



HAL
open science

Implication de la protéine Bcl-xL dans la mégacaryopoïèse humaine normale et dans le purpura thrombopénique immunologique chronique

Étienne Rivière

► **To cite this version:**

Étienne Rivière. Implication de la protéine Bcl-xL dans la mégacaryopoïèse humaine normale et dans le purpura thrombopénique immunologique chronique. Hématologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0148 . tel-01616700v2

HAL Id: tel-01616700

<https://theses.hal.science/tel-01616700v2>

Submitted on 23 Nov 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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE des SCIENCES de la VIE et de la SANTE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE et PHYSIOPATHOLOGIE

Par Etienne RIVIERE

**Implication de la protéine Bcl-x_L dans la mégacaryopoïèse
humaine normale et dans le purpura thrombopénique
immunologique chronique**

Sous la direction de : Jean-François VIALLARD et Chloé JAMES

Soutenue publiquement le 13 Octobre 2015

Membres du jury :

M. le Professeur Jean-Luc PELLEGRIN, PU-PH, Université de Bordeaux	Président
M. le Professeur Marc MICHEL, PU-PH, Université Paris-Est Créteil	Rapporteur
Mme le Docteur Najet DEBILI, DR2 INSERM, Institut Gustave Roussy, Villejuif	Rapporteur
M. le Docteur Jean RIPOCHE, DR INSERM, Université de Bordeaux	Examineur
Mme le Docteur Chloé JAMES, MCU-PH, Université de Bordeaux,	Directeur
M. le Professeur Jean-François VIALLARD, PU-PH, Université de Bordeaux	Directeur

RESUME

Titre : Implication de la protéine Bcl-x_L dans la mégacaryopoïèse humaine normale et dans le purpura thrombopénique immunologique chronique

Résumé : La protéine Bcl-x_L fait partie de la famille des protéines anti-apoptotiques Bcl-2. Il a été montré que cette protéine avait un rôle majeur dans la formation des plaquettes chez la souris (mégacaryopoïèse). Une dérégulation de cette protéine pourrait aboutir à une altération de la mégacaryopoïèse et donner des pathologies humaines comme des thrombopénies chroniques. Une des causes de thrombopénies chroniques est le purpura thrombopénique immunologique (ou PTI), qui associe 2 mécanismes physiopathologiques: une destruction auto-immune des plaquettes et une insuffisance de leur production par la moelle osseuse. Le PTI est un diagnostic d'exclusion par élimination de toutes les causes connues de thrombopénie. Au sein de notre cohorte de patients suivis en médecine interne pour cette maladie, nous avons identifié certains patients qui présentaient un profil non-immunologique, c'est-à-dire l'absence d'auto-immunité et une non réponse à tous les traitements immunomodulateurs, ou pas d'indication à un traitement compte tenu d'un taux de plaquettes suffisant. Nous montrons dans ce travail de thèse que Bcl-x_L est nécessaire pour la survie du mégacaryocyte humain pendant toute la mégacaryopoïèse, à la différence de la souris. Par ailleurs, certains patients ont une altération intrinsèque de la formation des proplaquettes, et certains d'entre eux ont également une diminution de l'ARN messager et de la protéine Bcl-x_L dans leurs plaquettes. Ces observations nouvelles suggèrent l'implication de Bcl-x_L dans la physiopathologie de leur maladie et ouvrent la voie à l'identification d'une potentielle nouvelle cause de thrombopénie chronique.

Mots clés : mégacaryopoïèse, apoptose, Bcl-x_L, purpura thrombopénique immunologique chronique

Title: Involvement of Bcl-x_L in human normal megakaryopoiesis and in chronic immune thrombocytopenia

Abstract: The Bcl-x_L protein is a member of Bcl-2 anti-apoptotic proteins. It has been shown in mouse that this protein had a major role in platelet production (megakaryopoiesis). Bcl-x_L deregulation could lead to megakaryopoiesis impairment and explain some human diseases such as chronic thrombocytopenias. One cause of chronic thrombocytopenia is immune thrombocytopenia (ITP) that associates 2 pathophysiological mechanisms: an immune-mediated platelet destruction and an insufficient production from the bone marrow cells. ITP is a diagnosis of exclusion when all known causes of thrombocytopenia have been ruled out by diagnosis work-up. In ITP cohort of patients followed in our internal medicine department, we have identified some patients with a haematological profile of their disease, ie absence of overt features of auto-immunity, and absence of response to immunomodulatory treatments, or no indication to such treatment because of sufficient platelet count. We demonstrate in this study that Bcl-x_L is necessary for megakaryocyte survival during all megakaryopoiesis, contrary to what was found in mouse. Moreover, some patients have an intrinsically impaired proplatelet formation, and some of them also have a decrease of Bcl-x_L mRNA and protein in their platelets. These novel observations suggest that a deregulation of Bcl-x_L is a possible cause of their disease and lead the way to the identification of a potentially new cause of chronic thrombocytopenia in human.

Keywords: megakaryopoiesis, apoptosis, Bcl-x_L, chronic immune thrombocytopenia

Unité de recherche : Unité INSERM 1034, « adaptation cardiovasculaire à l'ischémie », Directeur : Pr Thierry Couffinhal, 1 avenue Magellan, 33600 Pessac.

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Jean-Luc Pellegrin

Président du collège Santé de l'Université de Bordeaux

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse de sciences. Merci pour votre soutien indéfectible tant moral que matériel, en médecine interne, en recherche clinique ou scientifique, et en pédagogie médicale. Vous êtes un modèle de dévouement aux malades et aux étudiants, en cela, j'espère être à la hauteur de la confiance que vous m'accordez.

Monsieur le Professeur Marc Michel

Centre national de référence des cytopénies auto-immunes de l'adulte, APHP, Université Paris-Est, Créteil

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites de rapporter ce travail de thèse, et d'avoir accepté de faire partie du jury. Votre grande expertise dans le PTI sera sans nul doute très appréciée dans la critique de ce travail.

Madame le Docteur Najet Debili

DR2, CNRS, Equipe « Mécanismes de la production plaquettaire », Institut Gustave Roussy, Villejuif

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites d'apporter votre grande expertise dans la mégacaryopoïèse pour critiquer ce travail de thèse. Je vous remercie également d'avoir accepté de faire partie du jury.

Monsieur le Docteur Jean Ripoché

DR, INSERM unité 1026, « Bioingénierie Tissulaire », Université de Bordeaux

Je vous remercie d'apporter votre regard scientifique aiguisé à l'examen de ce travail de thèse. C'est un réel plaisir de travailler avec vous. Votre rigueur et votre disponibilité dans le cadre de travaux menés parallèlement à ce travail de thèse sur le CD40-ligand plaquettaire ont été très appréciées.

Madame le Docteur Chloé James

MCU-PH, Hémostase Spécialisée, CHU de Bordeaux, et INSERM unité 1034.

Co-directrice de ce travail de thèse

C'est avec un réel talent de chercheuse et beaucoup d'efficacité que tu m'as accompagné au jour le jour pendant ce travail de thèse. Tu as toujours été disponible dès les premières manip effectuées en Master 2 jusqu'à l'écriture du premier article, la relecture de la thèse et encore maintenant pour finir les dernières expériences nécessaires à la finalisation de ce travail. Tu as une vision perspicace et exemplaire des directions à prendre lorsque les problèmes se posent. Ce fut un plaisir de partager toutes ces années avec toi, et les prochaines à venir je l'espère. Sois assurée de ma grande admiration et de toute mon amitié.

Monsieur le Professeur Jean-François Viillard

PU-PH, Médecine Interne, centre de compétence des cytopénies auto-immunes du CHU de Bordeaux, et INSERM unité 1034.

Directeur de ce travail de thèse

Cher Jeff, je te remercie d'avoir dirigé ce travail de thèse. Nous avons initié ce projet avec Chloé il y a maintenant 5 ans et il commence à prendre bonne forme. Je te remercie de m'avoir fait confiance pour conduire ce travail, et pour ton aide dans de nombreux autres. J'apprécie de travailler avec toi, tes connaissances encyclopédiques en médecine interne, ton esprit de synthèse et ta grande puissance de travail sont un modèle pour

moi. J'espère pouvoir continuer à apprendre à tes côtés dans les années à venir. Reçois ici témoignage de ma grande admiration et de toute mon amitié.

A toute l'équipe paramédicale du service de médecine interne (G1B et G2)

Merci pour votre bonne humeur au fil des différentes consultations, votre efficacité et votre envie d'aller de l'avant. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous, et je l'apprécierai sans nul doute encore dans les années à venir.

A mes collègues de recherche qui m'ont aidé et soutenu tout le long de ce travail, Aurélie Bedel, Jean-Max Pasquet, Isabelle Lamrissi-Garcia, François Moreau-Gaudry, Eric Lippert, Virginie Gourdou, Valérie Prouzet-Mauléon, Véronique Guyonnet-Dupeyrat, Alice Bibeyran, Magalie Lalanne, Isabelle Moranvillier, **mes co-thésards** Badr Kilani, Mathieu Pernot, Claire Peghaire, Pierre-Yves Dumas, Olivier Mansier **et post-doc** François Béliveau, **les étudiants en master 2 encadrés** Caroline Gary et Alexandre Guy, et tous ceux que j'oublie et auxquels je présente mes excuses.

A tous les patients qui nous apprennent chaque jour la médecine et la font progresser, et à tous les patients qui ont activement contribué à ce travail.

A ma famille

Je vous remercie du fond du cœur pour m'avoir encadré et soutenu tout au long de mes études et dans certaines épreuves de la vie, mes parents, Antoine, Marie, Alice, ainsi que mes beaux-parents et Clémence.

Et enfin à ma magnifique épouse

Merci de m'avoir autant épaulé sur toutes ces années, et particulièrement sur cette dernière année en t'occupant notamment de nos deux enfants. La carrière hospitalo-universitaire demande certains sacrifices pour lesquels nous ne sommes pas trop de deux pour tenir le cap. Sans toi, ce travail, entre autres, n'existerait tout simplement pas.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS	11
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	12
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION	15
1. MEGACARYOPOÏESE NORMALE	15
1.1. Description de la mégacaryopoïèse	15
1.1.1. Lignée mégacaryocytaire.....	15
1.1.1.1. Aperçu général de la mégacaryopoïèse.....	17
1.1.1.2. Progéniteurs mégacaryocytaires	17
1.1.1.3. Promégacaryoblaste.....	17
1.1.1.4. Précurseurs mégacaryocytaires	17
1.1.2. Endomitoses.....	19
1.1.3. Maturation cytoplasmique.....	23
1.1.4. Maturation membranaire.....	24
1.1.5. Formation des plaquettes.....	25
1.1.5.1. Formation des proplaquettes	25
1.1.5.2. Un nouveau mode de formation des plaquettes en urgence : la rupture mégacaryocytaire	30
1.1.6. Cinétique de la mégacaryopoïèse.....	31
1.2. Régulation de la mégacaryopoïèse	32
1.2.1. Régulation transcriptionnelle de la mégacaryopoïèse	32
1.2.1.1. Régulation transcriptionnelle précoce	32
1.2.1.2. Rôle des FT dans la maturation mégacaryocytaire.....	34
1.2.1.3. Régulation post-transcriptionnelle.....	36
1.2.2. Régulation cytokinique de la mégacaryopoïèse	36
1.2.2.1. La thrombopoïétine (TPO).....	36
1.2.2.2. Autres cytokines impliquées dans la mégacaryopoïèse.....	41
1.3. Modèles d'étude de la mégacaryopoïèse	43
1.3.1. Mégacaryopoïèse à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34 ⁺	43
1.3.2. Mégacaryopoïèse à partir de cellules souches reprogrammées induites, ou iPSC pour « induced pluripotent stem cells ».....	44
1.3.2.1. Genèse des iPSC	44
1.3.2.2. Evolution des iPSC et des systèmes de reprogrammation.....	47
1.3.2.3. Evolution des cellules reprogrammées : ciblage des cellules hématopoïétiques	49
1.3.2.4. Différenciation hématologique et mégacaryopoïèse.....	49
2. IMPLICATION DE L'APOPTOSE DANS LA MEGACARYOPOÏESE	54
2.1. Description de l'apoptose	54
2.1.1. Voie intrinsèque de l'apoptose.....	55
2.1.2. Voie extrinsèque de l'apoptose	56
2.1.3. Voie terminale commune de l'apoptose, ou voie d'exécution	57
2.1.4. Focus sur la protéine Bcl-x _L	59
2.2. Controverse sur le rôle de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse murine et humaine	60
2.2.1. Une activation contrôlée de l'apoptose est nécessaire pour la formation des proplaquettes.....	61
2.2.2. L'apoptose doit être contenue pour permettre la survie mégacaryocytaire lors de la formation des proplaquettes	62
3. LE PURPURA THROMBOPENIQUE IMMUNOLOGIQUE (PTI)	65
3.1. Epidémiologie du PTI	65
3.2. Etiologie	65
3.3. Démarche diagnostique	66
3.3.1. Manifestations cliniques et risque vital du PTI.....	66
3.3.2. Examens complémentaires paracliniques	67
3.3.2.1. Hémogramme et hémostase/coagulation.....	67
3.3.2.2. Autres investigations pour le diagnostic différentiel, la recherche de PTI secondaire et le bilan pré-thérapeutique.....	67

3.4. Etat actuel des connaissances dans la physiopathologie du PTI	69
3.4.1. Mécanismes immunologiques de la destruction plaquettaire.....	71
3.4.1.1. De la destruction plaquettaire anticorps-dépendante à l'identification des anticorps anti-plaquettes (AAP) : implication des lymphocytes B (LB)	71
3.4.1.2. Mécanismes immunologiques contrôlant la destruction plaquettaire : implication des lymphocytes T (LT).....	72
3.4.2. Altération de la mégacaryopoïèse dans le PTI	75
3.4.2.1. Dérégulation de la TPO par une expansion intra-médullaire du compartiment mégacaryocytaire.....	75
3.4.2.2. Altération de la mégacaryopoïèse par les anticorps anti-plaquettes et les LT cytotoxiques	76
3.5. Traitements du PTI.....	77
3.5.1. Traitements « immunologiques » du PTI.....	77
3.5.1.1. Première ligne : corticoïdes et/ou immunoglobulines.....	77
3.5.1.2. Deuxième ligne : splénectomie et/ou rituximab	77
3.5.2. Traitement par les agonistes du récepteur de la TPO.....	79
3.5.2.1. Molécules actuellement sur le marché	79
3.5.2.2. Efficacité des agonistes du récepteur de la TPO.....	79
3.5.2.3. Tolérance des agonistes du récepteur de la TPO	80
3.5.2.4. Effets secondaires à long terme de ces molécules.....	80
3.5.2.5. Mode d'action des agonistes du récepteur de la TPO dans le PTI	81
HYPOTHESES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	83
RESULTATS.....	85
1. ARTICLE 1 : ALTERATION INTRINSEQUE DE LA MEGACARYOPOÏESE CHEZ CERTAINS PATIENTS ATTEINTS D'UN PTI PERSISTANT OU CHRONIQUE	86
2. ARTICLE 2 : BCL-X _L EST NECESSAIRE POUR LA SURVIE DU MEGACARYOCYTE PENDANT LES STADES DE MATURATION ET DE FORMATION DES PROPLAQUETTES CHEZ L'HOMME	95
3. ARTICLE 3 : BCL-X _L DANS LE PURPURA THROMBOPENIQUE CHRONIQUE	117
4. COMMUNICATION AFFICHEE : IPSC ET MEGACARYOPOÏESE, RETOUR SUR UNE EXPERIENCE.....	131
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	135
1. ANALYSE CRITIQUE DES RESULTATS	135
2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES OUVERTES PAR LES RESULTATS DE CE TRAVAIL DE THESE.....	143
CONCLUSION	145
ANNEXES : PRESENTATIONS A DES CONGRES.....	147
BIBLIOGRAPHIE.....	155

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAP : anticorps anti-plaquettes	IF : immunofluorescence
ADN : acide desoxyribo-nucléique	IL : interleukine
AHAI : anémie hémolytique auto-immune	iPSC : induced-pluripotent stem cell
ALPS : auto-immune lymphoproliférative syndrome	MAIPA : monoclonal antibody immobilization of platelet antigens
AMM : autorisation de mise sur le marché	MEP : Megakaryocyte-Erythrocyte progenitor
ANCA : anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires	MGG : May-Grünwald Giemsa
ARN : acide ribo-nucléique	MK : mégacaryocyte
BFU : burst-forming unit	MKP : mégacaryocyte plaquetto-gène
CD : cluster differentiation	MKNP : mégacaryocyte non plaquetto-gène
CFU : colony-forming unit	NK : lymphocyte « natural killer »
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	pDC : plasmatic dendritic cell
CMV : cytomégalovirus	PPO : peroxydase plaquettaire
CSH : cellule souche hématopoïétique	PTI : purpura thrombopénique immunologique
CX3CR1 : CX3C chemokine receptor 1	ROR : rougeole oreillons rubéole
DICV : déficit immunitaire commun variable	RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
EBV : Epstein-Barr virus	SAPL : syndrome des anticorps anti-phospholipides
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay	SCID : severe combined immune deficiency
FLT3-L : Fms-like tyrosine kinase 3-Ligand	SCF : Stem Cell Factor
hESC : human embryonic stem cell	TCA : temps de céphaline activé
HLA-DR : human leukocyte antigen DR	TCR : T cell receptor
HSV : herpes simplex virus	TP : taux de prothrombine
LB : lymphocyte B	TPO : thrombopoïétine
LES : lupus érythémateux systémique	VHC : virus de l'hépatite C
LGL : leucémie à grands lymphocytes granuleux	VIH : virus de l'immunodéficience humaine
LLC : leucémie lymphoïde chronique	VLA-4 : very late antigen-4 (intégrine)
LT : lymphocyte T	VZV : virus varicelle-zona

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAU 1. INDIVIDUALISATION DES 4 STADES MEGACARYOCYTAIRES A PARTIR DU STADE DES PRECURSEURS MEGACARYOCYTAIRES.....	18
TABLEAU 2. CARACTERISTIQUES COMPARATIVES DE LA MEGACARYOPOÏESE NEONATALE (DERIVEE DE CELLULES CD34+ DE SANG DE CORDON) ET ADULTE.	43
FIGURE 1. RESUME DE L'HEMATOPOÏESE.....	16
FIGURE 2. APERÇU GENERAL ET CYTOLOGIE DE LA MEGACARYOPOÏESE.....	16
FIGURE 3. AUGMENTATION DE LA PRODUCTION DE PLAQUETTES EN FONCTION DE LA PLOÏDIE DU MK.	20
FIGURE 4. MITOSE NORMALE ET ENDOMITOSE MEGACARYOCYTAIRES.....	21
FIGURE 5. MATURATION DU CYTOPLASME DU MEGACARYOCYTE, DE LA MISE EN PLACE DES MEMBRANES DE DEMARCATION A LA FORMATION DES PROPLAQUETTES.	24
FIGURE 6. RESUME DES MODIFICATIONS DU CYTOSQUELETTE DE MICROTUBULES (MT) ET DU SYSTEME DES MEMBRANES DE DEMARCATION (SMD) AU COURS DE LA FORMATION DES PROPLAQUETTES.	27
FIGURE 7. MODULATION DE LA VOIE RHO/ROCK DANS LE MK.....	29
FIGURE 8. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA DIFFERENCIATION ERYTHRO-MEGACARYOCYTAIRE.	33
FIGURE 9. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES DERNIERES ETAPES DE LA MEGACARYOPOÏESE.....	34
FIGURE 10. SIGNALISATION DE LA TPO.	37
FIGURE 11. MODELE DOMINANT DE REGULATION DE LA SECRETION ENDOGENE CONSTANTE DE TPO PAR LE POOL PLAQUETTAIRE CIRCULANT ET LA MASSE MEGACARYOCYTAIRE.	39
FIGURE 12. REGULATION DE LA TPO PAR LE RECEPTEUR ASHWELL-MORELL ET HYPOTHESES DEVELOPPEES PAR LES AUTEURS CONCERNANT L'APPLICATION DE CE MODELE DANS LA TE ET LE PTI.....	40
FIGURE 13. MODELES EXPLIQUANT LA VARIABILITE DE REPROGRAMMATION DES iPSC.	47
FIGURE 14. VOIE INTRINSEQUE DE L'APOPTOSE.....	55
FIGURE 15. VOIE EXTRINSEQUE DE L'APOPTOSE.	56
FIGURE 16. SCHEMATISATION DES VOIES INTRINSEQUE & EXTRINSEQUE DE L'APOPTOSE.	58
FIGURE 17. CONTROVERSE ACTUELLE AU SUJET DE L'IMPLICATION DE L'APOPTOSE DANS LA MEGACARYOPOÏESE.....	60
FIGURE 18. PURPURA HEMATOLOGIQUE.....	66
FIGURE 19. HEMORRAGIE INTRA-PARENCHYMEUSE.....	66
FIGURE 20. MEGACARYOCYTES DYSMORPHIQUES DE 2 PATIENTES AVEC UN PTI EVOLUANT DEPUIS 30 ANS.	68
FIGURE 21. RESUME DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PTI.....	70
FIGURE 22. ALTERATION DE LA FORMATION DES PROPLAQUETTES CHEZ CERTAINS PATIENTS AYANT UN PROFIL NON-IMMUNOLOGIQUE DE LEUR PTI.....	136
FIGURE 23. EFFET DU NAVITOCLOX® SUR LE TAUX DE PLAQUETTES DE PATIENTS LLC.	141

AVANT-PROPOS

L'étude de la formation des plaquettes, ou mégacaryopoïèse, normale humaine a été rendue possible *in vitro* depuis une vingtaine d'année grâce à l'individualisation de marqueurs des cellules souches hématopoïétiques comme le CD34, l'utilisation de milieux de culture spéciaux et, surtout, la découverte en 1994 de la thrombopoïétine (ou TPO), principale cytokine contrôlant la mégacaryopoïèse. Les modèles de culture actuellement développés nous permettent désormais d'étudier la mégacaryopoïèse normale, mais aussi de nombreuses pathologies mégacaryocytaires ou se répercutant sur la mégacaryopoïèse, comme par exemple le purpura thrombopénique immunologique (PTI). Le PTI est une maladie hétérogène dont la physiopathologie mêle destruction immunologique des plaquettes et insuffisance de production aboutissant à une thrombopénie, c'est-à-dire un taux de plaquettes inférieur à la normale établie chez l'homme entre 150 et 400 000 plaquettes/mm³ de sang (ou 150 à 400 G/L). Ce taux de plaquettes peut être très bas (< 30 G/L) avec ou sans manifestation hémorragique en rapport (purpura, mais aussi hémorragies intracrâniennes ou autres) qui font toute la gravité de cette maladie.

Dans ce travail de thèse, nous avons voulu étudier à la fois la mégacaryopoïèse de patients atteints d'un PTI persistant ou chronique, c'est à dire dont la durée d'évolution excède 3 mois, et l'implication de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L qui semble majeure dans le maintien en vie du mégacaryocyte chez la souris. Compte tenu des difficultés pour obtenir des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺, nous avons essayé de développer parallèlement une lignée de cellules reprogrammées induites, ou iPSC, issues de 2 patients atteints d'un PTI chronique afin d'obtenir le matériel nécessaire au test de nos hypothèses de travail.

INTRODUCTION

1. Mégacaryopoïèse normale

La mégacaryopoïèse, ou thrombopoïèse, est l'ensemble des processus aboutissant à la formation des plaquettes à partir d'une cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse. La différenciation mégacaryocytaire prend environ 14 jours chez l'homme contre 6 jours chez la souris.

1.1. Description de la mégacaryopoïèse

Les plaquettes sont formées à partir de la fragmentation du cytoplasme du MK en extensions filiformes appelées proplaquettes. La quasi-totalité du cytoplasme du MK est ainsi remodelé, transférant dans les proplaquettes son contenu en membranes, organites, granules, et macromolécules. Ce processus initialement observé *in vitro* l'a été *in vivo* chez la souris ¹. On estime la capacité de chaque MK à former entre 1000 et 3000 plaquettes ² avant que le résidu cytoplasmique contenant le noyau ne soit phagocyté par les macrophages intra-médullaires ³.

1.1.1. Lignée mégacaryocytaire

La lignée mégacaryocytaire est une des 3 lignées myéloïdes obtenues après différenciation de la cellule souche hématopoïétique (CSH) en progéniteur myéloïde d'un côté donnant les érythrocytes, les mégacaryocytes, les polynucléaires, les monocytes/macrophages et les mastocytes, et lymphoïde de l'autre donnant les lymphocytes B et T (figure 1). Le progéniteur myéloïde ou CFU-GEMM pour « colony forming unit granulocytaire, érythroblastique, mégacaryocytaire et monocytaire » (* sur la figure 1) est issu de la CSH, prolifère et se différencie en CFU-GMP donnant la lignée granuleuse et en progéniteur commun érythro-mégacaryocytaire (ou MEP) (** sur la figure 1). C'est à partir de cette cellule que la différenciation mégacaryocytaire va s'élaborer.

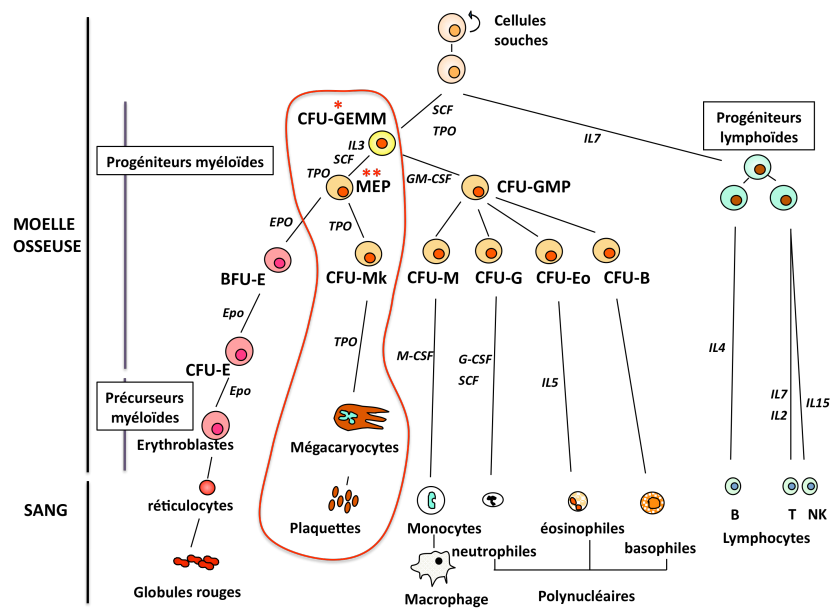


Figure 1. Résumé de l'hématopoïèse.

Abrév.: CFU : colony forming unit, CFU-GEMM = CMP : common myeloid progenitor, MEP : megakaryocyte-erythroid progenitor, CFU-GMP : granulocyte myeloid progenitor, BFU : burst forming unit, Mk : mégacaryocyte, M : monocytes, G : granulocytes, Eo : Eosinophiles, B : basophiles, TPO : thrombopoïétine, EPO : érythropoïétine, SCF : Stem cell factor, IL : interleukine, G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor.

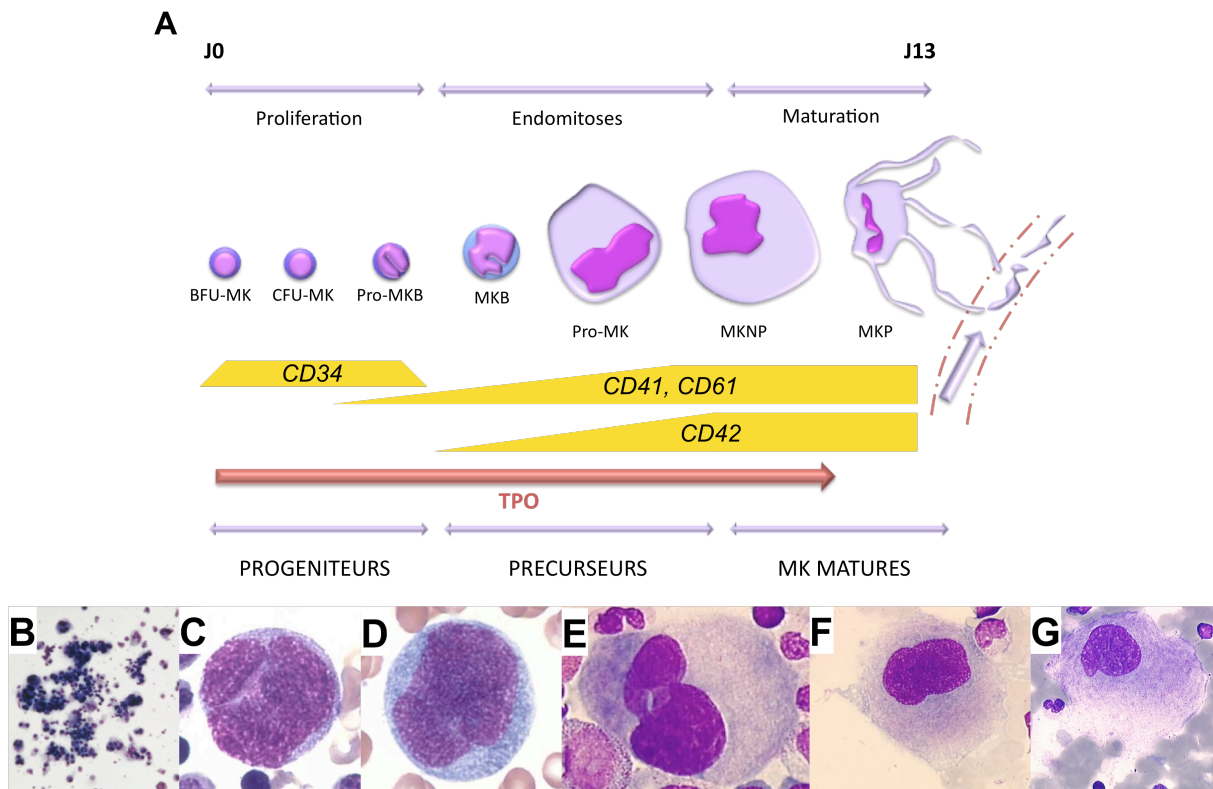


Figure 2. Aperçu général et cytologie de la mégacaryopoïèse.

A- Aperçu général de la mégacaryopoïèse de J0 à J13. Abrév. MK : mégacaryocyte ; MKB : mégacaryoblaste ; MKNP : MK non plaquetto-gène ; MKP : MK plaquetto-gène. B- CFU-MK, grossissement x10, C- Promégacaryoblaste, D- Mégacaryoblaste, E- Promégacaryocyte, F- Mégacaryocyte granuleux, et G- Mégacaryocyte mature, grossissement x40, tous sur frottis médullaire après coloration MGG. D'après l'iconographe du Pr Marc Zandecki, site web hematocell de l'université d'Angers (<http://hematocell.univ-angers.fr/>)

1.1.1.1. Aperçu général de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse humaine dure entre 13 et 14 jours. La phase précoce est une phase de prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires CD34⁺. La phase intermédiaire est la phase où les progéniteurs mégacaryocytaires dupliquent leur matériel nucléaire par un processus caractéristique du mégacaryocyte appelé endomitose. Les endomitoses permettent de former des cellules polyploïdes jusqu'à 128n chromosomes. Enfin la phase terminale est représentée par la formation des proplaquettes par les mégacaryocytes plaquetto-gènes. Jusqu'à la formation des proplaquettes, la mégacaryopoïèse est majoritairement régulée par la thrombopoïétine (Figure 2A).

1.1.1.2. Progéniteurs mégacaryocytaires

Le progéniteur commun érythro-mégacaryocytaire prolifère et se différencie en BFU-MK (burst-forming unit), progéniteur mégacaryocytaire précoce, qui est une cellule diploïde donnant des colonies d'aspect irrégulier *in vitro* (« burst ») ⁴. Puis il se différencie en CFU-MK, ou progéniteur mégacaryocytaire tardif, formant *in vitro* des colonies de petite taille composées de 15 à 30 cellules (Figure 2B).

1.1.1.3. Promégacaryoblaste

A partir du stade CFU-MK, la prolifération s'arrête et les petites cellules ainsi obtenues, qui sont encore à ce stade des progéniteurs mégacaryocytaires, vont commencer leur différenciation mégacaryocytaire proprement dite : ce sont les promégacaryoblastes. Ils représentent environ 10% de l'ensemble des MK et sont majoritairement diploïdes. Ils ont l'apparence de petites cellules lymphoïdes faisant moins de 10 µm, exceptionnellement visibles dans une moelle normale en microscopie optique, mais caractérisables en microscopie électronique puisqu'ils expriment la peroxydase plaquettaire (PPO), qui est le marqueur le plus précoce de la lignée (Figure 2C).

1.1.1.4. Précurseurs mégacaryocytaires

Quatre stades de MK peuvent être arbitrairement individualisés durant la mégacaryopoïèse à partir du stade des précurseurs mégacaryocytaires. Ils se

caractérisent par la qualité et la quantité de cytoplasme, la taille, la lobulation et l'aspect de la chromatine du noyau (Tableau 1).

Type	Taille en μm	Morphologie
Mégacaryoblaste (stade I)	8 – 24 μm	Noyau légèrement lobulé à chromatine fine et cytoplasme basophile
Mégacaryocyte basophile (stade II)	30 μm	Noyau en fer à cheval, cytoplasme basophile, granules azurophiles autour du centrosome
Mégacaryocyte granuleux (stade III)	30 à 50 μm	Noyau large multilobé, cytoplasme éosinophile, nombreuses granules azurophiles
Mégacaryocyte mature (stade IV)	30 à 50 μm	Noyau picnotique, groupes de 10 à 12 granules azurophiles intra-cytoplasmiques

Tableau 1. Individualisation des 4 stades mégacaryocytaires à partir du stade des précurseurs mégacaryocytaires.

1.1.1.4.1. Mégacaryoblaste

Environ 20% des cellules de la lignée mégacaryocytaire sont des mégacaryoblastes (Figure 2D). Ces cellules font entre 8 et 24 μm de diamètre *in vivo*, contiennent un volumineux noyau arrondi ou parfois bilobé, à la chromatine fine contenant de nombreux nucléoles, laissant peu de place pour un fin cytoplasme basophile (riche en ARN), avec un petit appareil de Golgi, quelques mitochondries et granules α , et de nombreux ribosomes. A ce stade, la ploïdie de la cellule augmente entre 4 et 8n et un système de membranes intra-cytoplasmiques (ou de démarcation primitives) se développe à partir de la membrane plasmique. Des molécules spécifiques du mégacaryocyte sont synthétisées en grande quantité.

1.1.1.4.2. Mégacaryocyte basophile (promégacaryocyte)

Le promégacaryocyte (Figure 2E) est une cellule au noyau polylobé et plus volumineux. La ploïdie atteint son maximum à ce stade et la synthèse d'ADN s'arrête. La majorité des mégacaryocytes ont une ploïdie de 4, 8 ou 16n. Le cytoplasme est également plus volumineux et moins basophile. Il contient plus de granules α et d'organites et le système des membranes de démarcation augmente. La taille de cette cellule peut atteindre 30 μm de diamètre. Environ 25% des MK médullaires sont des MK basophiles.

1.1.1.4.3. Mégacaryocyte granuleux

Ce sont de grandes cellules faisant jusqu'à 60 µm de diamètre, le noyau est polylobé, plus dense, le cytoplasme devient plus acidophile et riche en granulations. Le système des membranes de démarcation s'organise pour délimiter des territoires plaquettaires et remplace peu à peu le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le noyau s'excentre, et peut apparaître en plusieurs morceaux sur une même coupe, il reste intègre et unique tout au long de la mégacaryopoïèse (Figure 2F).

1.1.1.4.4. Mégacaryocyte mature

Les mégacaryocytes matures peuvent atteindre un diamètre de 120 µm et représentent les plus grandes cellules de la moelle osseuse. Le noyau est polylobé, plus dense et picnotique. Le cytoplasme est abondant et sa teinte acidophile se rapproche de celle des plaquettes. Les granulations cytoplasmiques forment des paquets, ébauches des futures plaquettes (Figure 2G).

1.1.1.4.5. Plaquettonèse

La maturation mégacaryocytaire s'effectue de la niche ostéoblastique vers la niche vasculaire de la moelle osseuse selon un gradient de la chimiokine SDF1⁵. Le mégacaryocyte devient plaquettonogène et relargue ses proplaquettes dans la circulation sanguine à travers les sinusoides médullaires⁶. Certains mégacaryocytes passent même entièrement dans la lumière vasculaire et forment leurs proplaquettes directement dans la circulation 12 à 24h après⁷.

1.1.2. Endomitoses

La mitose normale permet de passer d'une cellule mère à deux cellules filles identiques comportant le même nombre de chromosomes (2n). Elle comprend l'interphase composée d'une phase de croissance cellulaire (G1) généralement la plus longue, une phase de réplication de l'ADN (phase S), et une nouvelle mais plus courte phase de

croissance (G2). Vient ensuite la phase M de mitose proprement dite où les chromosomes se forment (prophase), se rassemblent en plaque équatoriale au centre du fuseau mitotique de microtubules (métaphase), puis se séparent (anaphase) et chaque cellule fille commence à réorganiser son cytosquelette et à décondenser ses chromosomes (télophase). Lors d'une mitose normale, l'apparition d'un anneau contractile de clivage, composé d'actine et de myosine II, permet dans un premier temps la répartition bipolaire des chromosomes, puis dans un deuxième temps la division cellulaire en deux cellules filles, ou cytokinèse. Le phénomène d'endomitose mégacaryocytaire, ou endomitoses, est caractéristique du MK. C'est une forme unique de mitose pendant laquelle la quantité de matériel nucléaire augmente par des cycles cellulaires répétés dépourvus de cytokinèse amenant à une cellule polyploïde. L'objectif de cette augmentation de la ploïdie était de permettre un accroissement de la capacité de synthèse des molécules nécessaires au MK pour augmenter le nombre de plaquettes émises⁸. Ainsi, plus un MK est polyploïde plus il forme de proplaquettes (Figure 3)⁹.

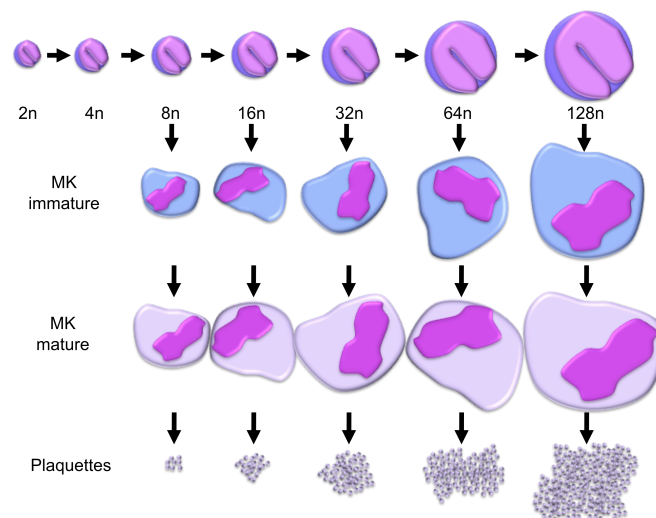


Figure 3. Augmentation de la production de plaquettes en fonction de la ploïdie du MK.
(D'après Lichman MA, et al : Williams Hematology, 8th Edition)

Les endomitoses débutent au stade de mégacaryoblaste, après la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires destinée à étendre le compartiment, et s'arrêtent au stade de promégacaryocyte¹⁰. A chaque endomitose, le MK duplique la totalité de ses chromosomes jusqu'à atteindre 128n chromosomes dans certaines cellules. Le noyau reste unique et polylobé.

Ce phénomène a pu être étudié en détail depuis la reproduction *in vitro* de la mégacaryopoïèse mais reste encore incomplètement élucidé. L'endomitose n'est pas seulement l'absence de mitose mais consiste plutôt en plusieurs cycles mitotiques avortés ¹¹. La cinétique de tels cycles cellulaires est bien spécifique au MK : phase G₁ courte, phase de réplication de l'ADN normale, phase G₂ courte et phase d'endomitose très courte ¹². Durant la phase d'endomitose proprement dite, au milieu ou à la fin de l'anaphase, les chromosomes du MK se condensent, la membrane nucléaire se décompose ; de multiples fuseaux se forment et fixent les chromosomes condensés. La répartition de chaque demi chromosome à chaque pôle cellulaire est impossible en raison de l'absence d'anneau de clivage. En conséquence le fuseau mitotique se décompose partiellement, la membrane nucléaire se reforme autour de tous les chromosomes qui se décondensent rapidement, les deux pseudo-cellules filles se recollent et fusionnent par « rétrocytokinèse ». La cellule repart alors en phase G₁. L'endomitose est donc une mitose normale jusqu'à la fin de l'anaphase où l'absence d'anneau contractile d'actine empêche la cytokinèse (Figure 4).

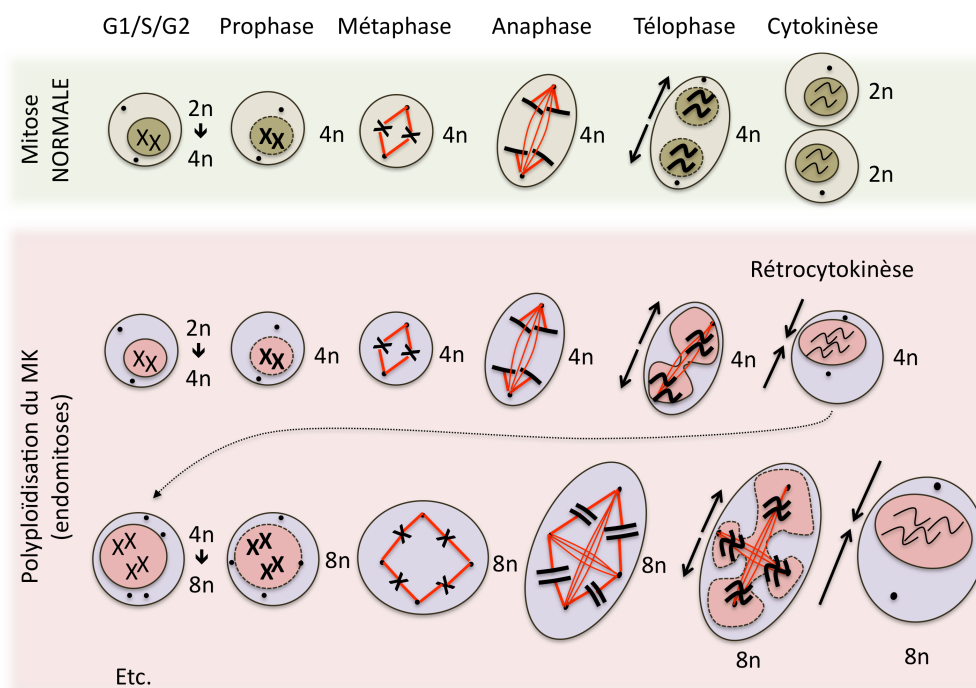


Figure 4. Mitose normale et endomitose mégacaryocytaires.
(D'après Geddis et al, 2007, et Lordier et al, 2008)

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer l'absence de cytokinèse qui est spécifique du MK. Toutes deux placent l'anneau contractile d'actine au centre de ce

phénomène, puisque la caractéristique principale de ce processus singulier est la fusion de deux cellules filles incomplètement individualisées en fin d'anaphase^{13,14}.

Une première hypothèse est une altération de la fonctionnalité de l'anneau contractile d'actine par absence de myosine IIa non musculaire en son sein - cette forme de myosine étant majoritaire dans les MK et les plaquettes¹⁵ - et une accumulation incomplète d'actine. Ceci serait la conséquence d'une inhibition de la voie Rho/Rock dans le MK. En effet, la voie Rho/Rock permet la cytokinèse en phosphorylant la chaîne légère de la myosine au niveau de l'anneau contractile et en activant la dynamique des microtubules¹⁴. Il faut noter qu'il n'y a pas d'inactivation complète de cette voie puisqu'elle participe aussi à l'établissement du fuseau d'actine, et qu'elle contrôle la polymérisation de l'actine et l'activité de la myosine II dans l'anneau contractile d'actine¹⁶⁻¹⁸. Un défaut d'activation de RhoA dans l'anneau contractile au cours des endomitoses serait lié à une diminution de l'expression de deux petites protéines GEF (*guanine exchange factors*) : GEF-H1 au stade 2n-4n, puis ECT2 dans les mégacaryocytes polyploïdes¹⁹.

Une seconde hypothèse avancée par la même équipe est la répression de la transcription de MYH10, une forme de chaîne lourde de myosine IIb non musculaire nécessaire pour la contractilité de l'anneau d'actine responsable de la cytokinèse. Cette inhibition serait médiée par RUNX1 qui est un facteur de transcription majeur au cours de la différenciation mégacaryocytaire (cf *chap. 1.2.1* : « régulation transcriptionnelle de la mégacaryopoïèse »)²⁰.

Plus récemment, un nouveau rôle pour les phosphatases Shp1 et Shp2 a été découvert dans l'endomitose du MK. En créant des modèles murins de KO MK-spécifiques pour Shp1, Shp2 et des doubles KO Shp1 et 2, les auteurs ont mis en évidence une altération des endomitoses, observant des MKs qui ne dépassaient pas une ploïdie 2n-4n. Deux mécanismes différents étaient suggérés en fonction de la phosphatase délétée. Dans les souris KO Shp1, il n'y avait pas de formation de l'anneau de clivage à la transition 2n-4n. Dans les souris KO Shp2, la macrothrombopénie observée résultait d'une diminution des voies de signalisation de Mpl (le récepteur de la TPO) et des intégrines. Les souris double KO avaient un phénotype encore plus sévère résultant de la combinaison de déficits dans de multiples voies de signalisation. Les phosphatases Shp1 et 2 auraient donc un rôle important dans les endomitoses des MKs²¹.

Enfin il est important de noter que le MK échappe à l'apoptose induite par la fin « anormale » de chaque cycle cellulaire d'endomitose en surexprimant la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L ²².

Quand la ploïdie du MK est suffisante, le cycle endomitotique est arrêté par les protéines CDKI (*Cyclin-dependent kinase inhibitors*), et essentiellement par la protéine p19^{INK4D} régulée par RUNX1 ²³.

1.1.3. Maturation cytoplasmique

Tôt dans la mégacaryopoïèse (à partir du MK stade II), un riche réseau de microfilaments d'actine et de microtubules s'organise dans le cytoplasme. Dans les stades plus tardifs (III/IV), les protéines du cytosquelette s'accumulent à la périphérie de la cellule créant une zone périphérique pauvre en organites. Le cytosquelette se compose d'actine, d' α -actinine, de filamine, de β_1 -tubuline, de taline, de protéines liant l'actine et de myosines non musculaires (MYH9 ou MYH10). Le cytosquelette d'actine et les microtubules permettent au MK de changer de forme, de transporter les organites à travers le cytoplasme ou de sécréter le contenu de leurs granules en réponse à un stimulus extérieur, comme pour les plaquettes. Les microtubules jouent aussi un rôle important dans la formation des proplaquettes (cf *chap. 1.1.5 « formation des plaquettes »*) ^{6,24}.

Le cytoplasme du MK augmente pendant les endomitose, parallèlement à la synthèse des différents composants des futures plaquettes que sont :

- les granules α qui sont les plus abondantes, où sont stockées les protéines :
 - o *fabriquées par le MK* : platelet factor 4 ou PF4, la β -thromboglobuline, le facteur Willebrand ou vWF, le transforming growth factor β ou TGF- β et la vitronectine ;
 - o *ou endocytées du milieu extra-cellulaire* : fibrinogène, immunoglobulines, albumine, fibronectine, facteur V ;
- les granules denses contenant la sérotonine, l'épinéphrine et l'adénosine diphosphate ou ADP ;
- les corps multivésiculaires, structures intermédiaires de la biogénèse des granules α ou des granules denses ;

- le système des membranes de démarcation, à partir de l'invagination de la membrane plasmique. Ces membranes délimitent des canaux à l'intérieur du MK, ouverts sur l'extérieur ²⁵, permettant parfois l'empéripolèse des cellules dans le MK (par exemple des polynucléaires) qui n'y font que transiter ²⁶. La ré-organisation du cytoplasme du MK repose sur ce système puisqu'il le compartimente en proplaquettes, d'abord « repliées » donnant une forme arrondie au MK dit « non plaquettogène », puis « dépliées » à terme donnant une forme étoilée terminale au MK dit alors « plaquettogène ».

La figure 5 résume la maturation cytoplasmique du MK.

