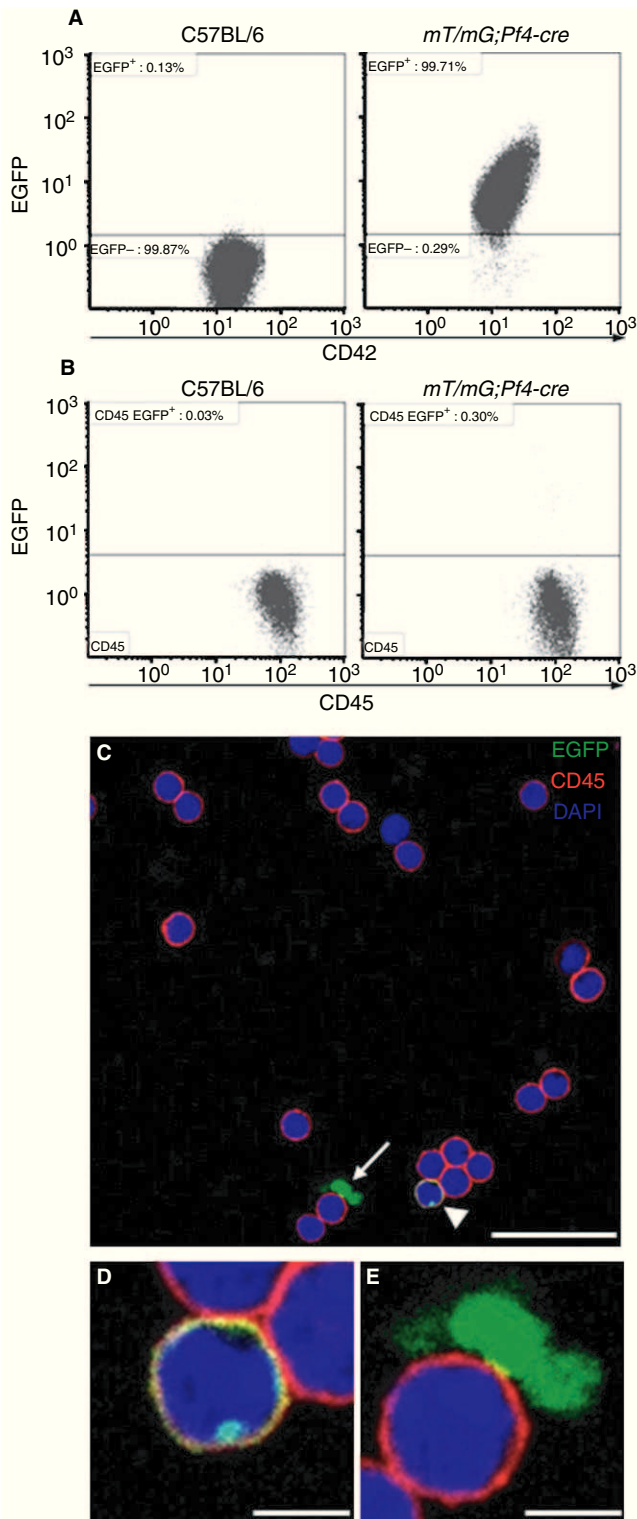


Fig. 2. *Pf4-cre* recombination in a minor fraction of circulating CD45-positive cells. (A) Flow cytometric analysis of whole blood showing that the vast majority of platelet-sized CD42-positive events are enhanced green fluorescent protein (EGFP)-positive. The dot plot is representative of at least 10 mice. The proportion of gated events is indicated. (B) Flow cytometric analysis of whole blood showing that a minor fraction of CD45-positive cells have recombined (EGFP-positive) in *mT/mG;Pf4-cre* mice (right), as compared with the background in control C57BL/six mice (left). The dot plot is representative of at least three independent experiments. The proportion of gated events is indicated. (C) Confocal image of CD45-positive blood cells, with one leukocyte expressing EGFP (arrowhead; see close-up in [D]), and one cell forming an aggregate with EGFP-positive platelets (arrow; see close-up in [E]). Images are representative of two independent experiments. Blue is 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) labeling, green is EGFP labeling, and red is CD45 immunolabeling. (C) Scale bar: 25 μ m. (D, E) Scale bar: 5 μ m.

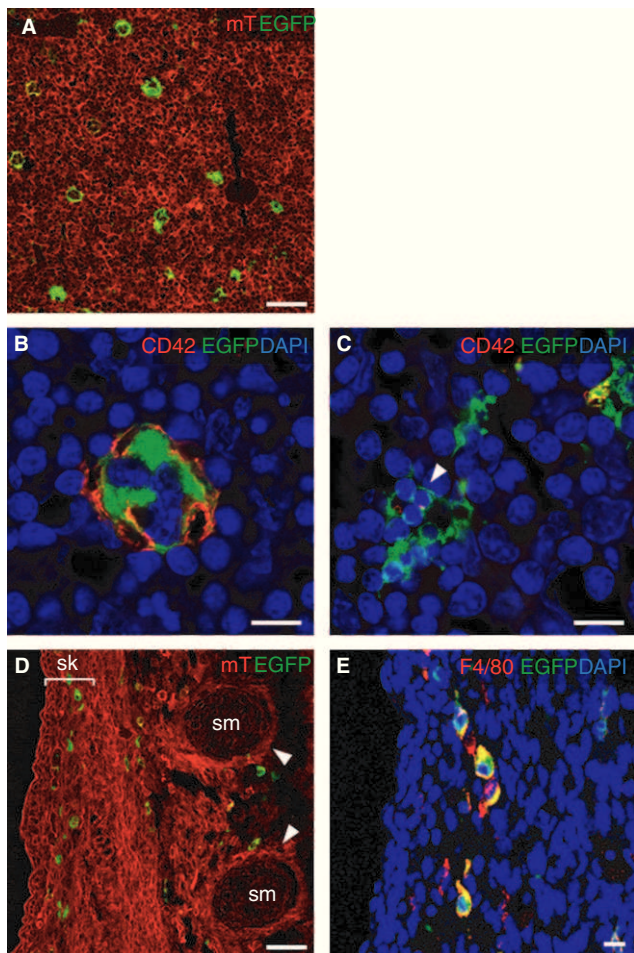


Fig. 3. Recombined cells in *mT/mG;Pf4-cre* embryos. (A–C) Confocal images of the fetal liver showing CD42-positive megakaryocytes displaying strong enhanced green fluorescent protein (EGFP) fluorescence (A, B) and small non-megakaryocytic (CD42-negative) recombined cells (C). (D, E) Confocal images of non-hematopoietic tissues (skin [sk]; somites [arrowheads]) showing infiltrated recombined cells (D) that are positive for the monocyte/macrophage marker F4/80 (E). sm, somite. (A, D) Red is tandem dimer Tomato staining and green is EGFP staining. (B, C) Blue is 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, red is CD42 staining, and green is EGFP staining. (E) Blue is DAPI staining, red is F4/80 staining, and green is EGFP staining. (A, D) Scale bars: 50 μm ; (B, C, E) Scale bars: 10 μm . Images are representative of three embryos observed.

(EGFP-positive) epithelial cells (Fig. 7A,B). This suggested that a monocyte/macrophage fusion to a stem/progenitor or mature epithelial cell is unlikely to occur. Interestingly, from time to time, one recombined non-epithelial cell infiltrated within the epithelium could be observed (Fig. 7B, inset), confirming the occurrence of such fusion events at least between cells of hematopoietic origin.

To investigate whether *Pf4-cre* expression is endogenous to the intestine, we decided to graft fluorescent colon tissue onto a non-fluorescent background tissue. The presumptive colon of 12.5 dpc *mT/mG;Pf4-cre* embryos was engrafted under the skin of adult nude mice [10]. As mentioned earlier, the intestine of *mT/mG;Pf4-cre*

embryos did not show signs of epithelial recombination. Engraftment of this embryonic tissue under the skin of adult mice allows maturation of the donor intestinal epithelium for several weeks in a foreign environment containing no monocytes/macrophages expressing *Pf4-cre* and no exogenous fluorescence. After 6 weeks, the tissue was removed and analyzed for red or green fluorescence. Green EGFP-positive epithelial cells were found to be present in the transplanted colons (Fig. 7C,D), although the extent of recombination was lower than that observed in the adult *mT/mG;Pf4-cre* colon tissue. Overall, these results provide evidence that the recombination observed in *Pf4-cre* mice originates from endogenous expression of the transgene in the epithelial cells of the colon.

Discussion

In the present study we show that *Pf4-cre*-mediated recombination occurs: (i) in all megakaryocytes as early as stage I of maturation, consequently affecting all circulating platelets; (ii) in a minor population of circulating leukocytes; (iii) in a subset of monocytes/macrophages infiltrating all tissues; (iv) in immune cells under inflammatory conditions; and (v) more unexpectedly, outside the hematopoietic lineage, in epithelial cells of the colon, potentially leading to a phenotype unrelated to megakaryocytes and platelets.

Recombination in non-megakaryocytic hematopoietic cells, in only a minor fraction of the circulating CD45-positive population, is consistent with the first report that no deletion was detected in leukocytes from *Pf4-cre* mice crossed with β_1 -integrin floxed mice [2]. Our observation that most infiltrated recombined cells were F4/80-positive, indicating a monocyte/macrophage origin, might indicate *Pf4* expression in these cells, as previously reported in a small fraction of monocytes and dendritic cells [3,4]. It should be noted that some rare, recombined infiltrated cells negative for the F4/80 marker were also observed. Whether these cells belong to some specialized F4/80-negative macrophage subpopulation [20] or to another lineage remains to be determined. Our results differ from those of an earlier study using *Pf4-cre* transgenic mice crossed with *Rosa26-tdRFP* reporter mice [7]. In this work, expression of the *tdRFP* reporter gene was detected in a high proportion (15–60%) of cells from all hematopoietic lineages, including stem and progenitor cells [7]. Although we cannot rule out the possibility that technical issues could account for this discrepancy, one important parameter could be the inflammatory status of the mice. We did indeed observe an increased proportion of recombined spleen non-megakaryocytic cells following their activation, suggesting that inflammatory triggers activate *Pf4-cre*. In support of this, an increase in *Pf4* expression has been reported in dendritic cells, T lymphocytes, monocytes and macrophages under a number of proinflammatory conditions [4,6,21–23]. In addition, a recent