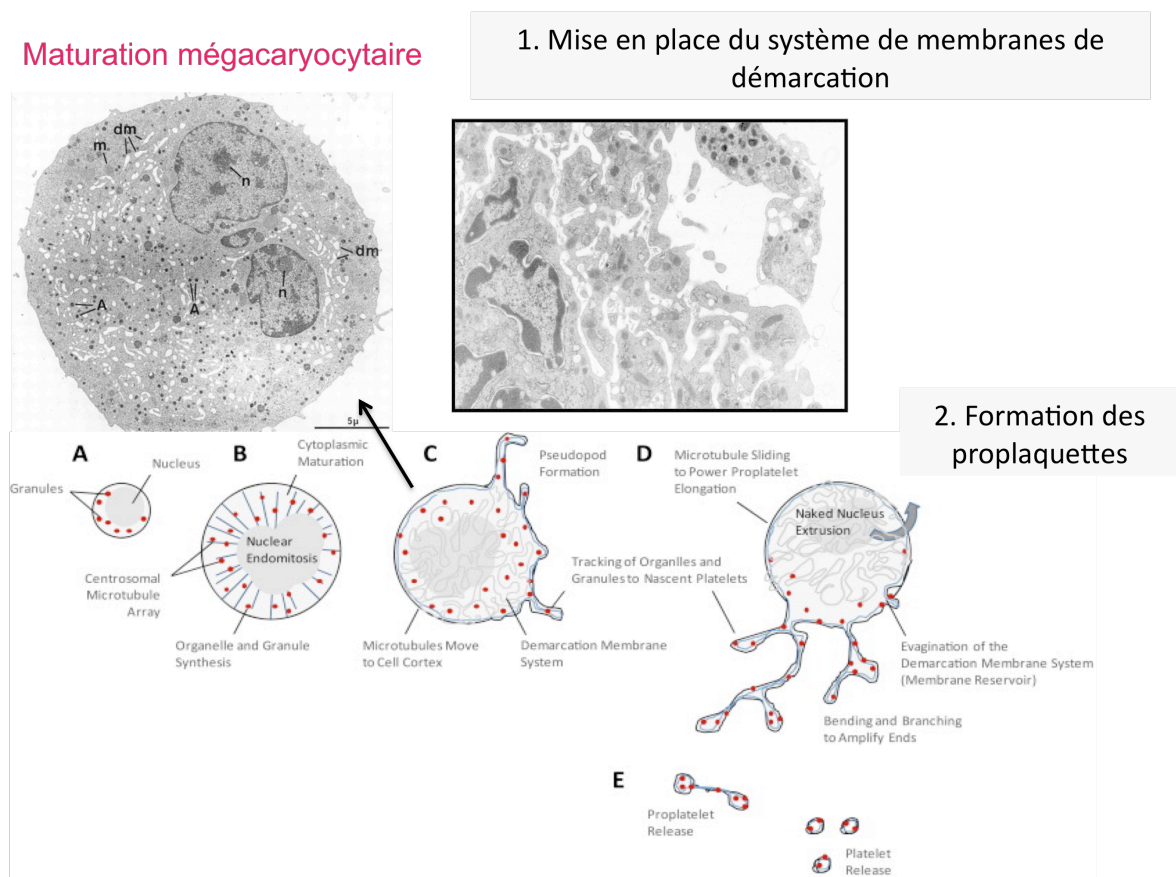


Figure 5. Maturation du cytoplasme du mégacaryocyte, de la mise en place des membranes de démarcation à la formation des proplaquettes.

D'après Thon, Semin Hematol, 2010 ²⁷.

1.1.4. Maturation membranaire

La composition lipidique de la membrane plasmique mégacaryocytaire évolue au cours du temps, multipliant par 4 la teneur en phospholipides et en cholestérol dans les MK

matures par rapport aux MK immatures. Ils contiennent autant de phospholipides que les plaquettes, mais plus de phosphatidyl-inositol et moins de phosphatidylsérine et d'acide arachidonique.

L'expression des protéines membranaires commence tôt dans la mégacaryopoïèse. Deux glycoprotéines, spécifiques des MKs et des plaquettes, sont particulièrement bien étudiées au cours de la mégacaryopoïèse : la GPIIb/IIIa et la GPIb/IX.

L'expression et la fonction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (ou GPIIb/IIIa, ou CD41a/CD61), bien que déjà présente au stade du progéniteur érythro-mégacaryocytaire ²⁸, devient réellement importante sur le MK au stade I. Cette intégrine est une protéine transmembranaire contenant deux sous-unités dont seulement la sous-unité α est MK-spécifique. L'absence de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ conduit à la thrombasthénie de Glanzmann, maladie génétique hémorragique s'expliquant par l'incapacité des plaquettes à lier le fibrinogène au cours de l'hémostase primaire ²⁹. Les MKs et les plaquettes possèdent 2 fois plus d'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les granules de leur cytoplasme que sur leur membrane. Ce compartiment granulaire constitue un pool mobilisable d'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ lors de l'activation plaquettaire. Pendant les phases précoce et intermédiaire de la mégacaryopoïèse, le contenu des granules en intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ augmente. De plus, puisque les MKs endocytent du fibrinogène dans leurs granules α (ce que ne font pas les patients atteints de la thrombasthénie de Glanzmann), l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est fonctionnelle bien avant la formation des plaquettes.

La GPIb/IX (ou CD42), récepteur du facteur Willebrand, est exprimée peu de temps après la GPIIb/IIIa ³⁰. Sa mutation génétique est à l'origine du syndrome de Bernard-Soulier, une macrothrombopénie familiale rare donnant un syndrome hémorragique ^{31,32}. Sur la figure 1A est résumée l'apparition des marqueurs membranaires mégacaryocytaires.

1.1.5. Formation des plaquettes

1.1.5.1. Formation des proplaquettes

L'étape terminale de la mégacaryopoïèse est la formation des proplaquettes, longues extensions ramifiées du cytoplasme du MK issues du « dépliement » de ses membranes

de démarcation. Ce processus est connu à la fois *in vitro* et *in vivo* depuis plus d'une vingtaine³³⁻³⁵ et a permis de produire *in vitro* des plaquettes fonctionnelles et proches de celles observées dans la microcirculation^{36,37}. Dans la moelle osseuse, les MKs matures sont proches des sinusoides vasculaires³⁸, dans la niche vasculaire³⁹, afin de relarguer leur proplaquettes dans la circulation sanguine, voire de passer en entier dans cette circulation comme vu précédemment^{1,40}. Le processus de formation des proplaquettes est encore assez mal connu, mais semble reposer sur plusieurs éléments. Tout d'abord, le pré requis indispensable à la formation des proplaquettes est la constitution d'un système des membranes de démarcation (SMD) qui sert de réservoir de membrane plasmique pour l'élaboration des futures proplaquettes. Les forces mises en jeu pour permettre l'invagination de la membrane plasmique semblent reposer sur un réassemblage des fibres d'actine par activation de la voie WASp-Arp2/3 en réponse à l'accumulation dans le cytoplasme de phospholipides PI-4,5-P₂ et des kinases PIP4K α ⁴¹. Un acteur central du remodelage membrano-cytoplasmique est la CDC42 interacting protein 4 (CIP4) qui établit un pont entre la membrane plasmique et le réseau d'actine en interagissant avec WASP⁴².

Le SMD est en continuité avec la membrane plasmique et reste en contact avec l'extérieur de la cellule. Une étude récente en microscopie spécialisée a confirmé que le point de départ de la formation du SMD était bien la membrane plasmique, avec invagination péri-nucléaire de celle-ci sous forme de pré-SMD. Les auteurs ont surtout montré pour la première fois que l'implémentation en membranes nouvellement synthétisées se faisait à partir de l'appareil de Golgi et l'apport en lipides à partir du réticulum endoplasmique, et ce du centre vers la périphérie du MK⁴³. Le SMD prend alors progressivement toute la place du cytoplasme à l'exception d'une fine bande en périphérie.

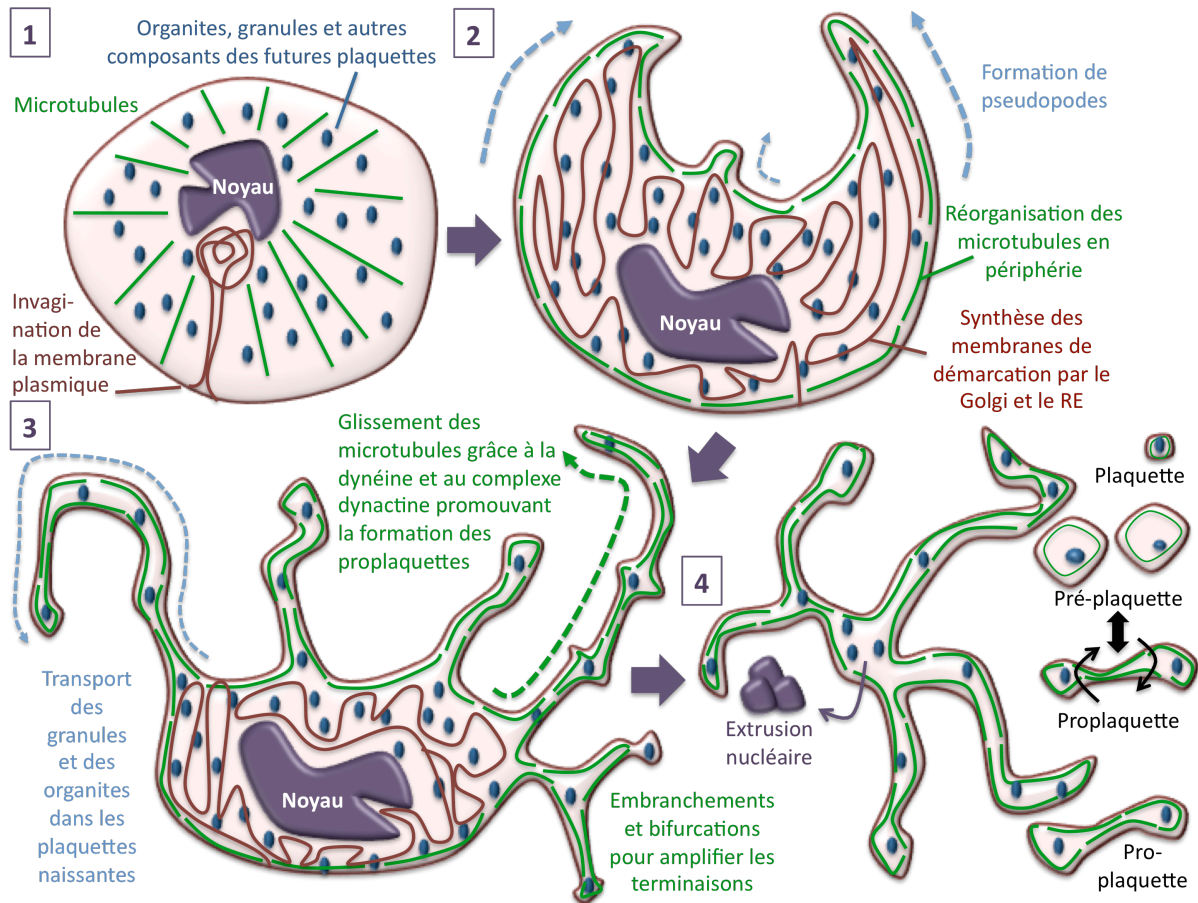


Figure 6. Résumé des modifications du cytosquelette de microtubules (MT) et du système des membranes de démarcation (SMD) au cours de la formation des proplaquettes.

1- MK non plaquetto-gène : organisation du fuseau de MT à partir du centre de la cellule (centrosome), synthèse des organites et autres futurs composants des plaquettes, invagination de la membrane plasmique formant le pré-SMD autour du noyau en cours d'endomitoses. 2- Dépolymérisation du fuseau de MT et repolymérisation sous la membrane plasmique pour initier la formation des pseudopodes, synthèse du SMD à partir du Golgi approvisionné en lipides par le RE. 3- Formation des proplaquettes, grâce à la réserve de membranes fournies par le SMD, par polymérisation des MT et glissement les uns sur les autres ; amplification de la plaquetto-génèse par multiplication des embranchements sur les proplaquettes, et acheminement des organites et des autres constituants des futures plaquettes par le réseau des MT. 4- Extrusion nucléaire du MK plaquetto-gène et relargage des proplaquettes, dont certaines deviennent des préplaquettes puis des plaquettes en condition de flux (d'après Italiano et al, JCB 1999, Patel et al, JCI 2005, Thon et al, JCB 2010 et Eckly et al, Blood 2014).

La réorganisation parallèle des microtubules est l'élément central de la formation des proplaquettes. Les microtubules déterminent la forme du MK et des plaquettes : ils se réorganisent d'un réseau centrifuge centrosomal en un réseau périphérique sous la membrane plasmique⁴⁴. En plus de déterminer et maintenir la forme du MK, ils créent de véritables « autoroutes » amenant les granules et les organites des futures plaquettes dans les extrémités naissantes du MK : les proplaquettes²⁴. Les microtubules glissent alors les uns sur les autres pour permettre dans un premier temps la formation de pseudopodes, puis des proplaquettes, puis des différents embranchements permettant

d'augmenter le nombre de plaquettes formées au final³⁷. Les microtubules forment une boucle aux extrémités des proplaquettes, cet anneau est celui qu'on retrouve dans les plaquettes. Deux protéines associées aux microtubules, EB3 et la dynéine, ont permis de mieux comprendre leur ré-organisation³⁷. La polymérisation des microtubules étant plus rapide que la formation des proplaquettes, l'équipe d'Italiano a montré grâce au couple de la GFP à la protéine EB3 que celle-ci s'effectuait à la fois vers la proplaquette en formation et le centre de la cellule. De plus, la formation des proplaquettes n'est pas altérée en présence de poison du fuseau de microtubules, ce qui suggère l'intervention d'autres mécanismes. Les mêmes auteurs ont ainsi montré que la dynéine, protéine motrice couplée aux microtubules, permettait de faire glisser les microtubules polymérisés les uns sur les autres et promouvoir la formation des proplaquettes. L'inhibition de la dynéine dissocie son complexe formé avec la dynactine et bloque complètement la formation des proplaquettes⁴⁵. La formation des proplaquettes repose donc à la fois sur la réorganisation des microtubules du centrosome en périphérie de la cellule par dépolymérisation/repolymérisation et sur le glissement des microtubules repolymérisés les uns sur les autres qui procure la force nécessaire à cette élongation⁴⁴. Une fois les proplaquettes formées, elles se détachent du MK plaquetto-gène et forment des pré-plaquettes par rotation. Ces pré-plaquettes sont de grosses plaquettes immatures qui deviennent des plaquettes matures seulement en condition de flux ; elles peuvent aussi redevenir des proplaquettes⁶. En accord avec ce qui avait été observé par Junt *in vivo* chez la souris¹, où de gros fragments de cytoplasme se détachaient du MK dans la circulation, le MK plaquetto-gène semble donc former majoritairement des proplaquettes et des pré-plaquettes, mais aussi quelques plaquettes directement à partir des extrémités distales des proplaquettes dans la circulation. La figure 6 résume les modifications du SMD et des microtubules opérées dans le MK.

Parallèlement à la réorganisation du cytosquelette de microtubules et la constitution des réserves de membrane, le cytosquelette d'actine se réorganise également à la fois pour permettre la migration du MK dans la moelle osseuse vers la niche vasculaire⁴⁷, mais aussi pour participer aux endomitoses¹⁴ et à la formation des proplaquettes⁴⁸. La voie Rho/Rock joue un rôle majeur dans cette réorganisation du cytosquelette car elle stimule l'activité contractile de l'interaction actine/myosine et favorise la rétraction membranaire^{49,50} (Figure 7).

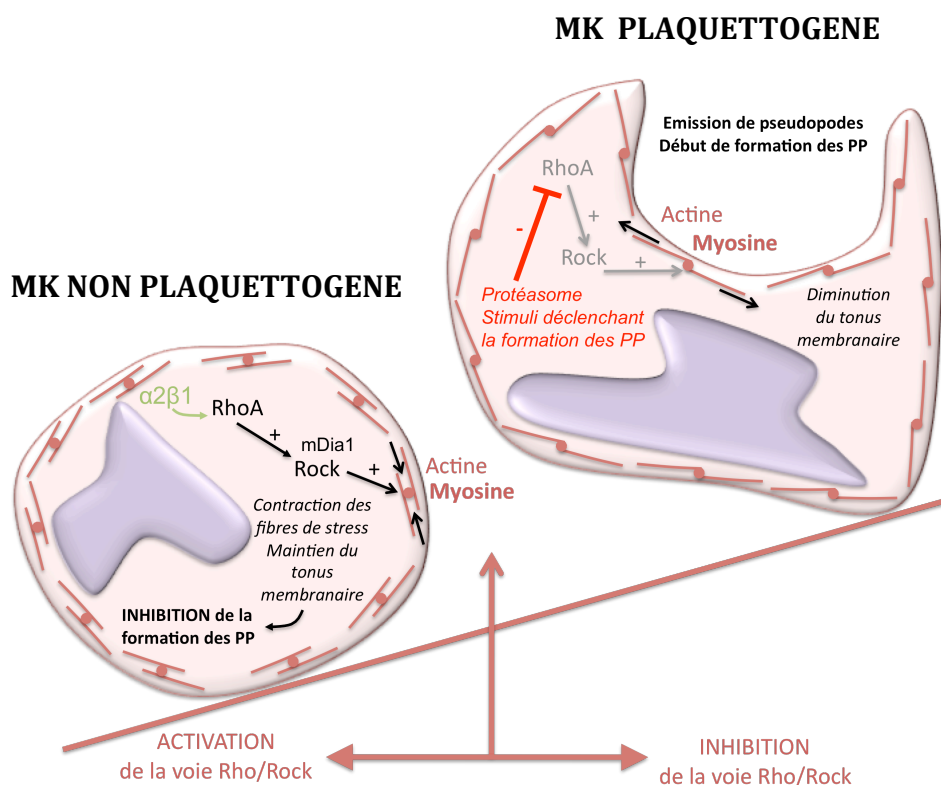


Figure 7. Modulation de la voie Rho/ROCK dans le MK.

A gauche, dans le MK non plaquettoène, l'activation de cette voie, par l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ par exemple, empêche la formation de protrusions cytoplasmiques par le maintien d'un tonus membranaire d'actine et de myosine II. A droite, dans le MKP ce tonus diminue en conséquence de l'inhibition de la voie Rho/ROCK, par exemple par la dégradation de RhoA dans le protéasome, et des pseudopodes peuvent alors se former, ce qui initie la formation des proplaquettes (PP).

Elle pourrait donc de cette manière inhiber la formation des pseudopodes⁴⁹. De manière intéressante, il semble exister dans le MK une balance dans la régulation positive puis négative de la voie Rho/ROCK contrôlant la rigidité membranaire. L'activation de cette voie dans les phases précoces assure un volume suffisant au MK pendant les endomitoses et l'augmentation de la synthèse des futurs composants des plaquettes. Elle empêche donc la formation trop précoce des proplaquettes⁴⁹. Certains effecteurs de cette voie comme MYH⁵¹, DOCK8 et ARHGEF3⁵² sont responsables de macrothrombopénies quand ils sont mutés.

De plus, il a été montré récemment que DIAPH1 (mDia1), un membre de la famille des formines et un des effecteurs de la voie Rho/ROCK, régulait négativement la formation des proplaquettes. Son inhibition par shRNA donnait plus de mégacaryocytes plaquettoènes *in vitro*⁴⁸. DIAPH1 et Rock semblent agir en contrôlant la réorganisation du cytosquelette d'actomyosine (fibres de stress) déclenchée par RhoA, en agissant respectivement sur la polymérisation des fibres d'actines et l'activation de la myosine⁴⁸.

Dans la même étude, les auteurs montrent que DIAPH1 et ROCK semblent aussi réguler la stabilité et la dynamique des microtubules lors de la formation des proplaquettes, plaçant ces deux molécules au centre de la coordination du remodelage du cytosquelette à cette étape de la mégacaryopoïèse⁴⁸.

Pour expliquer la modulation physiologique de la voie Rho/ROCK, il a été montré en 2004 que la liaison du collagène à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ activait cette voie et restreignait la formation intra-médullaire des proplaquettes, contribuant ainsi à une mégacaryopoïèse inefficace⁴⁷. Une autre équipe a montré en 2014 que la dégradation de RhoA par le protéasome était nécessaire pour que le MK devienne plaquettogène. En effet, l'inhibition du protéasome par le bortézomib se traduisait par une thrombopénie dans le myélome. Les auteurs ne précisent pas pour autant la cinétique de dégradation de RhoA ni les mécanismes qui l'organisent⁵³. La figure 7 résume la modulation de la voie Rho/ROCK dans le MK.

1.1.5.2. Un nouveau mode de formation des plaquettes en urgence : la rupture mégacaryocytaire

L'équipe japonaise de K. Eto a récemment décrit un nouveau type de mégacaryopoïèse partant du constat que le nombre de plaquettes formées par MK ne pouvait expliquer l'augmentation rapide du taux de plaquettes dans des situations d'urgence (inflammation, thrombopénie auto-immune etc.). Grâce à une optimisation technique 3D de la microscopie biphotonique intravitale dans des souris CAG-eGFP and CD41-tandem(td)Tomato, les auteurs ont observé les mégacaryocytes de ces souris directement dans la moelle osseuse. Ils ont montré que la production basale des plaquettes était assurée par la formation classique des proplaquettes mais que la production de plaquettes en situations de stress (comme l'injection intrapéritonéale d'anticorps anti-GPIIb) provenait d'une rupture précoce des mégacaryocytes matures à travers les sinusoides vasculaires médullaires. Lors de ce processus, le MK se froisse, modifie sa morphologie qui devient irrégulière et relargue des particules apparentées à des plaquettes en moins d'une demi-heure. Ce processus est différent d'une apoptose induite par le Fas-L qui provoque des modifications morphologiques différentes et qui dure plus longtemps dans leurs expériences (94 min) que la rupture du MK. Il est

également plus rapide que la classique formation des proplaquettes longues (210 min). Le nombre de particules formées par MK était beaucoup plus important en cas de rupture du MK (en moyenne 40/min) qu'en cas de passage par l'état de proplaquettes (1,4 /min +/-0,3 pour les courtes et 2,6 /min +/-0,5 pour les longues). Les auteurs ont également découvert que cette mégacaryopoïèse de stress était contrôlée par l'interleukine 1 α (IL-1 α) de manière indépendante de la TPO. Ainsi, les plaquettes formées par rupture en réponse à l'IL-1 α avaient une demi-vie plus courte et une taille plus grosse que les plaquettes formées en réponse à la TPO. Le raccourcissement de leur demi vie était lié à une désorganisation de l'assemblage des microtubules par une dérégulation de la synthèse de l' α - et de la β 1-tubuline. L'IL-1 α provoquait également la rupture de MK de foies fœtaux, et donc *in vitro*, la mégacaryopoïèse induite par l'IL-1 α a pu être reproduite. Elle était caractérisée par des MK plus nombreux, plus polyplôides et produisant de plus grosses plaquettes. La mécanistique moléculaire provoquant ce phénotype mégacaryocytaire était dépendante de la caspase 3 en réponse à la transcription de *Gata1*, *Bak1* et *Bax*, mais sans activation de l'apoptose par la technique TUNEL. Enfin, l'IL-1 α induisait une baisse du tonus membranaire des MK ainsi stimulés en comparaison à des MK CD41⁺ plus immatures (mononucléés), et ce sous la dépendance des caspases, car le tonus était restauré en présence d'un inhibiteur des caspases (Z-VAD OMe-FMK)⁵⁴.

Cette équipe décrit donc pour la première fois une forme de « fragmentation précipitée des MKs matures » en réponse à l'IL-1 α (indépendante de la TPO) aboutissant à une mégacaryopoïèse de stress produisant environ 20 fois plus de plaquettes fonctionnelles mais de demi-vie raccourcie.

1.1.6. Cinétique de la mégacaryopoïèse

La durée de vie des plaquettes humaines est habituellement de 10 jours dans des conditions physiologiques, et répond à une importante consommation quotidienne pour maintenir l'intégrité vasculaire de l'organisme⁵⁵. Le nombre total de MK médullaire est faible : entre 0,02 et 0,05 % des cellules nucléées de la moelle osseuse. En conditions physiologiques, la production plaquettaire des mégacaryocytes (MK) égale la consommation plaquettaire, mais la durée de vie des plaquettes peut être raccourcie

chez des patients thrombopéniques jusqu'à 5 jours voire seulement quelques heures dans les thrombopénies auto-immunes les plus sévères⁵⁶. Sachant que le taux de plaquettes normal est d'environ 200 G/L pour un volume de sang corporel total de 5 L, et une demi-vie des plaquettes de 10 jours, 100 milliards de plaquettes sont ainsi produites chaque jour, et si un MK produit 1000 plaquettes, environ 100 millions de MK sont générés dans la moelle chaque jour.

On estime qu'il faut entre 4 et 7 jours à un progéniteur mégacaryocytaire pour devenir plaquetto-gène et relarguer ses proplaquettes dans la circulation sanguine. Dans une étude sur la récupération plaquettaire après aphérèse, le taux de plaquettes commence à remonter 4 jours plus tard, pour redevenir normal une semaine plus tard⁵⁷. Un autre argument provient du domaine de la transplantation hépatique où, dans la semaine suivant la transplantation, le taux de plaquettes augmente significativement chez le receveur, le degré d'augmentation et la cinétique étant proches de ceux observés dans les essais cliniques sur les TPO mimétiques^{58,59}. Cette observation suggère qu'il faut entre 3 et 4 jours pour obtenir une expansion de la masse mégacaryocytaire en réponse à une stimulation par la TPO, ce qui, couplé aux 12h requises pour le relargage des proplaquettes dans la circulation³⁷, montre la grande capacité de réponse de ce compartiment médullaire.

1.2. Régulation de la mégacaryopoïèse

La régulation de la mégacaryopoïèse est à la fois transcriptionnelle par des facteurs de transcription et hormonale par l'intervention de cytokines / chimiokines.

1.2.1. Régulation transcriptionnelle de la mégacaryopoïèse

1.2.1.1. Régulation transcriptionnelle précoce

Tous les éléments figurés du sang proviennent des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH donnent naissance à des progéniteurs progressivement commutés comme le progéniteur myéloïde commun (CMP) et le progéniteur érythro-mégacaryocytaire (MEP) (Figure 1). Certains ont suggéré que le MEP pouvait également

provenir directement de la CSH⁶⁰. Les MEPs sont des précurseurs bipotents donnant naissance à la lignée érythrocytaire d'un côté et mégacaryocytaire de l'autre^{61,62}. On a longtemps pensé que la commutation érythro-mégacaryocytaire était liée aux cytokines régulatrices de l'hématopoïèse comme l'érythropoïétine (EPO) ou la thrombopoïétine (TPO). Il a été récemment montré que ces cytokines favorisent la prolifération, la survie et la différenciation des progéniteurs préalablement commutés et exprimant les récepteurs à l'EPO ou à la TPO mais ne sont pas à l'origine de cette commutation^{63,64}. Ce rôle de commutation semble revenir à de multiples facteurs de transcriptions (FT) formant un complexe de régulation transcriptionnelle à la fois positive et négative de la mégacaryopoïèse. Par exemple, Runx1, en plus d'être nécessaire à l'émergence des CSH pendant l'embryogenèse, est un FT essentiel et spécifique du développement mégacaryocytaire. Sa délétion dans les souris adulte provoque une thrombopénie et une dysmégacaryopoïèse⁶⁵. Runx1 interagit avec d'autres FT comme GATA-1 et Fli1^{66,67}. Gata1 et son cofacteur Fog1 (« Friend of GATA-1 ») promeuvent la différenciation érythro-mégacaryocytaire en même temps qu'ils inhibent Pu.1 et la différenciation myéloïde^{68,69} (Figure 8).

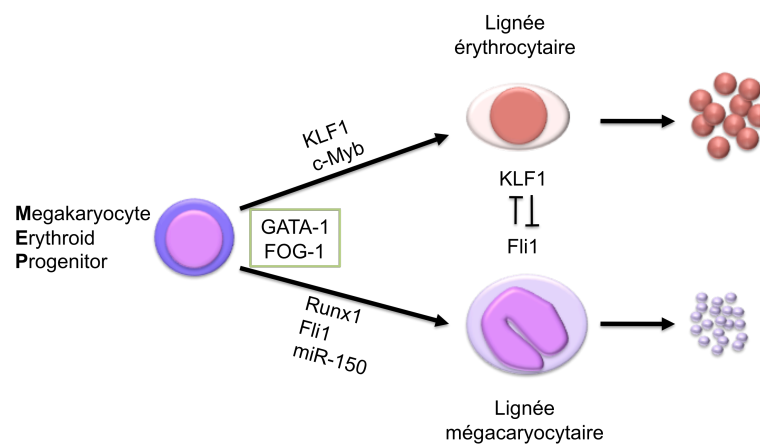


Figure 8. Régulation transcriptionnelle de la différenciation érythro-mégacaryocytaire.

Des sites de fixation pour GATA-1 et Fli1 sont présents sur plusieurs promoteurs de gènes spécifiques de la lignée mégacaryocytaire⁷⁰. Fli1 potentialise l'activité de GATA-1 sur ces promoteurs et réprime l'activité de FT érythroïdes sur les promoteurs des gènes érythroïdes⁷¹. Fli1 contraint donc le progéniteur MEP à la différenciation mégacaryocytaire, sa délétion dans des modèles murins aboutit à l'absence de MK matures⁷². De manière complémentaire, il a été montré qu'une haplo-insuffisance de Fli1 chez l'homme est responsable de la dysmégacaryopoïèse du syndrome congénital rare

de Paris-Trousseau qui associe une thrombopénie à une dysmorphie faciale⁷³. Runx1 et Fli1 semblent donc spécifiques de la mégacaryopoïèse⁷⁴. Un autre FT, KLF1, ou EKLF, est lui spécifique de la lignée érythroïde⁷⁵ et il semble qu'un antagonisme Fli1/KLF1 soit impliqué dans la commutation du MEP^{71,76-78}. Par ailleurs, l'expression du proto-oncogène c-Myb dans le progéniteur MEP promeut l'érythropoïèse et l'expression de c-Myb durant la mégacaryopoïèse est donc régulée négativement⁷⁹. D'autres gènes semblent impliqués dans la mégacaryopoïèse comme HOXA1, un gène impliqué dans le développement et la différenciation cellulaire, dont le rôle reste encore à préciser⁸⁰.

1.2.1.2. Rôle des FT dans la maturation mégacaryocytaire.

En plus de leur rôle dans la commutation du MEP, GATA-1 et Runx1 sont également impliqués dans les endomitoses et la maturation cytoplasmique du MK (Figure 9).

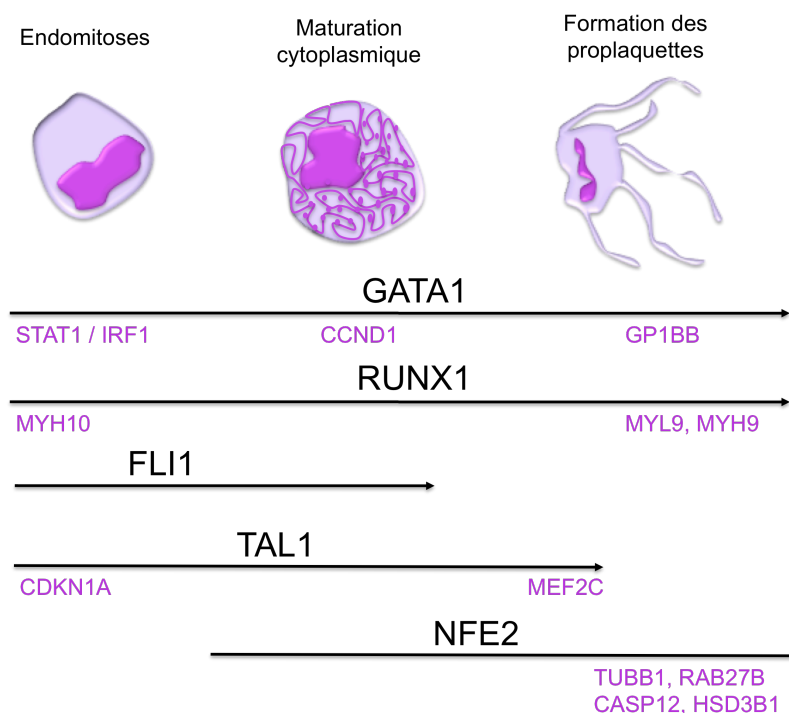


Figure 9. Régulation transcriptionnelle des dernières étapes de la mégacaryopoïèse.

En violet sont indiqués les gènes cibles des facteurs de transcription sus-jacents.

(D'après Tijssen MR & Ghevaert C, J Thromb Haemost, 2013)

On observe dans les KO conditionnels de GATA-1 ou de Runx1 une moindre polyploïdisation et un défaut de maturation cytoplasmique des MKs⁸¹. D'autres FT contrôlent les dernières étapes de la mégacaryopoïèse comme TAL1 dont le knock down

se traduit par une absence de prolifération, de polyploïdisation et de maturation cytoplasmique des MKs, ainsi que d'un nombre réduit de plaquettes produites même si elles sont tout de même fonctionnelles⁸². NFE2 est également important car les souris KO pour ce FT n'ont aucune plaquette circulante malgré un nombre important de MK intra-médullaires⁸³. Ces mêmes MKs cultivés *in vitro* en présence de TPO sont anormalement gros avec un cytoplasme désorganisé et une mauvaise répartition des membranes de démarcation, et des granules anormalement petites et rares, suggérant un blocage tardif de la maturation mégacaryocytaire⁸⁴. Le rôle de NFE2 dans la formation des proplaquettes passe par ses gènes cibles que sont TUBB1⁸⁵, RAB27B⁸⁶, CASP12⁸⁷ ou HSD3B1⁸⁸. En effet, les souris mutées pour TUBB1 sont thrombopéniques avec des plaquettes sphériques⁸⁹. Par ailleurs, une mutation de TUBB1 a été identifiée chez un patient atteint de macro-thrombopénie congénitale⁹⁰.

Les souris déficientes dans la voie de signalisation Rab ont aussi une macrothrombopénie, mais avec très peu de granules et des MK dysmorphiques ; RAB27B semble donc plutôt impliqué dans la coordination du transport des granules pendant la formation des proplaquettes⁸⁶. Les plaquettes mutées pour CASP12 sont déficientes pour l'intégrine GPIIBIIIA, et, de manière similaire, les MK délétés pour NFE2 n'arrivent pas à lier le fibrinogène en réponse aux agonistes plaquettaires indiquant un défaut dans la signalisation amenant à l'activation de la GPIIBIIIA⁹¹. Enfin, HSD3B1, une enzyme impliquée dans le métabolisme des œstrogènes, permet une formation des proplaquettes normale dans les MKs délétés pour NFE2, les auteurs concluant à un effet autocrine de l'œstradiol stimulant la formation des proplaquettes⁸⁸.

L'effet des FT ne se limite pas à leur effet individuel, ils forment un réseau de FT interagissant les uns les autres, tantôt réprimés dans une lignée, tantôt activés dans l'autre. Par exemple, Runx1 interagit avec le complexe co-répresseur mSin3A sur le promoteur de MPL dans les CSH et les progéniteurs précoces, alors qu'il forme un complexe activateur avec EP300 sur le même promoteur dans les MK⁹². Maf lui aussi doit interagir avec d'autres FT comme GATA, Fli1 et Sp1 sur le promoteur de la GPIIb (CD41) pour induire sa transcription au signal médié par ERK dans la voie des MAP-kinases⁹³.

1.2.1.3. Régulation post-transcriptionnelle

Certains micro-ARNs (miRNA) sont impliqués dans la régulation aussi bien négative que positive de la mégacaryopoïèse. En effet, certains miRNAs doivent être inactivés pour procéder à la maturation mégacaryocytaire, comme miR-10a qui inhibe le gène HOXA1 nécessaire pour la différenciation cellulaire ou miR-130a qui inhibe le FT MAFB activant la synthèse de la GPIIB. De la même manière, miR-155 doit être réprimé car il détruit les ARNm des FT ETS-1 et MEIS-1, sa surexpression se traduisant *in vitro* par une altération de la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires⁹⁴ et l'absence de mégacaryocyte dans la moelle de souris irradiées transplantées avec des CSH surexprimant miR-155⁹⁵. Parmi les miRNAs activateurs de la mégacaryopoïèse, le micro ARN miR-150 exprimé au cours de la mégacaryopoïèse précoce down-régule l'ARN de c-Myb influençant la commutation mégacaryocytaire du progéniteur MEP⁹⁶.

1.2.2. Régulation cytokinique de la mégacaryopoïèse

La régulation cytokinique de la mégacaryopoïèse fait intervenir de nombreuses molécules comme la thrombopoïétine (TPO), les interleukines (IL) 3 et 6, le stem cell factor (SCF), le Flt-3 ligand, le stromal cell-derived factor-1 (SDF1), le transforming growth factor- β (TGF- β) et l'interféron- α (IFN- α). La TPO joue un rôle central dans cette régulation.

1.2.2.1. La thrombopoïétine (TPO)

Le terme « thrombopoïétine » a été évoqué pour la première fois en 1958 pour décrire un facteur capable de stimuler la formation des plaquettes⁹⁷. L'étape majeure dans la découverte de cette cytokine est effectuée en 1986 dans la caractérisation du virus MPLV (myeloproliferative leukemia virus) induisant chez la souris une expansion majeure du compartiment hématopoïétique⁹⁸. L'oncogène viral responsable de ce phénotype fut découvert en 1990 par la même équipe⁹⁹ et son homologue cellulaire c-Mpl fut cloné en 1992¹⁰⁰. Il semblait possible que c-Mpl soit le récepteur d'un facteur de croissance puisqu'il lui était possible de transduire un signal prolifératif mais son ligand

n'était alors pas connu. Ce fut chose faite en 1994 avec le clonage de l'ADNc de cette hormone. Le gène de la TPO code pour une protéine de 36 kDa qui subit d'importantes modifications post traductionnelles¹⁰¹. La TPO présente d'importantes homologues avec l'érythropoïétine (EPO) et son effet en tant que régulateur principal de la mégacaryopoïèse a bien été démontré *in vitro* et *in vivo* chez la souris, les primates et l'homme¹⁰². *In vivo*, la TPO stimule la production plaquettaire de manière exponentielle jusqu'à 10 fois le taux de base sans stimuler la production de leucocytes ou d'érythrocytes¹⁰³. Chez la souris, les souris KO pour le gène de la TPO ou son récepteur c-Mpl ont une thrombopénie profonde liée à un faible nombre de progéniteurs ou de mégacaryocytes matures intra-médullaires, par ailleurs moins polyploïdes¹⁰⁴. Chez l'homme, les patients souffrant d'amégacaryocytose congénitale ont des mutations sévères de type non sens ou faux-sens, hétérozygotes ou homozygotes, dans le gène du récepteur de la TPO (c-Mpl). Ces mutations aboutissent à un épuisement du compartiment des cellules souches hématopoïétiques vers l'âge de 5 ans conduisant le plus souvent à une aplasie. Cette observation montre que la TPO a donc aussi un effet sur le maintien à l'état quiescent des cellules souches hématopoïétiques.

La TPO en se fixant sur son récepteur stimule la prolifération des mégacaryocytes et augmente leur ploïdie¹⁰⁵, ce qui augmente également le nombre de plaquettes formées par mégacaryocytes⁸. Le signal induit par la TPO contrôle la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation mégacaryocytaire (Figure 10).

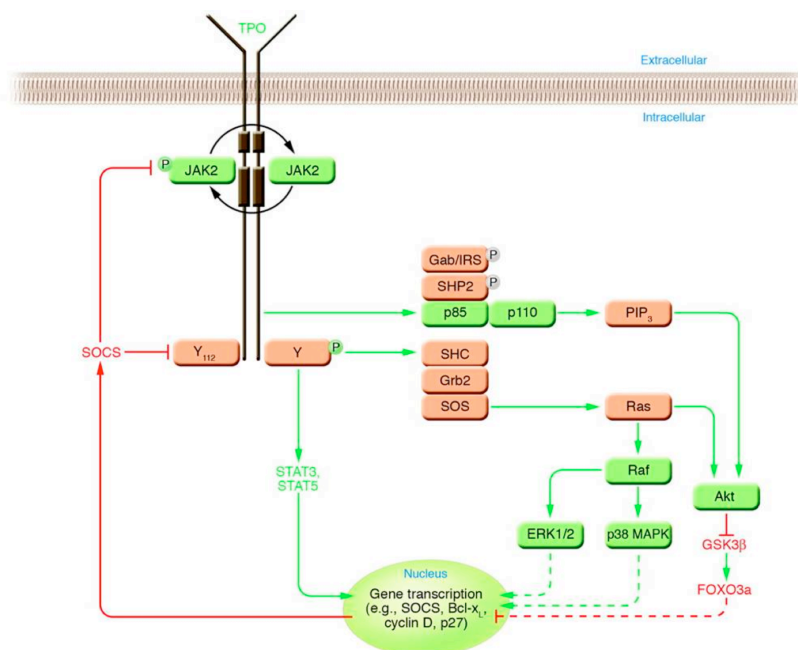


Figure 10. Signalisation de la TPO.
D'après Kaushanski, JCI, 2005 ¹⁰⁶

La TPO se fixe sur un récepteur homodimérique couplé aux tyrosines kinases JAK2. Celui-ci activé par sa liaison avec son ligand se dimérise et rapproche les kinases JAK2 inactives. Celles-ci s'activent en s'auto-phosphorylant, et recrutent des messagers intracellulaires afin d'activer différentes voies comme la voie des MAP kinases, la voie JAK/STAT, la voie PI3kinase/AKT et les inactivateurs de la transduction du signal comme les phosphatases SHP1, SHIP1 ou PTEN, et les protéines SOCS d'extinction du signal. La liaison avec Mpl conduit également à l'internalisation du récepteur, pour y être soit recyclé soit détruit. Dans les mégacaryocytes, ces différentes voies activent les facteurs de transcription STAT3 et STAT5¹⁰⁷. Les facteurs de transcription STAT ont pour cible des gènes de survie cellulaire, comme Bcl-x_L¹⁰⁸, et des gènes de prolifération et de différenciation comme RUNX-1, HIF-1 α , HOXB4, ou HOXA9¹⁰⁹⁻¹¹².

La régulation physiologique de la sécrétion de la TPO est actuellement expliquée par deux modèles tentant de comprendre une vieille observation : pourquoi quand on induit une thrombopénie chez le rat par l'injection d'anticorps anti-plaquettes s'ensuit une restauration rapide du taux de plaquettes, suivie d'une courte période de thrombocytose¹¹³ ?

1.2.2.1.1. Modèle de sécrétion constante de la TPO

Le premier modèle (figure 11) est le modèle dominant. Il suggère que le pool de plaquettes circulantes régule une sécrétion constante de TPO par le foie en internalisant la TPO circulante, la TPO restante servant à stimuler le compartiment mégacaryocytaire. C'est donc la quantité de récepteur Mpl présent à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes qui détermine la production médullaire de plaquettes : la concentration sanguine de TPO semble donc inversement proportionnelle à la « masse Mpl » regroupant les plaquettes et les MKs ¹¹⁴. Ainsi toute thrombocytose « absorbe » la TPO circulante diminuant alors la stimulation du compartiment mégacaryocytaire, et inversement toute thrombopénie permet une élévation du taux de TPO circulante et une hyperstimulation du compartiment mégacaryocytaire. Ce modèle est basé sur celui expliquant la régulation du taux circulant de M-CSF (macrophage colony stimulating factor)¹¹⁵. Le taux invariable d'ARN messager de la TPO dans le foie et le rein chez la souris ou chez l'homme apporte un argument complémentaire fort pour ce modèle^{116,117}. De plus, chez des souris KO pour le gène de la TPO, la quantité de plaquettes était

directement reliée à l'état hétéro- ou homozygote de la délétion : les souris KO à l'état hétérozygote n'avaient que la moitié des plaquettes des souris WT et les souris KO à l'état homozygote étant très profondément thrombopéniques. Une hypothétique régulation active de la TPO ne permettrait donc pas de compenser une « simple » thrombopénie modérée liée à la perte hétérozygote d'un allèle¹¹⁸.

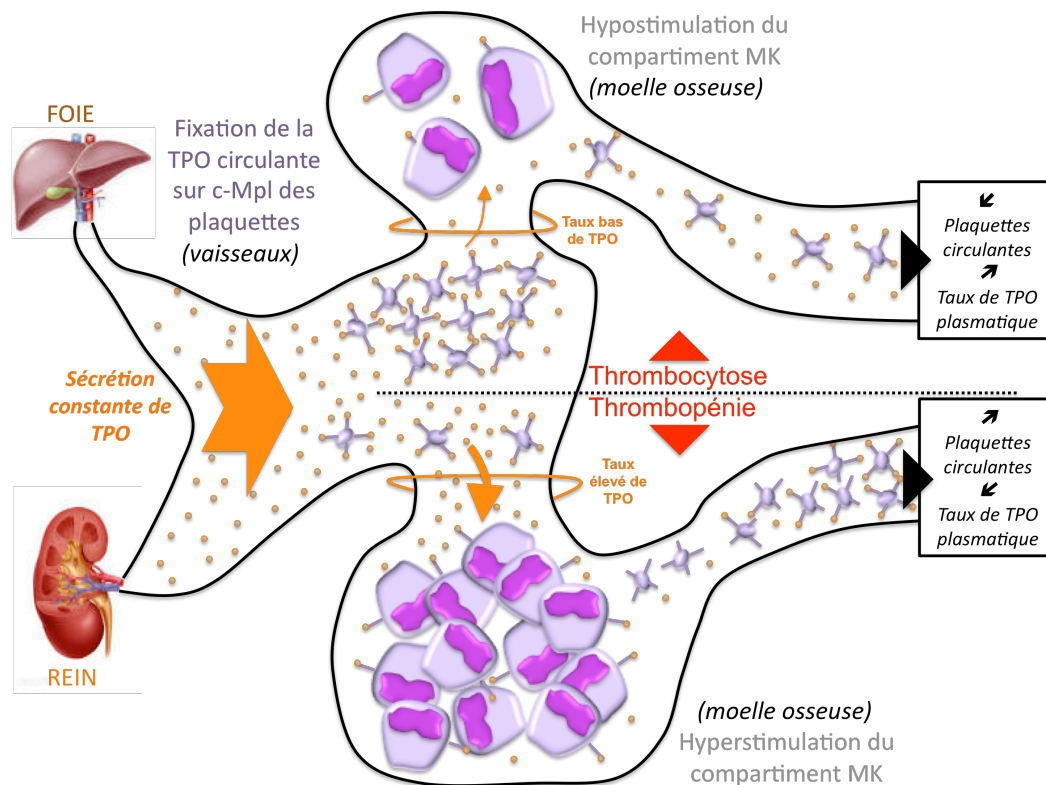


Figure 11. Modèle dominant de régulation de la sécrétion endogène constante de TPO par le pool plaquettaire circulant et la masse mégacaryocytaire.

Dans la lignée de ce modèle, l'équipe du WEHI dirigée par W. Alexander a montré dans un modèle murin dont les MKs étaient délétés spécifiquement pour le récepteur Mpl que l'expression de Mpl n'est pas indispensable pour la mégacaryopoïèse. Il semblait que Mpl servait surtout à capter la TPO circulante pour éviter une myéloprolifération mégacaryocytaire. Dans ce modèle $Mpl^{PF4cre/PF4cre}$, le récepteur Mpl était exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs MK mais pas sur les MK ni sur les plaquettes. Les auteurs montraient que ces souris étaient très thrombocytaires avec une importante prolifération du compartiment mégacaryocytaire en lien avec une surprolifération et une orientation préférentielle du progéniteur érythro-mégacaryocytaire vers la lignée mégacaryocytaire. La TPO ne semblait donc pas directement impliquée dans la mégacaryopoïèse pour ces auteurs¹¹⁹.

1.2.2.1.2. Modèle de régulation directe de la sécrétion de TPO

Le second modèle, plus récemment étudié, suggère une régulation directe de la sécrétion de TPO, notamment intra-médullaire, en réponse à un taux de plaquettes bas. Un taux plus élevé d'ARN messager de la TPO dans la moelle a été mis en évidence en réponse à un taux de plaquettes très bas¹²⁰, à une sécrétion d'IL-6¹²¹⁻¹²³ ou une irradiation hépatique¹²⁴. Des facteurs locaux comme le CD40-ligand, le Ftl3-ligand, le PDGF, le FGF, le PF4, le TGF β et la thrombospondine stimulent la production de TPO par les cellules stromales médullaires¹²⁵⁻¹²⁷.

Plus récemment, une équipe américaine de Boston a montré chez la souris que les plaquettes sénescents désialylées étaient reconnues dans le foie par le récepteur Ashwell-Morell (AM). Ceci contribuerait ensuite à leur destruction hépatique et à la stimulation de la sécrétion hépatocytaire de TPO via une activation du signal Jak1/2 - Stat3.