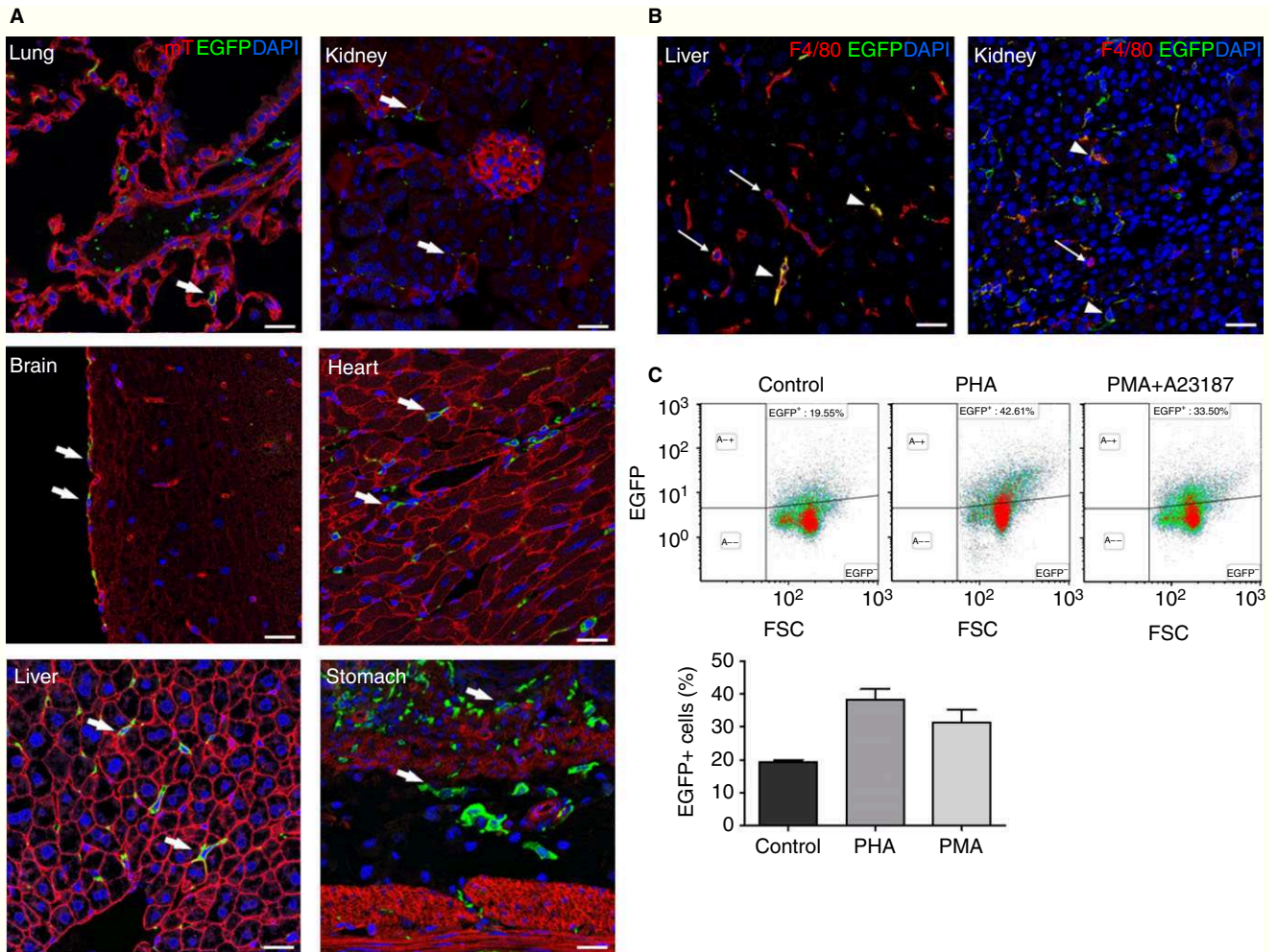


Fig. 4. Recombined cells in *mT/mG;Pf4-cre* adult organs and immune cells. (A) Confocal imaging of lung, kidney, heart, brain, liver and stomach tissues from *mT/mG;Pf4-cre* mice, showing the presence of infiltrated recombined cells in all organs (arrows). Red is tandem dimer Tomato staining, green is enhanced green fluorescent protein (EGFP) staining, and blue is 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Images are representative of five mice of both genders. (B) Infiltrated recombined cells in liver and kidney tissues. A subpopulation of F4/80-positive macrophages show EGFP fluorescence (double-positive cells appearing yellow [arrowheads]), whereas non-recombined F4/80-positive cells are red (arrows). Blue is DAPI staining, red is F4/80 staining, and green is EGFP staining. Scale bars: 25 μ m. Images are representative of immunolabeling on organs from three mice. (C) Flow cytometry analysis of spleen cells. Dot plots represent EGFP-positive events from *mT/mG;Pf4-cre* spleen cultured for 3 days without stimulation (phosphate-buffered saline) or stimulated with phytohemagglutinin (PHA) (5 μ g mL⁻¹) or with a combination of phorbol myristate acetate (PMA) (15 nM) and A23187 (100 μ M) (upper panels). The bar graph represents three experiments, and results are expressed as mean \pm standard error of the mean. FSC, forward scatter.

study reported activation of this same *Pf4-cre* transgene in T lymphocytes following their *in vitro* activation [24].

The observation of recombined cells outside the hematopoietic lineage has, to our knowledge, never been reported. In the course of this study, we made surprising discoveries in an *Apc^{flax/flax};Pf4-cre* mouse strain originally developed to study the role of the APC–Wnt regulation pathway in megakaryopoiesis and platelet production. These mice developed rectal prolapses and intestinal tumors, which were probably the cause of their premature death, at \sim 2 months. So far, a role for megakaryocytes or platelets has never been proposed in colon carcinogenesis, despite the numerous mouse models that have been developed. Hence, the most likely explanation

for this tumor development is recombination and APC deletion in the colon epithelia. Two mechanisms could contribute to this ‘non-specific’ recombination: (i) cell fusion between epithelial cells and monocytes/macrophages expressing *Pf4-cre*; or (ii) endogenous activation of the *Pf4* promoter in the intestine. Cell fusion events have indeed been reported in several tissues, including the intestine [25–27], but our bone marrow graft experiments do not support such a mechanism. In contrast, the presence of recombined epithelial cells in the tissue grafts implanted in nude mice, in the absence of monocytes/macrophages expressing *mT/mG;Pf4-cre*, provides proof of the intrinsic expression of *Pf4-cre* in colon epithelial cells. It is not yet clear whether this results from *Pf4-cre*

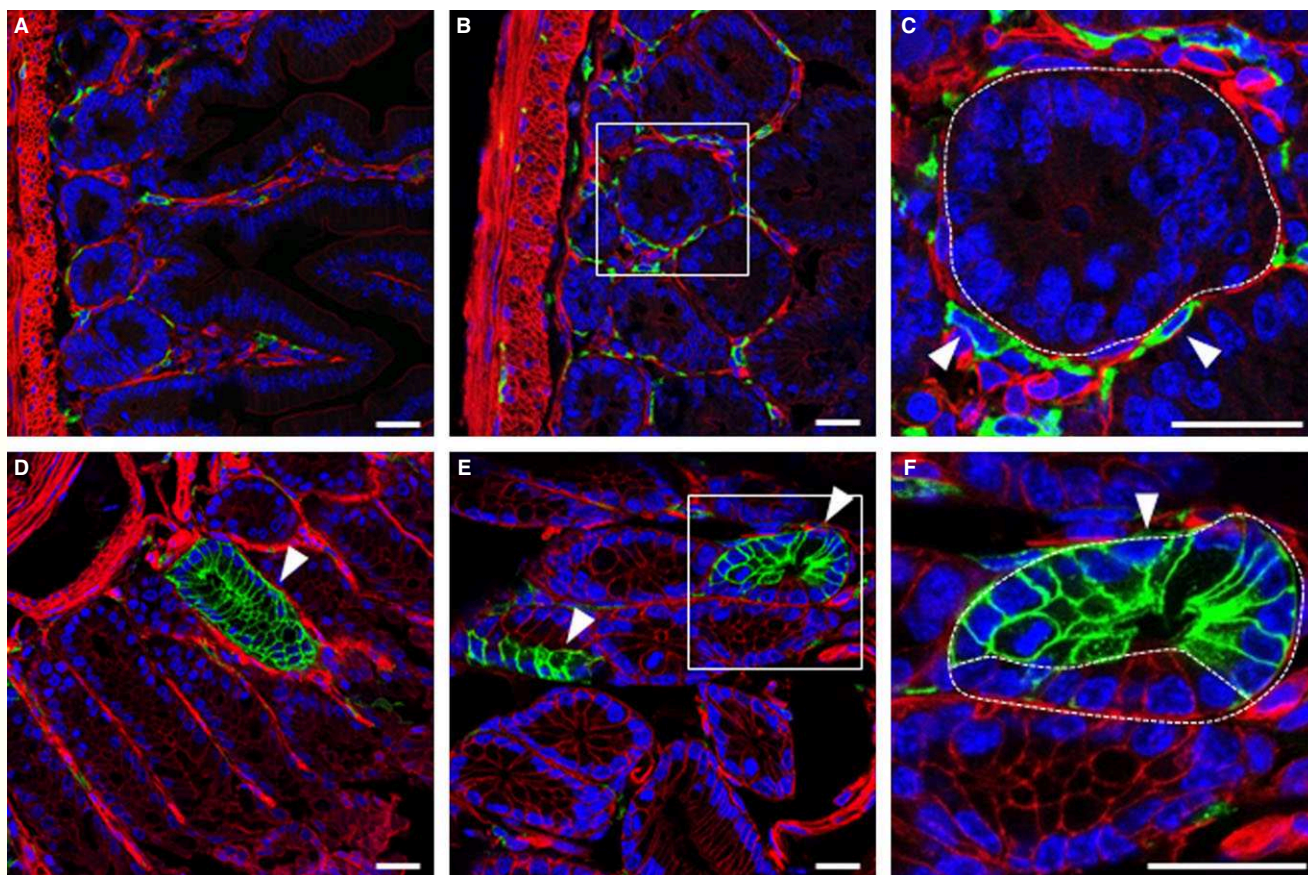


Fig. 5. *Pf4-cre* expression in the distal intestine. Confocal images of the small intestine (A), cecum (B, C), and colon (D–F). All sections of the intestine show infiltrated recombined cells (see arrowheads in cecum close-up [C]; the dashed line delineates a gland), whereas only the distal colon contains recombined epithelial cells (arrowheads, [D–F]). These recombined cells show a mosaic pattern, as seen in the colon close-up (F), where only part of the gland expresses enhanced green fluorescent protein (EGFP) (arrowhead; the dashed line delineates the two parts of the gland). Blue is 4',6-diamidino-2-phenylindole, red is tandem dimer Tomato staining, and green is EGFP staining. Scale bars: 25 μm . Images are representative of at least five mice.

transgene activation resulting from a position effect of the BAC insertion, or true *Pf4* expression. The latter hypothesis is supported by the presence of *Pf4* mRNA, although at low levels, in the gastrointestinal DLD1 cell line (personal observation). Nevertheless, the mosaic pattern of recombined epithelial cells remains puzzling. It may correspond to a phenomenon of variegation that is widely reported for transgene expression, or knock-in in the intestinal tissue, whose mechanism is still unknown [28–30].

Although the PF4 protein has long been considered to be a selective marker of the megakaryocytic lineage, over the last 10 years there have been several indications of its presence in other hematopoietic lineages [3–6]. Nevertheless, the regulation of *Pf4* expression outside megakaryocytes has received little attention. In the megakaryocytic lineage, it has been suggested that RUNX1, in combination with ETS-1 and CBF β or FLI-1, synergistically activates the *Pf4* promoter [31–33]. These transcription factors are active in various non-hematopoietic cells, especially members of the ETS

family, which have been reported to control epithelial maturation in the intestine [34]. Whether they support the expression of *Pf4* in these cells remains to be investigated. In addition, it should be noted that *Pf4-cre* recombination in the intestine of *mT/mG;Pf4-cre* mice occurred only in some glands and, most frequently, only in one half of a gland. This suggests that, for some unknown reason, only a fraction of the stem cell progeny undergoes recombination.

Pf4-cre mice were generated by insertion of a BAC construct containing four chemokine-encoding *Cxcl* genes in addition to the *Pf4-cre* transgene [2]. Thus, possible effects of the insertion locus or of the duplication of several chemokine genes cannot be ruled out. We found that at least one of the *Cxcl* genes was active, as a two-fold increase in plasma levels of CXCL5 was measured in *Pf4-cre* mice (116.8 ng mL⁻¹ vs. 54.5 ng mL⁻¹ in controls, $P < 0.005$). Whether chemokine overexpression is responsible for the decreased platelet count in *Pf4-cre* mice is still unclear. On the other hand, platelet function, the number of megakaryocytes and proplatelet production

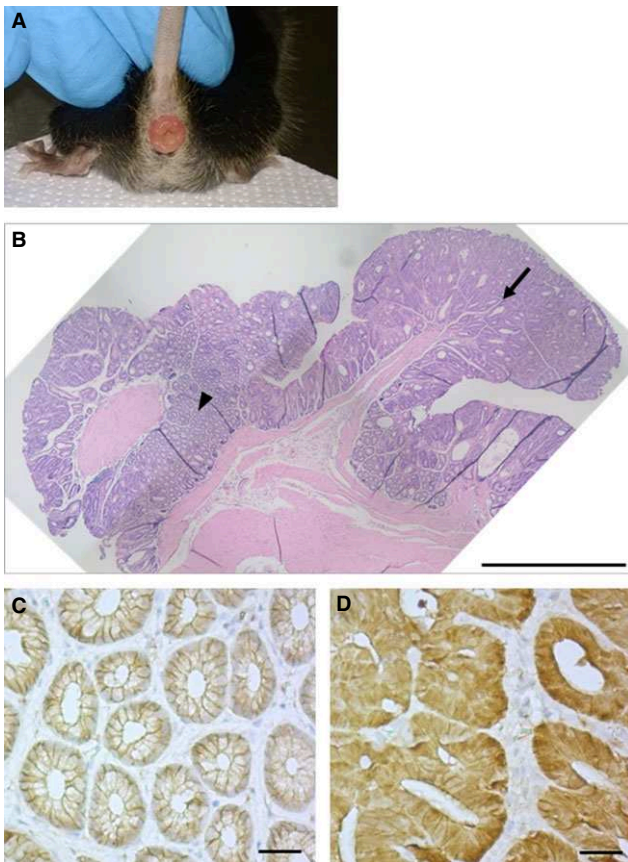


Fig. 6. *Apc^{fllox/fllox};**Pf4-cre* mice develop adenocarcinomas in the distal intestine. (A) Eighty per cent of *Apc^{fllox/fllox};**Pf4-cre* mice show rectal prolapses. (B) Hematoxylin and eosin staining of the distal colon of *Apc^{fllox/fllox};**Pf4-cre* mice, showing adenomatous (arrowhead) and carcinomatous (arrow) tissues. (C, D) Adenomatous tissue (C) shows plasma membrane localization of β -catenin (brown), whereas carcinomatous tissue (D) is associated with nuclear translocation of β -catenin in epithelial cells of *Apc^{fllox/fllox};**Pf4-cre* mice. (B) Scale bar: 1 mm. (C, D) Scale bars: 25 μ m. Images are representative of four or five mice.

are normal in *PF4-cre* mice (data not shown). Nonetheless, these data indicate that *Pf4-cre* mice constitute a proper control for *Pf4-cre*-mediated genetically modified mice, and should be preferred to a floxed-allele control.