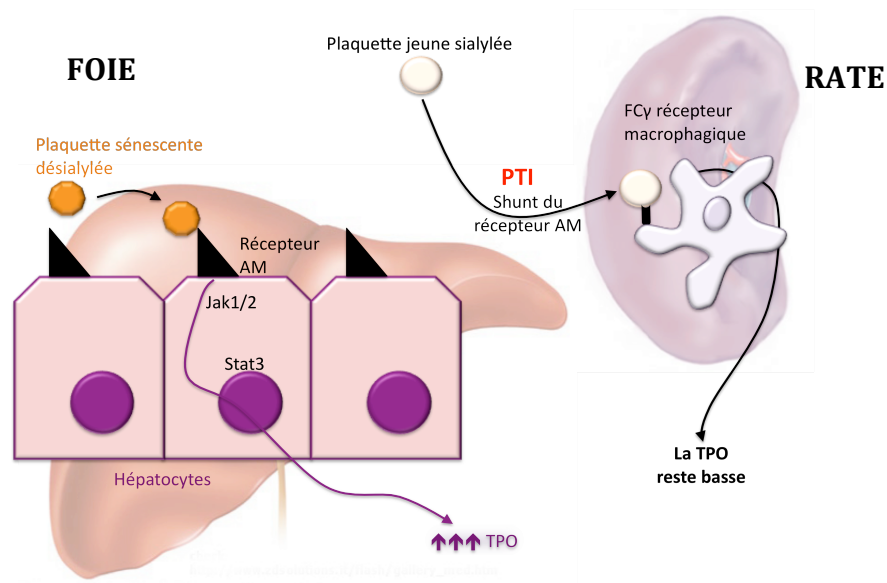


Figure 12. Régulation de la TPO par le récepteur Ashwell-Morell et hypothèses développées par les auteurs concernant l'application de ce modèle dans la TE et le PTI.

Dans le cas du PTI, une majorité de plaquettes jeunes sialylées circulantes sont opsonisées par les auto-anticorps anti-plaquettes et détruites dans la rate par les macrophages. Ceci ne stimulerait pas le récepteur AM qui est situé dans le foie. En revanche, dans le cas de la thrombocythémie essentielle (TE) le pool plaquettaire circulant serait fait de plus de plaquettes sénescents potentiellement éliminées par le récepteur AM hépatique pouvant donc contribuer à la sécrétion de TPO amplifiant la thrombocytose.

De manière intéressante, ce mécanisme n'intervient pas dans la thrombopénie auto-immune, probablement parce que les plaquettes opsonisées sont reconnues dans la rate

par le FC γ -récepteur des macrophages puis détruites dans la rate ; ainsi le pool plaquettaire circulant est majoritairement constitué de plaquettes jeunes sialylées. Dans cette étude, l'injection d'anticorps anti-plaquettes ne stimulait pas l'expression hépatique de l'ARN messenger de la TPO car les plaquettes étaient éliminées de la circulation par d'autre mécanisme que le récepteur AM. Ainsi en suivant ce modèle, la thrombocytose observée dans la thrombocytémie essentielle produirait plus de plaquettes désialylées et donc une activation de la sécrétion hépatique de TPO entretenant la thrombocytose (hypothèse avancée par les auteurs), alors que la thrombopénie auto-immune, indépendante du récepteur AM, provoque une diminution de cette sécrétion hépatique entretenant la thrombopénie¹²⁸ (Figure 12).

1.2.2.2. Autres cytokines impliquées dans la mégacaryopoïèse

La TPO étant le régulateur principal de la mégacaryopoïèse, son absence n'entraîne pas pour autant la disparition complète de ce compartiment médullaire, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs régulateurs.

1.2.2.2.1. Cytokines activatrices : IL-3, G-CSF, IL-6, SCF, Flt-3 ligand et IL-1 α

L'interleukine-3 (IL-3) est sécrétée par les lymphocytes T tout comme le G-CSF. Ces deux molécules n'ont qu'un effet mineur sur la mégacaryopoïèse chez la souris ou chez l'homme, soit en addition en contexte de mégacaryopoïèse normale, soit en substitution dans des souris déficientes pour le récepteur de la TPO^{129,130}.

En synergie avec l'IL-3, l'IL-6 agit modestement sur la mégacaryopoïèse, son injection chez le primate ou la souris résultant en une légère thrombocytose¹³¹⁻¹³³. Cette thrombocytose inflammatoire est également observée chez l'homme dans des pathologies dépendantes de l'IL-6 comme la polyarthrite rhumatoïde ou dans tout autre état inflammatoire. L'effet de l'IL-6 est majoritairement observé sur la maturation mégacaryocytaire^{134,135}. Par ailleurs, l'IL-6 agirait en augmentant la production hépatique de TPO¹²³.

Le stem cell factor (SCF) agit sur la mégacaryopoïèse précoce en augmentant la prolifération des progéniteurs MK¹³⁶. Cet effet est obtenu en synergie avec les cytokines

précédemment évoquées (IL-3, G-CSF, IL-6). Cet effet est diminué en l'absence de son récepteur c-kit dans un modèle de souris KO ¹³⁷. Cette prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires est aussi observée avec le Flt-3 ligand, qui présente une structure proche du SCF, effet également synergique ^{138,139}. Ainsi, afin d'optimiser les premiers jours de culture *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34+, le cocktail de cytokines SCF + Flt-3 ligand + TPO est souvent utilisé afin de soutenir la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires.

Enfin, il a récemment été montré chez la souris que l'interleukine-1 α - sécrétée par exemple dans un contexte inflammatoire - permettait de provoquer la rupture des MKs matures pour induire une mégacaryopoïèse de stress « précipitée » remplaçant la formation des proplaquettes (cf *chap. 1.1.5.2*). ⁵⁴

1.2.2.2. Chimiokine activatrice : SDF-1

Une chimiokine a un rôle intra médullaire bien défini, il s'agit de SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1) et de son récepteur CXCR4. En effet la moelle osseuse est la source primitive de SDF-1, et toutes les cellules qui expriment CXCR4 sont d'origine hématopoïétique. Les souris délétées pour l'un et/ou l'autre des gènes codant pour ces protéines ont un phénotype majeur d'aplasie médullaire, *a priori* dû à un défaut de « homing » des cellules souches hématopoïétiques embryonnaires ¹⁴⁰. SDF-1 a une importance majeure dans la mégacaryopoïèse par l'établissement d'un gradient croissant de la niche ostéoblastique à la niche vasculaire afin de rapprocher le MK des capillaires médullaires et de procéder ainsi à la fragmentation de son cytoplasme dans la lumière vasculaire, voire à son passage au travers pour certains auteurs¹⁴¹.

1.2.2.2.3. Cytokines inhibitrices : TGF β , Interféron- α

Deux groupes de cytokines ont des effets inhibiteurs sur la mégacaryopoïèse : les protéines du groupes TGF β et les interférons- α . La famille TGF β regroupe des cytokines qui présentent le double effet d'inhiber la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires ¹⁴², mais paradoxalement de favoriser leur différenciation, comme BMP4 ¹⁴³. Les interférons- α sont connus pour leur effet inhibiteur sur l'hématopoïèse, et

sont, par exemple, responsables de thrombopénies au cours du traitement de l'hépatite C¹⁴⁴, ou même utilisés à cet effet dans les syndromes myéloprolifératifs¹⁴⁵.

1.3. Modèles d'étude de la mégacaryopoïèse

1.3.1. Mégacaryopoïèse à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺

Le modèle le plus communément utilisé à l'heure actuelle pour obtenir des MKs en culture est la différenciation *in vitro* de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺. Ces cellules peuvent être obtenues à partir de sang de cordon, de cytophérèse de cellules CD34⁺ périphériques circulantes ou de moelle osseuse, la plupart du temps dans le cadre de dons de moelle osseuse hématopoïétique.

Les différences entre la différenciation mégacaryocytaire des cellules CD34⁺ juvéniles issues de sang de cordon et des cellules CD34⁺ adultes doit faire choisir le modèle d'étude *in vitro* le plus adapté à la maladie étudiée (pédiatrique vs adulte) (Tableau 2). En effet, la mégacaryopoïèse néonatale est plus « immature » que l'adulte, avec des MKs plus petits, moins polypléides, et donc donnant moins de plaquettes par MKs, ce qui est compensé par une plus importante prolifération des progéniteurs¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.

Caractéristiques	Néonatale	Adulte
Concentration de TPO	Haute	Basse
Réponse à la TPO par les MKs	Plus sensibles à des concentrations basses de TPO	Moins sensibles à des concentrations basses de TPO
Progéniteurs MKs	Très prolifératifs (jusqu'à 10 fois plus)	Moins prolifératifs
Taille des MKs	Petite	Grande
Ploïdie des MKs	Faible : 2n à 4n en culture	Importante, jusqu'à 128n
Maturation des MKs	Cytoplasme mature à ploïdie faible	Maturation cytoplasmique dépendante de l'augmentation de la ploïdie

Tableau 2. Caractéristiques comparatives de la mégacaryopoïèse néonatale (dérivée de cellules CD34⁺ de sang de cordon) et adulte.

D'après Ferrer-Marin F et al, Transfusion, 2013.

De plus, il a été montré que l'expression des glycoprotéines de surface était différente entre le sang de cordon et la moelle adulte. Chez l'adulte, il y a acquisition du CD41, puis

du CD42, puis perte du CD34 avec une population finale CD34⁻ CD41⁺ CD42⁺. Les MKs CD42⁺ n'ont plus de capacité de prolifération. Pour les cellules issues de sang de cordon, c'est légèrement différent puisqu'il y a quasiment disparition du CD34, puis apparition du CD41, puis du CD42, et ces cellules matures contrairement à l'adulte sont encore capables de prolifération³⁰. Il a été suggéré que ces différences permettaient au compartiment mégacaryocytaire de s'adapter à la croissance rapide du fœtus et du nouveau-né¹⁴⁹.

1.3.2. Mégacaryopoïèse à partir de cellules souches reprogrammées induites, ou iPSC pour « induced pluripotent stem cells »

Un autre modèle d'étude *in vitro* de la mégacaryopoïèse a pu être élaboré à partir des cellules embryonnaires humaines (hES) ou, plus récemment, des cellules souches reprogrammées induites (iPSC).

1.3.2.1. Genèse des iPSC

1.3.2.1.1. Historique et rationnel

Depuis une trentaine d'années, l'étude des hES a permis de mieux caractériser la pluripotence cellulaire. Ces cellules, de par leur pluripotence, ont un champ d'application large en médecine régénérative, mais la manipulation des embryons humains est encore à l'heure actuelle sujette à de nombreux obstacles : éthique tout d'abord, et, du fait de la différence génétique entre les cellules ES et le receveur, un risque de rejet une fois les cellules implantées. Une manière de contourner ces obstacles était de générer des cellules pluripotentes à partir de cellules adultes différenciées du même patient. La création de telles cellules ouvrirait la voie à de nombreuses applications, aux premiers rangs desquelles on retrouverait la médecine régénérative, la toxicologie et les tests pharmacologiques de nouvelles molécules, et la recherche fondamentale sur des maladies spécifiques (« diseases in a dish »¹⁵⁰).

C'est en 2006 que la première publication décrivant les iPSC dans la revue *Cell* a été publiée. Ces cellules ont été générées à Kyoto, dans le laboratoire de Shinya Yamanaka (prix Nobel de physiologie ou médecine en 2012 avec John Gurden), en plein essor de la médecine régénérative induit par les intéressantes propriétés des cellules souches

embryonnaire (ES). En effet, c'est à partir des nombreux travaux réalisés sur les cellules ES depuis les années 1981 que ces chercheurs ont défini quatre facteurs pouvant induire une pluripotence dans les fibroblastes murins¹⁵¹.

1.3.2.1.2. Facteurs impliqués dans la reprogrammation dans la description initiale des iPSC

Plusieurs équipes avaient préalablement montré qu'il était possible de reprogrammer des cellules différenciées en cellules souches pluripotentes de plusieurs manières : soit en transférant le matériel nucléaire dans des ovocytes ¹⁵², soit en fusionnant les cellules différenciées avec des cellules ES ^{153,154}, ce qui démontrait que les cellules germinales non fertilisées ou les cellules ES pouvait transférer leur pluripotence à des cellules différenciées. La pluripotence des cellules obtenues était alors évaluée par de nombreux tests :

- la morphologie des cellules en culture,
- l'expression génique par RT-PCR ou puces ADN,
- l'expression en IF de marqueurs embryonnaires comme SSEA-1 ou la phosphatase alcaline,
- la formation des 3 feuillets embryonnaires que sont l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme par la formation de tératomes dans des souris immunodéprimées (BALB/Jcl-nu),
- la contribution des cellules une fois injectées dans des blastocystes à tous les feuillets des embryons formés (bien qu'il ne fût pas possible d'obtenir des individus chimériques viables).

Des facteurs de transcription maintenant l'état de pluripotence embryonnaire ou dans les cellules ES ont été identifiés : Oct3/4, Sox2 et Nanog. D'autres gènes étaient up-régulés dans les tumeurs, comme *Stat3*, *E-Ras*, *c-myc*, *Klf4*, et la β -caténine. Ces facteurs permettaient la conservation de la pluripotence des cellules ES dans les cultures très prolongées (long-terme) ainsi que leur prolifération rapide, parmi d'autres gènes potentiels. En testant au total 24 gènes candidats, les chercheurs japonais ont identifiés 4 facteurs indispensables : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc, que ce soit pour reprogrammer des fibroblastes embryonnaires et adultes murins ou humains¹⁵⁵. De manière surprenante, Nanog n'était pas indispensable, et son expression était induite par la

transfection des 4 facteurs. Parmi les facteurs de transcription, Oct3/4 et Sox2 étaient indispensables, et parmi les gènes cibles, c-Myc et Klf4 étaient essentiels dans la génération des iPSC. Restait à expliquer le mode d'action de ces 4 facteurs. De par son effet d'acétylation globale des histones, c-Myc permettrait ainsi la liaison d'Oct3/4 et de Sox2 à leurs gènes cibles. Klf4 agirait par la répression de p53, la dé-dérégulation de nanog ainsi induite rétablissant donc son expression. Klf4 a également un effet anti-prolifératif qui semble contre-balancé par c-Myc, l'équilibre c-Myc/Klf4 semblant donc important pour la génération des iPSC. Enfin, l'utilisation de la forme activée de c-Myc empêchait l'utilisation de ces cellules en thérapie génique compte tenu de l'oncogénicité avérée de ce gène^{151,155}.

1.3.2.1.3. Critique de ce 1^{er} modèle de reprogrammation et évolution de la théorie de la reprogrammation

Le faible taux de cellules reprogrammées ainsi que l'impossibilité pour ces cellules de participer pleinement au développement d'un embryon chimérique a ouvert la discussion dans la communauté scientifique : était-ce une véritable reprogrammation ou seulement une reprogrammation partielle de cellules adultes différenciées ? Trois groupes sont rapidement parvenus à générer des iPSC qui parvenaient à coloniser l'embryon, persister au stade adulte, et donner des gamètes, donnant un début de réponse à la question¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Néanmoins, certaines équipes expliquaient que les cellules qui semblaient être pluripotentes devaient leur pluripotence à l'expression continue des 4 facteurs, notamment pour leur auto-renouvellement^{155,159,160}. Yamanaka proposait en 2009 deux modèles expliquant cette faible efficacité de reprogrammation (Figure 13) : un modèle « élite » dans lequel seules quelques cellules déjà susceptibles d'être reprogrammées avant l'introduction des 4 facteurs le devenaient, soit incomplètement, soit complètement, et un modèle « stochastique » de reprogrammation systématique de cellules qui redevenaient pour la plupart différenciées à l'exception des quelques unes partiellement ou complètement reprogrammées qui restaient indifférenciées¹⁶¹.

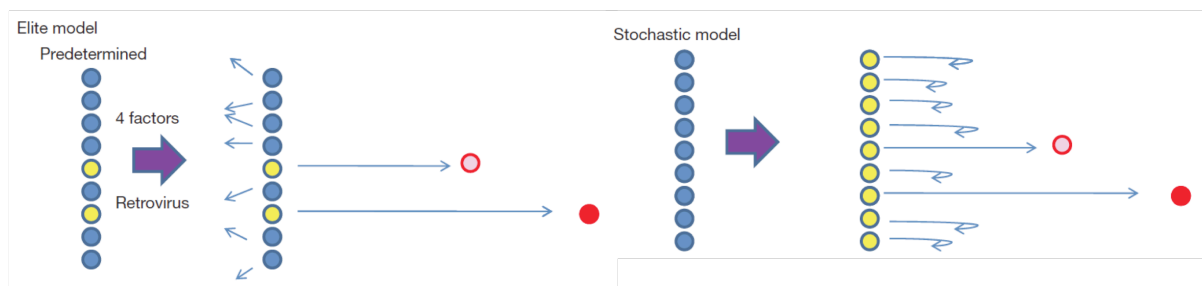


Figure 13. Modèles expliquant la variabilité de reprogrammation des iPSC.

D'après Yamanaka, Nature, 2009. Les cellules bleues sont les cellules originelles différenciées, les cellules jaunes sont les cellules compétentes pour être reprogrammées, les cellules roses sont des cellules incomplètement reprogrammées, et les rouges, complètement reprogrammées.

En se fondant sur cette hypothèse, une équipe américaine de Yale a suggéré qu'une reprogrammation « privilégiée » existait néanmoins pour certaines cellules, facilitée par l'introduction des 4 facteurs. Cette reprogrammation aboutirait à une prolifération ultra-rapide des cellules qui serait caractéristique de cet état¹⁶². De manière différente du modèle « élite », où seulement une cellule parmi d'autres est reprogrammée, ce modèle « privilège » témoignerait d'une reprogrammation complète de la cellule, donnant systématiquement et très rapidement un grand nombre de cellules reprogrammées et indifférenciées. Le modèle « privilège » serait ainsi un cas particulier du modèle « stochastique » car dans ce dernier, toutes les cellules sont reprogrammées, mais seules quelques unes restent indifférenciées.

1.3.2.2. Evolution des iPSC et des systèmes de reprogrammation

La technique initiale développée par l'équipe de Yamanaka passait par une infection lentivirale intégrant les facteurs dans le génome de la cellule cible, ce qui empêchait l'application thérapeutique de cette technique. De plus, l'efficacité de la reprogrammation était faible, de l'ordre de 1%. De nouvelles techniques non intégratives ont donc été proposées depuis.

Des vecteurs intégratifs excisables après reprogrammation ont été rapidement développés, l'excision étant rendue possible par la présence, dans la cassette provirale contenant les 4 facteurs, de séquences *Lox* reconnues par la protéine recombinante *Cre* exprimée transitoirement lors d'une infection par un adénovirus. Un sous-clonage des iPSC permettait par la suite de sélectionner les clones ne contenant plus aucun

provirus^{163,164}. L'efficacité de reprogrammation obtenue par cette technique était augmentée, de l'ordre de 0,1 à 1%¹⁶⁵. Une autre technique utilisait des transposons transfectés dans des fibroblastes murins et humains à l'aide de la technique FuGENE® HD de Roche (*piggyBac*)¹⁶⁶. L'efficacité de reprogrammation était toutefois dix fois plus faible pour cette technique (0,1%)¹⁶⁵.

Parmi les méthodes de reprogrammation non intégratives comme les adénovirus, plasmides, épisomes, vecteur minimaliste polycistronique circulaire, protéine recombinante, ou micro-ARN, c'est probablement les techniques employant le virus Sendai ou les ARN messagers qui montrent les résultats les plus intéressants. L'intérêt de ces techniques est la disparition progressive du matériel de reprogrammation implanté dans le cytoplasme de la cellule au fur et à mesure des mitoses successives de l'iPSC au prix d'une efficacité de reprogrammation plus faible, de 0,001 à 1 % pour le virus Sendai et les ARN messagers.

Le virus Sendai est un virus qui se réplique sous la forme d'un mono-brin anti-sens d'ARN qui a l'avantage de ne pas s'intégrer dans le génome de la cellule infectée, conférant ainsi à cette technique la possibilité d'utilisation thérapeutique des cellules obtenues. De plus, la cellule infectée exprime l'antigène protéique HN du virus Sendai, ce qui permet un tri négatif des cellules encore infectées avec un anticorps spécifique pour purifier la population en ne gardant que les cellules reprogrammées non infectées. Les auteurs ayant développé cette technique ont obtenu des iPSC^{167,168}.

Toujours dans un souci d'applicabilité clinique, d'autres équipes ont développé une approche par ARN messagers synthétiques permettant d'éviter une réponse immunitaire innée anti-virale. Ces ARN messagers codaient pour les 4 facteurs, comportaient un tag GFP afin de visualiser les protéines synthétisées, et leur demi-vie cytoplasmique était augmentée par une coiffe en 5'. Les ARN messagers ainsi modifiés étaient transfectés dans les cellules cibles (kératinocytes et fibroblastes) par électroporation et permettait d'obtenir des iPSC à partir de plusieurs types tissulaires de fibroblastes. Cependant, bien qu'efficace avec un pourcentage de reprogrammation de 2% selon les auteurs, et comme pour toutes les techniques de génération et d'entretien des iPSC, la culture permettant de maintenir les cellules sur le long terme était techniquement très complexe^{169,170}.

Ainsi, à l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus méthodologique sur la génération des iPSC, chaque équipe utilisant la technique qu'il souhaite, et qui est bien souvent celle qu'elle a développée.

1.3.2.3. Evolution des cellules reprogrammées : ciblage des cellules hématopoïétiques

Les cellules initialement reprogrammées chez l'homme étaient des fibroblastes, mais l'obtention de telles cellules nécessite un prélèvement invasif par biopsie de peau saine. De nombreux types cellulaires ont ainsi par la suite été reprogrammés en iPSC et notamment les cellules du système hématopoïétique comme les progéniteurs myéloïdes médullaires murins ¹⁷¹, les monocytes ¹⁷², ou les cellules CD34⁺ de moelle osseuse, de sang de cordon ou mobilisés par du G-CSF ¹⁷³⁻¹⁷⁵. A l'heure actuelle, les fibroblastes, les cellules mononucléées et CD34⁺ restent les plus utilisées pour la différenciation hématologique ultérieure.

1.3.2.4. Différenciation hématologique et mégacaryopoïèse

1.3.2.4.1. Différenciation hématologique des iPSC

La différenciation hématologique des cellules iPSC reproduit *in vitro* la différenciation hématologique embryonnaire, notamment dans sa phase définitive intraembryonnaire issue de l'aorte-gonade-mésonephros (AGM) où à partir du 27^e jour de développement, les cellules souches hématopoïétiques émergent de l'endothélium aortique. Cet endothélium témoigne de la filiation commune entre cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques. Ainsi, le développement de la différenciation hématologique des iPSC a été développée selon les mêmes protocoles que pour les cellules ES : à partir de colonies iPSC planes, développement de corps embryoïdes puis genèse de progéniteurs hématopoïétiques¹⁷⁶⁻¹⁸⁰.

Pour effectuer cette différenciation qui dure une trentaine de jours *in vitro*, la plupart des auteurs orientaient leurs cellules iPSC vers la formation du feuillet mésodermique grâce à l'utilisation de la cytokine BMP-4. Des corps embryoïdes étaient ainsi formés puis différenciés vers la lignée hématologiques sur un stroma de cellules OP9 à l'aide de

cytokines spécifiques de cette lignée (SCF, FLT3L, TPO, EPO, GM-CSF) mais aussi, selon les équipes, de VEGF, de PGE2 et de SR1 récemment décrite comme augmentant la prolifération des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ ¹⁸¹.

Peu d'équipes ont réussi une différenciation hématologique à partir d'iPSC adultes humaines, c'est-à-dire en-dehors des cellules CD34⁺ de sangs de cordon (déjà immatures)^{177,182,183}. De plus, le nombre de cellules CD34⁺ obtenues par ces équipes était faible (de l'ordre de 1% au mieux). Pour évaluer si les cellules obtenues sont transplantables et capables de reconstituer le système hématopoïétique, les techniques utilisées actuellement *in vivo* sont développées chez la souris profondément immunodéprimée NSG, pour NOD/SCID-IL2R $\gamma^{-/-}$, c'est à dire sans lymphocyte B, T ou NK. Un tel KO du système immunitaire murin permet donc le développement de tout type cellulaire allogénique dans la souris, notamment le développement de tératomes d'iPSC permettant de démontrer la pluripotence de ces cellules par la reconstitution des 3 feuillets embryonnaires que sont l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme. Ainsi, la reconstitution hématopoïétique des cellules obtenues par les équipes sus-citées^{177,182,183} dans des souris NSG était très faible. Ceci constituait un obstacle important pour utiliser ces cellules en thérapeutique, notamment dans la greffe de moelle hématopoïétique.

Cet obstacle a été partiellement levé par l'équipe américaine de DG Tenen qui a récemment décrit une méthode alternative de tératomes d'iPSC humaines obtenues à partir de kératinocytes et implantés dans des souris NSG. Ces tératomes formaient directement en leur sein des structures apparentées aux logettes de la moelle osseuse dans lesquels étaient retrouvés des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺. Cela leur permettait de s'affranchir de toutes les étapes de la différenciation hématopoïétique *in vitro*. Ces progéniteurs étaient capables de reconstituer un système hématopoïétique et immunitaire humains dans d'autres souris NSG irradiées¹⁸⁴.

Enfin, l'avancée la plus récente effectuée dans ce domaine a été effectuée par l'équipe américaine de HP Kiem¹⁸⁵. Ils ont réussi à greffer des cellules souches hématopoïétiques obtenues à partir de cellules iPSC de macaques et d'hES. Cet exploit a été rendu possible par la co-culture de ces cellules avec des cellules endothéliales surexprimant les ligands de Notch que sont jagged-1 (JAG1) et delta-like ligand-4 (DLL4) reconstituant ainsi *in vitro* une niche vasculaire. Grâce à leur protocole précédemment décrit ¹⁸⁶, les auteurs ont pu obtenir 35% de cellules CD34⁺ à partir d'hES, et 20% à partir des iPSC de macaque. Les deux ligands JAG1 et DLL4 surexprimés sur les cellules endothéliales

soutenant la culture des hES et des iPSC de macaques induisaient l'expression des cibles de Notch que sont *RUNX1* et *GATA2* dans les cellules CD34⁺. Le nombre de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ CD45⁺ ainsi formés était significativement plus élevé et la prise de greffe significativement plus importante (jusqu'à 45% de chimérisme) et prolongée dans le temps (>20 semaines) en comparaison avec les autres conditions (cellules endothéliales *wild type* ou sans cellules endothéliale).

La prise de greffe était donc favorisée par trois points : la co-injection des cellules endothéliales surexprimant JAG1 et DLL4, un pré-conditionnement des iPSC par la cytokine PGE2 afin d'activer l'expression de CXCR4 sur les cellules en voie de différenciation - favorisant le homing des cellules hématopoïétiques induites dans la moelle osseuse des souris - et par le conditionnement myélo-ablatif préalable des souris NSG receveuses. Cette découverte ouvre des perspectives intéressantes pour la greffe de moelle osseuse et la thérapie génique, les 45% de chimérisme étant largement suffisants pour obtenir un effet thérapeutique selon les auteurs. Des essais pré cliniques sur des macaques, d'où l'utilisation d'iPSC de macaques, devraient être rapidement menés¹⁸⁵.

1.3.2.4.2. Différenciation mégacaryocytaire des cellules souches hématopoïétiques obtenues à partir d'iPSC

Seules quelques équipes se sont intéressées à l'obtention de mégacaryocytes à partir de cellules hématopoïétiques issues d'iPSC : certaines ont développé différents protocoles pour obtenir ces mégacaryocytes^{177,183,187,188}. Les mêmes équipes et d'autres ont appliqué ces protocoles à l'étude de pathologies congénitales de la lignée mégacaryocytaire, avec notamment la dérivation élégante de fibroblastes de patients atteints d'amégacaryocytose congénitale pour enfin pouvoir analyser les MK de ces patients¹⁷⁶, la correction *in vitro* de la thrombasthénie de Glanzmann¹⁸⁹, ou la génération *in vitro* de grandes quantités de plaquettes à visée transfusionnelle¹⁹⁰⁻¹⁹².

Pour utiliser les plaquettes produites en thérapeutique, il était nécessaire de s'affranchir de 2 points importants : 1/ de conditions de culture utilisant des cellules stromales ou du sérum, tous deux pouvant être contaminés par des micro-organismes, et 2/ de l'incompatibilité HLA des plaquettes produites chez le receveur.

Pour le premier point, des techniques dites « feeder and serum-free » ont ainsi été développées. De cette façon, le protocole développé par l'équipe américaine de R. Lanza reproduisait *in vitro* la différenciation hématopoïétique via un progéniteur commun hémendothélial CD34⁺ CD31⁺ CD43⁺ CD105⁺ (endogline) et VECadherine⁺ permettant l'obtention rapide de MK à partir d'iPSC (en moins de 20 jours). Les iPSC étaient cultivées préalablement pendant 24 heures dans du milieu mTeSR1 avec un inhibiteur de Rock puis dans du StemSpan ACF avec du BMP4, VEGF et bFGF en condition hypoxique jusqu'à 6 jours. La morphologie des cellules évoluait d'une morphologie typique d'iPSC à une morphologie de cellules endothéliales adhérentes à J3 puis de cellules rondes flottantes de type cellules hématopoïétiques à J10. Les auteurs obtenaient ainsi jusqu'à 35% de cellules CD34⁺ à J6. A partir de J6, le milieu était changé pour du milieu STEM-diff APEL¹⁸⁰ avec de la TPO, du SCF, FLT3L, IL-3, IL-6 et de l'héparine. Les progéniteurs MK identifiés comme CD31⁺ CD34⁺ CD43⁺ CD41a⁺ CD13⁺ CD14⁻ CD42b^{+/-} étaient récoltés de J6+1 à J6+5 et réensemencés dans du milieu spécifique de différenciation contenant du STEM Span-ACF avec de la TPO, du SCF, de l'IL-6, de l'IL-9 et de l'héparine. Un inhibiteur de Rock était ajouté dans le milieu les 3 premiers jours et les plaquettes récoltées à partir de J4 dans ce nouveau milieu jusqu'à J9 (pic de production à J6). De manière intéressante, l'inhibition de c-myc par de l'iBET151 dans les progéniteurs MK issus d'iPSC facilitait la différenciation mégacaryocytaire, confirmant une observation déjà rapportée ¹⁷⁷. Les plaquettes ainsi obtenues avaient les mêmes caractéristiques morphologiques et fonctionnelles que les plaquettes humaines normales : formation d'agrégats, de lamellipodes, de filopodes après activation, circulation dans des souris déplétées pour les macrophages, et incorporation dans des thrombi.

Ainsi pour le deuxième point (compatibilité HLA), puisque cette méthode permettait d'obtenir de nombreuses plaquettes, les auteurs ont développé des iPSC délétées pour la β 2-microglobuline. Les plaquettes ainsi obtenues n'exprimaient donc pas de CMH de classe 1 ce qui les rendait moins immunogènes ¹⁹².

L'utilisation des iPSC comme moyen d'étude de la mégacaryopoïèse était alors envisageable au début de ce travail de thèse. Nous avons à disposition deux protocoles publiés dans la littérature, un sur la différenciation hématologique (Verma et al), et un sur la différenciation mégacaryocytaire (Eto et al). Ceci rendait possible la

reprogrammation de cellules mononucléées de patients suivis en médecine interne, au sein d'une équipe travaillant sur le sujet depuis plusieurs années dans l'Université de Bordeaux (l'équipe de François Moreau-Gaudry et Aurélie Bedel)¹⁹³.

2. Implication de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse

Le rôle joué par l'apoptose dans la mégacaryopoïèse normale et son implication potentielle en pathologie humaine fait toujours à l'heure actuelle l'objet d'une controverse. Après avoir rappelé le déroulement de l'apoptose normale et la place de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L dans celle-ci, nous détaillerons les principaux travaux chez la souris et chez l'homme qui se sont attelés à évaluer son implication dans la mégacaryopoïèse normale et pathologique.

2.1. Description de l'apoptose

L'apoptose, autrement appelée « mort cellulaire programmée », est un processus physiologique commun à l'ensemble des cellules eucaryotes ; il est notamment utilisé lors du développement, de la morphogénèse, du contrôle du nombre de cellules, et de l'élimination des cellules malades ou sénescents. L'apoptose se caractérise par la destruction des organelles et des protéines de structures par différentes protéases, par la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Tous ces changements entraînent une diminution de la taille de la cellule, une condensation de la chromatine, et une fragmentation nucléaire et cellulaire. En résulte le bourgeonnement de structures membranaires fermées appelées corps apoptotiques, sans relargage du contenu cytoplasmique. Ces corps apoptotiques expriment à leur surface la phosphatidylsérine, phospholipide membranaire qui, lors de l'apoptose, passe de la face intracellulaire de la membrane à la face extracellulaire. Les macrophages voisins reconnaissent les cellules exprimant la phosphatidylsérine et les phagocytent. Chez les mammifères, l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est composée de deux voies distinctes convergentes et : les voies intrinsèque et extrinsèque.

2.1.1. Voie intrinsèque de l'apoptose

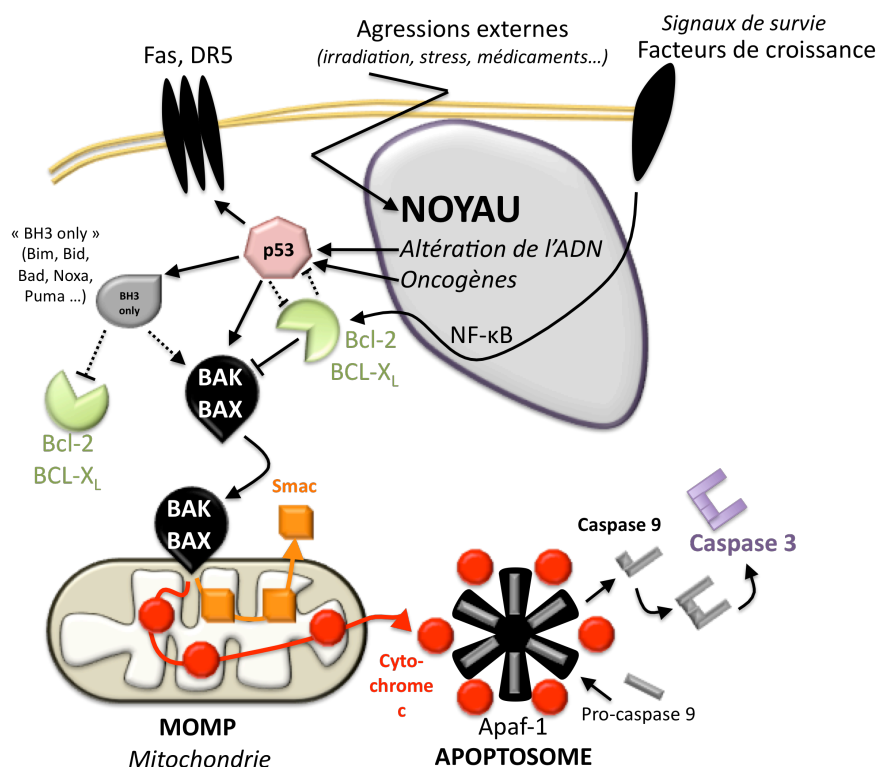


Figure 14. Voie intrinsèque de l'apoptose.

La voie intrinsèque (Figure 14) est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 qui comprend trois groupes :

- les protéines anti-apoptotiques : Bcl-2, Bcl-x_L (BCL2L1), Bcl-w, Mcl-1 et A1 ;
- les pro-apoptotiques multidomains Bak & Bax,
- et les protéines initiatrices de la mort cellulaire « BH3-only » comme Bim ou Bid.

Tout signal d'apoptose activant la voie intrinsèque, comme un dommage sur l'ADN, un défaut de mitose ou une anomalie métabolique intra-cellulaire active la protéine « gardienne du génome » p53. Cette protéine est un facteur de transcription qui régule la transcription de nombreux gènes, et, notamment dans l'apoptose, les gènes codant pour Bax, Noxa, Puma, APAF-1 et la caspase 6 (cf chap. 2.1.3). Elle est inhibée en temps normal par mdm2 qui est une E3 ubiquitine ligase provoquant son ubiquitination et sa dégradation dans le protéasome¹⁹⁴. La protéine p53 est également capable d'interagir avec les protéines BH3 directement, activant les pro-apoptotiques Bak, Bax et les

protéines BH3-only, inactivant les anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L, et Mcl-1, et activant les récepteurs de mort cellulaire (cf *chap. 2.1.2*).

En condition d'équilibre dans une cellule quiescente qui survit, Bak & Bax sont bloquées par les anti-apoptotiques qui s'hétéro-dimérisent avec elles par leur domaine BH3. Cette interaction empêche leur activation. Lorsque cette hétérodimérisation est rompue par p53, Bak & Bax sont activées et perméabilisent la membrane mitochondriale de manière irréversible. Cette perméabilisation provoque l'efflux de facteurs apoptotiques comme le cytochrome c ou la protéine Smac. Les protéines BH3-only, qui court-circuitent les anti-apoptotiques, peuvent aussi activer directement Bak et Bax. Après la perméabilisation de la membrane mitochondriale, le cytochrome c active la caspase 9 en association avec APAF-1 dans l'apoptosome. La caspase 9 activée active à son tour les caspases effectrices 3, puis 6 & 7 correspondant à la cascade des caspases dans la voie terminale commune. L'apoptose est inhibée par les protéines anti-apoptotiques, dont la synthèse peut être induite par le facteur de transcription NFκB en réponse à des signaux de survie cellulaire, comme des facteurs de croissance ou des cytokines (TPO) (Figure 14).

2.1.2. Voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose (Figure 15) est stimulée par des ligands de mort cellulaire comme TRAIL, le TNF-alpha ou le FAS-ligand. Ces ligands de mort cellulaire (*death ligands*) se lient au récepteur de mort cellulaire comme le récepteur du TNF-alpha, Fas ou DR5.

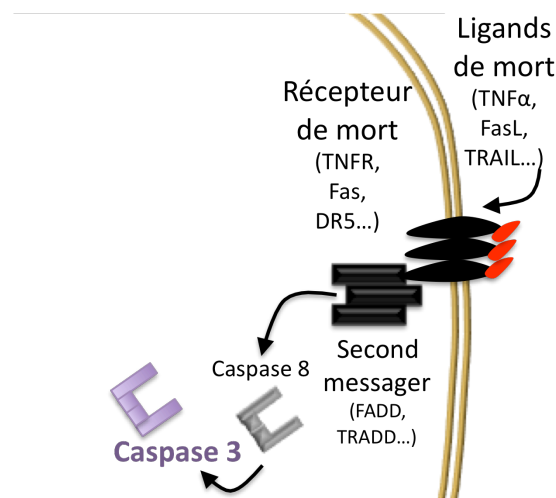


Figure 15. Voie extrinsèque de l'apoptose.

Cette liaison recrute un second messenger de mort cellulaire par l'interaction des domaines de mort (*death domains, DD*), domaines communs situés sur les deux protéines. Ce second messenger active la caspase 8 qui active à son tour la caspase 3 puis la cascade des caspases 6 et 7 jusqu'à la destruction de la cellule.

2.1.3. Voie terminale commune de l'apoptose, ou voie d'exécution

La caspase 3 est la caspase effectrice terminale de l'apoptose. Elle est activée par la caspase 9 dans la voie intrinsèque, et la caspase 8 dans la voie extrinsèque. Elle initie la « cascade des caspase », boucle d'auto-activation des caspases 3, 6 et 7 aboutissant à la compartimentation et à la mort de la cellule. Cette cascade des caspases est inhibée par les protéines IAPs (c-IAP, survivine etc.). Les IAPs sont inhibées par Smac qui quitte la mitochondrie avec le cytochrome c quand celle-ci est perméabilisée. A noter que l'activation de la voie extrinsèque conduit à l'activation de la voie intrinsèque par l'intermédiaire de la protéine BH3-only Bid qui perméabilise la mitochondrie. La figure 16 résume les deux principales voies de l'apoptose, leur inhibition par les protéines Bcl-2, Bcl-x_L et les IAPs entre autres, et leur interaction via Bid.

Les caspases détruisent une multitude de substrats ce qui aboutit au démembrement complet de la cellule sous forme de corps apoptotiques phagocytés par les macrophages¹⁹⁵. Une telle mort cellulaire, bien organisée, avec un emballage des compartiments cellulaires sous forme de corps apoptotiques n'est donc pas inflammatoire. Elle s'oppose en ce sens à la nécrose cellulaire qui n'est pas organisée, avec relargage de nombreux substrats non emballés fortement pro-inflammatoires¹⁹⁶.

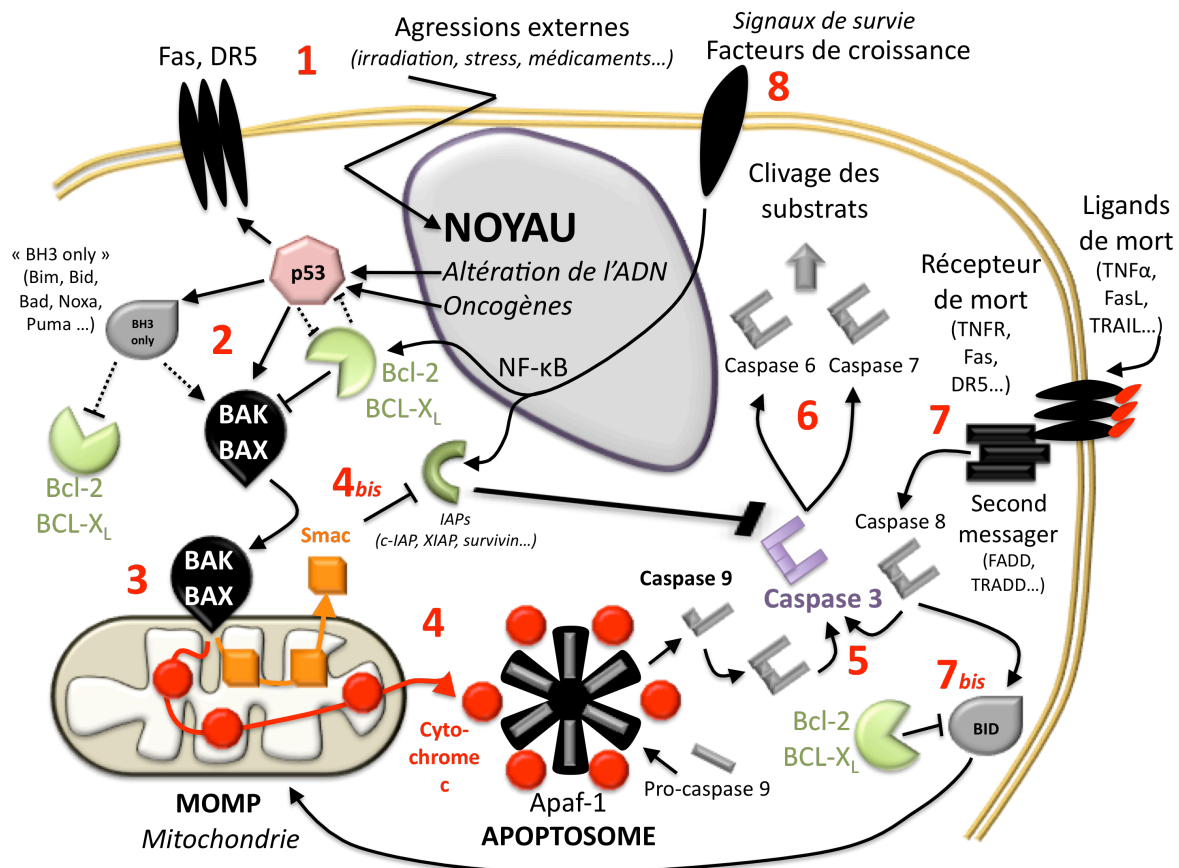


Figure 16. Schématisation des voies intrinsèque & extrinsèque de l'apoptose.

- 1- Activation du récepteur de mort cellulaire par un ligand (Fas, DR5, ...) ou agression cellulaire entraînant la synthèse de la protéine p53.
- 2- Activation de la voie intrinsèque et des protéines « BH3 only » et de BAK/BAX qui sont pro-apoptotiques.
- 3- BAK ou BAX perméabilisent la mitochondrie (*MOMP : mitochondry outer membrane permeabilisation*).
- 4- Ceci qui libère le cytochrome c qui entre dans la formation de l'apoptosome avec Apaf-1 polymérisé avec la pro-caspase 9 transformé en caspase 9 active.
- 4bis- Libération concomitante de smac qui inhibe les signaux anti-apoptotiques.
- 5- La caspase 9 active la caspase 3, caspase initiatrice de la destruction cellulaire.
- 6- Cascade d'activation des caspases et clivage des substrats (pro-caspases pour une boucle d'auto-amplification, noyau, actine, lamine, Bcl-2, protéine kinase C, XIAP, ribosomes, fodrine etc.).
- 7- Voie extrinsèque activée par des ligands de mort (TNF α , FasL, TRAIL...) et activation directe de la caspase 8 puis de la caspase 3.
- 7bis- Activation parallèle de Bid (« BH3 only protein ») qui perméabilise aussi la mitochondrie.
- 8- Inhibition de l'apoptose par les signaux de survie cellulaire comme les facteurs de croissance, activant NF κ B qui transcrit des anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-x_L ou les protéines IAPs.

2.1.4. Focus sur la protéine Bcl-x_L

Comme nous venons de le voir, Bcl-x_L (ou Bcl-2-like protein isoform 1, BCL2L1) est une protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl-2. Sa structure est très bien conservée dans la phylogénèse : elle est composée de 4 domaines BH (pour Bcl-2 Homology) et d'un domaine transmembranaire. Le repliement de la protéine permet le rapprochement des domaines BH1, BH2 et BH3, ce qui forme une poche hydrophobe dans laquelle le domaine BH3 de Bak vient s'insérer¹⁹⁷.

Bcl-x, le gène codant pour Bcl-x_L, est situé sur le bras long du chromosome 20 chez l'homme. Il est transcrit en ARN messager (ARNm) dans de nombreux tissus notamment le tissu hématopoïétique (lymphoïde et myéloïde) et le système nerveux central. Deux types d'ARNm issus de *bcl-x* ont été isolés chez l'homme, produit par épissage alternatif. Ils résultent de l'utilisation variable de deux sites d'épissages en 5' dans le premier exon du gène¹⁹⁸ :

- l'ARNm long code pour la protéine Bcl-x_L (L pour « Large ») qui présente une forte homologie avec Bcl-2 et une activité anti-apoptotique. Elle est présente dans les cellules qui ont une longue durée de vie.
- l'ARNm court code pour la protéine Bcl-x_S (S pour « Small ») qui présente une délétion de 63 acides aminés par rapport à Bcl-x_L qui lui confère une activité pro-apoptotique. Bcl-x_S est présente dans les tissus à haut renouvellement cellulaire.

Le promoteur de *Bcl-x* contient des sites GATA-1 et STAT5. Toute augmentation de la quantité de GATA-1 ou de STAT5 a donc pour conséquence une augmentation de la transcription de *Bcl-x* et donc de la quantité de Bcl-x_L, comme par le biais du récepteur de la TPO.

Bcl-x_L est une protéine anti-apoptotique importante, les souris inactivées pour *Bcl-x* (KO) meurent in utero en raison d'une apoptose neuronale et d'une anémie majeure¹⁹⁹. Bcl-x_L joue un rôle central au cours de l'hématopoïèse en inhibant l'apoptose des progéniteurs érythroïdes et out au long de la mégacaryopoïèse. Nous reviendrons en détail sur ce dernier point dans la suite de ce travail.

2.2. Controverse sur le rôle de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse murine et humaine

Le processus de formation des proplaquettes partage quelques caractéristiques avec l'apoptose, notamment la ré-organisation du cytosquelette d'actine et de microtubules, la condensation membranaire et la modification de sa morphologie au stade de MK plaquetto-gène. La figure 17 résume l'état actuel de la controverse.

Il faut de l'apoptose pour faire des plaquettes :

Chez la souris et chez l'homme

- Surexpression de Bcl2 (anti-apoptotique) *Ogilvy et al, PNAS, 1999*
- Surexpression de Bcl-xL (anti-apoptotique) *Kaluzhny et al, Blood, 2002*
- Suppression de BIM (pro-apoptotique) *Bouillet et al, Science, 1999*
- Inhibition des caspases *Clarke et al, JCB, 2003 ; De Botton et al, Blood, 2002*

PAS d'APOPTOSE

 **THROMBOPENIE**

Il faut restreindre l'apoptose pour faire des plaquettes :

Chez la souris

- Délétion ou inhibition de Bcl-xL (anti-apoptotique) *Josefsson et al, JEM, 2011*

APOPTOSE

 **THROMBOPENIE**

MÉGACARYOPOIÈSE NORMALE si :

- Délétion de BAK/BAX (pro-apoptotiques) *Josefsson et al, JEM, 2011*
- Ou délétion MK-spécifique de la caspase 8 (voie extrinsèque) *Josefsson et al, Nat Com, 2014*

Figure 17. Controverse actuelle au sujet de l'implication de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse.

Certaines équipes ont ainsi montré qu'en bloquant l'apoptose par la sur-expression des protéines anti-apoptotiques dans des modèles murins empêchait la formation des proplaquettes par le MK, tout comme sur-expression de Bcl-2 ou l'inhibition des caspases sur des mégacaryocytes en culture. Les auteurs concluaient à une implication directe mais maîtrisée de l'apoptose pour que le MK forme ses proplaquettes.

D'autres équipes ont montré qu'en supprimant Bcl-xL, les MK murins ne formaient pas non plus de proplaquettes mais que les MKs survivaient jusqu'à ce stade grâce à Mcl-1. En revanche, la délétion concomitante des pro-apoptotiques Bak/Bax, de la caspase 8 et de Bcl-2 ne perturbait pas la mégacaryopoïèse de ces souris. Les auteurs concluaient donc à une nécessaire inhibition de l'apoptose pour la survie du mégacaryocyte plaquetto-gène, et que cette inhibition passait par Bcl-xL et Mcl-1.

Nous reprenons ci-après les résultats publiés jusqu'à ce jour sur le rôle de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse.

2.2.1. Une activation contrôlée de l'apoptose est nécessaire pour la formation des proplaquettes

Le rôle actif de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse a été étudié par plusieurs équipes. Il a été montré au départ que l'apoptose était nécessaire à la destruction du noyau dans les MKs sénescents³, et qu'il existait un certain degré d'activation de l'apoptose dans les MKs les plus matures²⁰⁰. Dans les 15 dernières années, de nombreux travaux ont montré que le MK avait besoin d'une apoptose contrôlée pour former ses proplaquettes. Les souris surexprimant Bcl-2²⁰¹ ou déficientes pour Bim²⁰² étaient thrombopéniques, et de nombreux travaux ont suggéré l'importance de la voie intrinsèque de l'apoptose pour la formation des plaquettes. Une première équipe a s'être intéressée à Bcl-x_L dans la mégacaryopoïèse a utilisé des cellules CD34⁺ issues de sang de cordon cultivées en milieu liquide avec 20% de SVF ; les auteurs ont ainsi montré que la protéine était exprimée de manière graduelle au cours de la différenciation jusqu'à J15, alors que le taux de protéine Bcl-2 ne variait pas. En poussant les cultures jusqu'à J20, cette expression diminuait fortement et les auteurs décrivaient alors des « formes plaquetto-gènes de MK » avec un immunomarquage cytoplasmique positif pour Bcl-x_L. Il semblait donc possible que l'activation de l'apoptose provoque la formation des proplaquettes²⁰³. Une autre équipe a cherché à étudier Bcl-x_L. Ils ont créé un modèle de souris transgénique surexprimant Bcl-x_L sous le promoteur PF4, et donc MK spécifique. Les auteurs décrivent un nombre plus important de MK dans les souris transgéniques, sans variation de la ploïdie ni des taux de TPO, avec des variations très faibles du taux de plaquettes. L'ultrastructure des MKs était modifiée avec un SMD moins dilaté et une couronne cytoplasmique sans SMD plus large dans les MK des souris transgéniques. Enfin, les MK de ces souris cultivés *in vitro* semblaient donner moins de proplaquettes suggérant un effet inhibiteur sur la formation des proplaquettes d'un blocage de l'apoptose²⁰⁴. En partant de cette hypothèse, et de la constatation que la mégacaryopoïèse se finissait par l'extrusion du noyau du MK comme pour l'érythropoïèse, l'équipe de Najet Debili a cherché à identifier le rôle des caspases dans la mégacaryopoïèse et la formation des proplaquettes. Les pro-caspases 3 et 9 étaient clivées dans les MK plaquetto-gènes, avec une activité discrète et localisée en immunofluorescence suggérant que cette activation participait à la ré-organisation du cytosquelette. De plus, le traitement par un inhibiteur des caspases comme le z-VAD.fmk

inhibait la formation des proplaquettes, tout comme une surexpression de bcl-2²⁰⁵. Une équipe écossaise confirmait les précédents résultats en montrant que les caspases étaient activées au sein du mégacaryocyte plaquetto-gène, avec une expression circonscrite au corps de la cellule et non aux proplaquettes. En microscopie électronique, les mégacaryocytes de leurs cultures arboraient des signes d'apoptose de même que les plaquettes du surnageant. Enfin la production plaquettaire était augmentée en présence de Fas-ligand. Néanmoins, toutes les expérimentations chez ces auteurs étaient faites sur des lignées mégacaryocytaires ou des mégacaryocytes murins²⁰⁶.

Toutes ces observations semblaient renforcées par la publication en 2008 d'un cas de mutation ponctuelle du cytochrome c dans une forme de thrombopénie constitutionnelle autosomique dominante. Cette mutation conférait au cytochrome c une activité pro-apoptotique accrue. Elle provoquait, en outre, un relargage prématuré des proplaquettes dans le milieu de culture dès J6, entraînant *in vivo* une production intramédullaire des plaquettes et donc une mégacaryopoïèse inefficace²⁰⁷. Ces observations suggéraient donc un rôle productif d'une activation contrôlée de la voie intrinsèque de l'apoptose pour la formation des proplaquettes.

2.2.2. L'apoptose doit être contenue pour permettre la survie mégacaryocytaire lors de la formation des proplaquettes

Depuis les dernières années et les travaux, entre autres, de l'équipe de Benjamin Kile à Melbourne chez la souris, de nouvelles données sont venues contredire une implication directe des voies intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose dans la formation des proplaquettes. Cette équipe a montré que les plaquettes possédaient une horloge moléculaire déterminant leur durée de vie et provenant d'une probable dégradation au cours du temps de l'anti-apoptotique Bcl-x_L au profit des pro-apoptotiques Bak et Bax²⁰⁸. Tout comme les plaquettes, les mégacaryocytes possèdent bien une machinerie apoptotique fonctionnelle mais qui doit être contenue pour que le MK puisse former ses proplaquettes. En effet, en plus de Bcl-x_L, MCL1, un autre anti-apoptotique, est nécessaire dans cette ultime étape. La délétion MK-spécifique de Bcl-x_L chez la souris provoque une thrombopénie profonde, avec une diminution de la durée de vie des plaquettes mais également une formation aberrante des proplaquettes²⁰⁹. Il semblerait

que, chez la souris au moins, le MK devienne dépendant de Bcl-x_L au moment où il devient plaquetto-gène car les MK déficients pour Bcl-x_L mûrissent normalement mais sont incapables de former des proplaquettes *in vitro*. Leur ultrastructure est également altérée *in vivo* en microscopie électronique, avec une vacuolisation du cytoplasme et des lambeaux de MK relargués dans les sinusoides intramédullaires. La délétion conjointe de Bcl-x_L et de Mcl-1 se manifeste par une mégacaryopoïèse anormale responsable d'une mortalité *in utero* résultant d'hémorragies importantes. Ceci suggère un rôle complémentaire de ces 2 protéines dans la maturation du MK²¹⁰. De manière intéressante, lorsqu'on délète les anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 mais aussi les pro-apoptotiques Bak et Bax dans les MK murins, on observe une mégacaryopoïèse normale²¹¹. Mcl-1 et Bcl-x_L semblent donc agir en prévenant essentiellement l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Ainsi, plutôt que d'utiliser cette voie pour former ses proplaquettes, le MK aurait plutôt besoin de la contenir pour survivre lors de ce processus²⁰⁹. De manière complémentaire, il a été montré que l'apoptose semblait également activée dans d'authentiques pathologies comme les syndromes myélodysplasiques²¹² ou le purpura thrombopénique immunologique²¹³.

Qu'en est-il du rôle de la voie extrinsèque, et de son médiateur principal la caspase-8 (fig.19) dans la formation des proplaquettes ? Les travaux initiaux de Clarke et al ²⁰⁶ montraient que dans la lignée mégacaryocytaire MEG-01 ou dans des MKs murins la stimulation du récepteur de mort cellulaire Fas par le Fas ligand ou des anticorps agonistes de Fas (mais pas le TNF) augmentaient la production de plaquettes. Si, de manière complémentaire, on ajoutait une forme activée de la caspase-8 dans le milieu de culture, le nombre de mégacaryocytes plaquetto-gènes doublait. Ces résultats étaient reproductibles à partir de moelle osseuse humaine (culture d'un explant de tête fémorale remplacé pour une chirurgie prothétique). Les cellules médullaires produisaient plus de plaquettes quand on ajoutait des anticorps agonistes du récepteur Fas, et moins quand on ajoutait un inhibiteur large spectre des caspases comme le z-VAD.fmk. Cette observation princeps établissait la première hypothèse qu'une activation de la voie extrinsèque de l'apoptose favorisait la production plaquettaire. L'étude de TRAIL, un autre récepteur de mort cellulaire, confirmait cette hypothèse en montrant que son activation favorisait la maturation mégacaryocytaire²¹⁴. De plus, une restriction de l'apoptose dans les mégacaryocytes liée à une diminution de l'expression de TRAIL

pouvait être impliquée dans la thrombopénie observée dans le PTI ²¹⁵. Une étude récente de l'équipe de Kile vient contredire ces données par la construction d'un modèle murin dont les mégacaryocytes étaient spécifiquement délétés pour la caspase-8, l'allèle floxé étant sous contrôle du promoteur Pf4-Cre. Ils ont dans un premier temps confirmé l'existence d'une voie extrinsèque mégacaryocytaire, mais rapidement montré que les mégacaryocytes délétés pour la caspase-8 fabriquaient des plaquettes fonctionnelles et en nombre équivalent au témoin. Les MKs étaient également morphologiquement normaux avec la même maturation de même que les progéniteurs. L'analyse de la mégacaryopoïèse de stress chez ces animaux (par injection d'anticorps anti-plaquettes) se révélait également normale. De plus, le Fas ligand provoquait la mort des MKs en culture, et l'injection de Fas ligand chez des souris génétiquement modifiées pour résister à ce traitement n'augmentait pas la production plaquettaire. Enfin, les auteurs montraient que, dans des souris triplement délétées pour la caspase-8, Bak et Bax de manière spécifique dans les mégacaryocytes, ceux-ci étaient normaux morphologiquement, quantitativement et dans leur maturation. La durée de vie des plaquettes était augmentée, comme dans les souris délétées pour Bak, le régulateur majeur (négatif) de la durée de vie des plaquettes²⁰⁸. Ainsi les auteurs montraient que ni la voie intrinsèque, ni la voie extrinsèque de l'apoptose n'étaient utilisées pour former les paquettes, en tout cas dans leurs modèles murins, et sont par contre impliqués normalement dans la mort cellulaire programmée de ces cellules²¹⁶. Mais qu'en est-il chez l'homme ?

3. Le purpura thrombopénique immunologique (PTI)

Le purpura thrombopénique immunologique (PTI), ou « thrombopénie auto-immune » dans la littérature internationale, est une cytopénie auto-immune définie par un taux de plaquettes sanguines inférieur à 100 G/l lié à une destruction périphérique immunologique²¹⁷.

3.1. Epidémiologie du PTI

La prévalence du PTI est d'environ 10/100 000 habitants ²¹⁸, avec une incidence de 3 à 4 cas/100 000 habitants/an ^{219,220}. Une conférence de consensus internationale récente classe le PTI en fonction de la durée d'évolution de la thrombopénie. Ainsi, on distingue le PTI nouvellement diagnostiqué d'une durée inférieure à 3 mois, le PTI persistant (durée de 3 à 12 mois) et le PTI chronique au-delà de 12 mois d'évolution ²²¹. Le PTI touche légèrement plus le sexe féminin avec un sexe ratio de 3/2, et son incidence augmente après 40 ans chez l'homme et 50 ans chez la femme ²²⁰. Le PTI devient chronique chez 4 adultes sur 5 ce qui lui confère un profil évolutif très différent de l'enfant où l'évolution vers la chronicité ne se fait que chez 1 enfant sur 4.

3.2. Etiologie

Il n'y a pas d'étiologie clairement identifiée dans cette maladie. Deux types de PTI sont actuellement distingués : 80% sont des PTI dits « primaires » et 20% des PTI « secondaires » à d'autres pathologies²²². Brièvement, ont été décrits des PTI secondaires à certains vaccins (ROR), des infections bactériennes (comme *helicobacter pylori*) ou virale (VIH, VHC, CMV, VZV), des hémopathies comme la LLC, la maladie de Hodgkin, la prolifération LGL ou la LMMC²²³, des maladies auto-immunes (AHA1 dans le syndrome d'Evans, SAPL, LES, ALPS chez l'enfant) ou des déficits immunitaires (DICV)²²². Certains PTI secondaires sont également liés à une prise médicamenteuse²²⁴.

3.3. Démarche diagnostique

La démarche diagnostique dans cette maladie s'attachera à identifier les manifestations cliniques liées à la thrombopénie, notamment les signes de gravité (fièvre, syndrome hémorragique, déficit moteur ou des paires crâniennes etc.). Elle visera à rechercher une cause connue de thrombopénie, le PTI étant un diagnostic d'élimination. En cas de probable PTI, le reste de la démarche aura pour objectif de rechercher les causes de PTI secondaires. Si toute cette démarche diagnostique est négative, le diagnostic de PTI primaire sera retenu par défaut.

3.3.1. Manifestations cliniques et risque vital du PTI

La découverte d'une thrombopénie est souvent fortuite lors d'un bilan biologique systématique réalisé au cours d'un suivi en médecine générale, en médecine du travail ou lors d'un bilan pré-opératoire. Des manifestations hémorragiques cutanées bénignes peuvent apparaître, comme un purpura hématologique pétéchial ou ecchymotique (non infiltré, figure 18). Un syndrome hémorragique plus grave peut associer à des degrés divers des gingivorragies, une épistaxis, une hémoptysie, une hématurie, un méléna, une hématurie, ou des bulles hémorragiques intra-buccales qui précèdent le plus souvent les hémorragies les plus graves représentées par les saignements intra-crâniens (Figure 19).

Le risque principal du PTI est donc hémorragique, et ce risque hémorragique apparaît quand les plaquettes chutent en dessous de 30 G/l, seuil où un traitement est recommandé²²¹. Toutefois, certains patients ne présentent aucun saignement y compris pour un taux

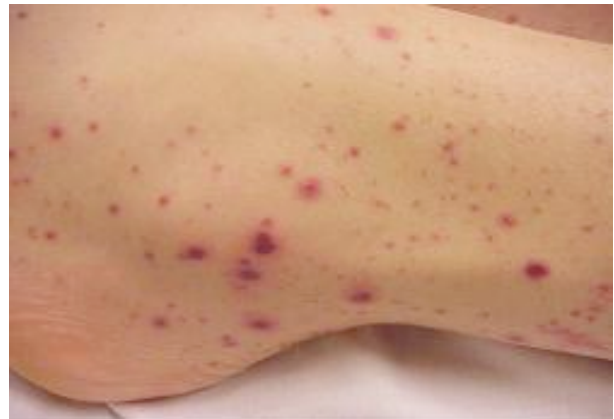


Figure 18. Purpura hématologique déclive (cheville gauche) à la phase aiguë d'un PTI



Figure 19. Hémorragie intra-parenchymateuse occipitale droite (flèche noire) et céphalhématome postérieur droit (flèche blanche) dans un contexte de PTI résistant aux premières lignes thérapeutiques.

de plaquettes très bas (<10 G/l) mais restent à risque hémorragique ; *a contrario*, d'autres patients peuvent présenter un syndrome hémorragique beaucoup plus sévère nécessitant une mise en route urgente et maximaliste du traitement. Toutefois, les manifestations hémorragiques graves engageant le pronostic vital comme les hémorragies digestives ou intra-craniennes sont rares au diagnostic (respectivement 1,1 et 0,4%) et plus fréquentes dans les âges extrêmes de la vie²¹⁹.

3.3.2. Examens complémentaires paracliniques

3.3.2.1. Hémogramme et hémostase/coagulation

Pour parler de PTI, il est nécessaire d'avoir une thrombopénie isolée sur l'hémogramme, avec un taux de plaquettes inférieur à 100 G/l, rectifié sur tube citraté si besoin en présence d'agrégats plaquettaires à l'EDTA sur le frottis sanguin. Un cas particulier est l'association avec une anémie macrocytaire régénérative qui intégrerait la thrombopénie à un syndrome d'Evans. Dans ce cas, le test de Coombs direct est positif signant l'origine auto-immune de l'anémie. Toute cytopénie leucocytaire, ou anémie macrocytaire arégénérative ou microcytaire associées doivent faire reconsidérer le diagnostic de PTI²²¹. Des tests simples de la coagulation (TP, TCA, dosage du fibrinogène) sont également réalisés afin de ne pas méconnaître une thrombopénie de consommation comme une coagulation intra-vasculaire disséminée, ou une micro-angiopathie thrombotique quand la thrombopénie est associée à une anémie hémolytique mécanique. Un test d'agrégation plaquettaire comme test d'hémostase primaire peut être réalisé en cas de syndrome hémorragique cutanéomuqueux diffus afin de rechercher une éventuelle (mais rare) thrombopathie associée.

3.3.2.2. Autres investigations pour le diagnostic différentiel, la recherche de PTI secondaire et le bilan pré-thérapeutique.

Le dosage de l'haptoglobine est indispensable pour éliminer une hémolyse en cas d'anémie normo ou macrocytaire régénérative qui pourrait s'intégrer dans le cadre d'un syndrome d'Evans ou d'une micro-angiopathie thrombotique. Le dosage des enzymes

hépatiques permet d'évoquer une hépatite virale associée en cas de cytolysé hépatique. La fonction rénale et l'ionogramme sont évalués dans le cadre du bilan pré-thérapeutique. Enfin, une ferritine basse peut révéler une anémie ferriprive en cas de microcytose qui peut dans une minorité de cas donner une thrombopénie^{225,226}.

Des causes de PTI secondaires peuvent être facilement recherchées par des sérologies, comme l'infection à *helicobacter pylori* ou au VIH, aux virus des hépatites, ou d'autres virus moins fréquents (CMV, EBV, VZV) en cas de tableau clinique évocateur.

La recherche d'anticorps anti-nucléaires, anti-antigènes nucléaires solubles (ENA) et anti-ADN natif sera importante pour éliminer une maladie auto-immune responsable d'un PTI secondaire, notamment un lupus érythémateux systémique. La recherche d'anticorps anti-phospholipides permettra l'identification d'un SAPL associé. La présence d'anomalies immunologiques sera un critère supplémentaire pour retenir une cause immunologique à la thrombopénie, tout comme la présence d'anticorps anti-plaquettes. Il faut noter que la présence de tels anticorps anti-plaquettes n'est pas spécifique du PTI et ils ne sont donc pas pathognomoniques même positifs.

Un myélogramme est souvent proposé dans la démarche diagnostique pour éliminer une thrombopénie centrale. Le groupe d'expert international recommande de sursoir à cet examen en cas de présentation typique de PTI. En cas d'âge avancé ou d'anomalie associée à l'hémogramme, le myélogramme est indiqué pour ne pas méconnaître une hémopathie²²¹. Il faut garder en tête qu'une dysmégacaryopoïèse secondaire peut être observée chez des patients présentant un PTI très ancien (Figure 20). La biopsie ostéo-médullaire en revanche n'est pas indiquée pour le diagnostic de PTI.

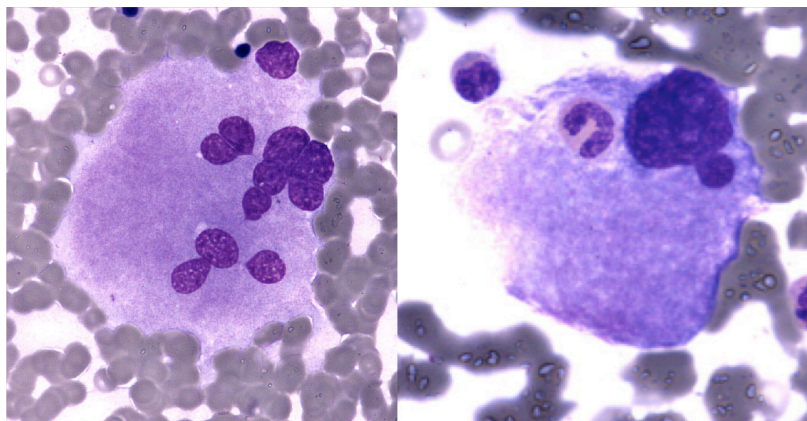


Figure 20. Mégacaryocytes dysmorphiques de 2 patientes avec un PTI évoluant depuis 30 ans.

A gauche, on note un MK très multinucléé (grossissement x10) d'une première patiente sans auto-immunité détectable, mais dont le PTI a guéri après splénectomie ; à droite un MK avec un noyau hypolobulé et une image d'empéripolèse correspondant au passage d'un polynucléaire au travers du MK (grossissement x20) d'une seconde patiente avec des Ac anti-plaquettes et qui reste actuellement thrombopénique entre 30 et 100 G/L en attendant la splénectomie.

Toujours à visée différentielle, la recherche par une échographie abdominale d'une splénomégalie isolée ou dans le cadre d'une hypertension portale infra-clinique peut se discuter à la phase diagnostique du PTI.

Enfin, le marquage des plaquettes à l'oxinate d'indium-111 ($^{111}\text{In-Ox}_3$) permet d'étudier la durée de vie des plaquettes sur une semaine, ainsi que leur potentiel lieu de séquestration en cas de thrombopénie périphérique. Cet examen est prescrit en 2^e ligne du PTI quand l'échec aux traitements de première ligne fait envisager une splénectomie. En effet, en cas de séquestration splénique pure (Figure 21), la splénectomie est efficace chez 85 à 90% des patients (cf *chap. 3.5*)²²⁷.

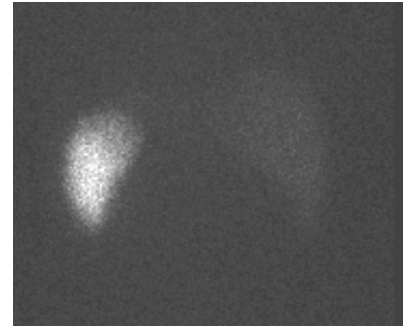


Figure 21. Séquestration splénique pure (abdomen en vue postérieure) au cours d'une scintigraphie aux plaquettes marquées.

3.4. Etat actuel des connaissances dans la physiopathologie du PTI

La physiopathologie du PTI est très complexe car c'est une maladie hétérogène²²². Quelques axes sont aujourd'hui mieux connus, et d'autres ont été caractérisés sur les dernières années : 1/ la présence d'anticorps anti-plaquettes et les mécanismes immunologiques de la destruction plaquettaire, et 2/ une altération de la mégacaryopoïèse (Figure 21).

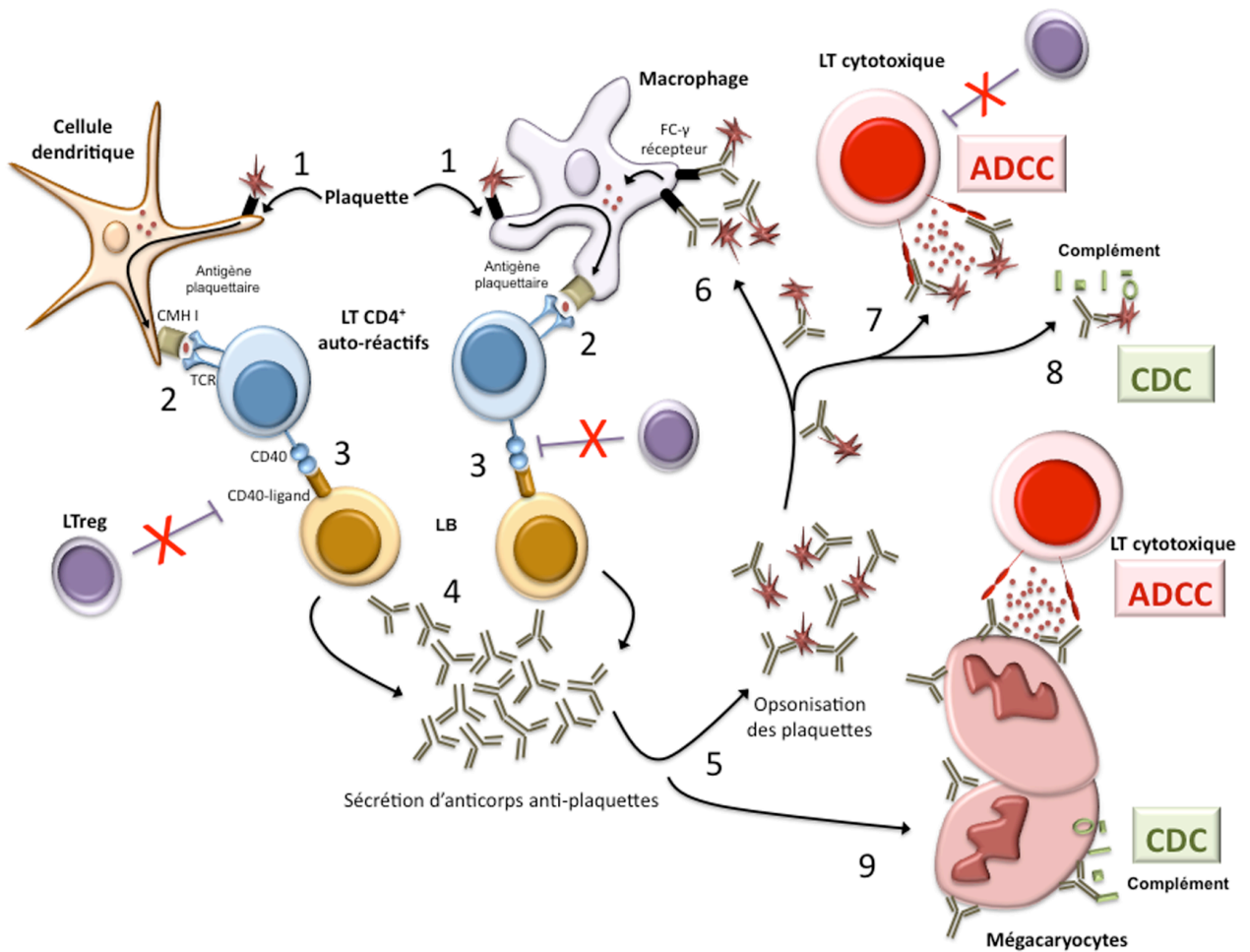


Figure 21. Résumé de la physiopathologie du PTI.

1- Les cellules dendritiques et les macrophages spléniques sont capables de présenter des auto-antigènes plaquettaires. 2- Des LT CD4 auto-réactifs spléniques reconnaissent alors ces auto-antigènes sur le CMH-I. 3- Ces LT activent les LB via l'interaction CD40/CD40-ligand, le contrôle inhibiteur de ce dialogue par les LTregs étant absent. 4- Les LB devenus auto-réactifs sécrètent des auto-anticorps anti-plaquettes. 5- Ces anticorps se lient aux plaquettes circulantes qui sont ainsi opsonisées. 6- Le fragment FC des anticorps anti-plaquettes est reconnu par les macrophages spléniques via leurs FC γ -récepteur ; ils phagocytent alors les plaquettes pour de nouveau présenter des antigènes plaquettaires dans une boucle d'auto-entretien de la réaction auto-immune. 7- Les anticorps anti-plaquettes entraînent l'activation et la dégranulation des LT cytotoxiques dans un mécanisme de cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC). 8- Le complément est également activé et détruit les plaquettes par la formation du complexe de perméabilisation membranaire dans un mécanisme de cytotoxicité médiée par le complément (CDC). 9- Les anticorps anti-plaquettes fixés aux mégacaryocytes de la moelle osseuse recrutent des LT cytotoxiques et activent le complément aboutissant à une destruction de mégacaryocytes et à une diminution de la production plaquettaire.

3.4.1. Mécanismes immunologiques de la destruction plaquettaire

3.4.1.1. De la destruction plaquettaire anticorps-dépendante à l'identification des anticorps anti-plaquettes (AAP) : implication des lymphocytes B (LB)

L'hypothèse d'une destruction plaquettaire dépendante des anticorps a émergé en 1953 lorsque William Harrington et ses collègues se sont transfusés du sérum de patients atteints de PTI et ont développé par la suite une thrombopénie profonde²²⁸. Douze ans plus tard, l'équipe de Schulman faisait le parallèle entre les anticorps anti-plaquettes connus et le « facteur thrombopéniant » décrit par Harrington²²⁹. Les tests actuels permettent une reconnaissance des anticorps dirigés contre certaines glycoprotéines plaquettaires (GPIIb-IIIa, GPIb-IX ou GPIa-IIa) chez 60% des patients, avec une spécificité de 80 à 90%²³⁰. Un test négatif n'élimine pas le diagnostic alors qu'un test positif est un argument en faveur d'un mécanisme immunologique de la destruction plaquettaire chez les patients atteints de PTI, et plus particulièrement dans les cas de PTI secondaires²³¹.

Dans les années 1974, l'équipe de McMillan a montré que la rate était le lieu de production des AAP par quelques clones lymphocytaires B (LB) autoréactifs ayant subi une mutation somatique^{232,233}. Les LB seraient donc en quelque sorte le maillon final de la dérégulation immunitaire dans le PTI, car à l'initiation de cette réponse immunitaire contre les antigènes plaquettaires se trouvent les lymphocytes T (LT). En effet, ceux-ci sont nécessaires au processus de maturation d'affinité des LB, notamment via l'interaction CD40-CD154 (CD40-ligand) au sein des centres germinatifs des organes lymphoïdes, et plus particulièrement dans la rate²³⁴. Les plaquettes sont donc opsonisées par les AAP, puis phagocytées et détruites dans la rate par les macrophages du système réticulo-endothélial via leurs Fcγ-récepteurs, l'activité de phagocytose médiée par les Fcγ-récepteurs étant de surcroît augmentée dans le PTI²³⁵. D'autres études montrent le rôle supplémentaire du complément dans la lyse des plaquettes^{236,237}. Par ailleurs, les AAP peuvent exceptionnellement altérer la fonction plaquettaire et donner une thrombopathie associée à la thrombopénie accentuant le syndrome hémorragique²³⁸. Enfin, plus récemment a été décrit un impact des AAP sur la mégacaryopoïèse quand on cultive des mégacaryocytes normaux avec ces anticorps, les

mégacaryocytes étant alors moins nombreux en culture et moins polyploïdes ²³⁹, donc moins plaquetto-gènes ⁹.

Les LB interviennent également dans la physiopathologie du PTI par d'autres mécanismes : leur activité présentatrice d'antigène ou leur capacité de production de cytokines. Ainsi, les LB pourraient être impliqués dans la présentation d'antigènes plaquettaires aux lymphocytes T auto-réactifs, comme les glycoprotéines GPIIb/IIIa, GPIb/IX, et GPIa/IIa. Certains clones B comme les LBe1 pourraient participer à l'entretien de la réponse auto-immune par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires contrôlant la réponse Th1 comme l'IL-2 ou l'IFN- γ ²⁴⁰. Par ailleurs, le taux plasmatique de BAFF (B-cell Activating Factor) est élevé dans le PTI, provoquant une amplification du contingent B de même qu'une modification des sous-populations lymphocytaires B ²⁴¹. Parmi les LB, une petite population a d'ailleurs récemment été décrite : les LB régulateurs (ou Bregs), de phénotype CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. L'activité régulatrice des Bregs passerait par l'interaction CD40/CD40-ligand ²⁴² et par leur capacité de sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF- β ²⁴³. Une étude récente dans le PTI montre que le compartiment des Bregs est défectueux, les Bregs étant moins nombreux chez les patients non splénectomisés, avec un taux circulant d'IL-10 plus faible. De plus, les Bregs inhibent moins les macrophages activés par le TNF- α chez les patients très thrombopéniques (<50 G/l). Enfin, les auteurs retrouvaient un taux de Bregs augmentés chez les patients non splénectomisés qui répondaient aux agonistes du récepteur à la TPO ²⁴⁴.

3.4.1.2. Mécanismes immunologiques contrôlant la destruction plaquettaire : implication des lymphocytes T (LT)

Le PTI semble avoir un profil cytokinique plutôt de type Th1 (T helper 1) ²⁴⁰, plusieurs études ayant suggéré un déséquilibre des populations lymphocytaires T CD4⁺ Th1 et Th2. L'augmentation de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'interféron- γ (IFN- γ) témoigne d'une réponse Th1 prédominante, au détriment de la réponse Th2, avec diminution des IL-4, 5 et 10.

3.4.1.2.1. Rôle central des LT CD4⁺ spléniques

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle central dans le PTI. En effet, le répertoire T des patients atteints de PTI présente un profil oligoclonal à la différence des sujets sains

dont le répertoire est polyclonal ²⁴⁵. Ces anomalies montrent qu'il existe au cours du PTI une réponse cellulaire T spécifique restreinte à quelques antigènes et ces clones T CD4⁺ auto-réactifs prédominent dans la rate ²⁴⁶. Il a été découvert dans le sang circulant des patients PTI une petite population de LT CD4⁺ helper qui stimule la sécrétion d'anticorps anti-GPIIbIIIa (la GPIIbIIIa est une intégrine présente à la surface des plaquettes) par les LB, et que ces anticorps étaient capables de se fixer sur des plaquettes normales. De plus, la production de ces anticorps par les LB ne pouvait pas se faire en l'absence des LT CD4⁺ auto-réactifs spécifiquement dirigés contre la GPIIb-IIIa ²⁴⁶. En comparant les clones auto-réactifs T CD4⁺ et B spécifiques de la GPIIb-IIIa dans le sang circulant et la rate, il a été montré que même si le nombre de clones semblait quantitativement identique entre le sang circulant et la rate, la stimulation lymphocytaire des clones T CD4⁺ auto-réactifs par la GPIIb-IIIa et la capacité des clones B auto-réactifs à fabriquer des Ac anti-GPIIb-IIIa étaient significativement plus fortes dans la rate que dans le sang périphérique. Par ailleurs, les cellules sécrétrices des Ac anti-GPIIb-IIIa (CD19⁺/surfaceIg⁺/CD38⁺/CD138⁺) n'étaient retrouvées que dans la rate ²⁴⁷. Enfin, il est important de souligner que le nombre de clones B et T auto-réactifs diminue drastiquement dans le sang circulant de patients ayant répondu à la splénectomie alors qu'il ne change pas chez les patients non répondeurs à la splénectomie ²⁴⁷. Ces données indiquent que l'interaction entre les clones B et T spécifiques de la GPIIb-IIIa conduisant à la sécrétion des AAP a lieu dans la rate et qu'un nombre significatif de ces clones activés dans la rate sont libérés dans le sang circulant sous forme de cellules mémoires²⁴⁷.

3.4.1.2.2. Rôle des LT cytotoxiques dans la destruction plaquettaire

Chez 50 à 60% des patients atteints de PTI, les anticorps anti-plaquettes ne sont pas détectés, et dans le travail initial d'Harrington *et al*, certains sérums de patients atteints de PTI ne provoquaient pas de thrombopénie chez le receveur ²²⁸. Ce constat a amené certaines équipes à suggérer l'existence d'autres mécanismes à l'origine de la destruction plaquettaire. En 2003, l'équipe de B. Olsson a été la première à démontrer *in vitro* l'existence directe d'une lyse des plaquettes par des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, mais sur un faible nombre de patients ²⁴⁸. En 2006, l'existence de ce

mécanisme de cytotoxicité médiée par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques a été confirmé par la détection des enzymes perforine et granzyme dans ces cellules stimulées par les plaquettes autologues de patients atteints d'un PTI chronique ²⁴⁹. En 2010, Chow et al, établissent les premières expériences *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficiente (SCID). Ces souris SCID CD61⁺, dont les plaquettes expriment l'antigène plaquettaire CD61, deviennent thrombopéniques et meurent d'hémorragies lorsqu'on leur transfuse des splénocytes provenant de souris KO pour le CD61 et immunisées contre ce CD61. La thrombopénie ne survient pas si on transfuse des splénocytes dépourvus de LB CD19⁺ et/ou de LT CD8⁺ avec un rôle central organisationnel des LTh CD4⁺. L'administration d'immunoglobulines polyvalentes corrigeait le taux de plaquettes par abolition de la destruction plaquettaire anticorps médiée mais pas la réponse cellulaire cytotoxique des LT CD8⁺. Il semble donc y avoir co-existence de 2 mécanismes de destruction plaquettaire dans le PTI : par les AAP et par les LT CD8⁺ cytotoxiques ²⁵⁰.

3.4.1.2.3. Rupture de tolérance périphérique : rôle des LT régulateurs (Treg)

La présence de LT auto-réactifs reconnaissant le complexe antigénique plaquettaire GPIIb/IIIa chez des sujets sains ²⁵¹ mais également chez les sujets atteints de PTI ²⁴⁶ laisse supposer une rupture de la tolérance périphérique au cours du PTI. Dans ce dernier cas, la rupture de tolérance pourrait être liée à un défaut quantitatif et/ou qualitatif en Treg. Les Treg constituent une sous population lymphocytaire T CD4⁺ d'origine thymique exprimant de façon constitutive et intense le CD25, chaîne α du récepteur de l'IL-2, et le facteur de transcription Foxp3 ²⁵². Ils expriment très peu le CD127, récepteur de l'IL-7, ce qui permet de les distinguer des LT effecteurs activés ²⁵³. Les Treg sont donc définis par le phénotype CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺CD127^{Low}. Après activation, ils acquièrent leurs fonctions inhibitrices qu'ils exercent de façon non spécifique de l'antigène ²⁵⁴ et dépendante du contact intercellulaire ²⁵⁵. Les résultats concernant les anomalies quantitatives et qualitatives des Treg au cours du PTI sont encore discordants. Pour certains auteurs, il existe une diminution du nombre de Treg circulants chez les patients PTI, comparativement aux sujets sains ²⁵⁶⁻²⁵⁹, tandis que pour d'autres les taux sont identiques ²⁶⁰. L'activité des Treg peut être évaluée en

étudiant leur capacité à inhiber la prolifération de LT effecteurs co-cultivés en leur présence, et un déficit fonctionnel des Treg semble exister dans le PTI ^{256,258,259}. Des résultats similaires sont observés en utilisant des Treg spléniques de patients atteints de PTI ²⁵⁹. Chez les malades présentant une élévation de leur taux de plaquettes, le nombre de Treg augmente après splénectomie ²⁵⁹ ou un traitement par rituximab ²⁵⁸.

3.4.2. Altération de la mégacaryopoïèse dans le PTI

La destruction périphérique des plaquettes a longtemps été considérée comme le seul mécanisme physiopathologique du PTI. On sait maintenant qu'un défaut de production plaquettaire par la moelle osseuse est aussi en cause et constitue le rationnel physiopathologique pour expliquer l'efficacité des agonistes du récepteur à la TPO.

3.4.2.1. Dérégulation de la TPO par une expansion intramédullaire du compartiment mégacaryocytaire

Paradoxalement, sur les myélogrammes de patients atteints de PTI, le nombre de mégacaryocytes n'est pas aussi augmenté qu'attendu. Ceci s'explique notamment par un taux de TPO circulante anormalement bas au vue de la thrombopénie ²⁶¹, en comparaison aux autres situations de thrombopénie centrale ^{117,262}. Cette observation peut s'expliquer par le mode principal de régulation de la TPO, à savoir que sa fixation sur les plaquettes et les mégacaryocytes contribue à la diminution de son taux plasmatique. Ainsi dans le PTI, puisque les plaquettes sont basses, le taux « anormalement normal » de TPO serait dû à sa captation par le pool mégacaryocytaire en expansion en réaction à la thrombopénie périphérique ^{105,263}. De plus, le turn-over plaquettaire, c'est-à-dire l'équilibre entre production et destruction plaquettaire, établi à partir de marquages radioactifs des plaquettes par le ⁵¹Cr puis le ¹¹¹In, était paradoxalement normal voire réduit dans le PTI ²⁶⁴⁻²⁶⁶.

3.4.2.2. Altération de la mégacaryopoïèse par les anticorps anti-plaquettes et les LT cytotoxiques

Les anticorps anti-plaquettes de patients atteints de PTI inhibent la croissance et la prolifération *in vitro* des mégacaryocytes de sujets sains : ils reconnaissent des épitopes exprimés sur les mégacaryocytes et ces derniers seraient détruits *in vivo* par activation du complément (par CDC ou *Complement Dependant Cytotoxicity*) ou par cytotoxicité dépendante des anticorps (par ADCC ou *Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*).

Ceci a bien été décrit par plusieurs équipes dont celle de McMillan en 2004^{239,267}. Partant du constat que les glycoprotéines plaquettaires étaient la cible des anticorps anti-plaquettes et que ces protéines étaient également exprimées à la surface des MK, ils ont émis l'hypothèse que les anticorps anti-plaquettes pouvaient altérer la mégacaryopoïèse. En différenciant *in vitro* des cellules humaines CD34⁺ périphériques obtenues par plasmaphérèse en MK, ils ont montré que le plasma de patients atteints d'un PTI réfractaire à la splénectomie (contenant des anticorps anti-GPIIb/IIIa ou anti-GPIb/IX) diminuait le nombre de MK produits à partir des CD34 (12 plasmas sur 18, avec une diminution de la formation de MK entre 26 et 90%). Les plasmas 1 à 5 qui réduisaient le plus la formation des MK provoquaient également une baisse significative du nombre de MK polyploïdes (4n, 8n et 16n). Ces effets étaient annulés quand les anticorps anti-GPIIb/IIIa étaient adsorbés, ou avec les plasmas témoins ne contenant que des IgG contrôles. Trois mécanismes à l'origine de ces observations étaient discutés par les auteurs de ce travail. Tout d'abord, la population cellulaire obtenue après plasmaphérèse n'était enrichie que de 30 à 35% de cellules CD34⁺ et contenait donc de nombreux monocytes/macrophages. Ces cellules pouvaient alors être activées par les anticorps anti-plaquettes contenus dans la culture et détruire les MK cibles sur lesquels ces anticorps étaient fixés. Deuxièmement, une activation du complément était possible dans la culture après ajout de plasma. Enfin, une induction de l'apoptose par les anticorps anti-plaquettes était possible, ce qui corroborait les observations en ME de MK de patients atteints de PTI d'allure apoptotiques ou para-apoptotique²¹³.

Le recrutement médullaire des LT, qui est plus important chez les patients PTI que chez les sujets contrôles, s'expliquerait par la surexpression de molécules d'adressage comme VLA-4 et CX3CR1²⁶⁸. Les LB par la production d'anticorps anti-plaquettes et les LT par

leur cytotoxicité contribueraient donc à un défaut de production et une destruction médullaire, et pas seulement périphérique, des plaquettes ou des mégacaryocytes.

3.5. Traitements du PTI

L'objectif des traitements est de restaurer un taux de plaquettes supérieur à 30 G/l pour limiter le risque hémorragique qui augmente avec l'âge²⁶⁹, plutôt que de normaliser complètement le taux de plaquettes²⁷⁰.

3.5.1. Traitements « immunologiques » du PTI

3.5.1.1. Première ligne : corticoïdes et/ou immunoglobulines

La corticothérapie est le traitement de première ligne du PTI, efficace dans 80% des cas pour remonter les plaquettes dans les premiers jours, elle n'entraîne que peu de guérison, le taux de rechute étant de 75% après son interruption²⁷¹. Elle peut être administrée en bolus (15 mg/kg) initiaux, ou directement par voie orale à la dose de 1 mg/kg et décroissance rapide sur 3 semaines, mais avec une efficacité semblant inférieure aux bolus²⁷². Une alternative à la corticothérapie en première ligne est représentée par les immunoglobulines polyvalentes (IgIV), notamment dans les cas liés à des infections potentielles. Ce traitement est habituellement efficace à la posologie d'1 g/kg en une perfusion pouvant être répétée une seconde fois, mais cette efficacité est souvent transitoire et son coût est élevé. Les corticoïdes (en cas de cortico-sensibilité) et les IgIV sont utiles soit pour remonter rapidement le taux de plaquettes au diagnostic, surtout en présence d'hémorragies sévères, soit avant un geste invasif ou une chirurgie comme la splénectomie.

3.5.1.2. Deuxième ligne : splénectomie et/ou rituximab

Un consensus concernant le traitement de 2^e ligne du PTI n'est toujours pas établi dans le PTI²⁷³. Néanmoins, le seul traitement curatif à ce jour est la splénectomie qui guérit environ 2/3 des patients²⁷⁴ et reste actuellement le « gold standard ». Ce geste n'est pas

anodin et présente un risque de complications infectieuses et thrombotiques plus élevé que dans la population générale, mais semblant moindre chez les patients atteints de PTI comparé à d'autres maladies hématologiques (thalassémies, drépanocytose, syndromes myéloprolifératifs notamment)²⁷⁵. Quand le taux de plaquettes est supérieur à 30 G/l ou que le patient ne montre aucun signe hémorragique, il est recommandé de différer la splénectomie après 12 mois d'évolution, c'est-à-dire quand le PTI entre en phase « chronique », et une fois passée la possibilité d'une rémission spontanée (environ 30% des cas)²⁷⁰.

Depuis plus de 5 ans, le rituximab est envisagé en 2^e ligne de traitement dans une stratégie d'évitement de la splénectomie et de ses complications infectieuses ou thrombotiques²⁷⁶, et hors AMM. Un protocole temporaire d'utilisation est néanmoins en cours dans le PTI. Le rituximab est efficace dans 50 à 60 % des cas de PTI^{277,278}, avec une réponse prolongée à 1 an dans 38 % des cas²⁷⁸ et à 5 ans dans 21 % des cas²⁷⁹. La problématique principale de ce traitement est liée à son important effet immunosuppresseur en relation avec la disparition des clones lymphocytaires B. Son coût est également élevé. Ses effets secondaires sont dominés par une immunosuppression transitoire d'environ 6 mois, et la mise à jour préalable du calendrier vaccinal s'applique comme pour la splénectomie. Dans la 2^e ligne du traitement du PTI, le rituximab pose problème en cas d'absence de remontée du taux de plaquettes. En effet, une splénectomie est alors indiquée dans ce cas de figure, et celle-ci intervient alors que la reconstitution du système immunitaire n'a pas encore eu lieu. Ceci a pour conséquence une moins bonne réponse vaccinale et donc un risque majoré de complications infectieuses chez ces patients²⁸⁰. Il a également été décrit quelques cas de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) sous ce traitement²⁸¹. Pour toutes ces raisons, le rituximab est placé en 2^e ligne en cas d'échec de la splénectomie dans le consensus international²²¹. Le rituximab n'a pas fait l'objet d'études contrôlées de phase III si bien qu'on manque encore de recul pour affirmer son rôle potentiellement curatif et préciser sa place exacte dans la stratégie thérapeutique^{278,282,283}.

D'autres traitements ont été prescrits en 2^e ligne, comme la vincristine, la dapsonne, l'hydroxychloroquine, l'azathioprine, la ciclosporine, le cyclophosphamide, le mycophénolate-mofétil ou le danazol, avec une efficacité variable dans les premiers jours ou les premières semaines, sans preuve objectivée par des essais cliniques bien

menés, et sans qu'aucun ne soit curatif. De plus chaque molécule a des effets secondaires propres parfois sévères qui doivent être pris en compte initialement par le clinicien²²¹.

3.5.2. Traitement par les agonistes du récepteur de la TPO

Depuis plusieurs années sont disponibles sur le marché des agonistes du récepteur de la TPO qui permettent de restaurer au moins partiellement la production plaquettaire altérée dans le PTI. Bien que ces molécules soient capables d'activer le récepteur de la TPO, elles n'ont aucune homologie de séquence avec la TPO endogène évitant ainsi le développement d'anticorps neutralisants comme cela avait été le cas lors des premiers essais cliniques avec la TPO recombinante.

3.5.2.1. Molécules actuellement sur le marché

Il existe à l'heure actuelle deux médicaments sur le marché : le romiplostim (Nplate®, laboratoire Amgen) et l'eltrombopag (Revolade®, laboratoire GSK). Le romiplostim est un peptibody, union d'un fragment FC d'immunoglobuline lui permettant une plus longue demi-vie plasmatique et d'un peptide dimérisé capable d'activer le récepteur mégacaryocytaire Mpl en agissant sur sa partie extra-membranaire. L'administration se fait par voie sous-cutanée de façon hebdomadaire à la dose de 1 à 10 µg/kg. L'eltrombopag s'administre par voie orale en une prise quotidienne de 50 ou de 75 mg et agit sur la partie transmembranaire de Mpl. L'activation de la cascade de signalisation intracellulaire se fait de la même façon que pour la TPO endogène. Ces 2 médicaments sont indiqués en 2^e ou 3^e ligne de traitement, selon que les patients ont une contre-indication à la splénectomie (2^e ligne) ou sont en échec de celle-ci (3^e ligne).

3.5.2.2. Efficacité des agonistes du récepteur de la TPO

Dans les nombreux essais cliniques de phase III ayant permis l'AMM de ces molécules, une réponse (plaquettes > 50 G/l) était obtenue chez 70% des patients recevant 50 mg d'eltrombopag par jour⁵⁹ et chez 80% des patients splénectomisés ou non recevant

entre 2 et 3 µg/kg de romiplostim par jour⁵⁸. L'effet n'était que suspensif car une fois le traitement interrompu les patients retrouvaient un taux de plaquettes proche de celui avant traitement, sans aggravation de la thrombopénie toutefois chez 9 patients sur 10²⁸⁴. Dans 10% des cas, la thrombopénie s'aggravait à l'arrêt du traitement et le risque hémorragique augmentait dans les 4 semaines qui suivaient cet arrêt^{58,285}. De manière intéressante, 7 patients sous romiplostim (27%) ont conservé un taux de plaquettes supérieur à leur taux de base dans les 3 mois suivant l'arrêt du traitement⁵⁸.