The exact time of the onset of recombination during megakaryopoiesis has remained elusive. This information is important to elucidate the role of a particular gene product in megakaryopoiesis. Initial characterization of the *mT/mG* reporter mouse showed that EGFP is detected within 24 h following induction of cre activity, whereas loss of red fluorescence is relatively slow, with 70% red fluorescence left after 3 days [8]. In *mT/mG;**Pf4-cre* tissues, we never observed yellow recombined cells. This suggests that *Pf4-cre* was expressed > 3 days previously in macrophages and intestinal cells. It is difficult to conclude regarding megakaryocytes, owing to the probable dilution effect of the remnant tdTomato resulting from the very rapid enlargement of these cells. We thus used

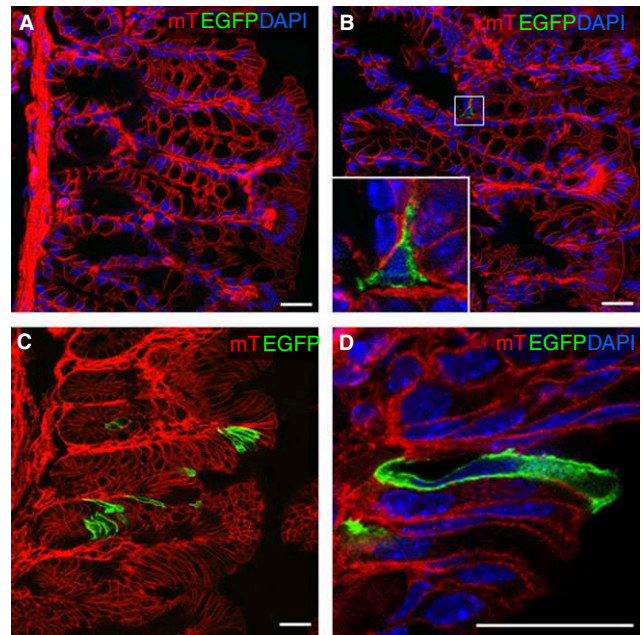


Fig. 7. *Pf4-cre* activity is intrinsic to the distal intestine. (A, B) Confocal imaging of *mT/mG* mouse colon 8 weeks after engraftment with *Pf4-cre* bone marrow. No recombination of epithelial cells is observed in the colon. Nevertheless, rare infiltrated cells expressed enhanced green fluorescent protein (EGFP) (B), proving that some cell–cell fusion did occur in recipient mice. (C) Confocal imaging of *mT/mG;**Pf4-cre* embryonic colon grafts in nude mice after 6 weeks. Some epithelial cells show EGFP fluorescence (green), indicating intrinsic *Pf4-cre* activity, whereas all other cells show tandem dimer Tomato (tdTomato) fluorescence (red). (D) Close-up view of a recombined epithelial cell. Blue is 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, green is eGFP staining, and red is tdTomato staining. Scale bars: 25 μ m. (A, B) Images are representative of five mice at 8 weeks or 12 weeks after bone marrow engraftment. (C, D) Images are representative of four independent embryonic colon grafts.

immunolabeling combined with TEM observation, and showed that recombination occurs as early as stage I of megakaryocyte differentiation. This suggests that *Pf4-cre* mice could be used to obtain genetic alterations of stage I–II megakaryocytes, when the cells have entered endomitosis cycles and started to synthesize granules and the demarcation membrane system. As the total maturation time from stage I to platelet release has been estimated to be 43–75 h in the rat [35], and the disappearance of a target molecule will vary according to its mRNA and protein turnover, it is not surprising that variations are observed in the disappearance of target proteins, some showing full extinction in megakaryocytes and others minor residual persistence in megakaryocytes or platelets (Table S1).

Altogether, our results confirm that *Pf4-cre* mice remain the best available tool for genetic manipulation of the megakaryocyte lineage. Moreover, the differences observed between *Pf4-cre* and C57BL/6J mice in platelet parameters and *Cxcl* gene expression indicate that

Pf4-cre mice should be chosen as the control for any *Pf4-cre*-mediated engineered mice. We have shown that *Pf4-cre* expression can occur in other hematopoietic cells that are present in all the organs, as well as in epithelial cells of the distal intestine. Thus, one must be cautious when investigating the role of platelets in processes outside hemostasis, especially involving inflammatory conditions that trigger recombination of immune cells, and when interpreting any unexpected phenotype. Finally, the *Pf4-Cre* mouse might represent a valuable tool with which to induce genetic recombination in the colon epithelium, while leaving intact the small intestinal epithelium.

Addendum

F. Pertuy performed experiments, prepared the figures, and wrote the manuscript. A. Aguilar performed experiments. C. Strassel generated the *Apc^{fllox/fllox};Pf4-cre* mice and carried out phenotypic observations. A. Eckly performed immunoelectron microscopy. J. N. Freund and I. Duluc performed *Apc^{fllox/fllox};Pf4-cre* mouse histology and intestinal grafts, and interpreted the data. C. Gachet and F. Lanza interpreted the data and wrote the manuscript. C. Léon designed the study, supervised the experiments, interpreted the data, and wrote the manuscript.

Acknowledgements

We thank M. Freund for supervising the animal facilities, P. Laeuffer and J. Weber for excellent technical assistance, and E. Martin for immunohistology. We also thank J. Mulvihill for reviewing the English of the manuscript.

This study was supported by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique). C. Léon was the recipient of a 'contrat d'interface' between the EFS and INSERM. F. Pertuy was the recipient of a fellowship from the SFH (Société Française d'Hématologie).

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Materials.

Fig. S1. Mosaic reconstitution of an *mT/mF;Pf4-cre* 14.5 dpc embryo.

Fig. S2. CD11c-positive cells in the small intestine of *mT/mF;Pf4-cre* mice.

Table S1. Non-exhaustive list of the studies using *Pf4-cre* mice in gene depletion or transgene expression strategies.

References

- 1 Ravid K, Beeler DL, Rabin MS, Ruley HE, Rosenberg RD. Selective targeting of gene products with the megakaryocyte platelet factor 4 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1521–5.
- 2 Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knock-outs for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood* 2007; **109**: 1503–6.
- 3 Schaffner A, Rhyn P, Schoedon G, Schaer DJ. Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes – role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J Leukoc Biol* 2005; **78**: 202–9.
- 4 Maier M, Geiger EV, Henrich D, Bendt C, Wutzler S, Lehnert M, Marzi I. Platelet factor 4 is highly upregulated in dendritic cells after severe trauma. *Mol Med* 2009; **15**: 384–91.
- 5 Furuya M, Tanaka R, Miyagi E, Kami D, Nagahama K, Miyagi Y, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Aoki I. Impaired CXCL4 expression in tumor-associated macrophages (TAMs) of ovarian cancers arising in endometriosis. *Cancer Biol Ther* 2012; **13**: 671–80.
- 6 Adlard NJ, Yeo L, Hardie DL, Adams H, Juarez M, Buckley CD, Raza K, Filer A, Scheel-Toellner D. 1.66 CXCL4 and CXCL7 expression on macrophages: a potential predictor of disease outcome in patients presenting with early synovitis? *Ann Rheum Dis* 2014; **73**(Suppl. 1): A28–9.
- 7 Calaminus SDJ, Guitart AV, Sinclair A, Schachtner H, Watson SP, Holyoake TL, Kranc KR, Machesky LM. Lineage tracing of pf4-cre marks hematopoietic stem cells and their progeny. *PLoS One* 2012; **7**: e51361.
- 8 Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 2007; **45**: 593–605.
- 9 Qian Z, Chen L, Fernald AA, Williams BO, Le Beau MM. A critical role for *Apc* in hematopoietic stem and progenitor cell survival. *J Exp Med* 2008; **205**: 2163–75.
- 10 Duluc I, Freund JN, Leberquier C, Kedinger M. Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. *J Cell Biol* 1994; **126**: 211–21.
- 11 Zucker-Franklin D. Megakaryocytes and platelets. In: Zucker-Franklin D, Grossi CE, eds. *Atlas of Blood Cells-Function and Pathology*, 3rd edn. Milan: Edi. Ermes Srl, 2003: 753–864.
- 12 Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, Geerts W, Proamer F, Rinckel J-Y, Léon C, Lanza F, Gachet C. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* 2014; **123**: 921–30.
- 13 Cao Q, Wang Y, Wang XM, Lu J, Lee VWS, Ye Q, Nguyen H, Zheng G, Zhao Y, Alexander SI, Harris DCH. Renal F4/80+CD11c+ mononuclear phagocytes display phenotypic and functional characteristics of macrophages in health and in adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2014. [Epub ahead of print].
- 14 Persson EK, Scott CL, Mowat AM, Agace WW. Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function. *Eur J Immunol* 2013; **43**: 3098–107.
- 15 Al-Nafussi AI, Wright NA. Cell kinetics in the mouse small intestine during immediate postnatal life. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1982; **40**: 51–62.
- 16 Calvert R, Pothier P. Migration of fetal intestinal intervillous cells in neonatal mice. *Anat Rec* 1990; **227**: 199–206.
- 17 Dauça M, Bouziges F, Colin S, Kedinger M, Keller MK, Schilt J, Simon-Assmann P, Haffen K. Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. *Int J Dev Biol* 1990; **34**: 205–18.