3.5.2.3. Tolérance des agonistes du récepteur de la TPO

Le profil de tolérance était satisfaisant chez les patients, les effets secondaires décrits dans les essais cliniques étaient des céphalées, nausées, vomissements, asthénie, diarrhée, douleurs articulaires et des rhinopharyngites. Sur le plan biologique, l'eltrombopag était responsable d'une élévation des transaminases > 3N chez 11% des patients, et d'une élévation de la phosphatase alcaline et de la bilirubine totale à 1,6 fois la normale²⁸⁶. En conséquence, des recommandations ont été émises par le fabricant préconisant l'arrêt du traitement en cas de persistance de la cytolyse hépatique 4 semaines ou plus, avec élévation de la bilirubine directe ou en cas de symptômes d'insuffisance hépato-cellulaire.

3.5.2.4. Effets secondaires à long terme de ces molécules

Trois préoccupations concernant les effets secondaires à long terme de ces traitements sont aujourd'hui toujours d'actualité : la fibrose médullaire induite, les conséquences d'une sur-stimulation chronique du compartiment mégacaryocytaire et le risque thrombotique.

La fibrose médullaire, qui était augmentée dans les premiers essais^{287,288}, a fait l'objet d'un suivi étroit pendant plusieurs années chez 66 patients : 1 patient sur 5 avait une fibrose médullaire grade 2/3, notamment après 2 ans de traitement par agonistes du récepteur de la TPO et réversible à son l'arrêt. Les auteurs recommandaient donc une biopsie ostéomédullaire annuelle voire semestrielle pour interrompre le traitement en cas d'apparition d'une myélofibrose grade 2/3²⁸⁹. La question de la répercussion

clinique et hématologique de l'induction de ce type de myélofibrose persiste et nécessitera un suivi sur du plus long terme.

La sur-stimulation chronique de la moelle reste une préoccupation majeure sous de tels traitements, car on peut craindre l'émergence de pathologies clonales. Les données de la littérature sont encore trop limitées et on manque actuellement de recul pour mieux caractériser ce risque. Dans l'étude récente de Ghanima et collègues, aucune anomalie caryotypique n'a été retrouvée chez les 66 patients, mais la durée de suivi n'était probablement pas suffisamment longue pour pouvoir observer de telles pathologies (médiane : 2,4 ans, de 0,8 à 8,3 ans)²⁸⁹.

Le risque thrombotique quant à lui a été surveillé dans les études d'extension des essais cliniques princeps, lors du suivi à plus long terme, avec 25 évènements thrombotiques artériels ou veineux décrits chez 17 patients parmi les 291 recevant du romiplostim^{287,290} et 21 évènements chez 16 patients parmi les 299 patients recevant de l'eltrombopag²⁸⁶. La fréquence de ces évènements n'augmentait pas avec la durée de traitement. La majorité des évènements observés étaient survenus chez des patients ayant au moins un facteur de risque thrombotique²⁹¹.

3.5.2.5. Mode d'action des agonistes du récepteur de la TPO dans le PTI

Comment ces molécules augmentent-elles le taux de plaquettes ? Trois explications sont possibles.

La plus simple est de dire que l'augmentation de la masse mégacaryocytaire induite par les TPO mimétiques suffit à contrebalancer la destruction des plaquettes chez les patients répondeurs, et probablement insuffisamment chez les non répondeurs. Ceci a été montré initialement chez l'homme avec un analogue recombinant de la TPO (PEG-rHuMGDF)²⁹² injecté chez des volontaires sains. Cet analogue permettait une augmentation du pool mégacaryocytaire de $37,4 \pm 18,5 \times 10^{10}$ fL/kg à $62 \pm 17 \times 10^{10}$ fL/kg et de l'augmentation du volume et de la ploïdie mégacaryocytaire²⁹³.

La seconde provient de l'observation au cours des essais cliniques de ces molécules que, à l'exception de certains patients, l'arrêt de la molécule provoquait le plus souvent une nouvelle baisse en moins d'une semaine du taux de plaquettes ; ce traitement est ainsi

toujours considéré comme suspensif. Ceci suggère que la durée de vie des plaquettes reste basse⁵⁸.

Enfin, une explication plus fine provient des observations de l'équipe d'Harker pour qui la correction de la thrombopénie serait due à une inhibition de l'apoptose. Cette équipe s'était intéressée aux thrombopénies induites par le VIH chez 8 patients, dont 6 ont reçu la première TPO humanisée (PEG-rHuMGDF) à 5 µg/kg tous les 15 jours pendant 16 semaines, avec un taux de plaquettes multiplié par 10 dans les 14 premiers jours. Chez ces patients la masse mégacaryocytaire, calculée selon Harker et al², avant traitement était de $69 \pm 37 \cdot 10^{10}$ fL/kg (N=31 $\pm 5 \cdot 10^{10}$ fL/kg) et demeurait constante à $76 \pm 45 \cdot 10^{10}$ fL/kg sous traitement. Devant la faible variation de la masse mégacaryocytaire par rapport à la franche élévation du taux de plaquettes, une durée de vie des plaquettes identiques, la présence constante d'anticorps anti-plaquettes et d'une charge virale constante, les auteurs concluaient à la possibilité d'une action par inhibition de l'apoptose des progéniteurs mégacaryocytaires tardifs (et pas des MK eux-mêmes car le délai avant réponse à cette TPO humanisée était de 5 à 7 jours). Ce mode d'action corrobore également l'observation faite par Houwerzijl et al concernant l'aspect apoptotique ou para-apoptotique des MK de moelle de patients atteints d'un PTI²¹³.

Nous avons rappelé les trois principaux axes fondamentaux sur lesquels vont se baser nos recherches : la mégacaryopoïèse, le rôle de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse et le PTI.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Au sein de la cohorte de malades thrombopéniques que nous suivons dans notre service de médecine interne, nous avons observé qu'une certaine catégorie de patients étaient suivis au long cours pour une thrombopénie acquise, chronique, oscillant entre 30 et 100 G/L et sans traitement requis. Ces patients étaient identifiés comme ayant un « PTI primaire chronique » devant l'absence d'autres étiologies habituellement retrouvées devant une thrombopénie chronique. Nous avons émis l'hypothèse d'une atteinte médullaire primitive chez ces patients. En effet, ils ne présentaient aucun stigmate d'auto-immunité car :

- ils n'avaient pas d'anticorps anti-plaquettes détectables,
- leur bilan auto-immun était strictement négatif: anticorps antinucléaires négatifs, anti ADN natif négatifs, ANCA négatifs, anti-CCP négatifs, SAPL négatif, pas de cryoglobulinémie, complément normal etc.
- ils n'avaient jamais eu besoin d'un traitement spécifique immunologique (corticoïdes, IGIV, rituximab, splénectomie etc.) de leur PTI.

En reproduisant *in vitro* la mégacaryopoïèse de 9 de ces malades à partir de leurs propres cellules CD34⁺, nous avons montré que leurs mégacaryocytes présentaient intrinsèquement une altération de la formation des proplaquettes.

Par ailleurs, il a été montré chez la souris, au cours de travaux précédents réalisés en post-doc par le Dr Chloé James, que les mégacaryocytes délétés spécifiquement pour Bcl-x_L dans la lignée mégacaryocytaire présentaient une maturation normale mais une altération isolée de la formation des proplaquettes, et donc un phénotype identique à celui observé chez nos patients.

Nous avons donc d'abord voulu investiguer le rôle physiologique de la protéine Bcl-x_L dans la mégacaryopoïèse humaine normale, ce qui n'a encore jamais été fait, observer le

phénotype mégacaryocytaire obtenu et la vérification de cette hypothèse Bcl-x_L chez nos patients, et évaluer l'implication de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse humaine.

Nous avons ensuite voulu savoir si une mutation/délétion génomique dans les progéniteurs myéloïdes ou la cellule souche hématopoïétique aboutissant à une potentielle absence ou non fonctionnalité de la protéine Bcl-x_L pouvait expliquer le phénotype observé chez nos patients. Dans le même but, nous avons recherché des modifications d'expression de Bcl-x_L dans leurs plaquettes tant en ARN qu'en protéines.

Nous avons parallèlement essayé de créer une lignée de mégacaryocytes à partir d'iPSC de 2 de ces patients pour obtenir une source pérenne de mégacaryocytes nous permettant ainsi de tester nos hypothèses mécanistiques et d'éventuelles hypothèses futures.

RESULTATS

Nous présenterons ci-après les résultats obtenus au cours de la thèse sous forme d'articles :

Article 1 : *Altération intrinsèque de la mégacaryopoïèse chez certains patients atteints d'un PTI persistant ou chronique*, publié en août 2015 dans le British Journal of Hæmatology.

Article 2 : *Bcl-x_L est nécessaire pour la survie du mégacaryocyte humain au cours de la maturation mégacaryocytaire et la formation des proplaquettes*, soumission envisagée sous la forme d'un article original dans Blood.

Article 3 : *Implication de Bcl-x_L dans le PTI chronique*, soumission sous forme d'un Brief Report envisagée dans Blood.

1. Article 1 : Altération intrinsèque de la mégacaryopoïèse chez certains patients atteints d'un PTI persistant ou chronique

British Journal of Haematology, 2015

Nous avons identifié au cours de ce travail certains patients atteints d'un PTI persistant ou chronique qui présentaient des caractéristiques particulières :

- une thrombopénie acquise oscillant entre 30 et 100 G/L,
- stable dans le temps,
- d'évolution chronique avant que le diagnostic de PTI ne soit posé,
- n'ayant jamais reçu de traitement spécifique de leur PTI,
- sans stigmatisme d'auto-immunité

Nous avons montré que les MKs de ces patients maturaient normalement dans les phases précoces de la mégacaryopoïèse, mais ne parvenaient pas à former correctement leurs proplaquettes, et ce sans augmentation de la mortalité par rapport aux témoins ou à des patients atteints d'un PTI nouvellement diagnostiqué.

Cette altération était bien intrinsèque, acquise dans une probable cellule souche hématopoïétique, car la différenciation mégacaryocytaire se faisait à partir de cellules CD34⁺ issues du prélèvement médullaire diagnostique ; la différenciation *in vitro* était donc conduite intégralement en-dehors du micro-environnement médullaire du patient ou de son système immunitaire.

Cette observation nouvelle ouvre donc la voie à la caractérisation de profils particuliers de patients chez qui un diagnostic d'élimination de PTI chronique a été retenu.

Intrinsically impaired platelet production in some patients with persistent or chronic immune thrombocytopenia

Étienne Rivière,^{1,2,3} Jean-François Viillard,^{1,2,3} Alexandre Guy,^{1,2,3} Badr Kilani,^{2,3} Juliana Vieira-Dias,^{2,3} Anne C. Pons,⁴ Thierry Couffinhal,^{2,3} Jean-Luc Pellegrin¹ and Chloé James^{2,3,4}

¹Internal Medicine Department, Bordeaux University Hospital Centre, ²Adaptation Cardiovasculaire à l'Ischémie, University of Bordeaux, ³Adaptation Cardiovasculaire à l'Ischémie, INSERM, and ⁴Laboratory of Haematology, Bordeaux University Hospital Centre, Pessac, France

Received 19 November 2014; accepted for publication 9 March 2015

Correspondence: Chloé James, INSERM U1034, Haut-Leveque Hospital, Bordeaux University Hospital Centre, 1, avenue Magellan, Pessac 33600, France.
E-mail: chloe.james@inserm.fr

Primary immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disorder characterized by a platelet count $<100 \times 10^9/l$ in the absence of another aetiology (Rodeghiero *et al*, 2009). Several disease-evolution and treatment-response differences exist among ITP patients. Some patients have acute-ITP (A-ITP) with sudden onset and profound thrombocytopenia ($<30 \times 10^9/l$), which is restored with steroids and/or intravenous immunoglobulins, while others, refractory to that first-line therapy, have persistent or chronic ITP (P/C-ITP) because thrombocytopenia persists beyond 3 months (Rodeghiero *et al*, 2009). Some of them still have low platelet counts, despite second-line treatments (e.g., splenectomy, rituximab, hydroxychloroquine, dapsone), and finally respond to a thrombopoietin-receptor agonist (THPO-RA). Others respond to a second THPO-RA and some do not respond at all. Lastly, some patients have platelet counts of $30\text{--}100 \times 10^9/l$ at diagnosis that remain stable over time and never require any treatment.

In light of the variety of P/C-ITP clinical presentations, evolution profiles and therapeutic responses, it has been proposed that P/C-ITP is a heterogeneous and multifaceted disease, and might be a syndrome of several disorders culminating in thrombocytopenias (Cuker & Cines, 2010).

Summary

Persistent or chronic immune thrombocytopenias (P/C-ITP) are acquired blood disorders lasting more than 3 months or 1 year, respectively. The pathogenesis of these disorders is thought to be immunological. We hypothesized that some patients with P/C-ITP might have an intrinsic megakaryopoiesis defect. We identified a group of P/C-ITP patients with acquired isolated mild thrombocytopenia ($30\text{--}100 \times 10^9/l$), undetectable anti-platelet antibodies, negative autoimmune investigations and no need for treatment. We examined *in vitro* megakaryocyte differentiation and compared these patients' results with those of acute-ITP patients and healthy controls. No difference in proliferation, ploidy or expression of surface markers was found. In contrast, P/C-ITP patients had significantly fewer proplatelet-forming megakaryocytes. This novel observation demonstrated that some patients diagnosed with P/C-ITP have an intrinsic megakaryopoiesis defect independent of the bone-marrow environment. Further investigations are needed to dissect mechanisms underlying this impaired proplatelet formation in these patients.

Keywords: thrombocytopenia, immune thrombocytopenia, platelet, megakaryocyte, megakaryopoiesis.

We focused on anti-platelet antibody-negative ITP patients with acquired, isolated, chronic, mild thrombocytopenia not requiring treatment, and hypothesized that they defined a patient subset for whom the pathogenesis of their acquired thrombocytopenia might be different.

It is commonly accepted that the cornerstone of ITP pathogenesis is anti-platelet antibodies that bind to mature platelets, leading to their elimination by macrophages through Fc-mediated recognition mechanisms, mainly in the spleen and/or liver (He *et al*, 1995). These antibodies can also bind to megakaryocytes (MKs), thereby impairing platelet production, by blocking proliferation of MK precursors and/or decreasing MK ploidy, yielding fewer proplatelets (Chang *et al*, 2003; McMillan *et al*, 2004; Lev *et al*, 2014). The good efficacy of THPO-RAs in chronic ITP refractory to previous therapies (Nurden *et al*, 2009) suggests a pivotal role of abnormal megakaryopoiesis in this disorder (Bromberg, 2006). However, anti-platelet antibodies are found in only $\leq 50\%$ of ITP patients (McMillan *et al*, 2003). We hypothesized that patients whose ITP was characterized as acquired, isolated, chronic, mild thrombocytopenia, anti-platelet antibody-negative and not requiring treatment define a

subset of ITP patients that have an intrinsic megakaryopoiesis defect rather than an immune-mediated disorder.

Methods

Patients

All patients met the diagnosis criteria for ITP according to the international consensus (Provan *et al*, 2010). All had undergone bone-marrow aspiration at diagnosis to exclude any haematological malignancy; the remaining bone-marrow samples were used for analyses. Controls were male or female healthy bone-marrow donors or patients with normal blood counts undergoing cardiovascular surgery for valve replacement. Control experiments were run concomitantly with patients' samples as often as possible. The relevant institutional review boards or ethics committees approved our research, and all patients and controls gave written informed consent.

In vitro generation of MKs

Immunomagnetic CD34⁺ cells were selected with the EasySep[®] kit (STEMCELL, Grenoble, France) according to the manufacturer's protocol. CD34⁺ cells were seeded in liquid, serum-free medium, as previously described (De Botton *et al*, 2002), with 100 ng/ml of thrombopoietin (THPO; STEMCELL). MK-progenitor proliferation was assessed with the following coefficient: [(% of CD41⁺ MKs × number of cells counted on culture day 6 or 10)/total number of CD34⁺ cells seeded on day 0].

Flow cytometry

Expression of MK-surface glycoproteins (GPs) was assessed with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD41a (HIP8 clone, BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) and phycoerythrin (PE)-coupled anti-CD42a (ALMA16 clone, BD Pharmingen) double-labelling. Ploidy was analysed as previously described (Kruse *et al*, 2009), with mean ploidy calculated according to the following formula: [(% of 2n CD41⁺ MKs × 2) + (% of 4n CD41⁺ MKs × 4) + (8n × 8) + (16n × 16) + (32n × 32) + [64n × 64)]/100. Sample counts were acquired on a Cytomix FC500 (Beckman Coulter, Villepinte, France) flow cytometer and analysed with CYTOMIX software (Beckman Coulter).

Proplatelet formation

On Day 8, MKs were enriched on an albumin density gradient, as previously described (Drachman *et al*, 1997), and seeded onto 96-well plates in serum-free medium with THPO. At the same time every day for 5 days, proplatelet-forming and non-proplatelet-forming MKs were counted with a Zeiss Primovert[®] inverted microscope (10×) (Zeiss, Oberkochen, Germany). On day 12, mature MKs were deposited overnight on polylysine-coated slides and immuno-

labelled with anti-CD41-FITC antibody and nucleus-staining 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The slides were examined with an Olympus FX100 confocal microscope (Olympus Europa, Hamburg, Germany).

Anti-platelet-antibody assay

Anti-platelet antibodies were detected using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (Lifecodes PakAuto, GTI, Brookfield, WI, USA).

Electronic microscopy

MK morphology was studied with standard electron microscopy on culture day 10. MKs were fixed in 1.25% glutaraldehyde (Fluka, Buchs, Switzerland) in 0.1-M phosphate buffer (pH 7.2) for 1 h at room temperature. Samples were washed and post-fixed in 4% osmic acid containing potassium ferrocyanide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 h at room temperature. Post-fixation, the samples were dehydrated using graded alcohols and propylene oxide, and then embedded in Epon (Taab Laboratories, Reading, UK). Sections (75 nm thick) of embedded samples were prepared with an Ultracut E ultramicrotome (Reichert, Vienna, Austria), and stained with uranyl acetate and lead citrate (Merck, Darmstadt, Germany).

Statistical analyses

Statistical analyses were computed with unpaired, 2-tailed, Student *t*-tests or non-parametric Kruskal–Wallis tests using PRISM[®] software v5 (Graphpad, San Diego, CA, USA). *P* < 0.5 defined significance.

Results

Patient characteristics

Patients with progressive acquired and isolated mild thrombocytopenia lasting more than 3 months were referred to our Internal Medicine Department by general practitioners for aetiological investigations. Among this group of patients, we identified nine with acquired, mild thrombocytopenia who met international consensus criteria for persistent/chronic ITP (Provan *et al*, 2010) and for whom immunological investigations (plasmatic proteins electrophoresis, antinuclear antibodies, anti-extractable nuclear antigens antibodies, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, rheumatoid factor, anti-citrullinated protein antibodies, anti-phospholipid antibodies, anti-thyroid antibodies, complement) remained normal: their platelet counts were previously normal, and, after their general practitioner diagnosed thrombocytopenia, it oscillated between 30 and 100 × 10⁹/l and remained stable for 3 months to 10 years before admission to our department. Negative biological investigations excluded secondary causes of thrombocytopenia. Bone-marrow aspiration at diagnosis eliminated any

haematological malignancy, especially myelodysplasia. All patients underwent normal abdominal ultrasonography, assuring the absence of splenomegaly and, thus, hypersplenism. None had initial A-ITP with platelets $<30 \times 10^9/l$ that subsequently became persistent or chronic. No anti-platelet antibodies were detected in these patients and autoimmune investigations were negative. They required no specific treatment and their platelet counts remained stable during the 15–42 months of follow-up. Their medical histories are detailed in Table I. For comparison, four patients with A-ITP at diagnosis and platelet counts $<30 \times 10^9/l$, and nine healthy controls were also enrolled. Characteristics of ITP patients and controls are summarized in Table II.

Selected P/C-ITP patients had normal MK-precursors proliferation and normal GPIIb/IIIa–GPIbIX expression compared to controls

To precisely describe the megakaryopoiesis of P/C-ITP and A-ITP patients and controls, we designed our *in vitro* studies based on normal megakaryopoiesis. We analysed MK-precursor

proliferation and MK membrane. CD34⁺ cells were selected from bone-marrow aspirates at diagnosis, and seeded in liquid cultures with THPO. First, we investigated MK-progenitor proliferation by counting CD41⁺ cells on days 6 and 10 of culture. Mean proliferation coefficients calculated for P/C-ITP patients and controls, respectively, did not differ significantly: 0.8 and 1.05 on day 6 ($P = 0.42$) and 1.58 and 1.97 on day 10 ($P = 0.66$) (Fig 1A). Our examination of MK differentiation continued with flow-cytometric analyses of surface GPIIb/IIIa (CD41a) and GPIIX (CD42a) expressions on days 6 and 10. Mean percentages of P/C-ITP patients' and controls' CD41a⁺/CD42a⁺ MKs, respectively, were comparable: 35.9% and 35.1% on day 6 ($P = 0.95$), and 55% and 59.8% on day 10 ($P = 0.68$) (Fig 1B, C). Thus, there was no difference in proliferation and main GP expression in the MKs of our selected P/C-ITP patients.

Selected P/C-ITP patients had normal endomitosis compared to controls

MK is a singular type of cell in the way that it can become polyploid by increasing its nuclear material in a mitotic

Table I. Medical histories of nine patients with P/C-ITP and 4 with A-ITP.

Patient	Age at diagnosis (years)	Sex	Medical history	Initial platelet count ($\times 10^9/l$)	Post-diagnosis follow-up (months)	Last known platelet count ($\times 10^9/l$)	Bone-marrow examination	Anti-platelet antibodies (PakAuto)
P/C-ITP1	53	F	Gonarthrosis	76	42	88	Normal	Negative
P/C-ITP2	59	F	None	90	41	68	Normal	Negative
P/C-ITP3	79	F	Bilateral knee prostheses, appendicitis, hypertension, vertigos	39	40	72	Normal	Negative
P/C-ITP4	23	F	Untreated bipolar disorder	91	40	93	Normal	Negative
P/C-ITP5	52	M	Type 2 diabetes under dietary control alone; hepatitis B cured 10 years before ITP diagnosis; depression	88	38	94	Normal	Negative
P/C-ITP6	70	M	None	90	34	96	Normal	Negative
P/C-ITP7	66	M	Hepatic steatosis without fibrosis, arterial hypertension, hyperuricemia, dyslipidemia, unexplored moderate chronic renal insufficiency	96	27	97	Normal	Negative
P/C-ITP8	59	F	Hysterectomy and ovariectomy (myomas), maxillary cyst	78	18	98	Normal	Negative
P/C-ITP9	49	M	Hypertension, obesity, hepatic steatosis without fibrosis	99	15	100	Normal	Negative
A-ITP1	26	F	None	34	NA	NA	Normal	Negative
A-ITP2	76	M	Stent for acute coronary syndrome in 1996, COPD with tobacco abuse, alcoholic cirrhosis and ongoing treated <i>Helicobacter pylori</i> bulbar ulcer	16	NA	NA	Normal	Positive
A-ITP3	51	M	None	22	NA	NA	Normal	Positive
A-ITP4	32	F	None	1	NA	NA	Normal	Negative

P/C-ITP, persistent or chronic immune thrombocytopenia; A-ITP, acute immune thrombocytopenia; F, female; M, male; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; NA, not applicable.

Table II. Characteristics of patients with P/C- or A-ITP and controls.

Characteristic	P/C-ITP	A-ITP	Controls
Patients (n)	9	4	9
Age, years; mean (range)	56 (24–79)	46 (26–76)	49 (37–65)
Sex (female/male)	6/3	2/2	3/6
Platelet count at diagnosis, $\times 10^9/l$; mean (range)	76 (31–97)	17 (1–28)	246 (158–373)
Thrombocytopenia duration (months)			
3 to 12	3	NA	NA
≥ 12	6	NA	NA
Mean	17	NA	NA
Range	7–120	NA	NA
Anti-platelet antibodies			
Positive	0	2	NA
Negative	9	2	NA
Megakaryocytes in bone marrow			
Very numerous	3	3	0
Numerous	5	1	9
Quite numerous	1	0	0
Poor	0	0	0

P/C-ITP, persistent or chronic immune thrombocytopenia; A-ITP, acute immune thrombocytopenia; NA, not applicable.

process without nuclear or cytoplasmic division. This phase, called endomitosis, usually happens before demarcation membrane system (DMS) development and proplatelet formation. It begins in early megakaryoblasts and ends in stage II megakaryocytes approximately after 8–10 days in liquid culture. To explore MKs' endomitotic phase, MKs were harvested on culture day 9 or 10 and analysed by flow cytometry. Again, MK-ploidy distribution, expressed as a percentage of respective polyploid MKs, for P/C-ITP patients and controls, respectively, were comparable: 48.3% and 38.9% of 2n ($P = 0.28$); 26.1% and 28% of 4n ($P = 0.68$); 17% and 22.2% of 8n ($P = 0.31$); 7.3% and 6.9% of 16n ($P = 0.83$); and 2% and 1.3% of 32n ($P = 0.22$). Their respective mean ploidy values were 5.2n

and 5.14n ($P = 0.94$) (Fig 2). Taken together, these results indicate that this subpopulation of P/C-ITP patients showed no difference in MK precursor proliferation, GPIIbIIIa and GPIbIX membrane expression and polyploidization when compared to controls.

Selected P/C-ITP patients had intrinsically impaired proplatelet formation

The final step of MK maturation is proplatelet release after the endomitosis process has increased MK ability to produce proplatelets by increasing its cellular machinery and gene expression (Raslova *et al*, 2003). Progressively, along with the endomitotic process, the MK synthesizes platelet granules and glycoproteins, and creates the DMS that will gradually fill the whole MK's cytoplasm and give birth to proplatelets (Italiano & Shivdasani, 2003). To assess the ability of P/C-ITP patients' mature MKs to generate proplatelets, MKs were enriched on an albumin density gradient on culture day 8, and the number of proplatelet-forming and non-proplatelet-forming MKs were counted under a phase-contrast microscope every 24 h from days 9 to 13. We compared the percentages of proplatelets forming MK in P/C-ITP patients, controls and A-ITP subjects, and found respectively, 12% vs 53% ($P = 0.046$) or 39% ($P = 0.03$) on day 11, 11% vs 54% ($P = 0.024$) or 46% ($P = 0.0002$) on day 12, and 10% vs 55% ($P = 0.015$) or 46% ($P = 0.03$) on day 13 (Fig 3A). These differences between P/C-ITP patients and control MKs were not explained by viability, which was comparable for both groups (Fig 3B).

Quantitatively, we observed less proplatelet-forming MKs in our population of P/C-ITP patients. We wanted to know if these MKs had an abnormal morphology. Thus, we investigated whether P/C-ITP patients' MKs adhering to polylysine could form proplatelets and whether their morphology was different from control ones. We noted that P/C-ITP patients had very few proplatelet-forming-MKs, and the rare ones found were mostly abnormal, with fewer proplatelets per MK and fewer bifurcations per proplatelet, compared to controls (Fig 4).

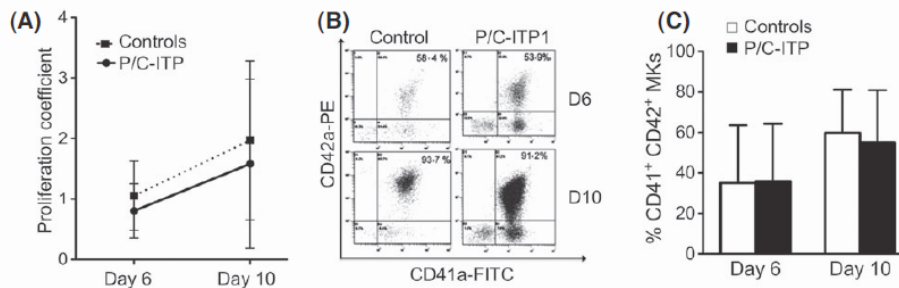


Fig 1. Proliferation and membrane expression of GPIIbIIIa and GPIbIX in P/C-ITP patients. (A) MK-proliferation profiles of P/C-ITP patients (black) and controls (white) expressed as mean proliferation coefficients. (B) MK maturation assessed by GPIIbIIIa (CD41a) and GPIbIX (CD42a) surface expression. Representative flow-cytometry results after CD41a-FITC and CD42a-PE labelling on culture days 6 and 10 of MKs from P/C-ITP Patient 5 (P/C-ITP1) and 1 healthy control. (C) Mean percentages of CD41⁺CD42⁺ MKs from P/C-ITP patients and controls compared on culture days 6 and 10. P/C-ITP, persistent or chronic immune thrombocytopenia; MK, megakaryocyte; GP, glycoprotein.

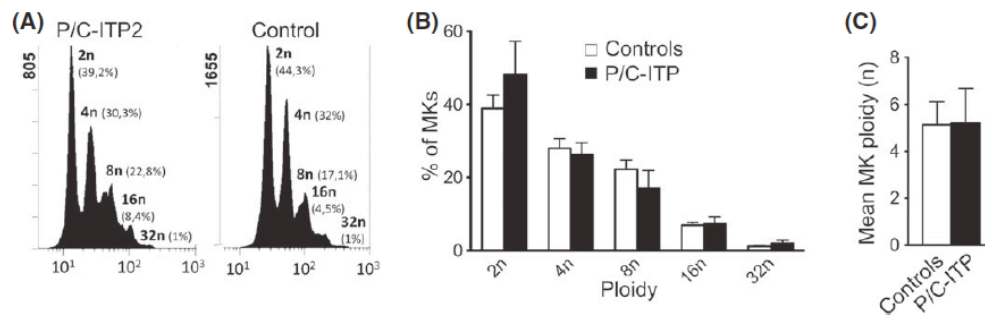


Fig 2. Megakaryocyte-ploidy profiles in P/C-ITP patients. (A) MK-ploidy profiles for P/C-ITP Patient three (P/C-ITP2) and one healthy control, representative of all patients and controls. Ploidy was analysed by flow cytometry of MKs after CD41a-FITC labelling and propidium iodide-staining. (B) Mean percentages of 2n, 4n, 8n, 16n and 32n MK polyploids from P/C-ITP patients and controls did not differ significantly. (C) Mean MK ploidy for patients and controls. All data are expressed as mean (SEM). P/C-ITP, persistent or chronic immune thrombocytopenia; MK, megakaryocyte.

Finally, to confirm this defective terminal stage of megakaryopoiesis using another method, the ultrastructure of MKs from three controls and three P/C-ITP patients on culture day 10 were examined under standard electronic microscopy (Fig 5). Control MKs (Fig 5A) had a polylobulated nucleus and a well-delimited DMS (Fig 5B), whereas abnormal MKs from P/C-ITP patients (Fig 5C) had apoptotic surface blebbing and a disorganized DMS (Fig 5D). This latter image was reminiscent of MK morphology obtained after DAPI- and CD41a-immunofluorescence labelling (Fig 4, upper right). In summary, the 9 P/C-ITP patients identified in our study were not different in terms of MK precursor proliferation and maturation, analysed by the expression of GPIIb/IIIa

and GPIbIX membrane expression and polyploidization. Those patients rather had an intrinsic, i.e., independent of the bone-marrow environment or auto-immuneprocesses, quantitative and qualitative defect in late-differentiation proplatelet formation.

Discussion

This study focused on a specific subpopulation of P/C-ITP patients with acquired, progressive, mild thrombocytopenia that was stable over time, whose platelet counts oscillated between 30 and 100 × 10⁹/l. These patients had no history of A-ITP and no anti-platelet antibodies were detected. All

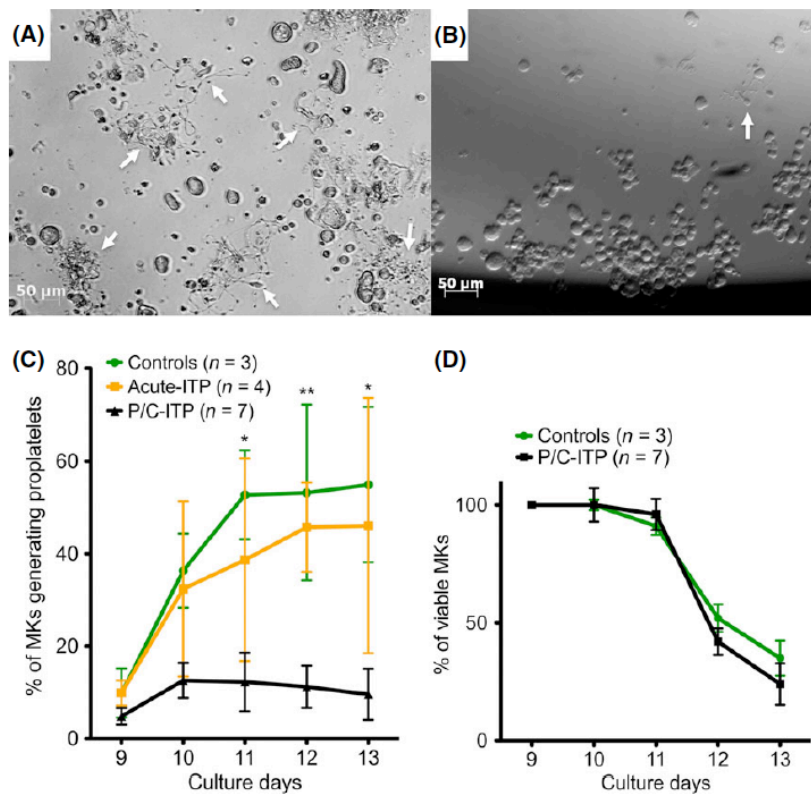


Fig 3. Impaired proplatelet formation in P/C-ITP patients. (A) Normal proplatelet formation at culture day 13 with numerous and large MKs generating proplatelets (arrows, Nikon phase-contrast optical microscope, × 10). (B) Abnormal proplatelet formation at culture day 13 from P/C-ITP Patient one, with only one small MK generating proplatelets (arrow, Nikon phase-contrast optical microscope, × 10). (C) Analysis of proplatelet release expressed as the ratio of proplatelet-forming MKs/total number of MKs per well in a 96-well plate after albumin-gradient enrichment to synchronize large, dense, mature MKs on culture day 8. (D) Curves of the percentages of viable MKs derived from P/C-ITP patients and controls on culture days 10, 11, 12 and 13 vs. day 9. All data are mean (SEM). **P* < 0.05, ***P* < 0.01. P/C-ITP, persistent or chronic immune thrombocytopenia; MK, megakaryocyte.

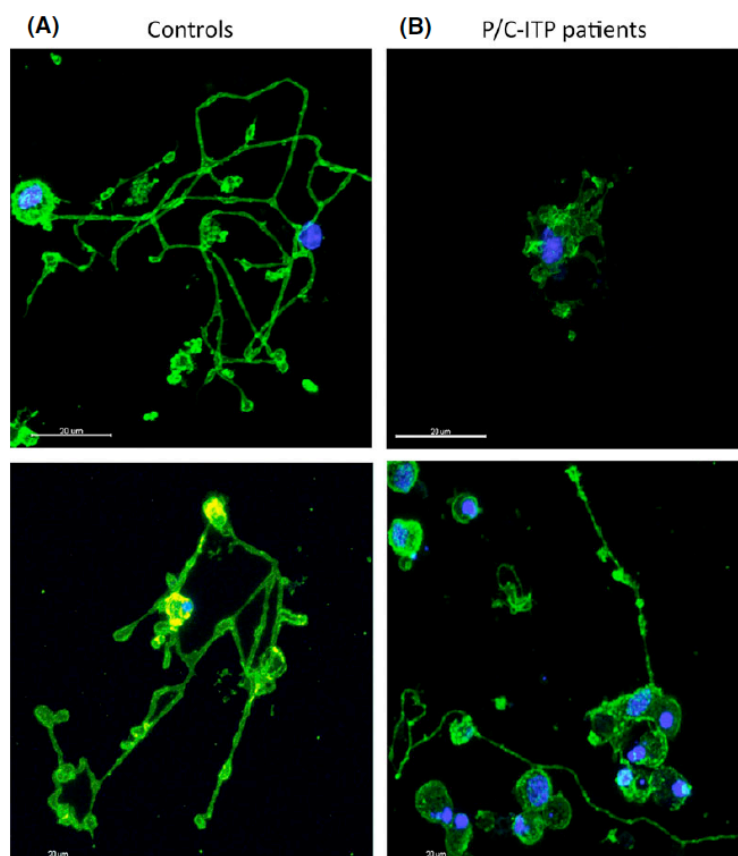


Fig 4. P/C-ITP patients' abnormal morphology on confocal microscopy. Proplatelet formation in controls (A) and P/C-ITP patients (B). After overnight adherence on polylysine-coated slides, DAPI and CD41-FITC double-labelled MKs from two controls (left, normal) and P/C-ITP Patients one and five (right). The latter showed no or fewer proplatelets per MK and less bifurcation per proplatelet [$\times 60$, Olympus FX100 confocal microscope; deconvolution and 3D-reconstruction on Imaris[®] (BITPLANE software, Zurich, Switzerland), bars 20 μ m]. P/C-ITP, persistent or chronic immune thrombocytopenia; MK, megakaryocyte.

patients had normal bone-marrow examinations that excluded myelodysplasia, and previously normal platelet counts that were not compatible with constitutional thrombocytopenia. Hence, their platelet counts were closely monitored 2-4 times a year to ensure no drop below the $30 \times 10^9/l$ threshold, for which specific treatment is required (Provan *et al*, 2010). Of note, none of these patients had received ITP-directed therapy challenge because they had never suffered haemorrhagic symptoms and their platelet count had never fallen below $30 \times 10^9/l$. A platelet rise in response to such treatment is a strong argument for ITP, but it is important to keep in mind that non-response to ITP-directed therapies does not rule out this diagnosis. Because classical diagnostic work-ups for thrombocytopenia yielded no obvious diagnosis, these patients were diagnosed with P/C-ITP.

ITP is a multifaceted disease (Cines *et al*, 2009) and all causes explaining acquired, chronic thrombocytopenias remain unknown. We hypothesized that this defined P/C-ITP-patient subset might have intrinsically impaired megakaryopoiesis, rather than an immune-mediated disorder. By examining these patients' megakaryopoiesis in comparison to A-ITP patients, we identified an intrinsic defect in proplatelet formation. As the MKs were analysed after differentiation of CD34⁺ cells in liquid culture, we avoided the effects of plasma factors or bone-marrow components on megakaryopoiesis.

McMillan *et al*, (2004) previously described a megakaryopoiesis defect in C-ITP patients with anti-platelet antibodies, but the mechanism was different from that identified herein. They showed that, the addition of anti-platelet antibodies to normal MKs in liquid culture resulted in impaired MK proliferation and abnormal ploidy distribution, thereby highlighting a role of these antibodies not only in destroying their target, but also hampering their production. Moreover, a recent study by another team (Lev *et al*, 2014) completed those observations by revealing defective proplatelet formation induced by anti-platelet antibodies. Using a model of normal, *in vitro* megakaryopoiesis from cord-blood cells, those authors showed that ITP plasmas containing anti-platelet antibodies impeded normal proplatelet formation (Lev *et al*, 2014).

In our study, no anti-GPIIb/IIIa, -GPIb/IX or -GPIa/IIa platelet antibodies were detected in patients' sera. Our reference centre for the southwest of France has a cohort of 280 confirmed ITP patients. Among them, 75 (27%) have positive anti-platelet antibodies whereas 113 (40%) do not, and 92 (33%) were not screened for these antibodies because anti-platelet antibodies are not routinely used to diagnose ITP (Rodeghiero *et al*, 2009). According to the literature (Davoren *et al*, 2005), around 60% of the ITP patients followed in our centre do not have any detectable anti-platelet antibodies. Two interpretations are possible: either they can-

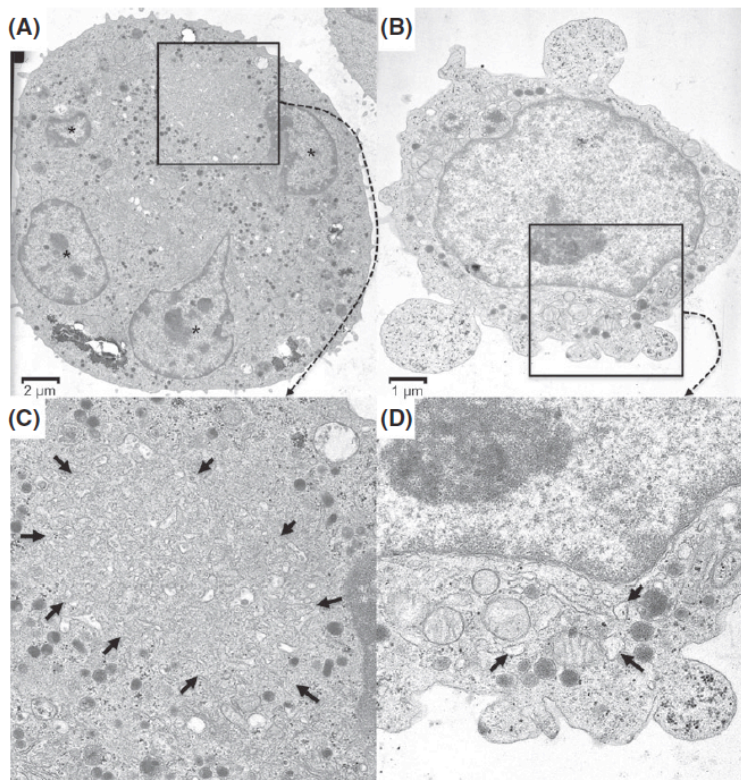


Fig 5. P/C-ITP patients' abnormal MK ultrastructure and demarcation membrane system (DMS) on electronic microscopy. Normal MK (A) from a control with a polylobulated nucleus (*) and well-delimited DMS (original magnification $\times 3000$), better visualized in (B) at higher magnification ($\times 15\,000$). (C) Abnormal MK from P/C-ITP Patient 6, representative of the other patients, with apparent apoptotic blebbing and disorganized DMS (arrows, original magnification $\times 6000$), better visualized in (D) at higher magnification ($\times 15\,000$), similar to the MK shown in Fig 2C, top right corner. P/C-ITP, persistent or chronic immune thrombocytopenia; MK, megakaryocyte.

not be technically detected but are indeed present, or anti-platelet antibodies are really absent. Some could argue that the proplatelet-formation defect observed herein was due to the presence of undetected residual anti-platelet antibodies in patients' sera. We do not think that this explanation is plausible, mainly because, after selecting our CD34⁺ cells for culture, they were subjected to numerous washes to ensure elimination of most antibodies or other P/C-ITP patients' plasma components. Indeed, some antibodies might still have been bound to their antigen or been endocytosed by a few CD34⁺/CD41⁺ cells in our initial subset. To test this hypothesis, we performed one culture of normal MKs from a healthy bone marrow donor with the sera of a control and PC-ITP Patients 2 and 5. We did not see any difference in either the CD41/CD42 expression at culture days 6 and 9, or in proplatelet formation or cell viability (data not shown). This result is in favour of an intrinsic megakaryopoiesis impairment rather than an antibody-induced impairment. The strength of our study is that we did not use enriched MKs that could possibly have endocytosed antibodies, but CD34⁺ cells further differentiated to MKs. Thus, our experimental strategy excluded any involvement of an immune process, raising a novel observation that some P/C-ITP patients with undetectable anti-platelet antibodies have an intrinsic megakaryopoiesis defect.

Our results are a step forward in dissecting the aetiological heterogeneity of chronic thrombocytopenias. Acquired chronic thrombocytopenias include heterogeneous disorders and when aetiological investigations remain negative, a diag-

nosis of P/C-ITP is made for lack of another alternative. We postulate that some patients now diagnosed as having P/C-ITP, indeed have a haematological disorder that is the consequence of an acquired mutation in a still unknown target gene. We have retrospectively looked for clonality in this subpopulation of patients, as the main differential diagnosis is myelodysplasia. First, no patient had macroscopic myelodysplasia on bone marrow smears. Second, we could only search for chromosome X inactivation as a marker of clonality in PC-ITP Patient 2 with the HUMARA method, and found a X-chromosome inactivation bias that could be linked with clonality in the myeloid compartment (Schroeder *et al*, 2010). This result is in agreement with our hypothesis that the patients we studied have a clonal haematological disorder rather than an immune-mediated one. The haematological disorder they have could be considered as a myelodysplasia that only impairs the megakaryocytic lineage.

The proplatelet formation assay might be a new diagnostic test to evaluate patient megakaryopoiesis in isolated chronic thrombocytopenia. Indeed, if the platelet count falls below $30 \times 10^9/l$ in patients with a proplatelet formation defect, ITP-directed therapies that modulate the immune system would probably not be effective. Considering that the underlying cause of the thrombocytopenia observed in our group of patients might be a haematological disease, THPO-RAs would probably be more adequate. A prospective study would be necessary to further confirm the usefulness of this test in patients with the same features as the patients described in this work.

How can we explain the phenotype we describe in our study? It is conceivable that the genetic mutation that probably occurs in a haematopoietic stem cell targets some genes specifically expressed in proplatelet-forming MKs. Given the central role of microtubules and actin in proplatelet formation (Tablin *et al*, 1990; Italiano *et al*, 2007), genes coding for proteins involved in cytoskeleton reorganization could potentially be candidates for investigation. Because of the absence of other haematological cell defects, future efforts should focus on cytoskeleton re-organization proteins that are specifically expressed in MKs.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM (ATIP-AVENIR), and the Fondation Bettencourt-Schueller. The authors would like to thank Emma C. Josefsson and Janet Jacobson for their careful reading of the manuscript and use-

ful advice, Caroline Rooryck-Thambo and Sylvie Deves for the HUMARA investigation in PC-ITP Patient 2, and Annie Paponneau and Mathieu Fiore for their technical assistance in electronic microscopy.

Author contributions

ER, J-FV and CJ designed the research, analysed data and wrote the manuscript; ER, AG, BK, JVD, ACP and CJ conducted the research and analysed data; TC, J-LP designed the research.

Conflict of interest disclosure

ER, JVD, ACP, TC, J-LP and CJ have no conflict of interest to disclose concerning this article. J-FV is a member of advisory boards for Amgen and GSK.

References

Bromberg, M.E. (2006) Immune thrombocytopenic purpura—the changing therapeutic landscape. *The New England journal of medicine*, **355**, 1643–1645.

Chang, M., Nakagawa, P.A., Williams, S.A., Schwartz, M.R., Imfeld, K.L., Buzby, J.S. & Nugent, D.J. (2003) Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis *in vitro*. *Blood*, **102**, 887–895.

Cines, D.B., Bussel, J.B., Liebman, H.A. & Luning Prak, E.T. (2009) The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*, **113**, 6511–6521.

Cuker, A. & Cines, D.B. (2010) Immune thrombocytopenia. *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, **2010**, 377–384.

Davoren, A., Bussel, J., Curtis, B.R., Moghaddam, M., Aster, R.H. & McFarland, J.G. (2005) Prospective evaluation of a new platelet glycoprotein (GP)-specific assay (PakAuto) in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia (AITP). *American Journal of Hematology*, **78**, 193–197.

De Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J.E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W. & Debili, N. (2002) Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, **100**, 1310–1317.

Drachman, J.G., Sabath, D.F., Fox, N.E. & Kauschansky, K. (1997) Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood*, **89**, 483–492.

He, R., Reid, D.M., Jones, C.E. & Shulman, N.R. (1995) Extracellular epitopes of platelet glycoprotein Ib alpha reactive with serum antibodies from patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, **86**, 3789–3796.

Italiano, Jr, J.E. & Shivdasani, R.A. (2003) Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, **1**, 1174–1182.

Italiano, Jr, J.E., Patel-Hett, S. & Hartwig, J.H. (2007) Mechanics of proplatelet elaboration. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, **5**, 18–23.

Kruse, E.A., Loughran, S.J., Baldwin, T.M., Josefsson, E.C., Ellis, S., Watson, D.K., Nurden, P., Metcalf, D., Hilton, D.J., Alexander, W.S. & Kile, B.T. (2009) Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 13814–13819.

Lev, P.R., Grodzkiński, M., Goette, N.P., Glembofsky, A.C., Espasandin, Y.R., Pierdominici, M.S., Contrufo, G., Montero, V.S., Ferrari, L., Molinas, F.C., Heller, P.G. & Marta, R.F. (2014) Impaired proplatelet formation in immune thrombocytopenia: a novel mechanism contributing to decreased platelet count. *British Journal of Haematology*, **165**, 854–864.

McMillan, R., Wang, L. & Tani, P. (2003) Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, **1**, 485–491.

McMillan, R., Wang, L., Tomer, A., Nichol, J. & Pistillo, J. (2004) Suppression of *in vitro* megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood*, **103**, 1364–1369.

Nurden, A.T., Viillard, J.-F. & Nurden, P. (2009) New-generation drugs that stimulate platelet production in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Lancet*, **373**, 1562–1569.

Provan, D., Stasi, R., Newland, A.C., Blanchette, V.S., Bolton-Maggs, P., Bussel, J.B., Chong, B.H., Cines, D.B., Gernsheimer, T.B., Godeau, B., Grainger, J., Greer, I., Hunt, B.J., Imbach, P.A., Lyons, G., McMillan, R., Rodeghiero, F., Sanz, M.A., Tarantino, M., Watson, S., Young, J. & Kuter, D.J. (2010) International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*, **115**, 168–186.

Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J.P., Brison, O., Metivier, D., Feunteun, J., Kroemer, G., Debili, N. & Vainchenker, W. (2003) Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*, **101**, 541–544.

Rodeghiero, F., Stasi, R., Gernsheimer, T., Michel, M., Provan, D., Arnold, D.M., Bussel, J.B., Cines, D.B., Chong, B.H., Cooper, N., Godeau, B., Lechner, K., Mazzucconi, M.G., McMillan, R., Sanz, M.A., Imbach, P., Blanchette, V., Kühne, T., Ruggeri, M. & George, J.N. (2009) Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*, **113**, 2386–2393.

Schroeder, T., Ruf, L., Bernhardt, A., Hildebrandt, B., Aivado, M., Aul, C., Gattermann, N., Haas, R. & Germing, U. (2010) Distinguishing myelodysplastic syndromes (MDS) from idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS): HUMARA unravels clonality in a subgroup of patients. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO*, **21**, 2267–2271.

Tablin, F., Castro, M. & Leven, R.M. (1990) Blood platelet formation *in vitro*. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *Journal of cell science*, **97** (Pt 1), 59–70.

2. Article 2 : Bcl-x_L est nécessaire pour la survie du mégacaryocyte pendant les stades de maturation et de formation des proplaquettes chez l'homme

En préparation

Nous démontrons dans ce travail que Bcl-x_L est une protéine anti-apoptotique nécessaire pour la survie du mégacaryocyte humain à tous les stades de maturation.

Pour cela nous utilisons plusieurs stratégies :

- une inhibition pharmacologique forte dose avec l'ABT-263 (navitoclax) à 0,5 µM soit pendant toute la durée de la mégacaryopoïèse, soit uniquement au stade de la formation des proplaquettes, parallèlement à une inhibition ciblée par shRNA anti-Bcl-x_L afin d'observer par 2 méthodes différentes si l'inhibition de cette seule protéine altère la mégacaryopoïèse
- une surexpression de Bcl-x_L par un plasmide MND-Bcl-x_L-IRES-GFP afin de restaurer l'altération potentielle induite par l'ABT-263, et vérifier que l'action de l'ABT-263 passe bien par Bcl-x_L étant donné que l'ABT-263 inhibe aussi Bcl-2 et Bcl-w ; cette surexpression nous permet aussi d'observer si la formation des proplaquettes est altérée ou pas quand on inhibe fortement l'apoptose
- une inhibition pharmacologique plus faible avec l'ABT-263 à 0,05 µM, soit pendant toute la mégacaryopoïèse, soit à partir de J9 afin d'observer l'effet d'une inhibition partielle de Bcl-x_L sur la mégacaryopoïèse, comme ce qui peut être observé chez certains patients traités par navitoclax dans les essais de phase I dans les hémopathies lymphoïdes.

Il reste encore des répliques d'expérimentation à réaliser pour affiner les résultats, mais au minimum 3 expérimentations par condition ont d'ores et déjà été réalisées et amènent des résultats pour la plupart déjà significatifs.

Bcl-x_L is necessary for megakaryocyte survival during maturation and proplatelet formation in human.

Etienne Rivière^{1,2,3}, Jean-François Viillard^{1,2,3}, Mathieu Pernet^{1,2,4}, Badr Kilani^{1,2}, Alexandre Métras^{1,2,4}, Béatrice Jaspard-Vinassa^{1,2}, Véronique Guyonnet-Duperat^{5,6}, Isabelle Lamrissi-Garcia⁵, Jean-Max Pasquet⁵, Emma C. Josefsson^{7,8}, Benjamin T. Kile^{7,8}, Jean-Luc Pellegrin^{1,2,3} and Chloé James^{1,2,9}

¹INSERM, Cardiovascular Adaptation to Ischemia, U1034, Pessac, France;

²University of Bordeaux, Cardiovascular Adaptation to Ischemia, U1034, Pessac, France;

³Internal Medicine Department, Bordeaux University Hospital Center, Pessac, France;

⁴Cardiac Surgery Department, Bordeaux University Hospital Center, Pessac, France;

⁵INSERM, Biotherapy of Genetic Diseases and Cancers, U1035, Bordeaux, France;

⁶Vectorology platform, University of Bordeaux, Bordeaux, France;

⁷The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville 3052, Australia;

⁸Department of Medical Biology, The University of Melbourne, Parkville, 3010, Australia;

⁹Laboratory of Hematology, Bordeaux University Hospital Center, Pessac, France.

Corresponding authors: Etienne Rivière & Chloé James, INSERM U1034, Haut-Leveque Hospital, Bordeaux University Hospital Center, 1 avenue Magellan, 33600 Pessac, France. Phone: (+33)57891979, fax: (+33)56368979, E-mails: e.riviere@neuf.fr & chloe.james@inserm.fr.

ABSTRACT

Human platelets are small anucleate cells produced by human bone marrow megakaryocytes (MKs) in 14 days after a terminal maturation process called proplatelet formation. Bcl-x_L is an anti-apoptotic protein that belongs to the intrinsic apoptosis pathway. It was shown to regulate platelet life span and survival of proplatelet-forming megakaryocytes in mice. On the contrary, in human, it was reported that intrinsic apoptosis needed to be tightly activated at the time of proplatelet formation. To elucidate the role of Bcl-x_L in human megakaryopoiesis, we analyzed *in vitro* differentiation of normal CD34⁺ cells into MKs, with inhibition or over-expression of

anti-apoptotic protein Bcl-x_L. We found that pharmacological and shRNA inhibition of Bcl-x_L led to impaired MKs maturation with early apoptosis, preventing MKs from proplatelet formation. When BH3-mimetic ABT-263 was added on normally matured-MKs just before proplatelet formation, the latter was greatly reduced. Over-expression of Bcl-x_L completely reverted these findings, leading to numerous long lasting proplatelet bearing MKs. Our results show that, in human, apoptosis should rather be restrained for MK survival than tightly activated and controlled for proplatelet formation.

INTRODUCTION

Platelets are small anucleate cells produced by bone marrow megakaryocytes (MKs). They participate mainly in normal haemostatic processes and blood vessel repair. At steady state, platelets arise from long MK extensions called proplatelets: they extrude through bone marrow sinusoids into the blood stream at the end of a 14 days-maturation process controlled by thrombopoietin (TPO).^{1,2} Proplatelets further become individual platelets in shear stress of small pulmonary circulation capillaries³ after microtubule twisting and fission processes.⁴ Mature MKs can also entirely protrude through those sinusoids and give birth to platelets once in blood circulation^{5,6}, or even, once mature, fragment their cytoplasm in sinusoids in response to acute platelet need and interleukin-1 α .⁷ The mechanisms by which large polyploid MKs undergo proplatelet formation are becoming clearer with recent works published over the last 10 years: formation of the demarcation membrane system⁸, microtubule reorganization with implication of EB3 and dynein molecules^{9,10}, decrease in MK plasma membrane's tonus by inhibition of the Rho/Rock pathway and DIAPH1, once in vascular niche.¹¹

Involvement of the apoptosis machinery to this final step of human megakaryopoiesis remains a subject of debate, as conflicting results have been generated over the last 15 years. On one hand, some groups argue that proplatelet formation requires a certain degree of controlled apoptosis as observed in erythropoiesis¹². The evidences are that thrombocytopenia is observed in mice when anti apoptotic Bcl-2¹³ or Bcl-x_L¹⁴ are overexpressed or when pro apoptotic Bim¹⁵ is deleted. Besides, use of biochemical inhibitors of caspases in human megakaryocytes showed that caspase activation was necessary for proplatelet formation and apoptosis

of the remaining senescent MK¹⁶. On the other hand, other groups showed that, in mice, apoptotic mechanisms have to be restrained for MK survival and platelet production. In mice where Bcl-x_L was specifically deleted in MKs progenitors, the latter had normal proliferation and maturation but MKs failed to form proplatelet¹⁷, suggesting that Bcl-x_L was necessary for proplatelet forming MKs to survive. Mice deleted for anti-apoptotic protein Bcl-2 displayed normal platelet production and platelet lifespan¹⁸, demonstrating that Bcl2 had no role in platelet production. Lastly, when pro-apoptotic Bak and Bax from the intrinsic pathway, and caspases-8 from the extrinsic pathway, were specifically deleted in mice MKs, megakaryopoiesis was normal, showing that activation of apoptosis was not necessary to produce platelets in mice.¹⁹ It is now undoubtful that activation of apoptosis is not required for platelet production in mice and even further, that apoptosis needs to be restrained to efficiently produce platelets. But it is still unclear whether the intrinsic apoptotic pathway should also be restrained in human MKs.

Because Bcl-x_L is the most important anti apoptotic protein in mouse megaryopoiesis, we decided to shed light on its role in human megakaryopoiesis.

MATERIAL & METHODS

Collection of normal CD34⁺ cells

Normal MKs were obtained from healthy patients with normal blood counts undergoing cardiovascular surgery for valve replacement, or healthy bone-marrow donors. The relevant institutional review boards or ethics committees approved our research, and controls gave written informed consent.

In vitro differentiation of MKs

Immunomagnetic CD34⁺ cells were purified using the EasySep® kit (STEMCELL, Grenoble, France) according to manufacturer's protocol. As, in our experience, a greater proportion of CD34⁺ cells get infected after being previously frozen, CD34⁺ cells were resuspended in 90% StemSpan SFEM II (STEMCELL) and 10% DMSO (Sigma-Aldrich) and stored in liquid nitrogen. After gentle thawing, cells were seeded in StemSpan SFEM II with 100 ng/mL of TPO, SCF, Flt-3L and IL-3 at a final concentration of 50 ng/ml

(STEMCELL). In comparison with previously described serum free medium^{16,20}, MKs were able to form proplatelets in StemSpan SFEM II in the same proportion (data not shown). Thus, the fourteen days of normal human megakaryocytic differentiation *in vitro* were conducted in StemSpan SFEM II. In our hands, proportion of infected CD34⁺ cells was greater with the use of IL-3 during 24 hours before infection (up to 65% of infected cells). Fresh medium was added at culture days 3 and 8 with TPO alone for a final concentration of 50 ng/ml. In MKs cultures with ABT-263, this molecule was added at culture days 1, 3 and 6 for a final concentration of 0.5 μ M or 0.05 μ M.

Lentiviral construction & production, and CD34⁺ cells transduction

Briefly, a shRNA against Bcl-x_L was designed to interfere with Bcl-x_L's coding sequence (with the following sense sequence: GTGGA ACTCTATGGGAACAAT) and control shRNA (against luciferase) were constructed as previously described. Briefly, ShRNA against Bcl-x_L (5'-AGCTTCCGCTCACTCTTCAGTCGGAAATTTCAAGAGAATTTCCGACTGAAGAGTGAGCTTTTTGGAAG-3') and control ShRNA (cgcggtccccCACGTACGCGGAATACTTTCGAttcaagagaTCGAAGTATTCCGCGTACGTGtttttgaaa) were cloned into the pTripDU3-EF1a-eGFP vector downstream of the H1 promoter. To over-express Bcl-x_L, its 702bp-coding sequence was cloned after MND promoter with an IRES-GFP sequence following, as previously described.²¹ Plasmid sequence was verified after Sanger's sequencing. VSV-G pseudotyped lentivectors were produced by triple-transient transfection of 293T cells. Titers were determined by the transduction of 293T cells through the serial dilution of the lentiviral supernatant and were analyzed for EGFP expression 5 days later. Infections of CD34⁺ cells were done at culture day 1 with a multiplicity of infection of 100. After 24 hours of infection, cells were washed in PBS + HSA 0.05% and seeded in StemSpan SFEM II with 50 ng/ml TPO alone.

Antibodies and reagents

For immunostaining, directly conjugated monoclonal antibodies (mAbs) were used: phycoerythrin (PE)-coupled anti-CD41a (HIP8 clone) for GFP⁺ cells, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD41a (HIP8 clone) for other cells, allophycocyanin (APC)-coupled annexin V and 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD), all as well as Annexin V binding buffer 10X concentrate were purchased from BD

Pharmingen™, Le Pont de Claix, France. ABT-263 was purchased from Selleckchem (Houston, Texas, USA), and concentrated at 5 mM in DMSO.

Cell staining protocols and flow cytometry analysis

MKs were harvested at culture days 6, 8 and 10, then washed in PBS + human serum albumin 0,05% (LFB biomedicament, Courtaboeuf, France) and resuspended in 100 µl of annexin V buffer 1X. 50 000 cells were stained with 4 µl of primary mAb PE-CD41a, 2µl of APC-Annexin V in one tube, 1µl of 7AAD in a second tube for 30 minutes. Cells were washed and resuspended in 200 µl of annexin V buffer 1X and analyzed on a FacsCanto II flow cytometer and analyzed with BD Facs DIVA (BD Biosciences). For proplatelet formation assay, cells were sorted at culture day 6 on a Facs Aria and analyzed with BD Facs DIVA (BD Biosciences).

Proplatelet formation assays

When mentioned, MKs were enriched at culture day 8 or 9 on an albumin density gradient, as previously described²², and seeded in triplicate onto 96-well plates in 100µl of StemSpan SFEM II per well with TPO 50 ng/ml. Otherwise, transduced cells that were previously sorted at day 6 were allowed to rest for 3 days before being plated at 300 cells/well in triplicate as mentioned above. For the ABT-263 assays, cells were plated in triplicate with 1 and 0.1 µl of ABT-263 (for 0.5 and 0.05 µM respectively). At the same time every day for 5 more days, proplatelet-forming and non-proplatelet-forming MKs were counted with a Nikon Eclipse Ti inverted microscope system (Nikon Corp., Tokyo, Japan).

Western blot analysis

MKs were resuspended in a solution containing 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, and 3 mM EDTA (T3EN solution) and lysed with SDS-NEM solution containing 10 mM Tris, 30 mM NEM and 12% SDS. Platelet proteins quantification was done using the Pierce™ BCA protein assay kit (Life Technologies, St Aubin, France). Bcl-x_L protein (30 kDa) was recognized by Bcl-x_L (54H6) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) and α-tubulin by mouse mAb (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallaviers, France). Optical density quantification ratios of Bcl-x_L/α-tubulin were measured with Odyssey application software v3.0.21 (LI-COR Inc, Lincoln, USA).

Statistical analyses

Statistical analyses were computed with unpaired, 2-tailed, Student t-tests or one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post-test using Prism® software v5 (Graphpad, San Diego, CA, USA); $p < 0.05$ defined significance.

RESULTS

Pharmacologic Bcl-x_L inhibition by BH3-mimetic ABT-263 induces apoptosis in MKs.

We first aimed to assess the effect of Bcl-x_L pharmacological inhibition on normal megakaryopoiesis. To that end, we seeded normal human CD34⁺ cells with ABT-263 (Navitoclax), a BH3 mimetic that inhibits Bcl-x_L. ABT-263 is widely tested in clinical trials of human diseases such as lymphoid malignancies²³⁻²⁵ or solid tumors²⁶. In most trials, patients experienced dose-dependent thrombocytopenias with several dose-limiting grade IV thrombocytopenias²⁴. It is well known that Bcl-x_L is necessary for platelet life span²⁷, but its role in human megakaryopoiesis is still unknown. To assess ABT-263 effect on megakaryocytes, we used 2 concentrations of ABT-263, 0.5 μM and 0.05 μM. Western blot analyses revealed that after 6 days of culture with ABT-263 at 0.5 μM Bcl-x_L expression was completely reduced, and the 0.05 μM concentration only half-reduced Bcl-x_L expression (Figure 1A). We thus chose to use 0.5 μM concentration to assess whether Bcl-x_L was necessary for human megakaryopoiesis. ABT-263 was added at culture days 1, 3, and 6. We analyzed MKs differentiation by studying the expression of MK-specific integrin αIIb (CD41a) at culture days 6, 8 and 10. We did not observe any difference compared to control MKs (figure 1B) with an average of 37% CD41-positive MKs at day 6, 42% at day 8 and 52% at day 10 (4 experiments).

However, morphological examination of MKs cultured with ABT-263 revealed that a higher fraction of MKs died with 0.5 μM ABT-263. To confirm this overall impression, we performed annexin V (figure 1C) and 7AAD staining (data not shown) to quantify apoptotic cells. The number of annexin V and 7AAD-positive MKs was greatly increased at day 8 in wells with ABT-263 0.5 μM, with 56.2% of annexin V-positive MKs compared to 21.7% in controls ($p=0.028$).

ABT-263 apoptosis induction is due to Bcl-x_L specific inhibition in maturing MKs.

As ABT-263 was shown to have collateral inhibitory activity on Bcl-2 and Bcl-w²⁸, we constructed a plasmid that over-expressed Bcl-x_L under MND promoter (MND-Bcl-x_L) with an IRES-GFP to obtain the same amount of Bcl-x_L and GFP mRNA, and transduced normal human CD34⁺ cells at day 1. We verified Bcl-x_L over-expression by western blot in GFP⁺ sorted cells (figure 1A). From day 2, transduced MKs were seeded with ABT-263 at 0.5 μM. MKs over-expressing Bcl-x_L showed normal CD41a expression with or without ABT-263 compared to control MKs (figure 1D), and normal Annexin V expression with or without ABT-263 (figure 1E). MKs over-expressing Bcl-x_L were also able to completely survive from ABT-263 0.5 μM as attested by a higher proportion of GFP⁺ MKs, ie death of non-transduced MKs, compared to Bcl-x_L over-expressing MKs without ABT-263, with 86.3% of MKs Vs 72% at day 6, 93% Vs 78% at day 8, and 93.5% vs 80% at day 10 respectively. These results show that Bcl-x_L over-expression prevented MKs from ABT-263-induced apoptosis, thereby demonstrating that Bcl-x_L inhibition but not Bcl-2 or Bcl-w, is responsible for ABT-263-induced MKs apoptosis.

Specific Bcl-x_L inhibition by anti-Bcl-x_L shRNA also induces apoptosis in MKs.

In order to inhibit specifically Bcl-x_L in MKs, we developed an shRNA against Bcl-x_L and transduced normal human CD34⁺ cells at day 1. We verified specific Bcl-x_L inhibition by western blot (figure 2A&B) as compared to scramble shRNA. From day 3 to 10 (figure 2C-H), we observed cells that evoked apoptotic MKs in wells with Bcl-x_L shRNA-transduced MKs (white arrows, figure 2G at day 6) and no proplatelet bearing MKs (black arrow showing a GFP-positive-proplatelet bearing MK in control, figure 2E). In 8 different experiments, we observed a decline in the number of Bcl-x_L shRNA-transduced MKs. At culture day 6, 21.5% of Bcl-x_L shRNA-transduced MKs were CD41a positive Vs 56.2% for control MKs (p=0.0011). At culture day 10, 30.1% of Bcl-x_L shRNA-transduced MKs were CD41a positive Vs 66.6% for control MKs (p=0.038) (figure 2I). We hypothesized that Bcl-x_L shRNA-transduced MKs died from apoptosis and assessed Annexin V expression at culture days 6 (10 experiments), 8 (7 experiments) and 10 (6 experiments). We observed 40.5% of apoptotic MKs among Bcl-x_L shRNA-transduced MKs Vs 18.3% in controls at day 6 (p=0.0046), 52% Vs 18.6% at day 8 (p=0.0087), and

46.7% Vs 27.3% at day 10 ($p=0.3$) (figure 2J). Thus, Bcl-x_L is required for human MKs to survive during maturation, contrary to mouse MKs.¹⁷

Pharmacologic Bcl-x_L inhibition by BH3-mimetic ABT-263 impairs proplatelet formation from normal human MKs and this phenotype is rescued by Bcl-x_L over-expression.

As it was shown in mice that MK-specific deletion of Bcl-x_L only impaired proplatelet formation¹⁷, we wanted to know what impact on human MKs' proplatelet formation could have a pharmacologic inhibition of Bcl-x_L. In 3 different experiments, MKs that had been cultured with ABT-263 since culture day 1 and that were still alive were harvested at day 8 and layered over an albumin density gradient to synchronize large MKs between all wells. Proplatelet-bearing-MKs were then counted in triplicate each day for 5 more days until day 13. We only observed very rare proplatelet-bearing MKs in wells with ABT-263 0.5 μ M (figure 3B&D) compared to control MKs (figure 3A&C, with a normal proplatelet-bearing MK exemplified with a black arrow). We observed progressively more proplatelet bearing MKs in control wells: 21.5% at day 11, 34.2% at day 12 and 57.4% at day 13 (figure 3C). We also observed that MKs mortality was greatly increased in ABT-263 0.5 μ M wells compared to control wells (figure 3D). To make sure that the effect of ABT-263 we observed was due to Bcl-x_L inhibition, we performed the same experiments with normal human CD34⁺ cells transduced with IRES-MND-Bcl-x_L plasmid since day 1 and thus over-expressing Bcl-x_L protein. We were able to completely reverse the phenotype engendered by ABT 263. We observe normal proplatelet-bearing MKs in the 4 different conditions: control, IRES-MND-Bclx_L alone (figure 4A&C) or with ABT-263 0.5 μ M (figure 4B&C). It is to note that proplatelet formation seemed slightly increased in MKs over-expressing Bcl-x_L compared to control (figure 4C). Mortality was also reduced to normal, and even slightly decreased in MKs over-expressing Bcl-x_L as compared to control (figure 4D). Interestingly, we were able to observe proplatelet-bearing MKs at days 16 and even 18 of culture in IRES-MND-Bclx_L transduced MKs but not in control MKs. This over-expression seemed to "immortalize" MKs and proplatelet-bearing MKs, at least for 5 more days (data not shown). These results suggest that absence of proplatelet formation induced by ABT-263 on normal MKs is specific of Bcl-x_L inhibition rather than Bcl-2 or Bcl-w.

Specific Bcl-x_L inhibition by anti-Bcl-x_L shRNA completely prevents proplatelet formation from normal human MKs.

To confirm Bcl-x_L specific inhibition of proplatelet formation in normal human MKs, MKs transduced by shRNA against Bcl-x_L or by scramble shRNA at day 1 that were still living were sorted at day 6 and cultured for assessment of proplatelet formation as previously described. We could only detect proplatelet-bearing MKs in wells seeded with scramble shRNA transduced MKs (big black arrows, figure 5A&C), as shRNA against Bcl-x_L transduced MKs progressively died until day 13 with features suggesting apoptosis such as small apoptotic bodies (small black arrows, figure 5B&C). In scramble shRNA condition, we could observe a mean of 2.3% of proplatelet-bearing MKs at day 10, 9.7% at day 11, 30% at day 12 and 37% at day 13. Of note, we observed a high mortality rate among MK transduced with Bcl-x_L shRNA compared to control scramble shRNA (figure 5D). These results show that Bcl-x_L-specific inhibition by shRNA completely prevent MKs from proplatelet formation, and increased, although incompletely, MKs mortality.

Late pharmacological inhibition of Bcl-x_L also impaired proplatelet formation of normal human MKs.

As an impaired early MK maturation could lead to an impaired late MK maturation, ie proplatelet formation, we finally wanted to know if a late inhibition of Bcl-x_L could also lead to apoptosis of proplatelet-bearing MKs. To that end, we synchronized normal human MKs by albumin density gradient at culture day 8, and seeded them in Stemspan SFEM II in triplicate with ABT-263 at 0.5 μM. Four experiments were done. As compared to control with many proplatelet-bearing MKs (big arrows, Figure 6A), we could observe that ABT-263 0.5 μM almost completely inhibited proplatelet formation (Figure 6D). Significantly increased mortality was also observed (Figure 6D). Thus, Bcl-x_L is a major anti-apoptotic protein in MKs that is necessary for apoptosis restriction during proplatelet formation.

Lower doses of ABT-263 at a concentration of 0.05 μM only induced apoptosis of proplatelet-bearing MKs

The results obtained in clinical trials of navitoclax in chronic lymphoid leukemia revealed awaited platelet toxicity as well as some deep thrombocytopenias with a 5 days-delay to return to a normal platelet count. This delay could have accounted for a

certain degree of megakaryopoiesis impairment possibly linked to a partial inhibition of Bcl-x_L in MKs cytoplasm. We thus wondered what effect on megakaryopoiesis could have a partial inhibition of Bcl-x_L by low concentrations of ABT-263 at 0.05 μM. We observed that this concentration half-reduced Bcl-x_L protein quantity in MKs (Figure 7A), did not impair MKs number (Figure 7B) and only slightly increased MKs apoptosis between culture day 6 and 10 (Figure 7C). However, ABT-263 at 0.05 μM impaired proplatelet formation (Figure 7D) by increasing proplatelet-bearing MKs mortality, although the difference with controls is not statistically significant (Figure 7E).

DISCUSSION

We showed that complete Bcl-x_L inhibition impaired MKs differentiation by increasing apoptotic mortality and impaired proplatelet formation. When Bcl-x_L was over-expressed, it completely reverted the phenotype induced by pharmacological inhibition of Bcl-x_L thereby confirming the preponderant role of this protein for human MK survival.

Other teams demonstrated a necessary role for Bcl-x_L in human MKs. It has been shown that Bcl-x_L was involved in MKs survival during endomitoses: its over-expression prevented MKs from apoptosis when increasing their ploidy²⁹. Moreover, it was demonstrated that Bcl-x_L was expressed in human MKs cell-lines until proplatelet formation³⁰, and that its expression in MKs was post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation until then³¹. In our experiments, when lower concentrations of ABT-263 (0,05 μM) were used at day 9, ie on MKs that underwent normal maturation, we observed significantly less proplatelet-bearing MKs, but still proplatelet-bearing MKs compared to the 0,5 μM concentration, and non-significant increased MKs mortality. These results suggest that the amount of Bcl-x_L protein during proplatelet formation must be tightly regulated and that this late regulation is of major importance, as dose-dependent inhibition of proplatelet formation was observed. Thus, our results show that Bcl-x_L is necessary at all stages of megakaryopoiesis, including the proplatelet formation stage.

What do our results bring to the physiological role played by apoptosis during proplatelet formation in normal human megakaryopoiesis? Confirming a pivotal anti-apoptotic role of Bcl-x_L in human proplatelet-forming MKs as it was demonstrated in

mice^{17,18,27}, our results show that apoptosis must be restrained at early and late stages of MK maturation. Indeed, complete Bcl-x_L inhibition led to premature MK death. It also prevented remaining MKs from forming proplatelets as previously described in mice.¹⁷ How can we explain the differences between our results and those from the work by de Botton et al?¹⁶ This team used pan-caspase inhibition by fluoromethylketones (fmk) in cell-sorted human Mks at culture day 8, and observed no proplatelet formation. It has recently been shown that fmk pan-caspase inhibitors such as ZVAD.fmk had collateral effects activating other forms of cell death than apoptosis, such as necrosis and autophagy³². Therefore, apoptosis blockade with fmk could have induced these collateral forms of death in MKs explaining the absence of proplatelet formation in their experiments. Nevertheless, our results with Bcl-x_L over-expression in normal human MKs show that, once completely restrained, apoptosis does not contribute directly to proplatelet formation as numerous long-lived proplatelet bearing-MKs were observed in this condition.

The role played by Bcl-x_L in normal human megakaryopoiesis seems slightly different from that played in normal mouse megakaryopoiesis: it has been shown that, contrary to human, mice lacking Bcl-x_L specifically in their MKs displayed normal MKs' maturation, with numerous MKs in the bone marrow of these mice.¹⁷ Interestingly, human MKs survival seems to rely on only one anti-apoptotic protein, Bcl-x_L, which is not the case in mouse, with MKs lacking Bcl-x_L living until proplatelet formation stage¹⁷. This prolonged survival despite Bcl-x_L deletion is linked to Mcl-1 until proplatelet formation occurs, a stage where Bcl-x_L is not replaceable³³. Indeed, transgenic mice lacking Mcl-1 in their MKs displayed normal megakaryopoiesis, and the latter was completely impaired when pharmacological inhibition of Bcl-x_L by ABT-737 was performed. Thus, in mice, Mcl-1 is also necessary to sustain MK survival during the early stage of its maturation, but Mcl-1 alone cannot prevent MKs apoptosis during proplatelet formation.³³ Slight differences are known between human and murine megakaryopoiesis³⁴, although these differences were not extensively studied in the literature: ultrastructural differences³⁵, notably about the demarcation membrane system^{8,35}, and some protein expression such as protease-activation receptors (PAR 1, 3 & 4)³⁶. In the latter research, the authors observed that PAR 1 & 4 were expressed on human platelets and PAR 3 & 4 on murine platelets, therefore highlighting the possibility of a different protein expression between human and mouse MKs.

Finally, our results could partially explain navitoclax-induced thrombocytopenia in phase I trials.^{23,24} Indeed, in 29 patients with chronic lymphocytic leukemia, 8 patients experimented grade III/IV thrombocytopenias in accordance with Bcl-x_L inhibition-mediated platelet toxicity.²⁷ Of note, in 4 patients who had grade IV thrombocytopenias, platelet count returned to normal range in a mean of 5 days, and bone marrow histological examinations of 2 patients after 3 months of navitoclax showed normal MK density compared to pre-treatment histology. This 5-days delay to normal platelet count could be linked to a certain degree of megakaryopoiesis impairment through an incomplete cytoplasmic inhibition of Bcl-x_L in these patients' MKs. As showed in our study with a partial pharmacological inhibition of Bcl-x_L with lower concentration of ABT-263 of 0.05 μM, this incomplete inhibition also induced apoptosis of proplatelet-bearing MKs but did not significantly modify the number of non-proplatelet-bearing MKs. Normal density of MKs could thus be explained by MKs ability to synthesize Bcl-x_L *de novo* compensating navitoclax-induced Bcl-x_L inhibition, but not when time to proplatelet formation comes.^{23,24}

In conclusion, Bcl-x_L is the anti-apoptotic protein that is necessary for human MKs to survive during maturation and proplatelet formation. Bcl-x_L could therefore be implied in unexplained chronic thrombocytopenias either acquired or inherited.²⁰

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Vincent Pitard and Santiago Gonzales for their kind technical assistance for cell sorting, and Alice Bibeyran from the vectorology platform of the University of Bordeaux.

This work was supported by grants from the University Hospital Center of Bordeaux and the University of Bordeaux (MD-PhD grant for ER), INSERM (ATIP-AVENIR), and the Foundation Bettencourt-Schueller.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

ER, JFV & CJ designed research; ER, BK, BJV, VGD, ILG & JMP performed experiments & analyzed data; MP & AM provided normal bone marrow; ER, JFV, ECJ, BTK, JLP & CJ analyzed data and wrote the manuscript.

Disclosure of Conflicts of Interest

ER, MP, BK, AM, BJV, VGD, ILG, JMP, ECJ, BTK, JLP and CJ have no conflict of interest to disclose concerning this article. JFV is a member of advisory boards for Amgen, Shire and Novartis.

REFERENCES

1. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 2013;201(6):785–96.
2. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;369(6481):568–71.
3. Handagama PJ, Feldman BF, Jain NC, Farver TB, Kono CS. Circulating proplatelets: isolation and quantitation in healthy rats and in rats with induced acute blood loss. *Am J Vet Res* 1987;48(6):962–5.
4. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol* 2010;191(4):861–74.
5. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007;317(5845):1767–70.
6. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 1976;145(2):183–205.
7. 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):453–66.
8. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* 2014;123(6):921–30.
9. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, et al. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 2005;106(13):4076–85.
10. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* 2008;111(9):4605–16.
11. Pan J, Lordier L, Meyran D, et al. The formin DIAPH1 (mDia1) regulates megakaryocyte proplatelet formation by remodeling the actin and microtubule cytoskeletons. *Blood* 2014;
12. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001;193(2):247–54.
13. Ogilvy S, Metcalf D, Print CG, Bath ML, Harris AW, Adams JM. Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(26):14943–8.
14. Kaluzhny Y, Yu G, Sun S, et al. BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood* 2002;100(5):1670–8.
15. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999;286(5445):1735–8.

16. De Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002;100(4):1310–7.
17. Josefsson EC, James C, Henley KJ, et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J Exp Med* 2011;208(10):2017–31.
18. Debrincat MA, Pleines I, Lebois M, et al. BCL-2 is dispensable for thrombopoiesis and platelet survival. *Cell Death Dis* 2015;6:e1721.
19. Josefsson EC, Burnett DL, Lebois M, et al. Platelet production proceeds independently of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Nat Commun* 2014;5:3455.
20. Rivière É, Viallard J-F, Guy A, et al. Intrinsically impaired platelet production in some patients with persistent or chronic immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2015;
21. Hobbs S, Jitrapakdee S, Wallace JC. Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1alpha promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252(2):368–72.
22. Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood* 1997;89(2):483–92.
23. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol* 2010;11(12):1149–59.
24. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012;30(5):488–96.
25. Roberts AW, Advani RH, Kahl BS, et al. Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics, and antitumour activity of the BCL2 inhibitor navitoclax in combination with rituximab in patients with relapsed or refractory CD20(+) lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 2015;170(5):669–78.
26. Rudin CM, Hann CL, Garon EB, et al. Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2012;18(11):3163–9.
27. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007;128(6):1173–86.
28. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008;68(9):3421–8.
29. Lordier L, Chang Y, Jalil A, et al. Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. *Blood* 2010;116(13):2345–55.
30. Sanz C, Benet I, Richard C, et al. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp Hematol* 2001;29(6):728–35.
31. Kozuma Y, Kojima H, Yuki S, Suzuki H, Nagasawa T. Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL. *J Thromb Haemost JTH* 2007;5(6):1274–82.

32. Chauvier D, Ankri S, Charriaut-Marlangue C, Casimir R, Jacotot E. Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ* 2007;14(2):387–91.
33. Debrincat MA, Josefsson EC, James C, et al. Mcl-1 and Bcl-x(L) coordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood* 2012;119(24):5850–8.
34. Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost JTH* 2007;5(4):661–9.
35. Schmitt A, Guichard J, Massé JM, Debili N, Cramer EM. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 2001;29(11):1295–302.
36. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001;413(6851):74–8.

Figure Legends

Figure 1. Pharmacological inhibition of Bcl-x_L by BH3 mimetic ABT-263 at 0.5 μM since culture day 1.

(A) Western blot analyses from MK lysates at culture day 6, with optical density ratios of western blot analyses, representative of 2 experiments.

(B) CD41a flow cytometry analyses of MKs in culture with ABT-263 concentration of 0.5 μM from 3 different experiments.

(C) Annexin V staining flow cytometry analyses of MKs in culture with ABT-263 concentration of 0.5 μM from 3 different experiments.

(D) CD41a flow cytometry analyses of Bcl-x_L-over-expressing MKs in culture with ABT-263 concentrations of 0.5 μM from 3 different experiments.

(E) Annexin V staining flow cytometry analyses of Bcl-x_L-over-expressing MKs in culture with ABT-263 concentrations of 0.5 μM from 3 different experiments.

Figure 2. ShRNA against Bcl-x_L impairs MKs maturation.

(A) Western blot analyses from sorted-MKs lysate, representative of 2 experiments.

(B) Optical density ratios of western blot analyses, representative of 2 experiments.

(C-H) Optical and fluorescent microscopy (GFP) merged photographs (x20) of cultured MKs transduced by SCRAMBLE shRNA (C-E) or Bcl-x_L shRNA (F-H). Bars: 50 μm; white arrows: GFP⁺ apoptotic MKs; black arrow: GFP⁺ proplatelet bearing MK.

(I) CD41a flow cytometry analyses of SCRAMBLE shRNA of Bcl-x_L shRNA-transduced MKs in culture from at least 6 different experiments. *p<0.05, **p<0.005.

(J) Annexin V staining flow cytometry analyses of SCRAMBLE shRNA of Bcl-x_L shRNA-transduced MKs in culture from at least 6 different experiments. **p<0.05.

Figure 3. Proplatelet formation in MKs seeded with ABT-263 0.5 μ M since day 1.

(A-B) Optical (x20) microscopy photographs of proplatelet forming MKs at culture day 13, with control MKs (A), and MKs with ABT-263 0.5 μ M (B); black arrow exemplifies a proplatelet-bearing MK.

(C) Proplatelet formation assay of 3 different experiments.

(D) Viability assay of 3 different experiments.

Figure 4. Proplatelet formation in MKs over-expressing Bcl-x_L.

(A-B) Optical (x20) microscopy photographs of proplatelet forming MKs at culture day 13, with IRES-MND-Bcl-x_L MKs (A), and IRES-MND-Bcl-x_L MKs seeded with ABT-263 0.5 μ M (B).

(C) Proplatelet formation assay of 3 different experiments.

(D) Viability assay of 3 different experiments.

Figure 5. Proplatelet formation of SCRAMBLE and Bcl-x_L transduced-MKs.

(A-B) Optical (x20) microscopy photographs of proplatelet forming MKs at culture day 13, with MKs transduced with Scramble shRNA, big black arrows exemplify proplatelet-bearing MKs. (A), and Bcl-x_L shRNA, small black arrows exemplify apoptotic MKs (B).

(C) Proplatelet formation assay of 3 different experiments.

(D) Viability assay of 3 different experiments.

Figure 6. Proplatelet formation in MKs seeded with BH3-mimetics at culture day 8.

(A-B) Optical (x20) microscopy photographs of proplatelet forming MKs at culture day 13, with control MKs seeded in 1/100 diluted DMSO, black arrows (A) and MKs seeded with ABT-263 0.5 μ M (B).

(C) Proplatelet formation assay of 4 different experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

(D) Viability assay of 4 different experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

Figure 7. Proplatelet formation in MKs seeded with ABT-263 at 0.05 μ M since day 1.

- (A)** Western blot analyses from MK lysates at culture day 6, with optical density ratios of western blot analyses, representative of 2 experiments.
- (B)** CD41a flow cytometry analyses of MKs in culture with ABT-263 at 0.05 μ M from 3 different experiments.
- (C)** Annexin V staining flow cytometry analyses of MKs in culture with ABT-263 at 0.05 μ M from 3 different experiments.
- (D)** Proplatelet formation assay of 3 different experiments, * $p < 0.05$.
- (E)** Viability assay of 3 different experiments.