- 18 Sheng H, Shao J, Williams CS, Pereira MA, Taketo MM, Oshima M, Reynolds AB, Washington MK, DuBois RN, Beauchamp RD. Nuclear translocation of beta-catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 543–9.
- 19 Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; **82**: 1689–93.
- 20 Gordon S, Hamann J, Lin H-H, Stacey M. F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur J Immunol* 2011; **41**: 2472–6.
- 21 Maier M, Wutzler S, Bauer M, Trendafilov P, Henrich D, Marzi I. Altered gene expression patterns in dendritic cells after severe trauma: implications for systemic inflammation and organ injury. *Shock* 2008; **30**: 344–51.
- 22 Lasagni L, Grepin R, Mazzinghi B, Lazzeri E, Meini C, Sagrinati C, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Alain-Courtois N, Ballerini L, Netti GS, Maggi E, Annunziato F, Serio M, Romagnani S, Bikfalvi A, Romagnani P. PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood* 2007; **109**: 4127–34.
- 23 Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, Khalapyan TZ, Wolfe ML, Fairman R, Mitchell M, Carpenter J, Golden MA, Cines DB, Sachais BS. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost* 2003; **90**: 1112–20.
- 24 Shi G, Field DJ, Ko K, Ture S, Srivastava K, Levy S, Kowalska MA, Poncz M, Fowell DJ, Morrell CN. Platelet factor 4 limits Th17 differentiation and cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 2014; **124**: 543–52.
- 25 Rizvi AZ, Swain JR, Davies PS, Bailey AS, Decker AD, Willenbring H, Grompe M, Fleming WH, Wong MH. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 6321–5.
- 26 Silk AD, Gast CE, Davies PS, Fakhari FD, Vanderbeek GE, Mori M, Wong MH. Fusion between hematopoietic and epithelial cells in adult human intestine. *PLoS One* 2013; **8**: e55572.
- 27 Powell AE, Anderson EC, Davies PS, Silk AD, Pelz C, Impey S, Wong MH. Fusion between intestinal epithelial cells and macrophages in a cancer context results in nuclear reprogramming. *Cancer Res* 2011; **71**: 1497–505.
- 28 McConnell BB, Kim SS, Yu K, Ghaleb AM, Takeda N, Manabe I, Nusrat A, Nagai R, Yang VW. Krüppel-like factor 5 is important for maintenance of crypt architecture and barrier function in mouse intestine. *Gastroenterology* 2011; **141**: 1302–13, 1313.e1–6.
- 29 Itzkovitz S, Lyubimova A, Blat IC, Maynard M, van Es J, Lees J, Jacks T, Clevers H, van Oudenaarden A. Single-molecule transcript counting of stem-cell markers in the mouse intestine. *Nat Cell Biol* 2012; **14**: 106–14.
- 30 Muñoz J, Stange DE, Schepers AG, van de Wetering M, Koo B-K, Itzkovitz S, Volckmann R, Kung KS, Koster J, Radulescu S, Myant K, Versteeg R, Sansom OJ, van Es JH, Barker N, van Oudenaarden A, Mohammed S, Heck AJR, Clevers H. The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent ‘+4’ cell markers. *EMBO J* 2012; **31**: 3079–91.
- 31 Pang L, Xue H-H, Szalai G, Wang X, Wang Y, Watson DK, Leonard WJ, Blobel GA, Poncz M. Maturation stage-specific regulation of megakaryopoiesis by pointed-domain Ets proteins. *Blood* 2006; **108**: 2198–206.
- 32 Okada Y, Nobori H, Shimizu M, Watanabe M, Yonekura M, Nakai T, Kamikawa Y, Wakimura A, Funahashi N, Naruse H, Watanabe A, Yamasaki D, Fukada S-I, Yasui K, Matsumoto K, Sato T, Kitajima K, Nakano T, Aird WC, Doi T. Multiple ETS family proteins regulate PF4 gene expression by binding to the same ETS binding site. *PLoS One* 2011; **6**: e24837.
- 33 Okada Y, Watanabe M, Nakai T, Kamikawa Y, Shimizu M, Fukuhara Y, Yonekura M, Matsuura E, Hoshika Y, Nagai R, Aird WC, Doi T. RUNX1, but not its familial platelet disorder mutants, synergistically activates PF4 gene expression in combination with ETS family proteins. *J Thromb Haemost* 2013; **11**: 1742–50.
- 34 Jedlicka P, Sui X, Sussel L, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors control epithelial maturation and transit and crypt-villus morphogenesis in the mammalian intestine. *Am J Pathol* 2009; **174**: 1280–90.
- 35 Ebbe S, Stohlman F. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood* 1965; **26**: 20–35.

Bibliographie

Abercrombie, M., and Heaysman, J.E. (1954). Observations on the Social Behaviour of cells in tissue culture. *Exp. Cell Res.* *6*, 293–306.

Agool, A., Glaudemans, A.W.J.M., Boersma, H.H., Dierckx, R.A.J.O., Vellenga, E., and Slart, R.H.J.A. (2011). Radionuclide imaging of bone marrow disorders. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *38*, 166–178.

Aguilar, A., Pertuy, F., Eckly, A., Strassel, C., Collin, D., Gachet, C., Lanza, F., and Léon, C. (2016). Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood* *128*, 2022–2031.

Alam, S., Lovett, D.B., Dickinson, R.B., Roux, K.J., and Lele, T.P. (2014). Nuclear forces and cell mechanosensing. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *126*, 205–215.

Ali, N., Anwar, M., Majeed, I., and Tariq, W.U.Z. (2006). Chicken pox associated thrombocytopenia in adults. *J. Coll. Physicians Surg.* *16*, 270–272.

Almeida, F. V., Walko, G., McMillan, J.R., McGrath, J.A., Wiche, G., Barber, A.H., and Connelly, J.T. (2015). The cytolinker plectin regulates nuclear mechanotransduction in keratinocytes. *J. Cell Sci.* *128*, 4475–4486.

Antkowiak, A., Viaud, J., Severin, S., Zanoun, M., Ceccato, L., Chicanne, G., Strassel, C., Eckly, A., Léon, C., Gachet, C., et al. (2016). Cdc42-dependent F-actin dynamics drive structuration of the demarcation membrane system in megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* *14*, 1268–1284.

Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* *154*, 1047–1059.

Arnold, D.M., Nazi, I., Warkentin, T.E., Smith, J.W., Tottl, L.J., George, J.N., and Kelton, J.G. (2013). Approach to the Diagnosis and Management of Drug-Induced Immune Thrombocytopenia. *Transfus. Med. Rev.* *27*, 137–145.

Arsenovic, P.T., Ramachandran, I., Bathula, K., Zhu, R., Narang, J.D., Noll, N.A., Lemmon, C.A., Gundersen, G.G., and Conway, D.E. (2016). Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. *Biophys. J.* *110*, 34–43.

Arvidson, S.A., Lott, J.R., McAllister, J.W., Zhang, J., Bates, F., Lodge, T.P., Sammler, R.L., and Li, Y. (2013). Interplay of Phase Separation and Thermoreversible Gelation in Aqueous Methylcellulose Solutions. *Macromolecules* *46*, 300–309.

Asghar, W., El Assal, R., Shafiee, H., Pitteri, S., Paulmurugan, R., and Demirci, U. (2015). Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Mater. Today* *0*, 1–15.

Asparuhova, M.B., Ferralli, J., Chiquet, M., and Chiquet-Ehrismann, R. (2011). The transcriptional regulator megakaryoblastic leukemia-1 mediates serum response factor-independent activation of tenascin-C transcription by mechanical stress. *FASEB J.* *25*, 3477–3488.

Bibliographie

- Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., et al. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat. Med.* *10*, 64–71.
- Bagley, J., Rosenzweig, M., Marks, D.F., and Pykett, M.J. (1999). Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device. *Exp. Hematol.* *27*, 496–504.
- Baitsell, G.A. (1915). The origin and structure of a fibrous tissue which appears in living cultures of adult frog tissues. *J. Exp. Med.* *XXI*, 455–479.
- Baker, B.M., and Chen, C.S. (2012). Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* *125*, 3015–3024.
- Balduini, A., Pallotta, I., Malara, A., Lova, P., Pecci, A., Viarengo, G., Balduini, C.L., and Torti, M. (2008). Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* *6*, 1900–1907.
- Banu, N., Wang, J.-F., Deng, B., Groopman, J.E., and Avraham, H. (1995). Modulation of Megakaryocytopoiesis by Thrombopoietin : The c-Mpl Ligand. *Blood* *86*, 1331–1338.
- Banu, N., Rosenzweig, M., Kim, H., Bagley, J., and Pykett, M. (2001). Cytokine-augmented culture of haematopoietic progenitor cells in a novel three-dimensional cell growth matrix. *Cytokine* *13*, 349–358.
- Barnes, H.A., Hutton, J.F., and Walters, K. (1989). 1.Introduction; 2.Viscosity; 7.Rheology. In *An Introduction to Rheology*, H.A. Barnes, ed. (Oxford: Elsevier), pp. 1–156.
- Baró, A.M., and Reifengerger, R.G. (2012). General atomic force microscopy. In *Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Applications*, A.M. Baró, and R.G. Reifengerger, eds. (Weinheim: John Wiley & Sons), pp. 1–18.
- Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.S., Lu, H.S., Martin, F., Chang, M.S., Samal, B., Nichol, J.L., Swift, S., et al. (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* *77*, 1117–1124.
- Bausch, A.R., and Kroy, K. (2006). A bottom-up approach to cell mechanics. *Nat. Phys.* *2*, 231–238.
- Becker, R.P., and De Bruyn, P.P.H. (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am. J. Anat.* *145*, 183–205.
- Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J.C., and Giebel, B. (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Cell* *109*, 5494–5501.
- Bell, E., Ivarsson, B., and Merrill, C. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 1274–1278.
- Bellas, E., and Chen, C.S. (2014). Forms , forces , and stem cell fate. *Curr. Opin. Cell Biol.* *31*, 92–97.

Bibliographie

- Bender, M., Eckly, A., Hartwig, J.H., Elvers, M., Pleines, I., Gupta, S., Krohne, G., Jeanclos, E., Gohla, A., Gurniak, C., et al. (2010). ADF/n-cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. *Blood* *116*, 1767–1775.
- Bender, M., Thon, J.N., Ehrlicher, A.J., Wu, S., Mazutis, L., Deschmann, E., Sola-visner, M., Italiano, J.E., and Hartwig, J.H. (2015a). Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood* *125*, 860–869.
- Bender, M., Giannini, S., Grozovsky, R., Jonsson, T., Christensen, H., Pluthero, F.G., Ko, A., Mullally, A., Kahr, W.H.A., Hoffmeister, K.M., et al. (2015b). Dynamin 2 – dependent endocytosis is required for normal megakaryocyte development in mice. *Blood* *125*, 1014–1025.
- Berthier, R., Jacquier-Sarlin, M., Schweitzer, A., Block, M.R., and Molla, A. (1998). Adhesion of mature polyploid megakaryocytes to fibronectin is mediated by beta 1 integrins and leads to cell damage. *Exp. Cell Res.* *242*, 315–327.
- Besancenot, R., Roos-Weil, D., Tonetti, C., Abdelouahab, H., Lacout, C., Pasquier, F., Willenkens, C., Rameau, P., Lecluse, Y., Micol, J.-B., et al. (2014). JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation versus differentiation. *Blood* *124*, 1–4.
- Bianchi, E., Norfo, R., Pennucci, V., Zini, R., and Manfredini, R. (2016). Genomic landscape of megakaryopoiesis and platelet function defects. *Blood* *127*, 1249–1259.
- Birbrair, A., and Frenette, P.S. (2016). Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *IX*, 1–15.
- Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* *23*, 177–189.
- Blin, A., Le Goff, A., Magniez, A., Poirault-Chassac, S., Teste, B., Sicot, G., Nguyen, K.A., Hamdi, F.S., Reyssat, M., and Baruch, D. (2016). Microfluidic model of the platelet-generating organ: beyond bone marrow biomimetics. *Sci. Rep.* *6*, 1–12.
- Boneu, B., and Cazenave, J.-P. (1997). Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose (Laboratoire Millot).
- Bowers, M., Zhang, B., Ho, Y., Agarwal, P., Chen, C., and Bhatia, R. (2015). Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. *Blood* *125*, 2678–2689.
- Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* *44*, 287–300.
- Brangwynne, C.P., MacKintosh, F.C., Kumar, S., Geisse, N.A., Talbot, J., Mahadevan, L., Parker, K.K., Ingber, D.E., and Weitz, D.A. (2006). Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J. Cell Biol.* *173*, 733–741.
- Brummendorf, B.T.H., Dragowska, W., Zijlmans, J.M.J.M., Thornbury, G., and Lansdorp, P.M. (1998). Asymmetric Cell Divisions Sustain Long-Term. *J. Exp. Med.* *188*, 1117–1124.
- Bruno, S., Gunetti, M., Gammaitoni, L., Dane, A., Cavalloni, G., Sanavio, F., Fagioli, F., Aglietta, M., and

Bibliographie

Piacibello, W. (2003). In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica* 88, 379–387.

Buduo, C.A. Di, Wray, L.S., Tozzi, L., Malara, A., Chen, Y., Ghezzi, C.E., Smoot, D., Sfara, C., Antonelli, A., Spedden, E., et al. (2015). Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies. *Blood* 125, 2254–2265.

Bukoreshtliev, N. V., Haase, K., and Pelling, A.E. (2013). Mechanical cues in cellular signalling and communication. *Cell Tissue Res.* 352, 77–94.

Burkhardt, J.M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2012). The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 120, 73–81.

Caiazzo, M., Okawa, Y., Ranga, A., Piersigilli, A., Tabata, Y., and Lutolf, M.P. (2016). Defined three-dimensional microenvironments boost induction of pluripotency. *Nat. Mater.* 15, 344–352.