Figures

Figure 1

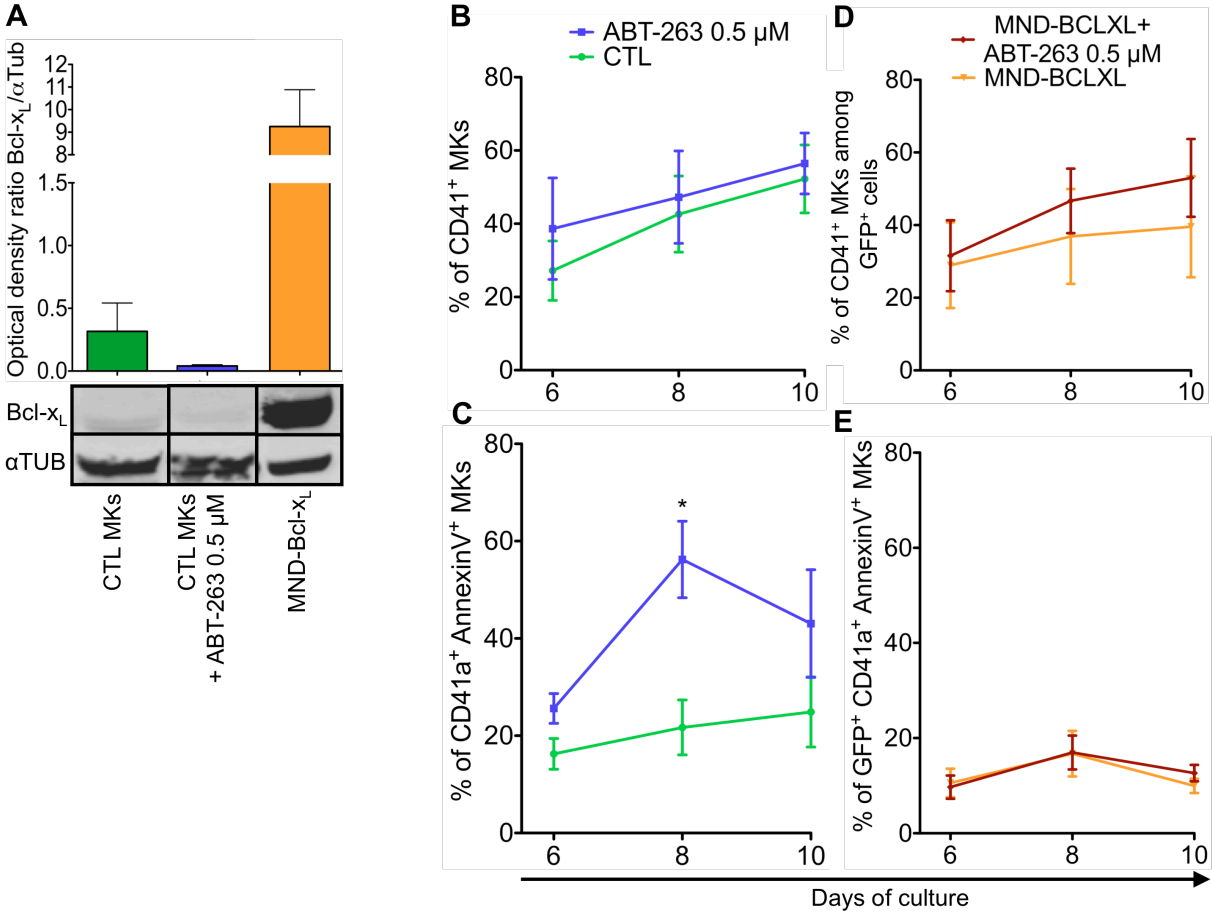


Figure 2

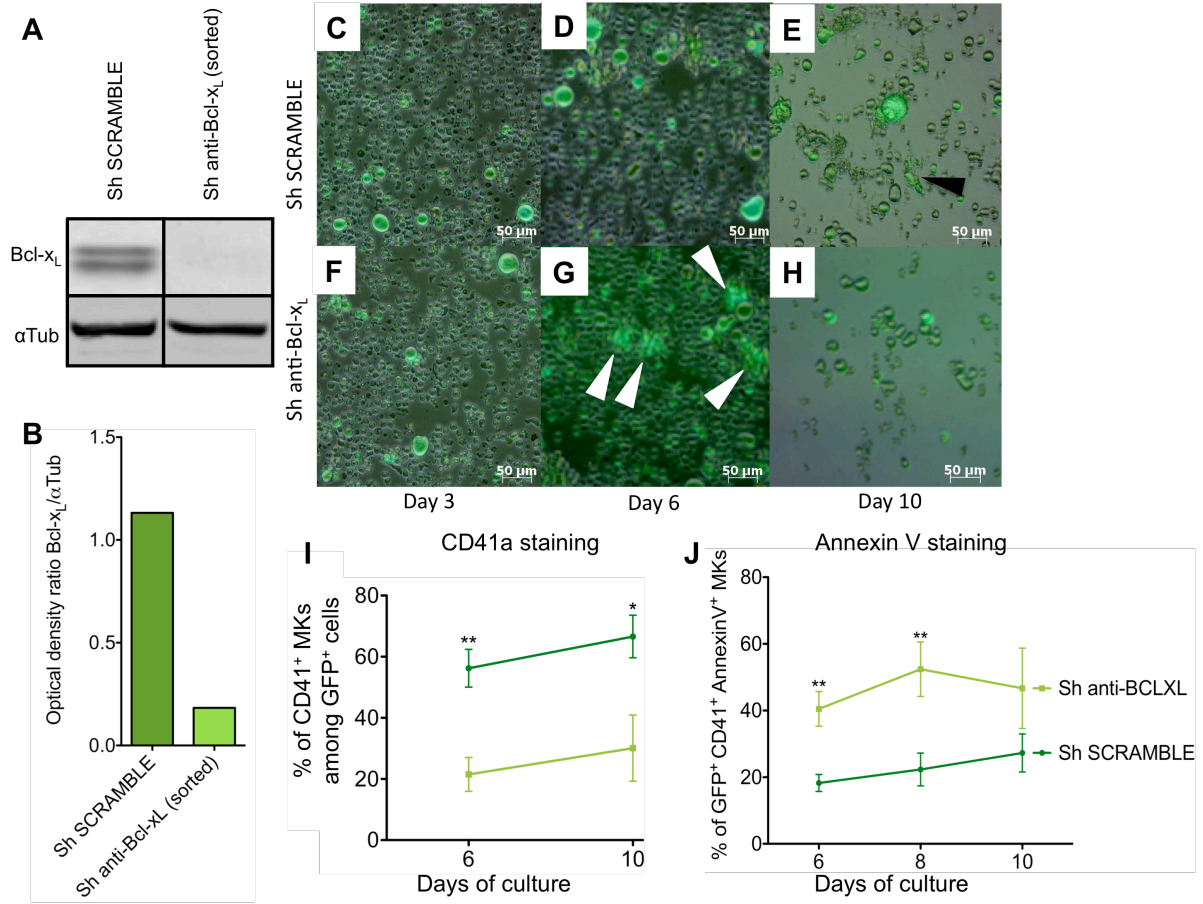


Figure 3

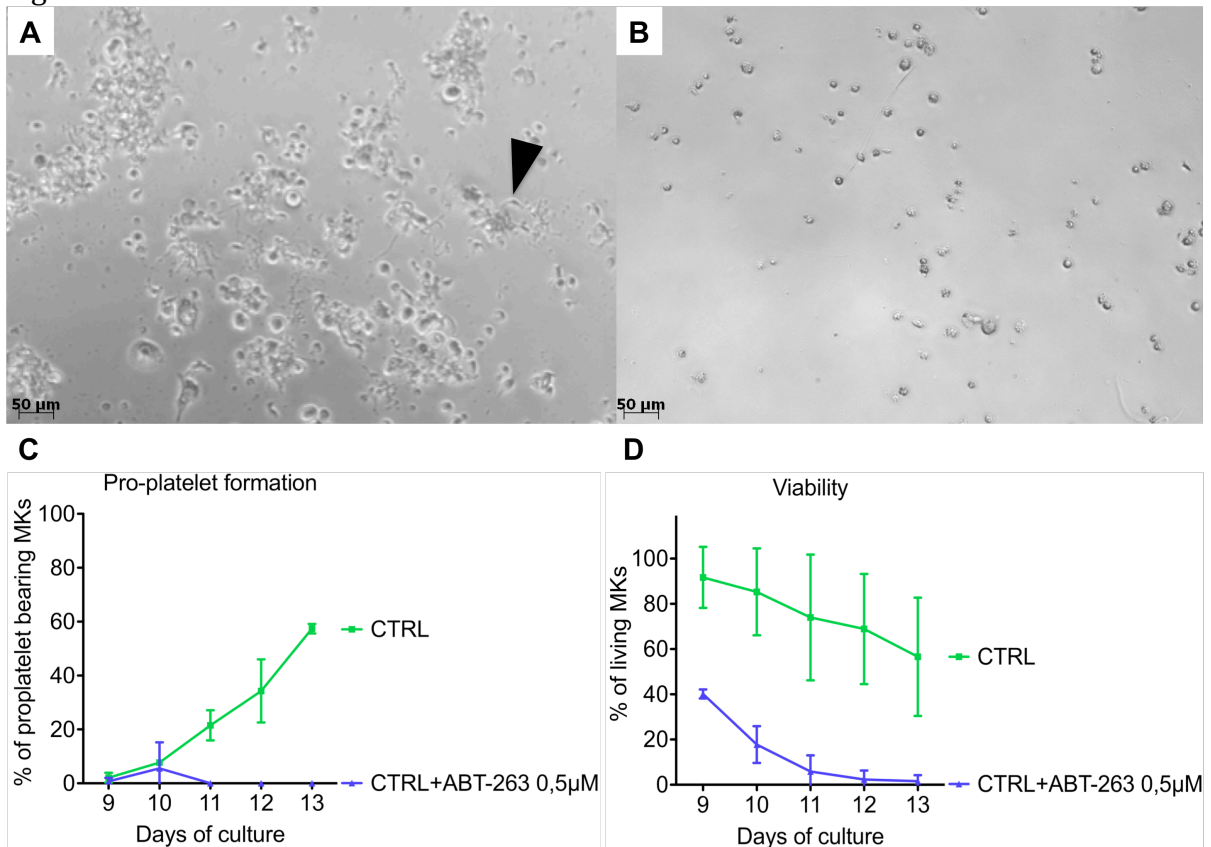


Figure 4

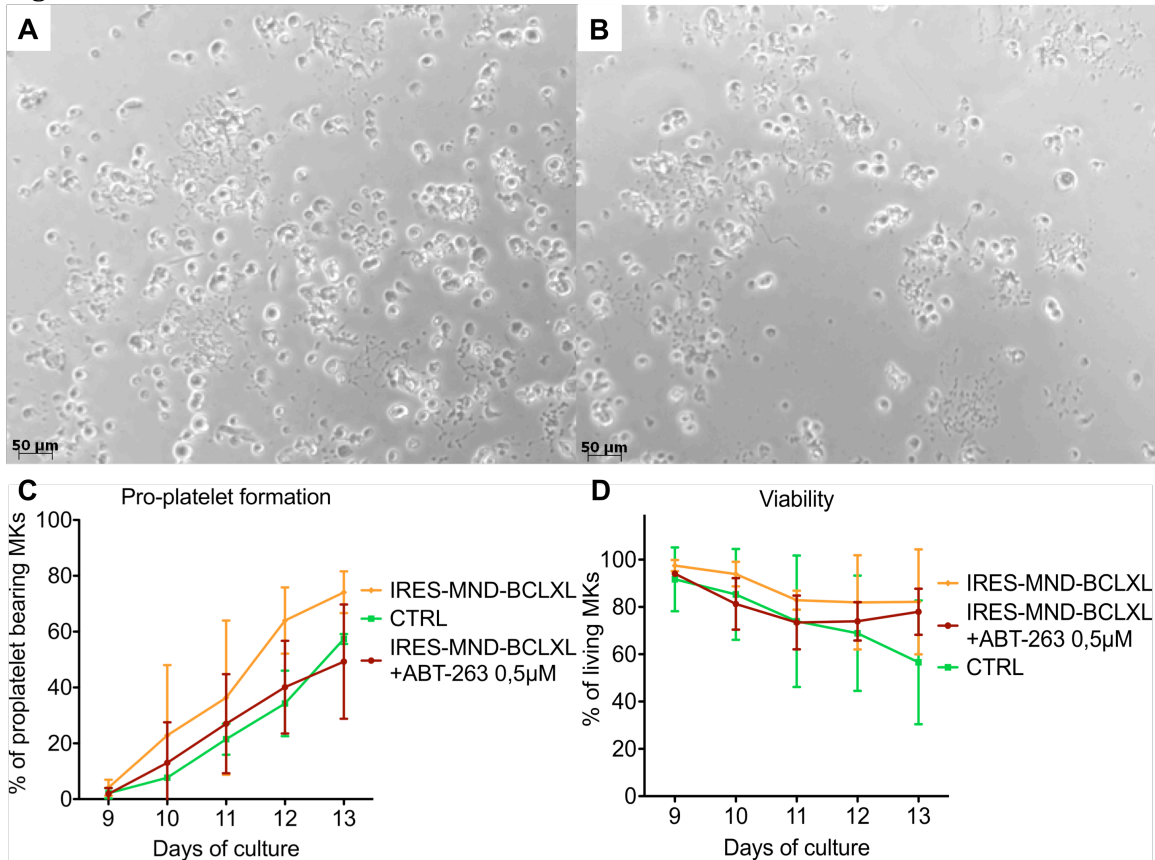


Figure 5

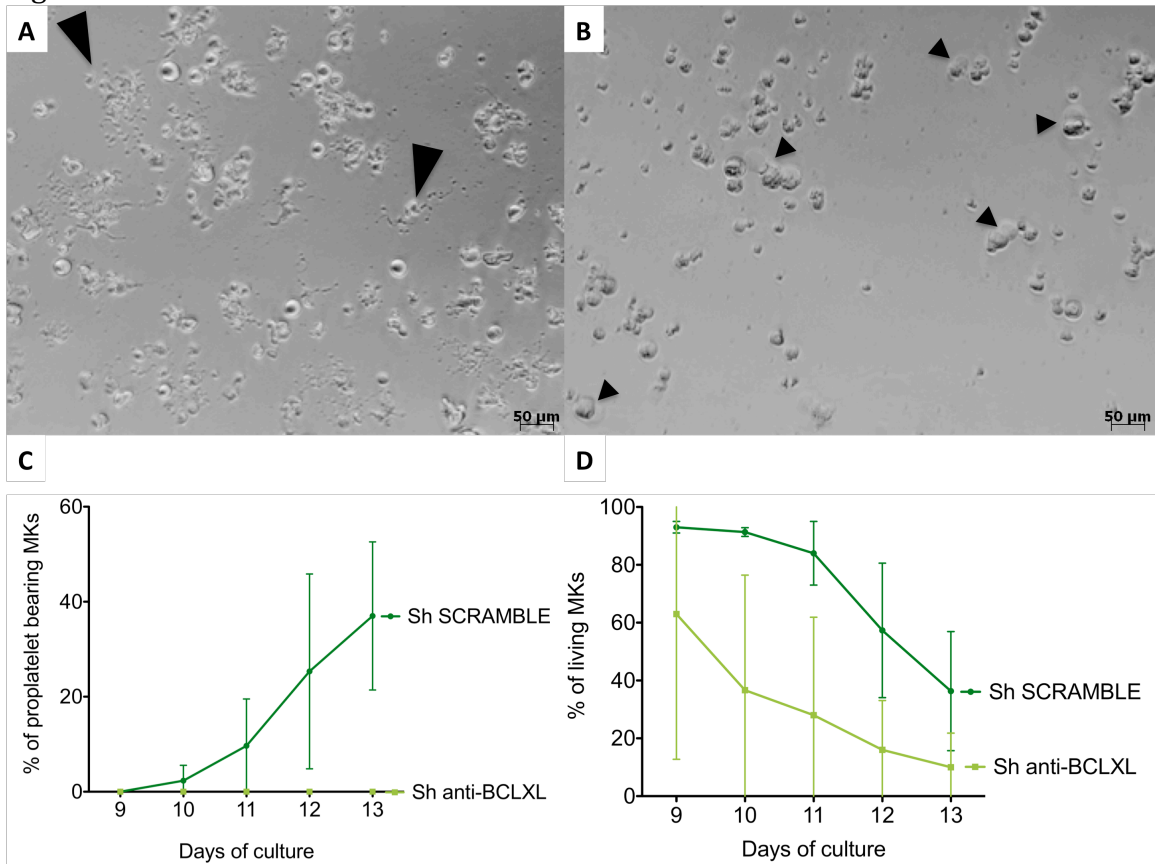


Figure 6

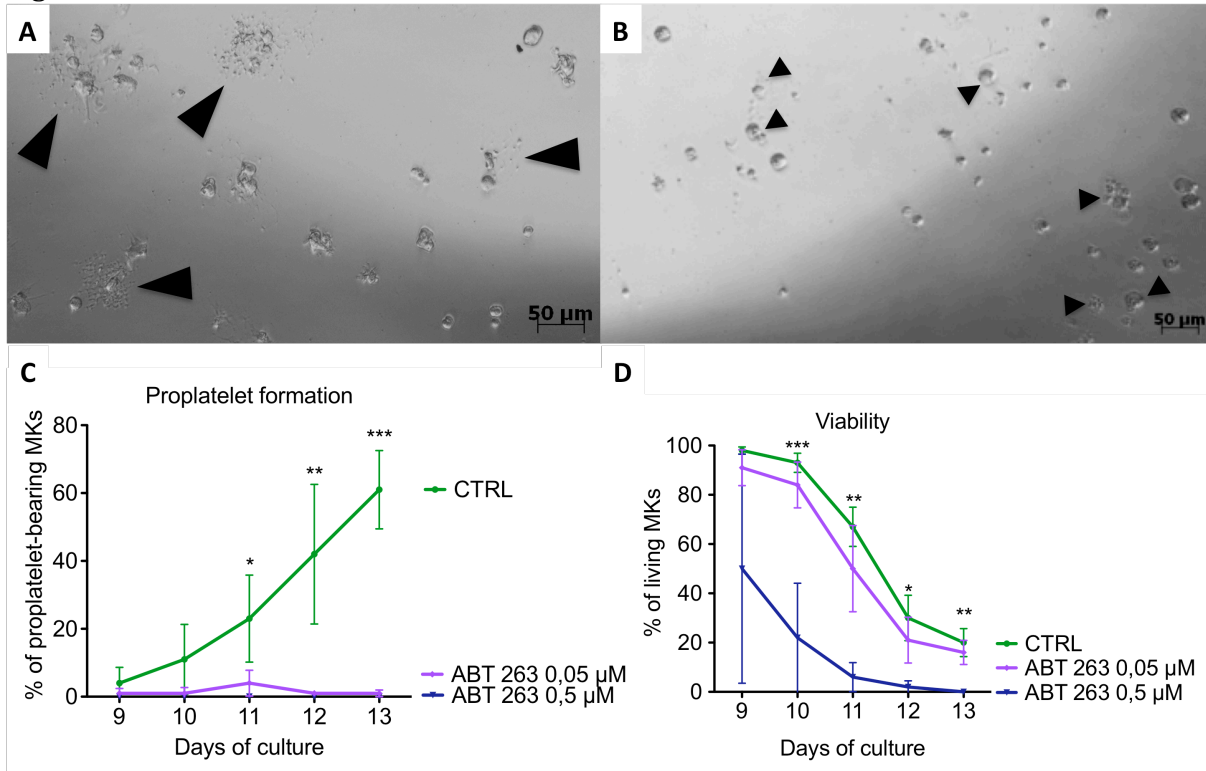
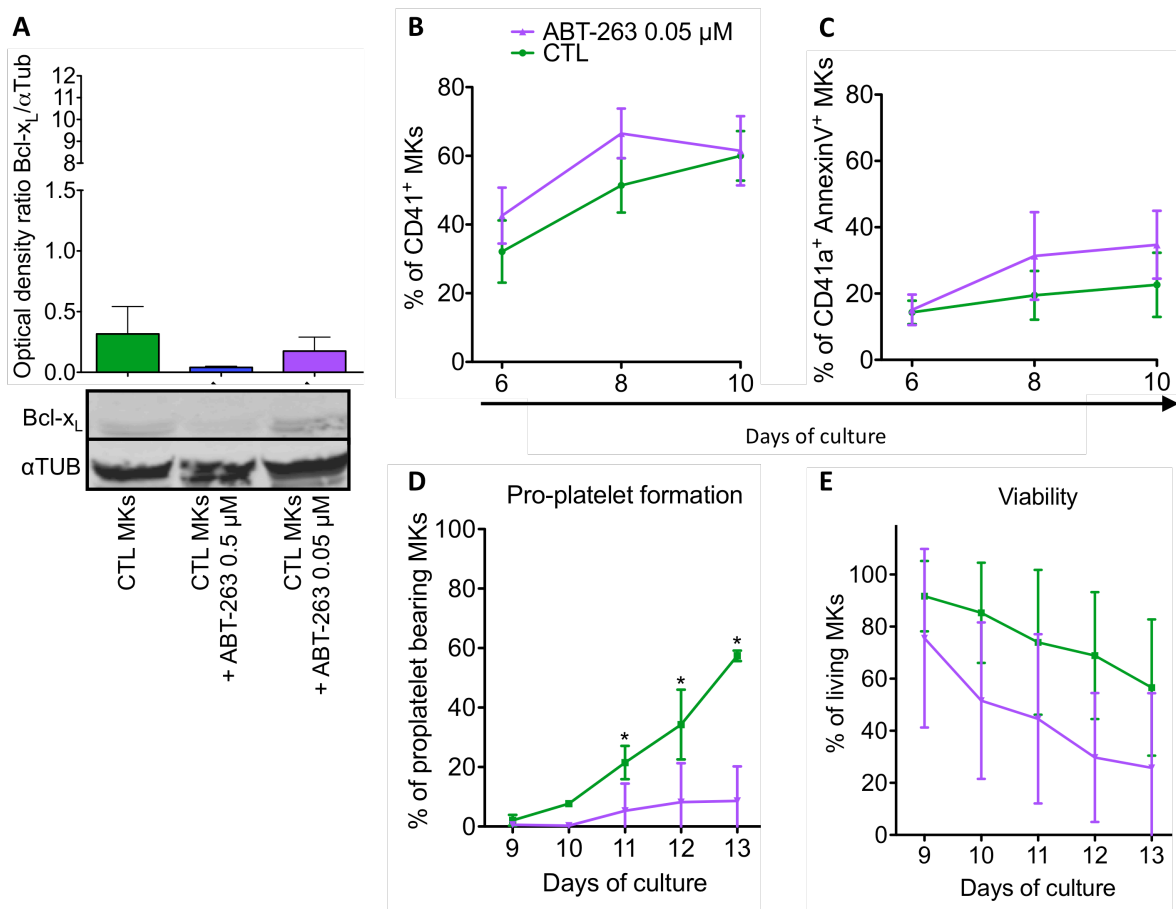


Figure 7



3. Article 3 : Bcl-x_L dans le purpura thrombopénique chronique

En préparation

Le PTI est une maladie hétérogène et un diagnostic d'élimination regroupant plusieurs profils de patients. Dans la suite du travail déjà publié dans le BJH, nous caractérisons plus précisément 2 profils de patients atteints de PTI chronique : un profil « immunologique », et un profil « non-immunologique », pour lesquels nous avons déjà montré une altération intrinsèque de la formation des proplaquettes. Compte tenu du rôle de Bcl-x_L dans la mégacaryopoïèse normale, nous nous sommes demandé si une dérégulation de celle-ci pouvait expliquer un tel phénotype.

Nous avons recherché par *High Resolution Melting (HRM)* une mutation dans la séquence codante du gène *bcl-x* de 43 patients identifiés comme ayant un profil « non-immunologique » de leur PTI. Nous n'avons pas retrouvé de mutation. En revanche, nous retrouvons chez certains d'entre eux une quantité d'ARN messager de Bcl-x_L basse et une diminution de la protéine dans leurs plaquettes, suggérant une dérégulation soit transcriptionnelle soit post-transcriptionnelle de Bcl-x_L.

Ces constatations, que nous sommes encore en train de confirmer, ouvrent la voie à l'identification d'une possible nouvelle cause de thrombopénie chronique.

Bcl-x_L in chronic immune thrombocytopenia

Authors: Étienne Rivière^{1,2,3}, Caroline Gary^{2,3,4}, Marie Tuffigo⁵, Xavier Pillois^{2,3}, Alexandre Guy^{1,2,3}, Badr Kilani², Eric Lippert^{5,6}, Rachel A. Burt^{7,8}, Benjamin T. Kile^{7,9}, Sarah Djabarouti^{2,3,4}, Jean-Luc Pellegrin^{1,2,3}, *Jean-François Viallard^{1,2,3} and *Chloé James^{2,3,5}

¹Internal Medicine Department, Bordeaux University Hospital Center, Pessac;

²University of Bordeaux, Cardiovascular Adaptation to Ischemia, U1034, Pessac;

³INSERM, Cardiovascular Adaptation to Ischemia, U1034, Pessac;

⁴Clinical Pharmacy, Bordeaux University Hospital Center, Pessac;

⁵Laboratory of Hematology, Bordeaux University Hospital Center, Pessac, France.

⁶INSERM, Biotherapy of Genetic Diseases and Cancers, U1035, Bordeaux;

⁷The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia ;

⁸Murdoch Children's Research Institute, Parkville, Victoria, Australia;

⁹Department of Medical Biology, The University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia.

* Contributed equally to this work

Corresponding author: Chloé James, INSERM U1034, Haut-Leveque Hospital, Bordeaux University Hospital Center, 1, avenue Magellan, 33600 Pessac, France. Phone: (+33)5 57 65 64 78, fax: (+33)5 57 65 68 45, E-mail: chloe.james@inserm.fr.

Abstract

Immune thrombocytopenia (ITP) is a heterogeneous disease typically due to immune-mediated platelet destruction. We have recently shown that some patients with chronic ITP have an intrinsic defect in proplatelet formation rather than immune platelet destruction, suggesting that some ITP patients might have “non-immune” disease linked to unknown acquired mutation in hematopoietic stem cell. In mice, Bcl-x_L is the most important anti-apoptotic protein, both for megakaryocytes to survive during proplatelet formation and for platelets to survive. We wondered if an acquired mutation in *bcl-x* or a deregulation of platelet Bcl-x_L mRNA and/or protein could be responsible for primary

chronic or refractory thrombopenia in some patients. We have selected 43 chronic ITP patients with “non-immune profile” divided into 2 groups: one with patients without detectable anti-platelet antibodies, no overt features of auto-immunity and unresponsive to previous immunomodulatory therapies (n=12), and one with untreated chronic ITP patients (n=31). We found no mutation in *bcl-x* coding sequence by high resolution melting but a significantly lower amount of Bcl-x_L mRNA and protein in platelets of most of these selected patients. For the first time, we show a deregulation of Bcl-x_L in some patients with chronic ITP, thereby strengthening hypothesis of primary hematological disease in these patients.

Introduction

Immune thrombocytopenia (ITP) is a heterogeneous disease that typically associates immune-mediated platelet destruction and impaired platelet production. We have recently shown that some patients with persistent or chronic ITP have an intrinsic defect in proplatelet formation rather than an immune platelet destruction.¹ This novel observation suggests that some patients with a presumptive diagnosis of ITP might have “non-immune” disease rather than immunologic thrombocytopenia with dysmegakaryopoiesis possibly linked to an unknown mutation in myeloid progenitor or hematopoietic stem cell. The group of B. Kile demonstrated in mice that Bcl-x_L regulated platelet life span² and survival of proplatelet-forming megakaryocytes³. Besides pharmaceutical inhibition of Bcl-x_L with BH3-mimetics such as ABT-263 (navitoclax) showed compromised therapeutic effect due to severe dose-dependent thrombocytopenias in human, highlighting the importance of Bcl-x_L in human.⁴ All together, these data lead us to hypothesize that persistent thrombocytopenia in a subgroup of patients with chronic/refractory ITP could be due to decreased expression of Bcl-x_L in platelets. This could be the consequence of acquired mutations in *bcl-x* in hematopoietic stem cells or myeloid progenitors, or deregulated mRNA and/or protein expression in platelets. We thus analyzed 43 chronic thrombocytopenic patients for whom a diagnosis of ITP was made but with a peculiar “non-immune profile” compared to healthy controls and chronic ITP patients with “immunological profile”: we screened them for mutation in *bcl-x* using high resolution melting in neutrophils, and analyzed bcl-x_L mRNA and protein expression directly in their platelets.

Methods

Patients

Caucasian patients with ITP according to the international ITP consensus^{5,6} were enrolled. Relevant institutional review boards or ethics committees approved our research, and all patients/controls gave written informed consent.

DNA collection

In our previous study¹, dry CD34⁻ cells pellets were frozen for DNA extraction. Neutrophils were selected from whole blood after 2% Dextran gradient, mononuclear cells eviction by Ficoll, and red cells lysis with water, 0.6M potassium and PBS. Dry neutrophils pellets were frozen for DNA extraction. DNA from *blc-x^{plt20/plt20}* mice² was kindly provided by EC Josefsson and BT Kile.

Platelet purification

Platelet purification was adapted from protocol described by Amisten.⁷ Briefly, blood was collected into ACDA tubes (BD biosciences, Le Pont de Claix, France) and centrifuged to collect platelet-rich plasma (PRP). ACDA and apyrase (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were added in order to prevent platelet activation. Platelets were centrifuged and resuspended in HEPES Thyrode buffer containing glucose, apyrase and 0.5 μ M EDTA. Leukocytes were removed by magnetic Dynabeads® pan-mouse IgG (Life Technologies, St Aubin, France) coupled to CD45 primary antibody (BD biosciences).

Molecular biology experiments

Genomic DNA extraction was performed using NucleoSpin Tissue DNA extraction according to manufacturer protocol (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France). HRM screening was performed on LightCycler® 480 instrument according to manufacturer protocol and previously described⁸ (Roche, Basel, Switzerland). Platelets' RNA extraction was performed as previously described.⁷ cDNA conversion using M-MLV reverse transcriptase and oligo-dt primers were done according to manufacturer protocol (Promega, Charbonnières, France). Cyclophilin A (PPIA), Bcl-xL, Glycoprotein IIb (GPIIb), and CXCR4 gene expression analyses were performed using qPCR PerfeCta®

SYBR® Green FastMix® (Quanta bioscience, Gaithersburg, USA) on LightCycler® 480 (Roche). Primers' sequence can be provided upon request.

Western blots

Platelets were resuspended in 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, and 3 mM EDTA (T3EN solution) and lysed with SDS-NEM solution containing 10 mM Tris, 30 mM NEM (N-Ethylmaleimide) and 12% SDS. Platelet proteins quantification was done using Pierce™ BCA protein assay kit (Life Technologies, St Aubin, France); forty micrograms were deposited in 15% western blot gel. Bcl-x_L (30 kD) was recognized by Bcl-x_L (54H6) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) and α-tubulin by mouse mAb (Sigma Aldrich). Quantification ratio of Bcl-x_L/α-tubulin was done with Odyssey application software v3.0.21 (Odyssey, LI-COR Inc, Lincoln, USA).

Results and discussion

Over the past three years, we have followed 76 patients with chronic/refractory primary ITP (C-ITP) according to consensus criteria⁵. Among them, thirty-three patients had overt features of auto-immunity were gathered in a group called “ITP with immunological profile” because of the presence of immunological abnormalities: detectable anti-platelet antibodies (by MAIPA), antinuclear antibodies, anti-extractable nuclear antigen (ENA) antibodies and/or other auto-antibodies, and/or responsive to a previous ITP-directed therapy challenges including steroids, IVIG, rituximab, disulone, hydroxychloroquine, immunosuppressive therapies (azathioprine, cyclophosphamide, ciclosporine, mycophenolate, or methotrexate) and/or splenectomy.

Among the 76 patients, there were also 43 chronic ITP patients with “non-immune profile” who were divided in two groups: a group of 12 patients with chronic ITP unresponsive to previous immunomodulatory therapies, non-splenectomized either because of scintigraphic platelet sequestration in liver or contra-indications to surgery, and thus requiring treatment with TPO mimetics (with response or not), including refractory ITP patients according to the international consensus⁵; a second group of 31 patients with untreated chronic ITP (no bleeding and platelet count > 30 G/L) and no overt feature of auto-immunity (Table 1; Figure 1A). General characteristic of enrolled patients were: 21 women (49%), 22 men (51%), mean age of 55 (range: 18-86), mean

platelet count at experiment of 87 G/L (range: 4-385) and mean evolution length of 7 years (range: 1-31).

We first sought for a genomic mutation in *bcl-x* gene's coding sequence by high-resolution melting, as we were able to detect the *bcl-x plt20* mutation previously described in mice² (data not shown). Unfortunately, we did not detect any mutation in *bcl-x* coding sequence in myeloid cells from patients with non-immune or immunological profile.

We then wondered if Bcl-x_L could be deregulated once transcribed and assessed level of expression of Bcl-x_L mRNA and protein in platelets by real-time quantitative PCR and western blot. *Bcl-x* has 2 transcript variants, a long one for anti-apoptotic Bcl-x_L and a short one without exon 2B for pro-apoptotic Bcl-x_S⁹; we thus designed reverse primer with exon 2B specific sequence. Of 43 patients, we only had exploitable platelet cDNA from 17 patients (ITP patients 1, 2, 6, 7, 10, 11, 12, 18, 24, 27, 28, 33, 39, 40, 41, 42 & 43, Figure 1A). Quantitative-PCR experiments were done in triplicate, and with associated primers of GPIIB, platelet specific, and CXCR4, neutrophils specific, to assess for sample platelet purity. After specific leukocyte depletion, we were able to analyze pure platelet RNA, even in thrombocytopenic patients (Figure 1B). We found that cDNA expression of Bcl-x_L was significantly lower in a significant proportion of ITP patients with non-immune profile compared with 13 healthy controls (p=0.019, Figure 1C). Of note, 11/17 patients had Bcl-x_L relative expression to PPIA lower than the lowest of control group (0.47). As RNA synthesis is impossible in anucleate platelets, mRNA quantification reflects *bcl-x* transcription in megakaryocytes, thereby suggesting either a decrease in *bcl-x* transcription or Bcl-x_L mRNA deregulation during megakaryopoiesis. Of note, the 4 patients with elevated mRNA level (ITP patients 24, 28, 42, 43) are all patients with short-evolution (mean: 2,5 years) untreated chronic ITP. On the contrary, 15 ITP patients with "immunological profile" had no difference in Bcl-x_L mRNA expression compared to control (p=0.55), reinforcing the hypothesis that Bcl-x_L is involved in the pathogenesis of these "non-immune" types of ITP.

We finally assessed Bcl-x_L protein quantity in platelets by western blots in 10 patients among previous patients with "non-immune profile" in whom we could also quantify platelet Bcl-x_L mRNA (ITP patients 1, 2, 6, 7, 24, 33, 39, 40, 42 & 43). We kept in mind that western blot is a limited semi-quantitative method to quantify protein, but in our hands flow cytometry analyzes were not conclusive due to lack of specificity of

commercialized Bcl-x_L antibodies (data not shown). We did 3 experiments with each sample in order to assess our results' reproducibility. In most patients, we found a significantly lower amount of Bcl-x_L protein in platelets than in controls (p=0.036, Figure 1C-D). Interestingly, 6/10 patients with low Bcl-x_L mRNA ratio (in red, Figure 1B) also had a low amount of Bcl-x_L protein (in red, Figure 1E). This observation suggests a decrease in mRNA synthesis rather than protein translational or post-translational deregulation, although both hypotheses are possible. Of note, the 3 patients with normal amount of Bcl-x_L protein (ITP patients 6, 7 & 42) also had a short-evolution (mean: 3,3 years) ITP, untreated in one, unresponsive to previous immunomodulatory therapies in two. Seven ITP patients with "immunological profile" had no difference in Bcl-x_L protein expression compared to control (p=0.08).

It has been shown in mice that Bcl-x_L is a major anti-apoptotic actor in megakaryopoiesis preventing megakaryocytes from premature death during proplatelet formation^{3,10} along with Mcl-1.¹¹ It also delimits platelets life span by a molecular competition with pro-apoptotic Bak and Bax within platelets.² We show here for the first time a clinical application to such findings, raising hypotheses of transcriptional or translational deregulation of Bcl-x_L in megakaryocytes from a subgroup of patients considered having a primary ITP according the actual criteria but without stigmata of autoimmunity. This novel observation also strengthens the hypothesis of a primary hematological disease in this subgroup of patients.

Acknowledgement

We are grateful to Béatrice Jaspard-Vinassa, Valérie Prouzet-Mauléon and Mathieu Fiore for technical assistance. This work was supported by grants from the University Hospital Center of Bordeaux and University of Bordeaux (MD-PhD grant for ER), INSERM (ATIP-AVENIR), and the Fondation Bettencourt-Schueller.

Authorship contributions

E.R., J.-F.V. and C.J. designed the research, analyzed data and wrote the manuscript; E.R., C.G., M.T., X.P., A.G., B.K., E.L., and C.J. conducted the research and analyzed data; R.A.B., B.T.K. and J.-L.P. designed the research and gave advices for the final version of the manuscript.

Disclosure of conflicts of interest

E.R., C.G., M.T., X.P., A.G., B.K., E.L., R.A.B., B.T.K., J.-L.P. and C.J. have no conflict of interest to disclose concerning this article. J.-F.V. is a member of advisory boards for Amgen, Shire and Novartis..

References

1. Rivière E, Viallard J-F, Guy A, et al. Intrinsically impaired platelet production in some patients with persistent or chronic immune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* 2015;
2. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell.* 2007;128(6):1173–1186.
3. Josefsson EC, James C, Henley KJ, et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J. Exp. Med.* 2011;208(10):2017–2031.
4. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol.* 2010;11(12):1149–1159.
5. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood.* 2009;113(11):2386–2393.
6. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood.* 2010;115(2):168–186.
7. Amisten S. A rapid and efficient platelet purification protocol for platelet gene expression studies. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2012;788:155–172.
8. Fiore M, Nurden AT, Vinciguerra C, Nurden P, Pillois X. Rapid diagnosis of the French gypsy mutation in Glanzmann thrombasthenia using high-resolution melting analysis. *Thromb. Haemost.* 2010;104(5):1076–1077.
9. Boise LH, González-García M, Postema CE, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* 1993;74(4):597–608.
10. Debrincat MA, Pleines I, Lebois M, et al. BCL-2 is dispensable for thrombopoiesis and platelet survival. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1721.
11. Debrincat MA, Josefsson EC, James C, et al. Mcl-1 and Bcl-xL co-ordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood.* 2012;

Table Legend.

Table 1. Clinical characteristics of eligible patients. No patient had features of overt auto-immunity and were divided into 2 groups according to their disease evolution: unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies, and untreated chronic ITP. The platelet count is the one at the time of experiments ; some patients were currently treated by TPO-receptor agonists explaining the normal platelet count. In the “previous ITP-specific treatment” section, currently ongoing treatment is indicated last. Abbreviations: F, female; M, male; ITP, immune thrombocytopenia; GP, glycoprotein; IVIG, intravenous immunoglobulins; Plt, platelet; G6PD, glucose-6-phosphatase dehydrogenase.

Patients	Age	Sex	Medical history	Disease	Duration of the disease (years)	Pt count	Previous ITP-specific treatment
ITP-1	34	F	Splenectomy at the age of 10 for pediatric ITP (relapse in 2013), migraine	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies	1	24	Steroids, IVIG, Rituximab, Dapsone, Etrombopag then Romiplostim
ITP-2	62	F	Grave's disease, G6PD deficiency	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies	6	385	Steroids, IVIG, Rituximab, Hydroxychloroquin, Etrombopag
ITP-3	77	M	None	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies	16	22	Steroids, IVIG, Hydroxychloroquin, Rituximab, Etrombopag
ITP-4	61	F	Schizophrenia, breast cancer	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies	30	4	Steroids, IVIG, Rituximab, Mycophenolate, Romiplostim then Etrombopag
ITP-5	75	M	Ischemic cardiopathy, hypothyroidism, gout, respiratory insufficiency, prostate cancer, idiopathic lung fibrosis, hypertension	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies	1	19	Steroids, IVIG, Rituximab, Romiplostim
ITP-6	30	F	None	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies	1	189	Steroids, IVIG, Etrombopag
ITP-7	86	M	Ischemic cardiopathy, auricular fibrillation, chronic lung disease, hypertension, treated H. Pylori gastritis	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies	5	367	Steroids, IVIG, Etrombopag then Romiplostim
ITP-8	81	F	Hypertension, ischemic arteriopathy	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies (refractory ITP)	5	17	Steroids, Dapsone, Rituximab, Splenectomy, IVIG, Romiplostim, Etrombopag
ITP-9	70	M	Type 2 diabetes	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies (refractory ITP)	31	81	Steroids, IVIG, Splenectomy
ITP-10	43	M	None	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies (refractory ITP)	5	8	Steroids, Splenectomy , Rituximab
ITP-11	66	F	Osteoporosis	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies (refractory ITP)	1	8	Splenectomy in 1990, Steroids, IVIG, Dapsone, Rituximab, Romiplostim then Etrombopag
ITP-12	82	F	Low grade T lymphoma with Evans syndrome in 1990, hyperthyroidism, polymyalgia rheumatica	Unresponsive chronic ITP to previous immunomodulatory therapies (refractory ITP)	24	110	Steroids, IVIG, Splenectomy , Romiplostim
ITP-13	54	F	Hysterectomy in 2009 with a septic choc	Untreated chronic ITP	6	76	None
ITP-14	60	F	None	Untreated chronic ITP	14	90	None
ITP-15	78	F	Hypertension, bilateral knee replacement	Untreated chronic ITP	5	29	None
ITP-16	24	F	Hysteria	Untreated chronic ITP	6	91	None
ITP-17	66	M	Hypertension, hypercholesterolemia, hyperuricemia	Untreated chronic ITP	5	97	None
ITP-18	69	M	None	Untreated chronic ITP	7	99	None
ITP-19	51	M	Type 2 diabetes, cured B hepatitis	Untreated chronic ITP	4	80	None
ITP-20	68	M	Type 2 diabetes, hypertension, obesity	Untreated chronic ITP	5	84	None
ITP-21	24	M	Acne	Untreated chronic ITP	7	88	None
ITP-22	68	M	Pancreatitis	Untreated chronic ITP	7	72	None
ITP-23	67	M	Obesity, hypertension, psoriasis	Untreated chronic ITP	3	99	None
ITP-24	27	F	Cholesteatome	Untreated chronic ITP	3	58	None
ITP-25	60	F	Hysterectomy	Untreated chronic ITP	3	78	None
ITP-26	57	M	None	Untreated chronic ITP	4	99	None
ITP-27	75	M	Ischemic stroke, ischemic cardiopathy	Untreated chronic ITP	1	85	None
ITP-28	57	F	Hypothyroidism, obesity	Untreated chronic ITP	1	98	None
ITP-29	66	M	Ischemic cardiopathy, obesity	Untreated chronic ITP	19	89	None
ITP-30	18	F	None	Untreated chronic ITP	14	86	None
ITP-31	27	F	None	Untreated chronic ITP	8	91	None
ITP-32	18	F	None	Untreated chronic ITP	5	26	None
ITP-33	28	F	None	Untreated chronic ITP	2	93	None
ITP-34	26	F	None	Untreated chronic ITP	14	99	None
ITP-35	72	M	None	Untreated chronic ITP	7	80	None
ITP-36	23	F	None	Untreated chronic ITP	3	64	None
ITP-37	37	M	None	Untreated chronic ITP	2	55	None
ITP-38	28	F	None	Untreated chronic ITP	2	76	None
ITP-39	76	M	Hypertension, hypercholesterolemia, gout, auricular fibrillation, chronic lung disease requiring oxygen	Untreated chronic ITP	4	98	None
ITP-40	69	M	None	Untreated chronic ITP	4	99	None
ITP-41	78	M	Unknown rheumatism treated with methotrexate 30 years ago	Untreated chronic ITP	2	98	None
ITP-42	41	M	None	Untreated chronic ITP	4	84	None
ITP-43	68	M	Ischemic cardiopathy, hypertension, type 2 diabetes, hypercholesterolemia	Untreated chronic ITP	2	57	None

Legend of Figure 1.

1A- Study flowchart detailing patients' selection and the different "immunological" or "non-immune" profiles of patients' ITP. *Abbreviations: ITP, immune thrombocytopenia; Ab, antibody; ENA, extractable nuclear antigens; CCP, citrullinated peptides; IVIG, intravenous immunoglobulins; HRM, high resolution melting; TPO, thrombopoietin; qPCR, quantitative polymerase chain reaction.*

1B- Quantification of GPIIb and CXCR4 mRNA relative to PPIA in platelets to assess platelet purity after leukocyte depletion in controls and patients (left, n=13 and 18 respectively), or without leukocyte depletion in controls (right, n=2 experiments).

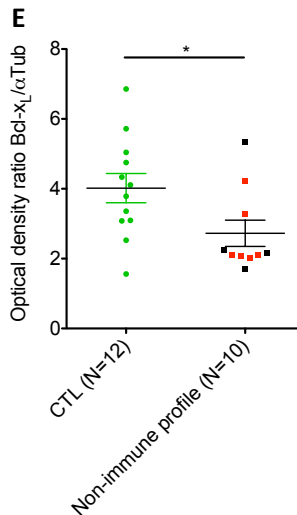
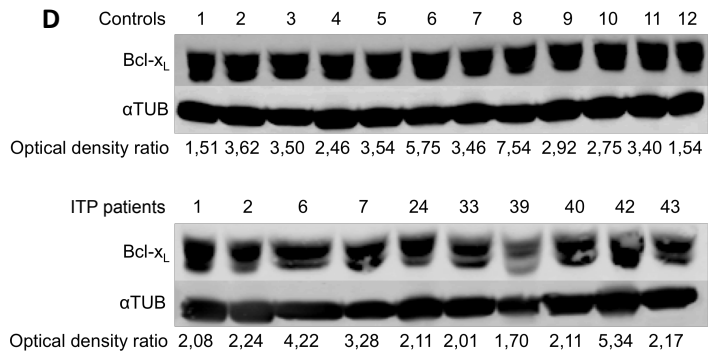
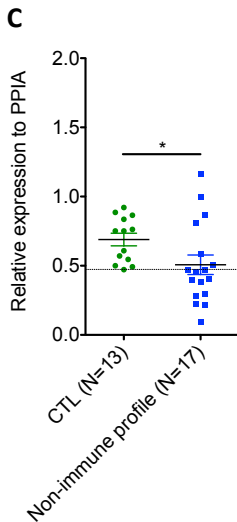
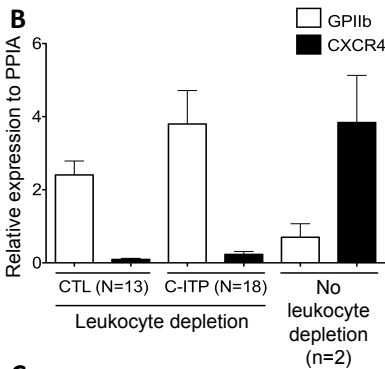
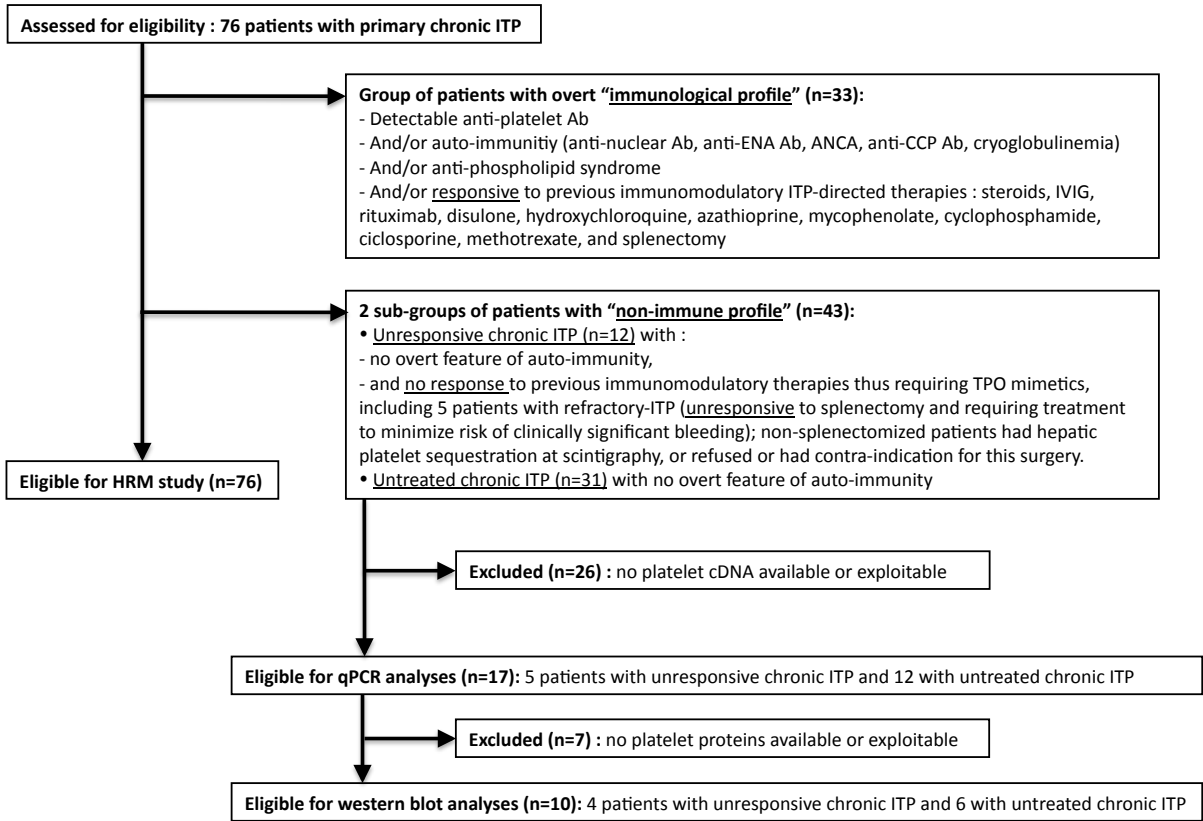
1C- Quantification of Bcl-x_L mRNA relative to PPIA (cylophilin A) in platelets from selected patients with "non-immune profile" compared to healthy controls. All experiments were done in triplicate. In red are shown patients with very low Bcl-x_L platelet mRNA content and from whom platelet proteins were available and plotted in Figure 1E; dotted line represent the lowest Bcl-x_L mRNA amount in control platelets (0.47). *p<0.05.

1D- Western blot analyses of chronic ITP patients with "non-immune profile" and controls Bcl-x_L amount in platelets, representative of 3 independent and reproducible experiments.

1E- Mean optical density ratios of Bcl-x_L/α-Tubulin from western blot gels of patients with "non-immune profile" compared to healthy controls, ** p<0.01. In red are plotted patients with very low Bcl-x_L mRNA amount in platelets, as shown in Figure 1B.

Figure 1.

A



4. Communication affichée : iPSC et mégacaryopoïèse, retour sur une expérience

Workshop de médecine régénératrice de Bordeaux (17 et 18 novembre 2014)

Nous exposons si après sous la forme d'une communication affichée un résumé de notre expérience dans la création et l'entretien d'iPSC humaines de patients atteints d'un PTI chronique non traité, et de leur différenciation en mégacaryocytes.

Parallèlement aux expérimentations initiées sur Bcl-x_L pendant les 2 premiers années de ce travail de thèse, nous avons tenté de produire puis différencier des iPSC à partir de cellules mononucléées de sang périphérique de 2 malades dont nous avons décrit la mégacaryopoïèse dans l'article publié dans le BJH.

Nous avons réussi à obtenir des iPSC à l'aide de vecteurs intégratifs transduits dans des érythroblastes différenciés en culture à partir des cellules mononucléées. Les iPSC exprimaient bien des marqueurs souches comme TRA1-60, SSEA4 ou nanog. En revanche, nous n'avons pas réussi de différenciation hématopoïétique. Il faut préciser ici la lourdeur de la génération et du maintien d'iPSC en culture, avec :

- la nécessité de changer le milieu quotidiennement, week-ends et jours fériés compris,
- le repiquage sur MEFs lorsque les colonies d'iPSC sont trop confluentes,
- et donc la gestion des MEFs en culture ou en stock dans l'azote,
- le coût en cytokines, notamment pour une différenciation hématopoïétique selon le protocole de Takayama & Eto, avec les doses colossales de hVEGF recombinant (3000 euros 1 mg), de TPO (3400 euros 1mg) et de SCF (1900 euros 1 mg) compte tenu du volume de milieu à changer quotidiennement (7 ml par boîte de diamètre 10 cm, pour 2 iPSC + condition controle) pendant 30 jours...
- sans compter la contamination des cellules en culture depuis 14 mois par un champignon suite à la panne de climatisation du P2.

Dans tous les cas, malgré une excision effective des cassettes contenant les 4 transgènes de reprogrammation (Sox2, Klf4, Oct4 et cMyc) et le shRNA anti-P53 par un adénovirus Cre mise en évidence par RT-PCR, c'est essentiellement pour les 2 arguments de temps et d'argent que nous avons finalement décidé de suspendre le projet après 2 années.

induced-Pluripotent Stem Cells (iPSC) et Mégacaryopoïèse : Retour sur une Expérience

Etienne Rivière¹, Jean-François Viillard¹, François Béliveau², Aurélie Bedel², François Moreau-Gaudry² et Chloé James¹

¹ Equipe interactions plaquettes/endothélium, Unité INSERM U1034 adaptation cardio-vasculaire à l'ischémie

² Unité INSERM U1035 biothérapies des maladies génétiques et cancers

I- Contexte scientifique

Les maladies constitutionnelles rares, même si elles ne touchent qu'un nombre très faible de patients, sont des modèles d'étude exemplaires pour les maladies plus fréquentes. La découverte de la cause de certaines maladies rares permet souvent de découvrir de nouvelles voies physiologiques, et même parfois thérapeutiques. On peut citer l'exemple de la découverte du récepteur plaquettaire P2Y12, à partir de l'étude d'un patient présentant une thrombopathie, récepteur qui est maintenant la cible thérapeutique de médicaments (thiénopyridines) prescrits chez plusieurs dizaines de millions de patients coronariens dans le monde. Notre équipe travaille sur les maladies des plaquettes, et notamment les thrombopénies constitutionnelles, pour lesquelles la plupart des patients n'ont à l'heure actuelle pas de diagnostic moléculaire, faute de connaître la cause de leur maladie. Il est très vraisemblable qu'un certain nombre de ces pathologies soient dues à des anomalies de la production plaquettaire par les mégacaryocytes (mégacaryopoïèse). Actuellement, il est nécessaire de réaliser une ponction de moelle osseuse pour pouvoir étudier la mégacaryopoïèse, et le prélèvement dont nous disposons ne nous permet de ne faire qu'une seule expérimentation.

Pour pallier au manque de matériel d'étude, notre projet était de dériver des iPSC de patients présentant une thrombopénie chronique, comme cela a déjà été fait pour un certain nombre de maladies humaines de cause inconnue (Tiscioni G, et al, Nature Med, 2011). Une équipe japonaise a publié en 2010 un protocole de mégacaryopoïèse à partir d'iPSC (Takayama N, et al. J Exp Med, 2010) et une équipe américano-suédoise en 2011 selon un autre protocole (Woods NB, et al, StemCells, 2011). Ces résultats ouvraient la possibilité d'utiliser cette approche pour l'étude des maladies plaquettaires. En effet, la découverte majeure des facteurs de transcriptions nécessaires pour la reprogrammation des cellules somatiques humaines en cellules pluripotentes, appelées iPSC, a ouvert, en 2007, de nouvelles perspectives dans la modélisation des pathologies dont la source de cellules primaires malades est rare ou difficilement accessible (Yu J, et al, Science, 2007 ; Takahashi K et al, Cell, 2007). L'avantage des iPSC est qu'elles peuvent être cultivées sans limite *in vitro* tout en conservant un potentiel de différenciation intact dans tous les types cellulaires et notamment les cellules hématopoïétiques. L'établissement d'iPSC de patients atteints de thrombopénies combiné à des protocoles performants de différenciation mégacaryocytaire pourrait constituer une source inépuisable de mégacaryocytes et pourrait être une alternative solide à leur obtention à partir des rares CD34+ de la moelle osseuse.

Notre projet consistait donc à mettre au point un modèle simple d'étude de la mégacaryopoïèse à partir d'iPSC normales, ce qui était tout à fait novateur à Bordeaux et plus largement en France. Un second objectif était, dans un deuxième temps, d'appliquer ce modèle à l'étude de maladies plaquettaires chroniques acquises ou constitutionnelles. En effet, nous avons observé chez des patients atteints de thrombopénie chronique (identifiés comme atteints d'un purpura thrombopénique immunologique chronique, PTIC) une anomalie terminale de la mégacaryopoïèse. Afin d'étudier la cause moléculaire, nous avions besoin de mégacaryocytes de patients en grande quantité et avons donc entrepris de créer une lignée d'iPSC pour 2 d'entre eux et ainsi obtenir une source illimitée de cellules.

III- Echec de la différenciation directe mégacaryocytaire

Nous avons essayé de différencier les iPSC ainsi obtenues en mégacaryocytes en suivant le protocole publié par l'équipe japonaise qui a découvert les iPSC en 2006 (Takayama N et Eto K Methods in Molecular Biology, 2012, figure 2). A J15, nous n'avons pas pu obtenir de CSH CD34+ exploitables pour une différenciation mégacaryocytaire, et à J26 nous n'avions aucun mégacaryocyte détectable, ni morphologiquement, ni par l'expression du CD41a (glycoprotéine GPIIb/IIIa).

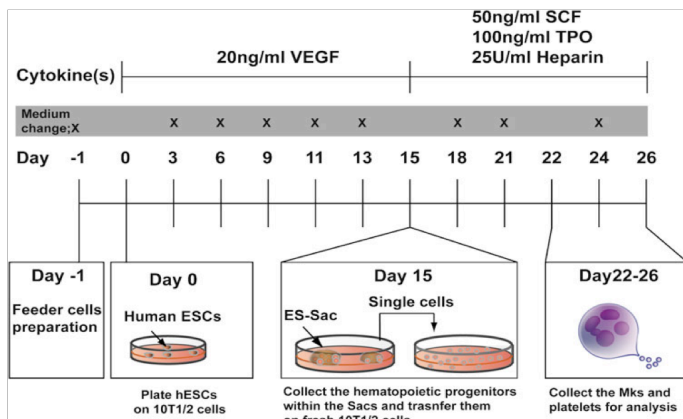


Figure 2. Schéma de la différenciation mégacaryocytaire de cellules ES (extrapolées aux iPSC) selon Takayama N & Eto K, Methods in Molecular Biology, 2012.

II- Génération d' iPSC à partir d' un prélèvement sanguin

Un simple prélèvement de sang sur tube EDTA a été réalisé chez 2 patients (EA et EB) présentant un PTIC. Après 15 jours de culture en milieu liquide avec de l'EPO, des érythroblastes ont été obtenus (figure 1A). Ces érythroblastes ont été ensuite infectés par deux lentivirus intégratifs excisables contenant les 4 facteurs de reprogrammation en iPSC : Oct-4, Sox-2, Klf4 pour le premier, c-Myc pour le 2^e associé à un sh anti-p53 pour favoriser la reprogrammation par le blocage de la voie p53 (schéma de la construction en figure 1B). Après 3 semaines de cultures en milieu pour cellules ES sur un stroma de MEF (mouse embryonic fibroblasts), les clones IPS-like (figure 1C) ont été prélevés à raison de 3 par patient (EA1, 2 et 3 ; EB&, 2 et 3) puis amplifiés pendant plusieurs semaines. La confirmation de l'obtention d'iPSC a été obtenue après vérification de l'expression d'antigènes embryonnaires induits par les 4 facteurs (NANOG, SSEA-4, TRA-1-60) en immunofluorescence (figure 1D).