Caliari, S.R., Vega, S.L., Kwon, M., Soulas, E.M., and Burdick, J.A. (2016). Dimensionality and spreading influence MSC YAP/TAZ signaling in hydrogel environments. *Biomaterials* 103, 314–323.

Calvi, L.M., and Link, D.C. (2015). The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood* 126, 2443–2452.

Capodanno, D., Ferreira, J.L., and Angiolillo, D.J. (2013). Antiplatelet therapy: new pharmacological agents and changing paradigms. *J. Thromb. Haemost.* 11, 316–329.

Chabanon, A., Desterke, C., Rodenburger, E., Clay, D., Guerton, B., Boutin, L., Bennaceur-Griscelli, A., Pierre-Louis, O., Uzan, G., Abecassis, L., et al. (2008). A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor-beta controls the quiescence/cycling switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin. *Stem Cells* 26, 3150–3161.

Chambliss, A.B., Khatau, S.B., Erdenberger, N., Robinson, D.K., Hodzic, D., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2013). The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction. *Sci. Rep.* 3, 1–9.

Charbonney, E., Speight, P., Masszi, A., Nakano, H., and Kapus, A. (2011). beta-Catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition. *Mol. Biol. Cell* 22, 4472–4485.

Charras, G., and Sahai, E. (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 813–824.

Chen, S., Du, C., Shen, M., Zhao, G., Xu, Y., Yang, K., Wang, X., Li, F., Zeng, D., Chen, F., et al. (2015). Sympathetic stimulation facilitates thrombopoiesis by promoting megakaryocyte adhesion, migration and proplatelet formation. *Blood* 127, 1024–1036.

Cheng, E.-C., Luo, Q., Bruscia, E.M., Renda, M.J., Troy, J. a, Massaro, S. a, Tuck, D., Schulz, V., Mane, S.M., Berliner, N., et al. (2009). Role for MKL1 in megakaryocytic maturation. *Blood* 113, 2826–2834.

Chervenick, P.A., and Boggs, D.R. (1970). Bone Marrow Colonies : Stimulation in vitro by Supernatant from Incubated Human Blood Cells. *Science* 169, 691–692.

Bibliographie

Chevillard, C., and Axelos, M.A. V (1997). Phase separation of aqueous solution of methylcellulose. *Colloid Polym. Sci.* 275, 537–545.

Chitu, V., and Stanley, E.R. (2015). PACSIN2 : a BAR-rier forming the megakaryocyte DMS FXa variants advance toward. *Blood* 126, 5–7.

Choi, J.S., and Harley, B.A.C. (2012). The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials* 33, 4460–4468.

Corselli, M., Chin, C.J., Parekh, C., Sahaghian, A., Wang, W., Ge, S., Evseenko, D., Wang, X., Montelatici, E., Lazzari, L., et al. (2013). Perivascular support of human hematopoietic cells. *Blood* 121, 2891–2901.

Cramer, E.M., Norol, F., Guichard, J., Breton-Gorius, J., Vainchenker, W., Massé, J.M., and Debili, N. (1997). Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood* 89, 2336–2346.

Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D., and Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* 172, 41–53.

Cui, Y., Hameed, F.M., Yang, B., Lee, K., Pan, C.Q., Park, S., and Sheetz, M. (2015). Cyclic stretching of soft substrates induces spreading and growth. *Nat. Commun.* 6, 1–8.

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

Currao, M., Malara, A., Di Buduo, C. a., Abbonante, V., Tozzi, L., and Balduini, A. (2015). Hyaluronan based hydrogels provide an improved model to study megakaryocyte–matrix interactions. *Exp. Cell Res.* 346, 1–8.

Dar, S., and Pucadyil, T.J. (2017). The pleckstrin-homology domain of dynamin is dispensable for membrane constriction and fission. *Mol. Biol. Cell* 28, 152–160.

Das, A., Fischer, R.S., Pan, D., and Waterman, C.M. (2016). YAP nuclear localization in the absence of cell-cell contact is mediated by a filamentous actin-dependent, myosin II- and phospho-YAP independent pathway during ECM mechanosensing. *J. Biol. Chem.* 291, 6096–6110.

Debili, N., Coulombel, L., Croisille, L., Katz, A., Guichard, J., Breton-gorius, J., and Vainchenker, W. (1996). Characterization of a Bipotent Erythro-Megakaryocytic Progenitor in Human Bone Marrow. *Blood* 88, 1284–1296.

Dellagi, K., Vainchenker, W., Vinci, G., Paulin, D., and Brouet, J.C. (1983). Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *EMBO J.* 2, 1509–1514.

Demange, E., Kassim, Y., Petit, C., Buquet, C., Dulong, V., Cerf, D. Le, Buchonnet, G., and Vannier, J. (2012). Survival of cord blood haematopoietic stem cells in a hyaluronan hydrogel for ex vivo biomimicry. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 7, 901–910.

Deng, W., Xu, Y., Chen, W., Paul, D.S., Syed, A.K., Dragovich, M.A., Liang, X., Zakas, P., Berndt, M.C., Di Paola, J., et al. (2016). Platelet clearance via shear-induced unfolding of a membrane

mechanoreceptor. *Nat. Commun.* **7**, 1–13.

Desbrières, J., Hirrien, M., and Ross-murphy, S.B. (2000). Thermogelation of methylcellulose : rheological considerations. *Polymer* **41**, 2451–2461.

Deutsch, V.R., and Tomer, A. (2006). Megakaryocyte development and platelet production. *Br. J. Haematol.* **134**, 453–466.

Deutsch, V.R., and Tomer, A. (2013). Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br. J. Haematol.* **161**, 778–793.

Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2015). Mechanosensing via cell-matrix adhesions in 3D microenvironments. *Exp. Cell Res.* **343**, 60–66.

Doyle, A.D., Kutys, M.L., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S., and Yamada, K.M. (2012). Micro-environmental control of cell migration--myosin IIA is required for efficient migration in fibrillar environments through control of cell adhesion dynamics. *J. Cell Sci.* **125**, 2244–2256.

Doyle, A.D., Carvajal, N., Jin, A., Matsumoto, K., and Yamada, K.M. (2015). Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat. Commun.* **6**, 1–15.

Drayer, A.L., Smit Sibinga, C.T., Blom, N.R., De Wolf, J.T.M., and Vellenga, E. (2000). The in vitro effects of cytokines on expansion and migration of megakaryocyte progenitors. *Br. J. Haematol.* **109**, 776–784.

Dunois-Lardé, C., Capron, C., Fichelson, S., Bauer, T., Cramer-Bordé, E., and Baruch, D. (2009). Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* **114**, 1875–1883.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–183.

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

Eckly, A., Rinckel, J.-Y., Laeuffer, P., Cazenave, J.-P., Lanza, F., Gachet, C., and Leon, C. (2010). Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2243–2251.

Eckly, A., Strassel, C., Cazenave, J.-P., Lanza, F., Leon, C., and Gachet, C. (2012). Characterization of Megakaryocyte Development in the Native Bone Marrow Environment. *Platelets and Megakaryocytes* **3**, 175–192.

Eckly, A., Heijnen, H., Pertuy, F., Geerts, W., Proamer, F., Rinckel, J.-Y., Léon, C., Lanza, F., and Gachet, C. (2014). Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* **123**, 921–930.

Elagib, K.E., Racke, F.K., Mogass, M., Khetawat, R., Delehanty, L.L., and Goldfarb, A.N. (2003). RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* **101**, 4333–4341.

Elsdale, T., and Bard, J. (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.* **54**, 626–637.

Bibliographie

- Emerman, J.T., and Pitelka, D.R. (1977). Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro* *13*, 316–328.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* *126*, 677–689.
- Even-Ram, S., Doyle, A.D., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S., and Yamada, K.M. (2007). Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat. Cell Biol.* *9*, 299–309.
- Fedorchak, G.R., Kaminski, A., and Lammerding, J. (2014). Cellular mechanosensing: Getting to the nucleus of it all. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *115*, 76–92.
- Fielder, B.P.J., Gurney, A.L., Stefanich, E., Marian, M., Moore, M.W., Carver-moore, K., and de Sauvage, F.J. (1996). Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood* *87*, 2154–2161.
- Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* *463*, 485–492.
- Fouchard, J., Mitrossilis, D., and Asnacios, A. (2011). Acto-myosin based response to stiffness and rigidity sensing. *Cell Adhes. Migr.* *5*, 16–19.
- Gachet, C. (2015). Antiplatelet drugs : which targets for which treatments ? *J. Thromb. Haemost.* *13*, 313–322.
- Galbraith, C.G., Skalak, R., and Chien, S. (1998). Shear stress induces spatial reorganisation of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton* *40*, 317–330.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., and Sheetz, M.P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *J. Cell Biol.* *159*, 695–705.
- Gasparski, A.N., and Beningo, K. a. (2015). Mechanoreception at the Cell Membrane: More than the Integrins. *Arch. Biochem. Biophys.* *2015 Nov 2*, 20–26.
- Ghassemi, S., Meacci, G., Liu, S., Gondarenko, A.A., Mathur, A., Roca-Cusachs, P., Sheetz, M.P., and Hone, J. (2012). Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5328–5333.
- Ghosh, S., Ashcraft, K., Jahid, M.J., April, C., Ghajar, C.M., Ruan, J., Wang, H., Foster, M., Hughes, D.C., Ramirez, A.G., et al. (2013). Regulation of adipose oestrogen output by mechanical stress. *Nat. Commun.* *4*, 1–14.
- Giulitti, S., Zambon, A., Michielin, F., and Elvassore, N. (2016). Mechanotransduction through substrates engineering and microfluidic devices. *Curr. Opin. Chem. Eng.* *11*, 67–76.
- Goldman, R.D., Grin, B., Mendez, M.G., and Kuczmarski, E.R. (2008). Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 28–34.
- Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettpepel, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* *495*, 227–230.

- Greenberg, M.J., Arpaž, G., Tüzel, E., and Ostap, E.M. (2016). A Perspective on the Role of Myosins as Mechanosensors. *Biophys. J.* *110*, 2568–2576.
- Grozovsky, R., Begonja, A.J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J.H., Falet, H., and Hoffmeister, K.M. (2015). The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat. Med.* *21*, 47–54.
- Guharay, F., and Sachs, F. (1984). Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol.* *352*, 685–701.
- Guthold, M., Liu, W., Sparks, E.A., Jawerth, L.M., Peng, L., Falvo, M., Superfine, R., Hantgan, R.R., and Lord, S.T. (2007). A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. *Cell Biochem. Biophys.* *49*, 165–181.
- Haas, S., Hansson, J., Klimmeck, D., Loeffler, D., Velten, L., Uckelmann, H., Wurzer, S., Prendergast, A.M., Schnell, A., Hexel, K., et al. (2015). Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell Stem Cell* *17*, 422–434.
- Halder, G., Dupont, S., and Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 591–600.
- Handagama, P., Rappolee, D.A., Werb, Z., Levin, J., and Bainton, D.F. (1990). Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* *86*, 1364–1368.
- Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Sweeney, M., and Proudfoot, A.E. (2005). Regulation of Protein Function By Glycosaminoglycans—As Exemplified By Chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 385–410.
- Harada, T., Swift, J., Irianto, J., Shin, J.W., Spinler, K.R., Athirasala, A., Diegmiller, R., Dingal, P.C.D.P., Ivanovska, I.L., and Discher, D.E. (2014). Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *J. Cell Biol.* *204*, 669–682.
- Hardouin, P., Rharass, T., and Lucas, S. (2016). Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front. Endocrinol.* *7*, 1–11.
- Harrison, R.G. (1914). The reaction of embryonic cells to solid structures. *J. Exp. Zool.* *17*, 521–544.
- Hashimoto, Y., and Ware, J. (1995). Identification of essential GATA and Ets binding motifs within the promoter of the platelet glycoprotein Iba gene. *J. Biol. Chem.* *270*, 24532–24539.
- Heijnen, H.F., Debili, N., Vainchencker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1998). Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood* *91*, 2313–2325.
- Heisenberg, C.P., and Bellaïche, Y. (2013). Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* *153*, 948–962.
- Herglotz, J., Kuvardina, O.N., Kolodziej, S., Kumar, A., Hussong, H., Grez, M., and Lausen, J. (2013). Histone arginine methylation keeps RUNX1 target genes in an intermediate state. *Oncogene* *32*, 2565–2575.

Bibliographie

Hiraiwa, T., and Salbreux, G. (2016). Role of Turnover in Active Stress Generation in a Filament Network. *Phys. Rev. Lett.* *116*, 1–5.

Hirata, H., Tatsumi, H., Hayakawa, K., and Sokabe, M. (2015). Non-channel mechanosensors working at focal adhesion-stress fiber complex. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* *467*, 141–155.

Ho, C.Y., Jaalouk, D.E., Vartiainen, M.K., and Lammerding, J. (2013). Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* *497*, 507–511.

Hoffman, A.S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *54*, 3–12.

Huang, H.-S., and Chang, H.-H. (2012). Platelets in inflammation and immune modulations: functions beyond hemostasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* *60*, 443–451.

Huang, C.-C., Ravindran, S., Yin, Z., and George, A. (2014). 3-D self-assembling leucine zipper hydrogel with tunable properties for tissue engineering. *Biomaterials* *35*, 5316–5326.

Huang, X., Yang, N., Fiore, V.F., Barker, T.H., Sun, Y., Morris, S.W., Ding, Q., Thannickal, V.J., and Zhou, Y. (2012). Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *47*, 340–348.

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

Huveneers, S., and de Rooij, J. (2013). Mechanosensitive systems at the cadherin-F-actin interface. *J. Cell Sci.* *126*, 403–413.

Ichikawa, Y., Pluznik, D.H., and Sachs, L. (1966). In Vitro Control of the Development of Macrophage and Granulocyte colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *56*, 488–495.

Italiano, J.E., Lecine, P., Shivdasani, R.A., and Hartwig, J.H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* *147*, 1299–1312.

Ivanovska, I.L., Shin, J.-W., Swift, J., and Discher, D.E. (2015). Stem cell mechanobiology: diverse lessons from bone marrow. *Trends Cell Biol.* *25*, 523–532.

Iyer, K.V., Pulford, S., Mogilner, A., and Shivashankar, G.V. (2012). Mechanical Activation of Cells Induces Chromatin Remodeling Preceding MKL Nuclear Transport. *Biophys. J.* *103*, 1416–1428.

Jacobelli, J., Friedman, R.S., Conti, M.A., Lennon-Dumenil, A.-M., Piel, M., Sorensen, C.M., Adelstein, R.S., and Krummel, M.F. (2010). Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions. *Nat. Immunol.* *11*, 953–961.

Jain, S., Sandhu, P.S., Malvi, R., and Gupta, B. (2013). Cellulose Derivatives as Thermoresponsive Polymer : An Overview. *J. Appl. Pharm. Sci.* *3*, 139–144.

Jansen, K.A., Donato, D.M., Balcioglu, H.E., Schmidt, T., Danen, E.H.J., and Koenderink, G.H. (2015). A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1853*, 3043–3052.

Bibliographie

- Jiang, Y., Chen, J., Deng, C., Suuronen, E.J., and Zhong, Z. (2014). Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 35, 4969–4985.
- Johnson, G.R., and Metcalf, D. (1977). Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3879–3882.
- Johnson, B., Fletcher, S.J., and Morgan, N. V (2016). Inherited thrombocytopenia: novel Insights into megakaryocyte maturation, proplatelet formation and platelet lifespan. *Platelets* 27, 519–525.
- Joshi, S.C., and Lam, Y.C. (2006). Modeling heat and degree of gelation for methyl cellulose hydrogels with NaCl additives. *J. Appl. Polym. Sci.* 101, 1620–1629.
- Jozaki, T., Aoki, K., Mizumoto, H., and Kajiwara, T. (2010). In vitro reconstruction of a three-dimensional mouse hematopoietic microenvironment in the pore of polyurethane foam. *Cytotechnology* 62, 531–537.
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Shivdasani, R. a, et al. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317, 1767–1770.
- Jurak Begonja, A., Pluthero, F.G., Suphamongmee, W., Giannini, S., Christensen, H., Leung, R., Lo, R.W., Nakamura, F., Lehman, W., Plomann, M., et al. (2015). FlnA binding to PACSIN2 F-BAR domain regulates membrane tubulation in megakaryocytes and platelets. *Blood* 126, 80–89.
- Kaminski, A., Fedorchak, G.R., and Lammerding, J. (2014). The cellular mastermind(?)—mechanotransduction and the nucleus. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 126, 157–203.
- Karagiannis, P., and Eto, K. (2015). Manipulating megakaryocytes to manufacture platelets ex vivo. *J. Thromb. Haemost.* 13, 47–53.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124, 407–421.
- Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R.D., Broudy, V.C., Lin, N., Bailey, M.C., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Oort, P.J., Hagen, F.S., et al. (1994). Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 369, 568–571.
- Khalilgharibi, N., Fouchard, J., Recho, P., Charras, G., and Kabla, A. (2016). The dynamic mechanical properties of cellularised aggregates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 42, 113–120.
- King, S.M., and Reed, G.L. (2002). Development of platelet secretory granules. *Cell Dev. Biol.* 13, 293–302.
- Klein, G. (1995). The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 51, 914–926.
- Klein, G., Conzelmann, S., Beck, S., Timpl, R., and Muller, C.A. (1994). Perlecan in human bone marrow: A growth-factor-presenting, but anti-adhesive, extracellular matrix component for hematopoietic cells. *Matrix Biol.* 14, 457–465.

Bibliographie

Kobayashi, K., Huang, C.-I., and Lodge, T.P. (1999). Thermoreversible gelation of aqueous methylcellulose solutions. *Macromolecules* *32*, 7070–7077.

Kricun, M.E. (1985). Red-yellow marrow conversion : Its effect on the location of some solitary bone lesions. *Skeletal Radiol.* *14*, 10–19.

Kunishima, S., Okuno, Y., Yoshida, K., Shiraishi, Y., Sanada, M., Muramatsu, H., Chiba, K., Tanaka, H., Miyazaki, K., Sakai, M., et al. (2013a). ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *Am. J. Hum. Genet.* *92*, 431–438.

Kunishima, S., Nishimura, S., Suzuki, H., Imaizumi, M., and Saito, H. (2013b). TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur. J. Haematol.* *92*, 276–282.

Kuter, D.J. (2009). Thrombopoietin and Thrombopoietin Mimetics in the Treatment of Thrombocytopenia. *Annu. Rev. Med.* *60*, 193–206.

Kuter, D.J., and Rosenberg, R.D. (1995). The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* *85*, 225–236.

Kutys, M.L., and Chen, C.S. (2016). Forces and mechanotransduction in 3D vascular biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* *42*, 73–79.

Lajtha, L.G., Oliver, R., and Gurney, C.W. (1962). Kinetic Model of a Bone-Marrow Stem-Cell Population. *Br. J. Haematol.* *8*, 442–460.

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

Lamé, G. (1866). Première leçon. In *Leçons Sur La Théorie Mathématique de L'élasticité Des Corps Solides*, Gauthier Villars, ed. (Paris), pp. 1–26.

Lammerding, J., Fong, L.G., Ji, J.Y., Reue, K., Stewart, C.L., Young, S.G., and Lee, R.T. (2006). Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J. Biol. Chem.* *281*, 25768–25780.

Lanotte, M., Schor, S., and Dexter, T.M. (1981). Collagen Gels as a Matrix for Haemopoiesis. *J. Cell. Physiol.* *106*, 269–277.

Larson, M.K., and Watson, S.P. (2006). Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin α IIb β 3. *Blood* *108*, 1509–1514.

Lataillade, J.J., Clay, D., Dupuy, C., Rigal, S., Jasmin, C., Bourin, P., and Le Bousse-Kerdilès, M.C. (2000). Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* *95*, 756–768.

Lataillade, J.J., Domenech, J., and Le Bousse-Kerdilès, M.-C. (2004). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: Survival, cell cycling and trafficking. *Eur. Cytokine Netw.* *15*, 177–188.

Bibliographie

Lecine, B.P., Villeval, J., Vyas, P., Swencki, B., Xu, Y., and Shivdasani, R.A. (1998). Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood* 5, 1608–1617.

Lecine, P., Italiano, J.E., Kim, S.W., Villeval, J.L., and Shivdasani, R.A. (2000). Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* 96, 1366–1373.

Leckie, F.A., and Bello, D.J. (2009). Strain and stress. In *Strength and Stiffness of Engineering Systems*, F.A. Leckie, and D.J. Bello, eds. (New York, NY: Springer Science & Business Media), pp. 43–57.

Lee, S., Vasishtha, M., and Prywes, R. (2010). Activation and Repression of Cellular Immediate Early Genes by Serum Response Factor Cofactors. *J. Biol. Chem.* 285, 22036–22049.

Lee-Thedieck, C., and Spatz, J.P. (2014). Biophysical regulation of hematopoietic stem cells. *Biomater. Sci.* 2, 1548–1561.

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

Lepage, A., Uzan, G., Touche, N., Morales, M., Cazenave, J.-P., Lanza, F., and De la Salle, C. (1999). Functional characterization of the human platelet glycoprotein V gene promoter : a specific marker of late megakaryocytic differentiation. *Blood* 94, 3366–3381.

Li, Y., Ma, T., Kniss, D.A., Yang, S.-T.T., and Lasky, L.C. (2001). Human Cord Cell Hematopoiesis in Three-Dimensional Nonwoven Fibrous Matrices: In Vitro Simulation of the Marrow Microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 355–368.

Liu, Y.J., Le Berre, M., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-Jones, A., Heuzé, M., Takaki, T., Voituriez, R., and Piel, M. (2015). Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell* 160, 659–672.

Lombardi, M.L., and Lammerding, J. (2011). Keeping the LINC: the importance of nucleocytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1729–1734.

Lombardi, M.L., Jaalouk, D.E., Shanahan, C.M., Burke, B., Roux, K.J., and Lammerding, J. (2011). The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 286, 26743–26753.

Lordier, L., Bluteau, D., Jalil, A., Legrand, C., Pan, J., Rameau, P., Jouni, D., Bluteau, O., Mercher, T., Leon, C., et al. (2012). RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun.* 3, 1–10.

Lutolf, M.P., Lauer-Fields, J.L., Schmoekel, H.G., Metters, A.T., Weber, F.E., Fields, G.B., and Hubbell, J.A. (2003). Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5413–5418.

Machlus, K.R., Wu, S.K., Stumpo, D.J., Soussou, T.S., Paul, D.S., Campbell, R.A., Kalwa, H., Michel, T., Bergmeier, W., Weyrich, A.S., et al. (2016). Synthesis and dephosphorylation of MARCKS in the late stages of megakaryocyte maturation drive proplatelet formation. *Blood* 127, 1468–1480.

Bibliographie

- Maciver, S.K. (1996). Myosin II function in non muscle cells. *BioEssays* 18, 179–182.
- Malara, A., Gruppi, C., Pallotta, I., Spedden, E., Tenni, R., Raspanti, M., Kaplan, D., Tira, M.E., Staii, C., and Balduini, A. (2011). Extracellular matrix structure and nano-mechanics determine megakaryocyte function. *Blood* 118, 4449–4453.
- Malara, A., Currao, M., Gruppi, C., Celesti, G., Viarengo, G., Buracchi, C., Laghi, L., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2013). Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen and laminin. *Stem Cells* 32, 1–17.
- Malek, A.M., and Izumo, S. (1996). Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J. Cell Sci.* 109, 713–726.
- Malkin, A.I., Malkin, A.Y., and Isayev, A.I. (2006). Introduction; 1. Continuum mechanics as a foundation of rheology; 2. Viscoelasticity. In *Rheology: Concepts, Methods & Applications*, (Toronto: ChemTec Publishing), pp. 1–91.
- Mammoto, A., Mammoto, T., and Ingber, D.E. (2012). Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. *J. Cell Sci.* 125, 3061–3073.
- Mammoto, T., Mammoto, A., and Ingber, D.E. (2013). Mechanobiology and developmental control. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 27–61.
- Martinac, B. (2014). The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 682–691.
- McDargh, Z.A., Vázquez-Montejo, P., Guven, J., and Deserno, M. (2016). Constriction by dynamin: Elasticity versus adhesion. *Biophys. J.* 111, 2470–2480.
- McNicol, A., and Israels, S.J. (1999). Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* 95, 1–18.
- Metcalf, D. (1970). Studies on Colony Formation In vitro by Mouse Bone Marrow Cells. *J. Cell. Physiol.* 76, 89–99.
- Metcalf, D., Johnson, G.R., and Mandel, T.E. (1979). Colony formation in agar by multipotential hemopoietic cells. *J. Cell. Physiol.* 98, 401–420.
- Michalopoulos, G., and Pitot, H.C. (1975). Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Exp. Cell Res.* 94, 70–78.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A., and Treisman, R. (2003). Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell* 113, 329–342.
- Mizuguchi, M., Fujii, T., Obita, T., Ishikawa, M., Tsuda, M., and Tabuchi, A. (2014). Transient α -helices in the disordered RPEL motifs of the serum response factor coactivator MKL1. *Sci. Rep.* 4, 1–6.
- Moon, S., Kim, W., Kim, S., Kim, Y., Song, Y., Bilousov, O., Kim, J., Lee, T., Cha, B., Kim, M., et al. (2017). Phosphorylation by NLK inhibits YAP-13-3-interactions and induces its nuclear localization. *EMBO Rep.* 18, 61–71.

Bibliographie

Morgan, J.T., Murphy, C.J., and Russell, P. (2013). What do mechanotransduction, Hippo, Wnt, and TGFbeta have in common? YAP and TAZ as key orchestrating molecules in ocular health and disease. *Exp. Eye Res.* *115*, 1–12.

Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J., and Kusumi, A. (2006). Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* *174*, 851–862.

Nakagawa, Y., Nakamura, S., Nakajima, M., Endo, H., Dohda, T., Takayama, N., Nakauchi, H., Arai, F., Fukuda, T., and Eto, K. (2013). Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp. Hematol.* *41*, 742–748.

Nakajima-Takagi, Y., Osawa, M., and Iwama, A. (2014). Manipulation of hematopoietic stem cells for regenerative medicine. *Anat. Rec.* *297*, 111–120.

Nakeff, A., and Maat, B. (1974). Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by velocity sedimentation. *Blood* *43*, 591–595.

Nasatto, P.L., Pignon, F., Silveira, J.L.M., Duarte, M.E.R., Nosedá, M.D., and Rinaudo, M. (2015). Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications. *Polymers* *7*, 777–803.

Naughton, B.A., and Naughton, G.K. (1989). Hematopoiesis on nylon mesh templates. Comparative long-term bone marrow culture and the influence of stromal support cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* *554*, 125–140.

Neidlinger-Wilke, C., Grood, E.S., Wang, J.H.C., Brand, R.A., and Claes, L. (2001). Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: Studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J. Orthop. Res.* *19*, 286–293.

Nichol, J.L., Hokom, M.M., Homkohl, A., Sheridan, W.P., Ohashi, H., Kato, T., Li, Y.S., Bartley, T.D., Choi, E., Bogenberger, J., et al. (1995). Megakaryocyte Growth and Development Factor. Analyses of in vitro effects on human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* *95*, 2973–2978.

Nilsson, S.K., Debatis, M.E., Dooner, M.S., Madri, J. a, Quesenberry, P.J., and Becker, P.S. (1998). Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J. Histochem. Cytochem.* *46*, 371–377.

Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T., Bertoncello, I., Bendall, L.J., Simmons, P.J., and Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* *106*, 1232–1239.

Nishikii, H., Kanazawa, Y., Umemoto, T., Goltsev, Y., Matsuzaki, Y., Matsushita, K., Yamato, M., Nolan, G.P., Negrin, R., and Chiba, S. (2015). Unipotent Megakaryopoietic Pathway Bridging Hematopoietic Stem Cells and Mature Megakaryocytes. *Stem Cells* *33*, 2196–2207.

Nishimoto, T., Okazaki, Y., Numajiri, M., and Kuwana, M. (2016). Mouse immune thrombocytopenia is associated with Th1 bias and expression of activating Fcγ receptors. *Int. J. Hematol.* 1–8.

Bibliographie

- Noh, J., Gandre-babbe, S., Wang, Y., Hayes, V., Yao, Y., Gadue, P., Sullivan, S.K., Chou, S.T., Machlus, K.R., Jr, J.E.I., et al. (2015). Inducible Gata1 suppression expands megakaryocyte- erythroid progenitors from embryonic stem cells. *J. Clin. Invest.* *125*, 2369–2374.
- Norotte, C., Marga, F.S., Niklason, L.E., and Forgacs, G. (2009). Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* *30*, 5910–5917.
- Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., Mcleod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., et al. (2015). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* *351*, 1–9.
- Nurden, A.T. (2005). Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 1773–1782.
- Nurden, A.T., and Nurden, P. (2013). Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br. J. Haematol.* *165*, 165–178.
- Occhetta, P., Sadr, N., Piraino, F., Redaelli, A., Moretti, M., and Rasponi, M. (2013). Fabrication of 3D cell-laden hydrogel microstructures through photo-mold patterning. *Biofabrication* *5*, 1–10.
- Olson, E.N., and Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 353–365.
- Pajerowski, J.D., Dahl, K.N., Zhong, F.L., Sammak, P.J., and Discher, D.E. (2007). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15619–15624.
- Park, R.J., Shen, H., Liu, L., Liu, X., Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2013). Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *J. Cell Sci.* *126*, 5305–5312.
- Patel, S.R., Richardson, J.L., Schulze, H., Kahle, E., Galjart, N., Drabek, K., Shivdasani, R. a, Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005a). Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* *106*, 4076–4085.
- Patel, S.R., Hartwig, J.H., and Jr, J.E.I. (2005b). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.* *115*, 3348–3354.
- Patel-Hett, S., Wang, H., Begonja, A.J., Thon, J.N., Alden, E.C., Wandersee, N.J., An, X., Mohandas, N., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2011). The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation. *Blood* *118*, 1641–1652.
- Pati, F., Jang, J., Ha, D.-H., Won Kim, S., Rhie, J.-W., Shim, J.-H., Kim, D.-H., and Cho, D.-W. (2014). Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat. Commun.* *5*, 1–11.
- Pease, D.C. (1956). An electron microscopic study of red bone marrow. *Blood* *11*, 501–526.
- Pecci, A., and Balduini, C.L. (2014). Lessons in platelet production from inherited thrombocytopenias. *Br. J. Haematol.* *165*, 179–192.
- Penington, D.G., Streatfield, K., and Roxburgh, A.E. (1976). Megakaryocytes and the Heterogeneity of

Circulating Platelets. *Br. J. Haematol.* *34*, 639–653.

Pertuy, F., Eckly, A., Weber, J., Proamer, F., Rinckel, J.-Y., Lanza, F., Gachet, C., and Léon, C. (2013). Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood* *123*, 1261–1269.

Petrie, R.J., and Yamada, K.M. (2016). Multiple mechanisms of 3D migration: the origins of plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* *42*, 7–12.

Pietrzyk-Nivau, A., Poirault-Chassac, S., Gandrille, S., Derkaoui, S.-M., Kauskot, A., Letourneur, D., Le Visage, C., and Baruch, D. (2015). Three-Dimensional Environment Sustains Hematopoietic Stem Cell Differentiation into Platelet-Producing Megakaryocytes. *PLoS One* *10*, 1–19.

Pineault, N., Cortin, V., Boyer, L., Garnier, A., Robert, A., Thérien, C., and Roy, D.-C. (2011). Individual and synergistic cytokine effects controlling the expansion of cord blood CD34(+) cells and megakaryocyte progenitors in culture. *Cytotherapy* *13*, 467–480.

Pipes, G.C.T., Creemers, E.E., and Olson, E.N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: Versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* *20*, 1545–1556.

Pleines, I., Dütting, S., Cherpokova, D., Eckly, A., Meyer, I., Morowski, M., Krohne, G., Schulze, H., Gachet, C., Debili, N., et al. (2013). Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42. *Blood* *122*, 3178–3187.

Plotnikov, S. V., Pasapera, A.M., Sabass, B., and Waterman, C.M. (2012). Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell* *151*, 1513–1527.

Radley, J.M., and Haller, C.J. (1982). The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* *60*, 213–219.

Radley, J.M., and Scurfield, G. (1979). Effects of 5-Fluorouracil on Mouse Bone Marrow. *Br. J. Haematol.* *43*, 341–351.

Ragu, C., Boukour, S., Elain, G., Wagner-Ballon, O., Raslova, H., Debili, N., Olson, E.N., Daegelen, D., Vainchenker, W., Bernard, O. a, et al. (2010). The serum response factor (SRF)/megakaryocytic acute leukemia (MAL) network participates in megakaryocyte development. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* *24*, 1227–1230.

Rape, A.D., Zibinsky, M., Murthy, N., and Kumar, S. (2015). A synthetic hydrogel for the high-throughput study of cell-ECM interactions. *Nat. Commun.* *6*, 1–9.

Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J.M., and Jones, M.R. (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell. Physiol.* *190*, 7–20.

Reagan, M.R., and Rosen, C.J. (2016). Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 154–168.

Reilly, G.C., and Engler, A.J. (2010). Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J. Biomech.* *43*, 55–62.

Bibliographie

- Richardson, J.L., Shivdasani, R. a, Boers, C., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005). Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 106, 4066–4075.
- Del Rio, A., Perez-jimenez, R., Liu, R., Roca-cusachs, P., Fernandez, J., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science* 323, 638–641.
- Rolland, L. (2013). Propriétés physico-chimiques de capsules d ' hydrogel à cœur liquide. Pierre et Marie Curie.
- Roy, A., Lordier, L., Mazzi, S., Chang, Y., Lapierre, V., Larghero, J., Debili, N., Raslova, H., and Vainchenker, W. (2016). Differential activity of nonmuscle myosin II isoforms determines their localization at the cleavage furrow of megakaryocytes. *Blood* 128, 3137–3146.
- Ruggeri, Z.M., Orje, J.N., Habermann, R., Federici, A.B., and Reininger, A.J. (2006). Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 108, 1903–1910.
- Sabri, S., Jandrot-Perrus, M., Bertoglio, J., Farndale, R.W., Mansat-De Mas, V., Debili, N., and Vainchenker, W. (2004). Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by alpha2beta1 integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood* 104, 3117–3125.
- Salbreux, G., Charras, G., and Paluch, E. (2012). Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 22, 536–545.
- Salles, I.I., Feys, H.B., Iserbyt, B.F., De Meyer, S.F., Vanhoorelbeke, K., and Deckmyn, H. (2008). Inherited traits affecting platelet function. *Blood Rev.* 22, 155–172.
- Sanada, C., Xavier-Ferruccio, J., Lu, Y.-C., Min, E., Zhang, P.-X., Zou, S., Kang, E., Zhang, M., Zerfati, G., Gallagher, P.G., et al. (2016). Adult human megakaryocyte-erythroid progenitors are in the CD34+CD38mid fraction. *Blood* 128, 923–933.
- Sanjuan-Pla, A., Macaulay, I.C., Jensen, C.T., Woll, P.S., Luis, T.C., Mead, A., Moore, S., Carella, C., Matsuoka, S., Jones, T.B., et al. (2013). Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* 502, 232–236.
- de Sauvage, F.J., Haas, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., Kuang, W.-J., et al. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369, 533–538.
- Scharenberg, M. a, Pippenger, B.E., Sack, R., Zingg, D., Ferralli, J., Schenk, S., Martin, I., and Chiquet-Ehrismann, R. (2014). TGF- β -induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms. *J. Cell Sci.* 127, 1079–1091.
- Scharenberg, M. a., Chiquet-Ehrismann, R., and Asparuhova, M.B. (2010). Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1911–1914.
- Scheufler, O., Schaefer, D.J., Jaquiery, C., Braccini, A., Wendt, D.J., Gasser, J.A., Galli, R., Pierer, G., Heberer, M., and Martin, I. (2008). Spatial and temporal patterns of bone formation in ectopically pre-fabricated , autologous cell-based engineered bone flaps in rabbits. *J. Cell. Mol.* 12, 1238–1249.
- Schmitt, A., Guichard, J., Massé, J.M., Debili, N., and Cramer, E.M. (2001). Of mice and men:

comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp. Hematol.* **29**, 1295–1302.

Schulze, H., Korpál, M., Hurov, J., Kim, S.W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T., and Shivdasani, R.A. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* **107**, 3868–3875.

Shaklai, M., and Tavassoli, M. (1978). Demarcation Membrane System in Rat Megakaryocyte and the Mechanism of Platelet Formation : A Membrane , Reorganization Process. *J. Ultrastructure Res.* **62**, 270–285.

Shamir, E.R., and Ewald, A.J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 647–664.

Shen, Y., and Nilsson, S.K. (2012). Bone, microenvironment and hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* **19**, 250–255.

Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S.I., Pack, C.G., Solovei, I., Goldman, A.E., Adam, S.A., Shumaker, D.K., Kinjo, M., Cremer, T., et al. (2008). The A- and B-type nuclear lamin networks: Microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* **22**, 3409–3421.

Shin, J.-W., Buxboim, A., Spinler, K.R., Swift, J., Christian, D.A., Hunter, C.A., Léon, C., Gachet, C., Dingal, P.C.D.P., Ivanovska, I.L., et al. (2013a). Contractile Forces Sustain and Polarize Hematopoiesis from Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* **14**, 81–93.

Shin, J.-W., Spinler, K.R., Swift, J., Chasis, J. a, Mohandas, N., and Discher, D.E. (2013b). Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18892–18897.

Small, J. V (1988). The actin cytoskeleton. *Electron Microsc. Rev.* **1**, 155–174.

Smith, E.C., Teixeira, A.M., Chen, R.C., Wang, L., Gao, Y., Hahn, K.L., and Krause, D.S. (2013). Induction of megakaryocyte differentiation drives nuclear accumulation and transcriptional function of MKL1 via actin polymerization and RhoA activation. *Blood* **121**, 1094–1101.

Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58–62.

Speight, P., Kofler, M., Szász, K., and Kapus, A. (2016). Context-dependent switch in chemo/mechanotransduction via multilevel crosstalk among cytoskeleton-regulated MRTF and TAZ and TGFβ-regulated Smad3. *Nat. Commun.* **7**, 1–17.

Spiegel, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Ludin, A., Netzer, N., Goichberg, P., Azaria, Y., Resnick, I., Hardan, I., Ben-Hur, H., et al. (2007). Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat. Immunol.* **8**, 1123–1131.

Starck, J., Cohet, N., Gonnet, C., Sarrazin, S., Doubeikovskaia, Z., Doubeikovski, A., Verger, A., Duterque-Coquillaud, M., and Morle, F. (2003). Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1390–1402.

Strassel, C., Eckly, A., Léon, C., Petitjean, C., Freund, M., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2009). Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse

model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 94, 800–810.

Strassel, C., Kubovcakova, L., Mangin, P.H., Ravanat, C., Freund, M., Skoda, R.C., Denis, C. V., Dupuis, A., Herbrecht, R., Gachet, C., et al. (2015). Haemorrhagic and thrombotic diatheses in mouse models with thrombocytosis. *Thromb. Haemost.* 113, 414–425.

Strassel, C., Brouard, N., Mallo, L., Receveur, N., Mangin, P., Eckly, A., Bieche, I., Tarte, K., Gachet, C., and Lanza, F. (2016). Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood* 127, 2231–2241.

Stricker, J., Falzone, T., and Gardel, M.L. (2010). Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *J. Biomech.* 43, 9–14.

Su, L., Wang, Z., Yang, K., Minamikawa, Y., Kometani, N., and Nishinari, K. (2013). In situ observation of heat- and pressure-induced gelation of methylcellulose by fluorescence measurement. *Int. J. Biol. Macromol.* 64, 409–414.

Sui, Z., Nowak, R.B., Sanada, C., Halene, S., Krause, D.S., and Fowler, V.M. (2016). Regulation of actin polymerization by tropomodulin-3 controls megakaryocyte actin organization and platelet biogenesis. *Blood* 126, 520–531.

Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C.D.P., Pinter, J., Pajerowski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.-W., Tewari, M., et al. (2013). Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science* 341, 965–966.

Tablin, F., Castro, M., and Leven, R.M. (1990). Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J. Cell Sci.* 97, 59–70.

Tavassoli, M. (1980). Megakaryocyte-Platelet Axis and the Process of Platelet Formation and Release. *Blood* 55, 537–546.

Thiery, J., and Bessis, M. (1956). Mécanisme de la plaquettogenèse. Etude in vitro par la microcinématographie. *Rev Hematol* 11, 162–174.

Thirumala, S., Gimble, J., and Devireddy, R. (2013). Methylcellulose Based Thermally Reversible Hydrogel System for Tissue Engineering Applications. *Cells* 2, 460–475.

Thon, J.N., Mazutis, L., Wu, S., Sylman, J.L., Ehrlicher, A., Machlus, K.R., Feng, Q., Lu, S., Lanza, R., Neeves, K.B., et al. (2014). Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* 124, 1857–1868.

Tijssen, M.R., and Ghevaert, C. (2013). Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J. Thromb. Haemost.* 11, 593–604.

Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* 125, 1855–1864.

Toole, B.P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer* 4, 528–539.

Tourte, M. (2003). Le cytosquelette. In *Aide-Memoire - Biologie Cellulaire 2eme Edition*, M. Tourte, ed. (Paris: Dunod), pp. 138–157.

Bibliographie

Trakala, M., Rodríguez-Acebes, S., Maroto, M., Symonds, C.E., Santamaría, D., Ortega, S., Barbacid, M., Méndez, J., and Malumbres, M. (2015). Functional Reprogramming of Polyploidization in Megakaryocytes. *Dev. Cell* 32, 155–167.

Tytell, A.A., and Neuman, R.E. (1963). A medium free of agar, serum and peptone for plaque assay of herpes simplex virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med.* 113, 343–346.

Vicente-Manzanares, M., Newell-Litwa, K., Bachir, A.I., Whitmore, L. a, and Horwitz, A.R. (2011). Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. *J. Cell Biol.* 193, 381–396.

Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Pique, C., Le Couedic, J.P., Norol, F., Larsen, a K., Katz, A., Vainchenker, W., and Debili, N. (1998). Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* 91, 3711–3723.

De vos, W.H., Houben, F., Kamps, M., Malhas, A., Verheyen, F., Cox, J., Manders, E.M.M., Verstraeten, V.L.R.M., Van steensel, M.A.M., Marcelis, C.L.M., et al. (2011). Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4175–4186.

Wang, N., and Stamenović, D. (2000). Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, 188–194.

Wang, W., Gilligan, D.M., Sun, S., Wu, X., and Reems, J.-A. (2011). Distinct Functional Effects for Dynamin 3 During Megakaryocytopoiesis. *Stem Cells Dev.* 20, 2139–2151.

Wang, X., Crispino, J.D., Letting, D.L., Nakazawa, M., Poncz, M., and Blobel, G. a (2002). Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1 : role of Ets transcription factors. *EMBO J.* 21, 5225–5234.

Weiss, L. (1961). An electron microscopic study of the vascular sinuses of the bone marrow of the rabbit. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 108, 171–199.

Weiss, P. (1959). Cellular dynamics. *Rev. Mod. Phys.* 31, 11–20.

Weiss, P., Fatimi, A., Guicheux, J., and Vinatier, C. (2010). Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. In *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, R.M. Ottenbrite, K. Park, and T. Okano, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 247–268.

Weissman, I.L., and Shizuru, J.A. (2008). The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112, 3543–3553.

Wendling, F., Maraskovsky, E., Debili, N., Fiorindo, C., Teepe, M., Titeux, M., Methia, N., Breton-gorius, J., Cosman, D., and Vainchenker, W. (1994). c-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 369, 571–574.

Winkler, I.G., Sims, N. a, Pettit, A.R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I.J., van Rooijen, N., Alexander, K.A., Raggatt, L.J., et al. (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSC. *Blood* 116, 4815–4829.

Bibliographie

- Woolthuis, C.M., and Park, C.Y. (2016). Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood* *127*, 1242–1249.
- Worton, R.G., McCulloch, E. a, and Till, J.E. (1969). Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *J. Cell. Physiol.* *74*, 171–182.
- Wright, J.H. (1906). The Origin and Nature of the Blood Plates. *Bost. Med. Surg. J.* *23*, 643–645.
- Wright, J.H. (1910). The histogenesis of the blood platelets. *J. Morphol.* *21*, 263–278.
- Xi, J., Zhu, H., Liu, D., Nan, X., Zheng, W., Liu, K., Shi, W., Chen, L., Lv, Y., Yan, F., et al. (2013). Infusion of megakaryocytic progenitor products generated from cord blood hematopoietic stem/progenitor cells: results of the phase 1 study. *PLoS One* *8*, 1–7.
- Yamada, E. (1957). The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)*. *29*, 267–290.
- Youssefian, T., and Cramer, E.M. (2000). Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood* *95*, 4004–4007.
- Yuan, Y., Kulkarni, S., Ulsemer, P., Cranmer, S.L., Yap, C.L., Nesbitt, W.S., Harper, I., Mistry, N., Dopheide, S.M., Hughan, S.C., et al. (1999). The von Willebrand Factor-Glycoprotein Ib / V / IX Interaction Induces Actin Polymerization and Cytoskeletal Reorganization in Rolling Platelets and Glycoprotein Ib/V/IX-transfected Cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 36241–36251.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* *425*, 836–841.
- Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J., and Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* *20*, 1321–1326.
- Zhao, X.-H., Laschinger, C., Arora, P., Szász, K., Kapus, A., and McCulloch, C. a (2007). Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J. Cell Sci.* *120*, 1801–1809.
- Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., et al. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat. Cell Biol.* *6*, 499–506.
- Zucker-Franklin, D. (1996). Megakaryocyte and platelet structure in thrombocytopoiesis: the effect of cytokines. *Stem Cells* *14*, 1–17.
- Zucker-Franklin, D., Stahl, C., and Hyde, P. (1987). Megakaryocyte ultrastructure. Its relationship to normal and pathologic thrombocytopoiesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *509*, 25–33.
- Zuckerman, K.S., and Wicha, M.S. (1983). Extracellular Matrix Production by the Adherent Cells of Long-Term Murine Bone Marrow Cultures. *Blood* *61*, 540–547.

Alicia AGUILAR

Impact des contraintes physiques sur la maturation des mégacaryocytes : rôle de la rigidité de l'environnement

Résumé

La mégacaryopoïèse regroupe l'ensemble des processus de différenciation et de maturation des mégacaryocytes (MKs) dans le but de produire des plaquettes capables d'arrêter les saignements. Or ces mécanismes sont mal connus. Afin de mieux les comprendre, nous avons mimé l'environnement médullaire *in vitro*, en 3D à l'aide d'un hydrogel de rigidité comparable à celle de la moelle osseuse. Dans cette étude nous avons: i) caractérisé le comportement physique de l'hydrogel de méthylcellulose et mis au point la culture de progéniteurs mégacaryocytaires dans ce système, ii) montré la capacité du MK à ressentir les contraintes physiques de son environnement, ainsi que, iii) l'impact de ces contraintes sur la maturation des MKs et la génération des proplaquettes, et enfin, iv) mis en évidence l'existence d'une réponse cellulaire des MKs à la rigidité. Les MKs sont « mécanosensibles », c'est-à-dire capables de ressentir les modifications physiques de leur environnement et de s'y adapter. L'activation de voies de mécanotransduction (dont MKL1) et la réorganisation du cytosquelette en réponse aux contraintes physiques extracellulaires favorisent la maturation des MKs, en termes de ploïdie, d'ultrastructure et in fine de génération de proplaquettes.

Mots clés : mégacaryocyte, rigidité, environnement, mécanobiologie, culture 3D

Résumé en anglais

Megakaryopoiesis is the process of differentiation and maturation of megakaryocytes (MKs) in the aim to produce platelets able to prevent hemorrhages. These mechanisms are not well known. To better understand the process of platelet formation, we mimicked the medullar microenvironment *in vitro*, in 3D using hydrogel of stiffness comparable to the bone marrow. In this study we: i) characterized the physical properties of the hydrogel and design the culture of hematopoietic progenitors in this system, ii) showed the MKs ability to feel the physical constraints of their environment, then iii) showed the impact of these constraints on the MK maturation and proplatelet generation, and finally iv) highlighted the MK response to stiffness. MKs are "mechanosensitive", being able to feel and to adapt to the physical modifications of the environment. The activation of mechanotransduction pathways (including MKL1) and the cytoskeleton reorganization in response to extracellular physical constraints improves MK maturation, in terms of ploidy, ultrastructure and ultimately proplatelet generation.

Key words : megakaryocyte, stiffness, environment, mechanobiology, 3D culture