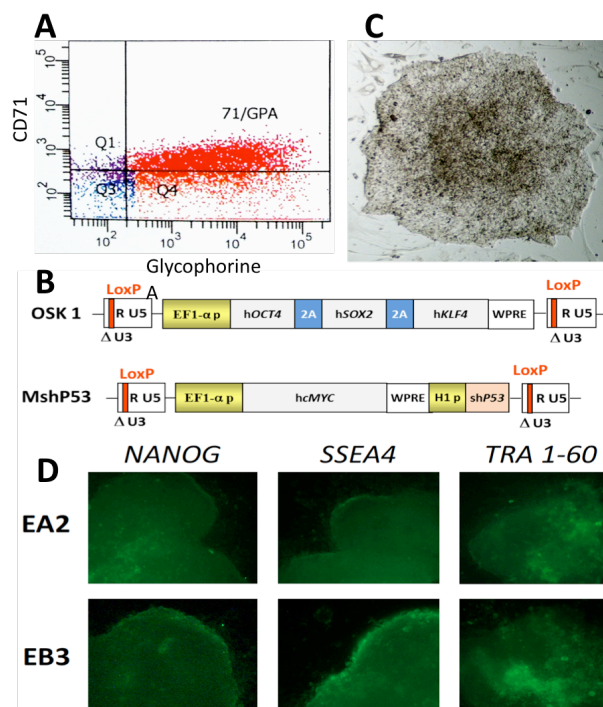


Figure 1. Génération d'iPSC par technique intégrative lentivirale. A- Obtention d'érythroblastes CD71+ GPA (glycophorin A)+. B- Schéma des deux constructions intégratives lentivirales « floxees » contenant les 4 facteurs de reprogrammation en iPSC (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc + shP53). C- Photo d'un clone iPSC typique obtenu sur stroma de MEFs. D- Vérification en immunofluorescence de l'expression induite d'antigènes embryonnaires comme NANOG, SSEA4 et TRA-1-60 chez les clones iPSC des deux patients atteints d'un PTIC.

IV- Discussion

Une explication de l'échec de la différenciation hématologique pourrait être que la pression de reprogrammation induite par les 4 facteurs ait été trop forte empêchant ainsi les iPSC de se différencier. Si tel est le cas, des systèmes de reprogrammation non intégratifs ou l'excision des facteurs de reprogrammation devraient permettre de résoudre ce manque de différenciation. De plus, le protocole suivi était initialement décrit pour les cellules ES, et extrapolé par les auteurs aux iPSC, il ne concernait donc pas primitivement des lignées iPSC. L'équipe de François Moreau-Gaudry est en train d'adapter le protocole de Woods et al pour tenter d'obtenir plus de CSH CD34+ à partir notamment d'une iPSC normale. Nous vérifierons dans un 2e temps la possibilité de différencier ces CSH CD34+ en mégacaryocytes.

V- Conclusion

Bien que séduisant, ce modèle d'iPSC est assez difficile à maîtriser en raison des difficultés de différenciation mégacaryocytaire, et très gourmand en temps et en euros. Il convient donc de trouver d'autres moyens pour parvenir à étudier la mégacaryopoïèse de patients atteints de thrombopénies chroniques acquises ou constitutionnelles.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Analyse critique des résultats

Nous avons émis l'hypothèse que les patients atteints d'un PTI chronique pouvaient présenter deux profils particuliers.

Certains auraient plutôt un profil **immunologique**, avec la présence avérée d'une auto-immunité se manifestant :

- soit par la présence d'anticorps anti-plaquettes,
- soit par la présence d'anticorps anti-noyaux, anti ENA etc.,
- ou soit par une histoire thérapeutique caractérisée par une remontée des plaquettes après un traitement immunomodulateur comme les corticoïdes, les immunoglobulines polyvalentes, le rituximab, la splénectomie etc.

Certains autres patients, quant à eux, auraient plutôt un profil **non-immunologique** de leur PTI :

- absence de stigmate biologique d'auto-immunité détectable - avec la limite technique actuelle de détection d'une auto-immunité chez les malades -
- et absence de réponse à des traitements immunomodulateurs du PTI rendant l'utilisation de TPO mimétiques nécessaire (avec réponse plaquettaire ou pas)
- ou absence de tout traitement devant un taux de plaquettes suffisant (>30 G/L).

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ce sous-groupe de patients ayant un profil non-immunologique de leur PTI.

Nous avons démontré dans un premier temps que certains patients avec un profil non-immunologique de leur PTI chronique présentaient une altération intrinsèque acquise de leur mégacaryopoïèse, la majorité de leurs mégacaryocytes ne parvenant pas à former des proplaquettes *in vitro* (Figure 22).

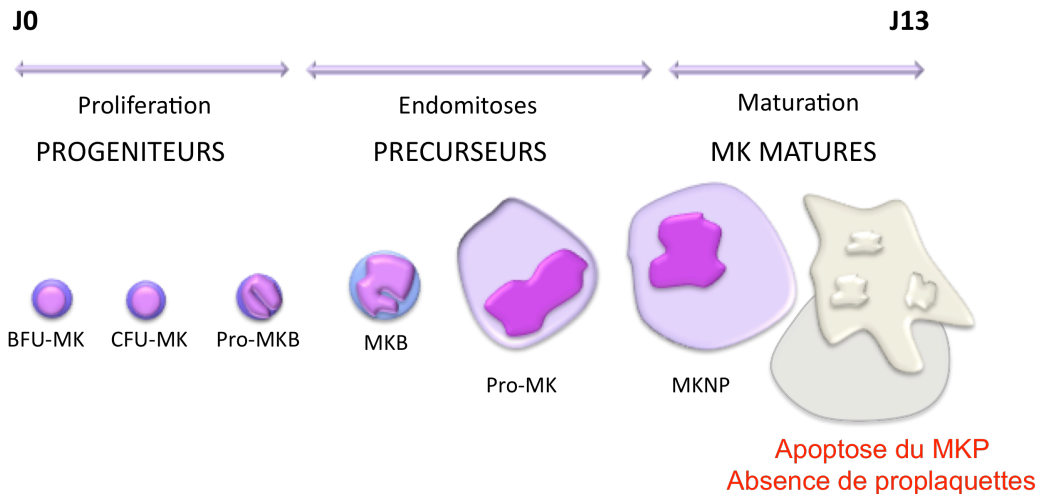


Figure 22. Altération de la formation des proplaquettes chez certains patients ayant un profil non-immunologique de leur PTI.

Dans ces expérimentations, nous nous sommes affranchis de toute influence exercée par le microenvironnement médullaire ou le système immunitaire de ces patients en différenciant leurs cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ en mégacaryocytes *in vitro*. Les cultures étaient donc dépourvues d'auto-anticorps anti-plaquettes et les MKs obtenus ne pouvaient pas avoir endocyté de tels anticorps puisqu'ils dérivait *in vitro* de cellules CD34⁺. Nous avons ainsi émis l'hypothèse d'une atteinte acquise de la cellule souche ou du progéniteur mégacaryocytaire par une mutation génique potentielle dans une cellule souche hématopoïétique. Il est important de noter que ces patients avaient tout de même un taux de plaquettes suffisant pour ne pas avoir de symptôme en rapport avec la thrombopénie. Cette observation suggère que si mutation acquise il y a, le clone muté n'est pas « total » dans la moelle osseuse hématopoïétique de ces patients. Compte tenu du phénotype comparable entre nos patients et les souris dont les mégacaryocytes étaient délétés pour Bcl-x_L²⁰⁹, nous avons voulu tester l'hypothèse d'une implication de Bcl-x_L dans le phénotype de ces patients.

Nous avons tout d'abord voulu évaluer dans un premier temps le rôle que pouvait avoir Bcl-x_L dans la mégacaryopoïèse normale chez l'homme car cela n'avait jamais été recherché. Nous avons démontré que les mégacaryocytes humains avaient besoin de Bcl-x_L pour survivre, maturer et former des proplaquettes. Comment cette protéine est-elle régulée dans le MK humain ? Peu de travaux se sont intéressés à la question. Une équipe japonaise a montré que son expression était régulée au niveau transcriptionnel par Stat5 (voie Jak-Stat) et la Pi3 kinase (voie Pi3K-AKT) en aval de la signalisation

induite par la fixation de la TPO sur son récepteur²⁹⁴. Une autre équipe japonaise a montré que la continuité de son expression tout ou long de la mégacaryopoïèse était régulée de manière post traductionnelle dans les mégacaryocytes par la TPO via la signalisation Pi3-kinase / AKT. En utilisant des mégacaryocytes murins et la lignée mégacaryocytaire humaine UT7/TPO, l'activation de cette voie empêchait sa dégradation de Bcl-x_L par la caspase 3 ²⁹⁷. Ces résultats suggéraient donc qu'une expression continue de Bcl-x_L devait être maintenue pour la survie du mégacaryocyte.

Par l'effet d'une inhibition de Bcl-x_L sur la maturation mégacaryocytaire, nos résultats sont différents de ceux obtenus chez la souris où une délétion spécifique dans la lignée mégacaryocytaire de Bcl-x_L ne provoquait qu'une impossibilité de formation des proplaquettes, sans impact sur la maturation, avec des mégacaryocytes en nombre normal dans la moelle osseuse de ces souris²⁰⁹. De manière complémentaire, la délétion d'autres protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Mcl-1 dans les MK n'altère pas la mégacaryopoïèse de ces souris. En revanche, quand on rajoute de l'ABT-737 inhibant ainsi Bcl-x_L dans des MKs délétés pour Mcl-1, toute la mégacaryopoïèse est altérée. Ces résultats étaient confirmés par la création de souris transgéniques doublement délétées pour Bcl-x_L et Mcl-1 dans les MKs. Ces souris mourraient in utero d'hémorragie, et la mégacaryopoïèse dans les foies fœtaux était altérée. Ainsi Mcl-1 est aussi importante, car elle permet la survie précoce du mégacaryocyte dans lequel Bcl-x_L a été délété, mais pas sa survie au moment où celui-ci devient plaquettogène²⁹⁶. En revanche la délétion de Bcl-2 isolée ou associée à une délétion de Mcl-1 n'a aucun impact sur la mégacaryopoïèse ou la durée de vie des plaquettes de ces souris²⁹⁷. Ces résultats suggèrent que Bcl-x_L est effectivement la protéine anti-apoptotique nécessaire pour la phase terminale de formation des proplaquettes dans la mégacaryopoïèse murine, son absence se traduisant par l'absence de plaquettes. A l'inverse, nos résultats montrent que l'inhibition précoce et isolée de Bcl-x_L dans les MKs humains n'est pas compensée par une autre protéine anti-apoptotique comme Mcl-1 et laissent donc penser que Bcl-x_L est la seule protéine responsable de la survie du MK chez l'homme.

Comment expliquer les différences observées sur le rôle de Bcl-x_L dans la mégacaryopoïèse humaine et murine ? Il faut garder à l'esprit que la mégacaryopoïèse diffère entre la souris et l'homme par certains points, notamment ultrastructuraux²⁹⁸,

même si très peu d'études se sont penchées sur le sujet dans la littérature. Il a été montré que les plaquettes murines étaient plus nombreuses, plus petites, avec une plus grande hétérogénéité dans leurs granules comparées aux plaquettes humaines. Par ailleurs, le système des membranes de démarcation du MK est différent, puisqu'il délimite des zones semblables à des plaquettes dans le cytoplasme du MK murin, alors que chez l'homme il se répartit d'abord au centre du MK puis à la périphérie de manière diffuse⁴³. De plus, la mégacaryopoïèse a lieu dans la moelle osseuse mais également dans la rate chez la souris, ce qui n'est pas le cas chez l'homme. Enfin, certaines protéines sont par ailleurs exprimées différemment entre les plaquettes humaines et murines, comme les récepteurs à la thrombine PAR (protease-activated receptors) avec PAR1 et PAR4 sur les plaquettes humaines, et PAR3 et PAR4 sur les plaquettes murines, témoignant d'une différence d'expression initiale sur les MKs²⁹⁹. Ces différences somme toute légères et l'absence d'études approfondies sur le sujet laissent cependant la possibilité d'une différence plus grande, comme celle relevée dans notre travail sur le rôle de Bcl-x_L dans la mégacaryopoïèse précoce chez l'homme.

Dans le débat sur l'implication directe de l'apoptose dans la mégacaryopoïèse, comment expliquer les différences observées chez l'homme entre notre étude et celle de de Botton et al ? Tout d'abord le mode opératoire était différent : inhibition des caspases et surexpression de Bcl-2 pour les travaux de de Botton et al²⁰⁵, et inhibition de Bcl-x_L dans nos expérimentations, ce qui ne permet pas de répondre *stricto sensu* aux mêmes questions. Néanmoins, une possibilité technique est le possible manque de spécificité dans l'inhibition des caspases par les fluorométhylketones (« fmk ») tels le ZVAD.fmk, Z-LEDH.fmk, Z-DEVD.fmk ou Boc-D.fmk avec une efficacité probablement élargie à d'autres effecteurs intra-cellulaires déclenchant également deux autres modes de mort cellulaire que sont la nécrose cellulaire et l'autophagie^{300,301}. Cette action aboutirait à une mort précoce et irréversible des MKs ne pouvant donc pas devenir plaquetto-gènes. De manière intéressante, nous avons observé un important blocage de l'apoptose avec la surexpression massive de Bcl-x_L : les mégacaryocytes plaquetto-gènes étaient très nombreux et survivaient longtemps à ce stade puisqu'ils étaient observés en plaque 96 puits jusqu'à 18 voire 20 jours de culture. Cette observation corrobore celle faite par l'équipe de BT Kile pour les mégacaryocytes plaquetto-gènes murins spécifiquement délétés pour les pro-apoptotiques Bak et Bax qui survivaient jusqu'à 10 jours en culture

en comparaison aux témoins (6 jours)²⁰⁹. Le blocage de l'apoptose permettait l'obtention de nombreux MKs plaquetto-gènes. Ces résultats de la surexpression de Bcl-x_L chez l'homme montrent donc que l'apoptose n'est pas nécessaire à la formation des proplaquettes par les MKs, son inhibition permettant la plaquetto-génèse et même une survie prolongée des MKs plaquetto-gènes contrairement à ce qui a été décrit jusqu'alors^{205,206}.

Un acteur majeur de la mégacaryopoïèse est le cytosquelette, et en utilisant le lien existant entre cytosquelette et apoptose, deux équipes ont travaillé sur l'inhibition ou l'activation de l'apoptose par le cytosquelette dans le MK.

Une première équipe a montré qu'une anomalie du cytosquelette pouvait inhiber l'apoptose par l'intermédiaire de Bcl-x_L en cas de modification importante de celui-ci comme au cours des endomitoses²². En effet, en étudiant la kinase Aurora B, l'équipe de William Vainchenker a montré en 2010 que celle-ci était nécessaire pour que le MK survive lors du passage d'une ploïdie de 2n à 4n. Son inhibition conduisait à une plus grande apoptose des MKs 2n et 4n. Les auteurs avaient relevé une plus grande quantité de Bcl-x_L dans les MKs polyploïdes, et cette quantité augmentait encore quand ils inhibaient pharmacologiquement Aurora B avec de l'AZD1152, et plus particulièrement dans les MKs di- ou quadri-ploïdes. Quand ils surexprimaient Bcl-x_L dans les MKs avec un vecteur rétroviral, ceux-ci survivaient à une inhibition pharmacologique d'Aurora B. Bcl-x_L semblait donc avoir un rôle anti-apoptotique majeur lors des endomitoses²², confirmant son rôle dans la maturation des MKs humains. Ces résultats vont dans le même sens que les nôtres, mais pas de ceux obtenus chez la souris²⁰⁹.

Une autre équipe³⁰² s'est intéressée plus récemment à l'activation de l'apoptose par le cytosquelette dans la mégacaryopoïèse normale, de précédents travaux ayant montré que la dépolymérisation de l'actine pouvait induire l'apoptose^{303,304}. Les auteurs ont montré que l'inhibition du cytosquelette d'actine par un agent dépolymérisant de l'actine comme la latrunculine permettait une augmentation de la ploïdie et de la formation des proplaquettes dans des MKs issus de cellules CD34⁺ de sang de cordon humain. Les auteurs montraient qu'une inhibition de l'apoptose par des inhibiteurs généraux des caspases, le zVAD.fmk à 20 μM et le Q-VD-OPH à 25 μM, empêchait la formation des proplaquettes, bien qu'il semble que l'image illustrant l'utilisation de Q-VD-OPH montre presque autant de MKs plaquetto-gènes que le témoin. Cependant, les doses utilisées ici étaient plus faibles que celles employées par de Botton et al²⁰⁵ et

Josefsson et al²⁰⁹ (50 μ M minimum) et les auteurs ne vérifiaient pas l'inhibition des caspases avec ces doses. Il semblait également exister une surexpression des gènes anti-apoptotiques comme Bcl-x_L (en cytométrie de flux et en western blot) en réaction à l'inhibition de l'actine. Ainsi, les auteurs montraient que le traitement par latrunculine augmentait le nombre de cellules apoptotiques en culture et concluaient que l'activation de l'apoptose induite par l'inhibition de la polymérisation de l'actine participait à la formation des proplaquettes. Or il a été clairement montré que le tonus membranaire et les endomitoses du MK étaient liés au cytosquelette d'actine-myosine contrôlé positivement par la voie Rho/Rock, et que l'inhibition de cette voie augmentait la ploïdie du MK et, en abaissant le tonus membranaire, permettait la formation de pseudopodes puis des proplaquettes. Ainsi, l'inhibition du cytosquelette d'actine par la latrunculine dans cette étude contribuait probablement directement à l'augmentation de la ploïdie et de la formation des proplaquettes sans forcément passer par un rôle actif de l'apoptose.

Compte tenu des résultats observés dans la mégacaryopoïèse humaine, Bcl-x_L pouvait-elle alors être impliquée dans certaines thrombopénies chez l'homme ?

Nos patients atteints d'un PTI chronique avec un profil immunologique avaient un phénotype mégacaryocytaire proche de celui des souris délétées pour Bcl-x_L dans les MKs, car ils ne présentaient qu'une anomalie intrinsèque de la formation des proplaquettes. Nous nous sommes donc astreints à rechercher une mutation dans la séquence codante du gène *bcl-x*, et à mesurer la charge moyenne plaquettaire en ARN messager de Bcl-x_L et en protéines. Nous avons fait l'observation nouvelle d'un taux d'ARNm et de protéines Bcl-x_L plus bas chez certains de ces patients en comparaison avec des témoins et des patients présentant un profil immunologique de leur PTI. Un nouveau mécanisme à l'origine de thrombopénies chroniques acquises chez l'homme pourrait donc être une dérégulation acquise de la protéine Bcl-x_L. Cette observation renforce également l'hypothèse de maladies hématologiques acquises inconnues chez des patients pour lequel le diagnostic de PTI a été posé à défaut d'autre cause retrouvée, et donc de l'existence de profils **non-immunologiques** de PTI. Il faut souligner ici la difficulté de quantifier précisément Bcl-x_L par western blot à défaut d'autres techniques. Nous avons montré dans un précédent travail non publié que l'anticorps anti-Bcl-x_L disponible sur le marché n'était pas spécifique de Bcl-x_L en cytométrie en flux. En effet, une fluorescence était constatée dans des cellules traitées par nilotinib n'exprimant plus

Bcl-x_L en western blot; le marquage observé était donc probablement un marquage de Bcl-2. A défaut nous avons donc utilisé la seule technique restante de quantification des protéines qu'est le western blot.

Nos résultats suggèrent donc que les molécules anti-Bcl-x_L devraient avoir un effet sur les MKs. Or, parmi les essais cliniques conduits avec l'ABT-263 (Navitoclax®)^{305,306}, l'étude de phase I dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) chez 29 patients avec facteurs de mauvais pronostic³⁰⁵, montrait que l'ABT-263 provoquait une thrombopénie dose dépendante, et que 8 patients ont eu une thrombopénie grade III-IV limitant les doses utilisées. Quand ce traitement était administré de manière discontinue (dosage intermittent) 14 jours sur 21 avant une nouvelle prise de 14 jours, on constatait la survenue d'une thrombopénie rapide et importante dans les 24h après la première prise, en accord avec l'importance de Bcl-x_L dans la durée de vie des plaquettes²⁰⁸, et une remontée rapide dans les 48h suivant l'arrêt du traitement (Figure 23).

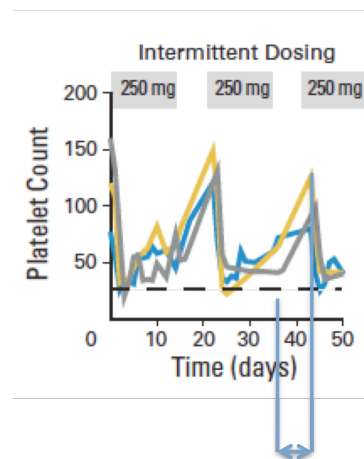


Figure 23. Effet du navitoclax® sur le taux de plaquettes de patients LLC.
D'après Roberts et al³⁰⁵

La remontée rapide des plaquettes semble donc en faveur d'une atteinte périphérique des plaquettes et non des mégacaryocytes dans cette étude. De plus, une BOM a été effectuée dans les 3 premiers mois sous traitement chez 2 patients thrombopéniques et montrait une densité médullaire mégacaryocytaire comparable à celle observée sur la BOM pré-thérapeutique. Néanmoins, les 4 patients recevant 250 mg ou plus d'ABT-263 et chez qui une thrombopénie grade IV a été observée ont mis entre 3 et 7 jours pour retrouver un taux de plaquettes normal ce qui pourrait correspondre à une atteinte minima du compartiment mégacaryocytaire médullaire. Une hypothèse pour expliquer

une atteinte majoritaire des plaquettes mais *a priori* pas des MKs serait que les MKs, de par leur capacité de synthèse conservée, compenseraient l'inhibition de Bcl-x_L induite par l'ABT-263, ce qui les maintiendrait en vie jusqu'à l'arrêt du navitoclax, puis permettrait la formation des pro-plaquettes à l'interruption du traitement.

Pour savoir quel serait l'effet de doses plus faibles d'ABT-263 sur la mégacaryopoïèse humaine normale, nous avons cultivé des MKs *in vitro* avec une concentration d'ABT-263 à 0,05 µM, cette concentration permettant de diminuer légèrement la quantité de protéine Bcl-x_L mégacaryocytaire sur deux western-blots différents. L'ABT-263 était ajouté à J1, J3 et J6 de culture. Nous avons observé une maturation comparable aux témoins avec une augmentation très légère de nombre de MK apoptotiques, mais une diminution significative du nombre de MKs plaquetto-gènes de J11 à J13 et non significative du nombre de MKs vivants. L'ABT-263 à plus faible dose *in vitro* n'altère donc pas la maturation cytoplasmique mégacaryocytaire mais provoque une apoptose des MKs plaquetto-gènes.

Une explication possible de ce phénotype observé ici *in vitro* serait qu'une faible quantité de Bcl-x_L suffirait à maintenir le MK en vie jusqu'au stade plaquetto-gène. En revanche, à ce stade, le MK perd sa capacité de synthèse protéique puisqu'il ressemble alors plus à une « méga-plaquette » ; il est donc incapable de re-synthétiser Bcl-x_L comme les plaquettes. Ceci pourrait expliquer la présence de MKs matures dans la moelle osseuse en nombre suffisant chez les patients traités pour une LLC par navitoclax, mais ces MKs ne seraient pas capables de former des proplaquettes tant que le patient reçoit la dose quotidienne de 250 mg de navitoclax. Ainsi, à l'arrêt du traitement, les MKs les plus matures, mais non encore plaquetto-gènes, pourront alors former leurs proplaquettes et participer à la remontée rapide des plaquettes observée chez les patients recevant le navitoclax par intermittence.

2. Conclusions et perspectives ouvertes par les résultats de ce travail de thèse

Nous avons donc montré un rôle anti-apoptotique majeur de Bcl-xL dans les mégacaryocytes humains. Nous avons également observé une diminution de la quantité d'ARNm et de protéines dans les plaquettes de patients avec un profil non-immunologique de leur PTI. Ces patients partageaient les mêmes caractéristiques que ceux chez qui nous avons démontré une altération intrinsèque dans la formation de leurs proplaquettes³⁰⁷.

Ainsi, nos résultats nous permettent d'envisager deux hypothèses en fonction du taux de Bcl-xL dans le MK :

- 1- soit Bcl-xL est **absente**, les MKs ne mûrent pas et ne donnent pas de proplaquettes et cela aboutit à un phénotype de thrombopénie à densité médullaire mégacaryocytaire basse.
 - ⇒ Puisque certains patients sur les 12 avec un PTI chronique et un profil non-immunologique gardent un taux de plaquettes bas (<30 G/L) et ce malgré les traitements par TPO mimétiques, il est possible que Bcl-xL soit presque absente de leurs MKs.

- 2- soit Bcl-xL est **présente mais diminuée**, et les MKs mûrent normalement mais meurent au stade plaquetto-gène, aboutissant à un phénotype de thrombopénie à densité médullaire mégacaryocytaire normale.
 - ⇒ Puisque les 31 patients avec un PTI chronique non traités et un profil non-immunologique gardent un taux de plaquettes suffisant, il est possible que la protéine Bcl-xL ne soit que partiellement dérégulée chez eux.

Nous souhaitons donc dans un premier temps vérifier la possibilité d'une dérégulation transcriptionnelle. Nous envisageons de dépister par HRM d'éventuelles mutations du promoteur du gène *bcl-x* qui confirmerait la diminution de l'ARNm de Bcl-xL et apporterait une composante génétique acquise à l'identification de ce nouveau mécanisme de thrombopénie.

D'autres gènes candidats que *bcl-x*, détaillés dans les *chap. 1.1.5.1 et 1.2.1.2*, pourraient être explorés dans les MKs par séquençage de l'exome ou puces à ARN, chez les patients à profil non-immunologique, notamment :

- les gènes impliqués dans la maturation cytoplasmique, comme GATA-1⁸¹, RUNX1⁸¹, TAL1⁸², ou NFE2⁸³,
- et ceux impliqués dans la formation des proplaquettes par :
 - la formation du réseau des membranes de démarcation, comme CIP4⁴², WASp-Arp2/3 ou les kinases PIP4K α ⁴¹,
 - ou la dynamique de ré-organisation du cytosquelette, comme EB3 et la dynéine⁴⁵, la voie Rho/Rock^{49,50} et ses effecteurs que sont DOCK8, ARHGEF3⁵² ou DIAPH1⁴⁸

CONCLUSION

Nous avons mis en évidence une altération intrinsèque de la formation des proplaquettes chez certains patients atteints d'un PTI persistant ou chronique non traités. En vue de tester l'hypothèse d'une diminution de la protéine Bcl-x_L chez ces patients, soit par une mutation/délétion, soit par une dérégulation transcriptionnelle ou traductionnelle, nous avons vérifié que cette protéine avait un rôle majeur dans la mégacaryopoïèse humaine. En inhibant totalement Bcl-x_L dans les MKs humains, nous avons montré qu'ils ne maturaient pas normalement et ne pouvaient pas former de proplaquettes. Une inhibition pharmacologique moins forte n'altérait pas la maturation mais provoquait la mortalité des MKs au moment où ils devenaient plaquetto-gènes. Enfin, la surexpression massive de Bcl-x_L dans les MKs augmentait le nombre de MKs plaquetto-gènes et leur survie. Nous avons donc recherché une dérégulation de Bcl-x_L chez des patients atteints de PTI chronique, soit non répondeurs aux traitements immunologiques, soit jamais traités, caractérisant ainsi un profil de type non-immunologique dans cette maladie. Nous n'avons pas mis en évidence de mutation dans la séquence codante de *bcl-x* mais observé une diminution de la quantité d'ARN messenger et de protéine chez certains de ces malades. Il est donc possible qu'une dérégulation de la protéine Bcl-x_L soit impliquée dans les thrombopénies chroniques, ouvrant la voie à la caractérisation potentielle d'une nouvelle maladie.

ANNEXES : présentations à des congrès

COMMUNICATIONS ORALES :

Communication orale au 54^e congrès de l'American Society of Hematology (ASH) à Atlanta le 10 décembre 2012 : Intrinsic Impairment of Platelet Production in Persistent/Chronic ITP. **Etienne Riviere**, Jean-François Viillard, Juliana Vieira-Dias, Anne-Cécile Pons, Thierry Couffinhal, Jean-Luc Pellegrin & Chloe James.

Communication orale lors du congrès de la SFH à Paris du 27 au 29 mars 2013 et du 67^e congrès de la SNFMI à Marseille du 5 au 7 juin 2013 : Altération intrinsèque de la formation des plaquettes dans le PTI persistant ou chronique. **E Rivière**, JF Viillard, J Vieira-Dias, AC Pons, T Couffinhal, JL Pellegrin, C James (Bordeaux)

Communication orale au congrès de la société française d'hématologie à Paris du 1^{er} au 3 avril 2015 :

SCO 18, présentation n°1 : BCL-XL dans les thrombopénies chroniques inexplicées. (12 - 19) **Étienne Rivière**, Xavier Pillois, Badr Kilani, Caroline Gary, Alexandre Guy, Jean-François Viillard, Chloé James (Bordeaux)

COMMUNICATION AFFICHEES

Communication affichée lors de la journée de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé de Bordeaux du 9 avril 2014 : Altération intrinsèque de la mégacaryopoïèse chez certains patients atteints d'un purpura thrombopénique immunologique persistant ou chronique. **Etienne Rivière**, Jean-François Viillard, Juliana Vieira Dias, Anne-Cécile Pons, Thierry Couffinhal, Jean-Luc Pellegrin et Chloé James.

Communications affichées au congrès de la société française d'hématologie à Paris du 1^{er} au 3 avril 2015 :

• CA168 - Rôle de la voie Wnt au cours de la mégacaryopoïèse adulte. (12 - 16)

Alexandre Guy, **Étienne Rivière**, Mathieu Pernot, Badr Kilani, Jean-François Viillard, Chloé James (Bordeaux)

• CA170 - Est-il possible d'obtenir de l'ARN plaquettaire chez des patients thrombopéniques sévères ? (12 - 22) Caroline Gary, **Étienne Rivière**, Xavier Pillois, Alexandre Guy, Dominique Breilh, Jean-François Viillard, Sarah Djabarouti, Chloé James (Bordeaux)



Start/Search

Browse by Day

Browse by Program

Browse by Author

Browse by Keyword


Personal Scheduler


ASH Meeting Home

ASH Home

-Author name in bold denotes the presenting author

-Asterisk * with author name denotes a Non-ASH member

 denotes an abstract that is clinically relevant.

 denotes that this is a recommended PHD Trainee Session .

624 Intrinsic Impairment of Platelet Production in Persistent/Chronic ITP

Program: Oral and Poster Abstracts

Type: Oral

Session: 311. Disorders of Platelet Number or Function: Immune Thrombocytopenia

Monday, December 10, 2012: 5:45 PM

Georgia Ballroom 3, Level 3, Building C (Georgia World Congress Center)

Etienne Riviere^{1,2,3*}, Jean-François Viillard, MD, PhD^{1,2,3*}, Juliana Vieira Dias, PhD^{2,3*}, Anne Cecile Pons^{4*}, Thierry Couffinhal, MD, PhD^{2,3*}, Jean-Luc Pellegrin, MD, PhD^{1*} and Chloe James, MD, PhD^{2,3,4}

¹Internal medicine department, University Hospital Center of Bordeaux, Pessac, France

²U1034, Université de Bordeaux, Pessac, France

³U1034, INSERM, Pessac, France

⁴Laboratory of hematology, University Hospital Center of Bordeaux, Pessac, France

Persistent/chronic immune thrombocytopenias (PC-ITP) are acquired thrombocytopenias characterized by a platelet count less than 100 G/L, lasting respectively more than 3 months/one year. It is a diagnosis of exclusion, and other causes of acquired thrombocytopenia such as neoplasms, infections, autoimmune diseases or drugs must have been ruled out. It is commonly admitted that the pathogenesis of ITP associates the presence of antiplatelet antibodies that bind to mature platelets, leading to their elimination by macrophages through Fc-mediated recognition mechanisms mainly in the spleen or liver, or both. These antibodies are also thought to bind to megakaryocytes impairing platelet production. Newly available TPO receptor agonists are highly effective in chronic ITP patients, with a dramatic increase in platelet count, which suggests a crucial role of altered megakaryopoiesis in this disorder. Because antiplatelet antibodies are only found in 20% of PC-ITP, we hypothesized that some of these patients might have an intrinsic defect in megakaryopoiesis rather than an immune-mediated dysmegakaryopoiesis. We thus analyzed in vitro megakaryocyte differentiation and proplatelet formation in 9 PC-ITP patients, 4 acute ITP patients (A-ITP), and 9 healthy controls (CTRL).

All PC-ITP patients had ITP criteria regarding last international consensus (Neunert C et al, Blood 2011), with a slowly progressing thrombocytopenia (76 G/L, range: 29-97) lasting more than 3 months (median: 17 months; range: 7-36 months), no anti-platelet antibodies and normal medullary density and number of megakaryocytes. All A-ITP patients also matched ITP criteria. All samples were taken at the time of diagnosis, before any treatment was administered. They were compared with 9 controls including patients undergoing valvular replacement or healthy bone marrow donors with normal blood count. To analyze whether there was a defect of megakaryopoiesis that was cell-intrinsic, we isolated CD34 positive cells from the bone marrow and analyzed in vitro megakaryocytic differentiation with TPO-mimetic romiplostim. Proliferation was measured at days 3, 6 and 10 and compared in the 3 groups by a proliferation coefficient. Membrane maturation was assessed at day 6 and 10 by flow cytometry (FC) after CD41-FITC and CD42-PE staining. Megakaryocytic ploidy was measured at day 10 by FC after propidium iodide and CD41 staining. At day 8, large mature megakaryocytes were isolated after discontinuous HSA density gradient and proplatelets forming megakaryocytes were counted from between days 9 and 13. Late mature megakaryocytes (day 12-13) were observed with a confocal microscope to qualitatively analyze proplatelet formation.

We did not observe any difference between A-ITP or PC-ITP patients and controls in term of proliferation, ploidy, or expression of surface differentiation markers (CD41, CD42). In contrast, PC-ITP-derived megakaryocytes showed a defect in proplatelet formation, as only 12% of large, mature megakaryocytes were able to form proplatelets in liquid culture at day 11 vs 37% in CTRL (p=0,046) and 39% in A-ITP (p=0,03), 11% at day 12 vs 43,2% in CTRL (p=0,024) and 46% in A-ITP (p=0,0002), and 10% at day 13 vs 44,5% in CTRL (p=0,015) and 46% in A-ITP (p=0,03). Besides, we observed that proplatelet-forming megakaryocytes from ITP patients had less proplatelets per megakaryocyte and less bifurcation per proplatelet.

In conclusion, our study shows that megakaryocytes from patients with persistent/chronic ITP have an intrinsic defect in megakaryocyte development that is independent from the medullary environment. This defect affects proplatelet formation and further investigations are now needed to better describe mechanisms underlying proplatelet alteration in this disease.

Disclosures: **Viillard:** Amgen: Honoraria, Membership on an entity's Board of Directors or advisory committees.

See more of: 311. Disorders of Platelet Number or Function: Immune Thrombocytopenia

See more of: Oral and Poster Abstracts

[<< Previous Abstract](#) | [Next Abstract](#)

*signifies non-member of ASH

AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY

2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036 | Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

[Contact Us](#) | [Terms of Service](#) | [Privacy Policy](#) | [RSS](#)

Copyright ©2011 American Society of Hematology



ABSTRACT : communication orale à la SFH/SNFMI 2013

Altération intrinsèque de la mégacaryopoïèse dans le PTI persistant ou chronique.

Etienne Riviere, Jean-François Viallard, Juliana Vieira Dias, Anne-Cécile Pons, Thierry Couffinhal, Jean-Luc Pellegrin et Chloé James

Le purpura thrombopénique immunologique (ou PTI) est une thrombopénie auto-immune acquise caractérisée par un taux de plaquettes inférieur à 100 G/L et évoluant depuis plus de 3 mois (persistant) ou 12 mois (chronique). Il s'agit d'un diagnostic d'exclusion. La physiopathologie du PTI est complexe, associant des anticorps anti-plaquettes qui peuvent également être dirigés contre les mégacaryocytes (1), et des anomalies de l'immunité cellulaire. Puisque ces auto-anticorps ne sont retrouvés au mieux que chez 50% des patients, nous avons émis l'hypothèse que certains patients diagnostiqués avec un PTI persistant ou chronique (PTI-P/C) avaient en réalité une altération intrinsèque de la mégacaryopoïèse.

Nous avons pour cela étudié la mégacaryopoïèse *in vitro* de 9 patients PTI-P/C, 4 patients atteints d'un PTI aigu (évoluant depuis moins de 3 mois, ou PTI-A), et 9 témoins. Tous les patients PTI-P/C présentaient les critères de PTI selon le consensus international (2) avec une thrombopénie modérée, en moyenne 76 G/L (29-97 G/L), évoluant depuis plus de 3 mois, en moyenne 17 mois (7-36 mois), sans anticorps anti-plaquettes détectés par ELISA ou MAIPA, avec une densité médullaire et une richesse en mégacaryocytes normales. Tous les patients PTI-A avaient une thrombopénie brutale (moins de 3 mois) et présentaient également les critères de PTI. Tous les échantillons étaient prélevés avant tout traitement spécifique. Neuf témoins étaient sélectionnés parmi des patients avec un hémogramme normal avant une chirurgie cardiaque par sternotomie ou un don de greffe de moelle osseuse.

Afin de déterminer s'il existe un défaut intrinsèque de production plaquettaire chez ces patients, nous avons purifié des cellules CD34⁺ de moelle osseuse et analysé la différenciation mégacaryocytaire sous TPO-mimétique (romiplostim). La prolifération a été comparée à J6 et J10 dans les 3 groupes. La maturation mégacaryocytaire a été évaluée par l'expression des molécules de surface CD41 et CD42 en cytométrie en flux (CF) et par la mesure en CF à J10 de la ploïdie mégacaryocytaire. A J8, après un gradient d'albumine, les mégacaryocytes ont étéensemencés dans des plaques 96 puits et les mégacaryocytes plaquetto-gènes ont été comptés tous les jours de J9 à J13 au microscope à contraste de phase. La formation des proplaquettes a été observée après marquage CD41/DAPI au microscope confocal à J13.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les patients PTI-P/C et les témoins en matière de prolifération, maturation membranaire (CD41/CD42) et ploïdie. En revanche, nous avons montré une altération de la formation des proplaquettes chez les patients PTI-P/C par rapport aux patients PTI-A et aux témoins : chez les PTI-P/C, seulement 12% de mégacaryocytes formaient des proplaquettes à J11 contre 37% chez les témoins ($p=0,046$) et 39% chez les patients PTI-A ($p=0,03$), 11% à J12 contre 43,2% chez les témoins ($p=0,024$) et 46% chez les patients PTI-A ($p=0,0002$), et 10% à J13 contre 44,5% chez les témoins ($p=0,015$) et 46% chez les patients PTI-A ($p=0,03$). Par ailleurs, les mégacaryocytes plaquetto-gènes des patients PTI-P/C formaient moins de proplaquettes avec moins d'embranchements par proplaquette au microscope confocal.

En conclusion, notre étude met en évidence un nouveau groupe de patients avec une thrombopénie acquise, modérée et peu évolutive, jusqu'alors appelés PTI Chronique, et qui présentent une anomalie intrinsèque de la mégacaryopoïèse caractérisée par une altération de la formation de proplaquettes. Nous montrons donc dans cette étude que ces patients présentent en réalité une maladie hématologique acquise et non immunologique. Restent à déterminer les mécanismes moléculaires responsables de cette anomalie de formation des proplaquettes.

(1) McMillan, R., et al. Blood 2004;103:1364–1369.

(2) Neunert, C. et al. Blood 2011;117:4190–4207.

ABSTRACT : communication orale à la SFH 2015

BCL-X_L dans les thrombopénies chroniques inexplicées

Etienne Rivière, Xavier Pillois, Badr Kilani, Caroline Gary, Alexandre Guy, Jean-François Viillard, et Chloé James

Le démantèlement nosologique des thrombopénies chroniques reste un challenge à l'heure actuelle malgré les considérables avancées réalisées dans ce domaine dans les 30 dernières années. Il a été montré en 2007 chez la souris que la durée de vie des plaquettes était régulée par une horloge moléculaire faisant intervenir un inhibiteur de l'apoptose, BCL-X_L (ou BCL2L1), et deux activateurs, BAK et BAX (Mason et al, Cell, 2007). Ce même travail décrivait des souris avec des mutations constitutionnelles de *BCL-X*, qui ne présentaient qu'une thrombopénie isolée. Ces mutations avaient pour conséquence la production d'une protéine BCL-X_L instable. Notre hypothèse est que, chez des patients présentant des thrombopénies chroniques, *BCL-X* pourrait être la cible de mutations. Ainsi une mutation constitutionnelle de BCL-X_L expliquerait certaines thrombopénies congénitales et une mutation acquise certaines thrombopénies chroniques.

Nous avons donc réalisé une étude visant à dépister des mutations dans le gène *BCL-X* (ou *BCL2L1*) par *high resolution melting* (HRM) pour tenter d'expliquer certaines thrombopénies chroniques. Le dépistage des mutations a été réalisé sur de l'ADN issu de polynucléaires neutrophiles ou de cellules CD34- de moelle osseuse par HRM sur un Lightcycler96 de Roche selon les recommandations du fabricant. Une possible mutation dépistée en HRM a systématiquement été vérifiée par séquençage selon la méthode de Sanger. Tous les patients ont signé un consentement éclairé en accord avec la déclaration de Helsinki.

Au total, 105 patients avec un taux de plaquettes stable de façon prolongée, et non préalablement traités, ont été inclus et répartis en 2 groupes selon les critères suivants :

- 1- 68 patients avec une thrombopénie acquise considérée comme auto-immune primitive (PTI) selon les recommandations en vigueur (Rodeghiero, Blood, 2009) ;
- 2- 37 patients avec une thrombopénie congénitale, c'est-à-dire des patients n'ayant jamais eu un taux de plaquettes normal ou ayant un membre de leur famille également thrombopénique, et sans aucune autre cause de thrombopénie congénitale connue retrouvée (MYH9, Wiskott-Aldrich, Bernard-Soulier, TAR syndrome etc.)

Les exons, la jonction intron/exon, ou les régions 3' ou 5' non traduites ont été analysées.

Aucune mutation n'a été détectée chez ces patients.

Les résultats obtenus chez la souris montrent que les protéines BCL-X_L, BAK et BAX régulent la durée de vie des plaquettes : la quantité de BCL-X_L intraplaquettaire devient de moins en moins importante au fil des jours, relâchant BAK et BAX qui perméabilisent la mitochondrie et déclenchent l'apoptose de la plaquette sénescence (Mason et al, Cell, 2007). Nous n'observons pas de mutation de *BCL-X* dans notre cohorte de patients. Cela n'élimine pas l'hypothèse que BCL-X_L puisse être diminuée dans les plaquettes, notamment par des mécanismes post transcriptionnels.

Altération intrinsèque de la mégacaryopoïèse chez certains patients atteints d'un purpura thrombopénique immunologique persistant ou chronique.

Etienne Rivière^{1,2,3}, Jean-François Viillard^{1,2,3}, Juliana Vieira Dias^{2,3}, Anne-Cécile Pons⁴, Thierry Couffinhal^{2,3}, Jean-Luc Pellegrin¹ et Chloé James^{2,3,4}
 1 Service de médecine interne, CHU de Bordeaux, Pessac, France; 2 U1034, Université de Bordeaux, Pessac, France; 3 U1034, INSERM, Pessac, France; 4 Laboratoire d'hématologie, CHU de Bordeaux, Pessac, France

INTRODUCTION

Le purpura thrombopénique immunologique (ou PTI) est une thrombopénie auto-immune acquise caractérisée par un taux de plaquettes inférieur à 100 G/L et évoluant depuis plus de 3 mois (persistant) ou 12 mois (chronique). Il s'agit d'un diagnostic d'exclusion. La physiopathologie du PTI est complexe, associant parfois des anticorps antiplaquettes qui peuvent également être dirigés contre les mégacaryocytes, et des anomalies de l'immunité cellulaire. Cependant elle reste encore largement incomprise. Puisque ces auto-anticorps ne sont retrouvés au mieux que chez 50% des patients, nous avons émis l'hypothèse que certains patients diagnostiqués avec un PTI persistant ou chronique (PTI-P/C) avaient en réalité une altération intrinsèque de la mégacaryopoïèse.

MATERIEL & METHODES

Neuf patients PTI-P/C, 4 patients atteints d'un PTI aigu (évoluant depuis moins de 3 mois, ou PTI-A), non traités, et 9 témoins ont été inclus. Tous les patients PTI-P/C et PTI-A présentaient les critères de PTI selon le consensus international. Tous les patients PTI-A avaient une thrombopénie brutale (moins de 3 mois) et tous les critères de PTI. Neuf témoins avaient donné leur consentement pour un prélèvement avant une chirurgie cardiaque par sternotomie ou un don de greffe de moelle osseuse. Une étude in vitro de la mégacaryopoïèse de ces patients a été effectuée à partir de leurs cellules CD34+ de moelle osseuse en milieu liquide sous TPO-mimétique (romiplostim) pendant 13 jours. L'expression des molécules de surface CD41 et CD42 à J6 et J10 et la ploïdie mégacaryocytaire à J10 ont été évaluées en cytométrie en flux. A J8, après un gradient d'albumine, les mégacaryocytes ont été ensemencés dans des plaques 96 puits et les mégacaryocytes plaquettoïques ont été comptés tous les jours de J9 à J13 au microscope à contraste de phase. La formation des proplaquettes a été observée après marquage CD41/DAPI au microscope confocal à J13.

RESULTATS

Patient	Age at diagnosis	Sex	Medical history	Medication	Year of last-known normal platelet count	Initial platelet count	Date of diagnosis	Evolution Length (months)	Bone marrow examination	Antiplatelet antibodies (ELISA/IFA/PA)
PTIC1	53	Female	Gonarthrosis	NSAID on demand	2009	76	06/07/11	21	Normal	Negative
PTIC2	59	Female	None	None	2009	90	23/02/11	36	Normal	Negative
PTIC3	79	Female	Bilateral knee prosthesis, appendicitis, arterial hypertension, vertigo	NSAID during 1 month 3 months before diagnosis, zolpidem, lercanidipin, nebivolol, escitalopram, paracetamol	2009	39	01/02/11	24	Normal	Negative
PTIC4	23	Female	Psychiatric troubles	Orlistat, amoxicillin for Proteus Mirabilis urinary tract infection one week before diagnosis	2008	91	03/02/11	37	Normal	Negative
PTIC5	52	Male	Type 2 diabetes under dietary control only, cured hepatitis B ten years before diagnosis, depression	Praxapram, escitalopram	2010	88	10/01/11	12	Normal	Negative
PTIC6	70	Male	None	None	2010	90	05/04/11	13	Normal	Negative
PTIC7	66	Male	Hepatic steatosis, arterial hypertension, hypercholesterolemia, dyslipidemia, non explored moderate chronic renal failure	None	2009	96	22/03/11	24	Normal	Negative
PTIC8	59	Female	Hypertension and ovulation (myomas), maxillar cyst	None	2011	78	23/01/12	13	Normal	Negative
PTIC9	49	Male	Arterial hypertension, obesity, hepatic steatosis	Perindopril, indapamide	1998	100	03/07/12	168	Normal	Negative
PTIA1	26	Female	None	None	2012	34	14/03/12	1	Normal	Positive
PTIA2	76	Male	Silent for acute coronary syndrome in 1996, COPD with tobacco abuse, alcoholic cirrhosis and actual bulbar ulcer with hi, pylori	Progabralon, furosemide, amoxicillin, clarithromycin	2012	16	21/03/12	1	Normal	Positive
PTIA3	51	Male	None	None	2012	22	23/03/12	1	Normal	Positive
PTIA4	32	Female	None	None	2012	1	09/05/12	1	Normal	Negative

Tableau 1. Résumé des caractéristiques clinico-biologiques des patients et des témoins.

Tous les patients PTI-P/C avaient une thrombopénie acquise modérée, en moyenne 76 G/L (29-97 G/L), évoluant depuis plus de 3 mois, en moyenne 17 mois (7-36 mois), sans anticorps antiplaquettes, avec une densité médullaire et une richesse en mégacaryocytes normales.

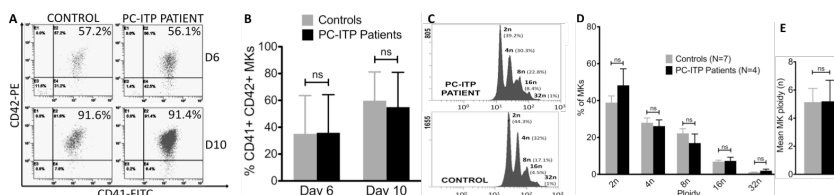


Figure 1. Caractérisation de la maturation mégacaryocytaire des patients et des témoins.

A- Analyse de la maturation mégacaryocytaire par l'expression des glycoprotéines GPIIb/IIIa (CD41a) et GPIb/IX (CD42) en cytométrie de flux à J6 et J10 chez un patient et un témoin. B- Pourcentages moyens de mégacaryocytes (MK) CD41⁺CD42⁺ chez les patients et les témoins à J6 et J10. C- Mesure en cytométrie de flux de la ploïdie mégacaryocytaire chez un patient et un témoin, après marquage CD41-FITC et iode de propidium. D- Pourcentages respectifs de ploïdie chez les patients et les témoins. (E) Ploïdie moyenne mégacaryocytaire des patients comparée à celle des témoins.

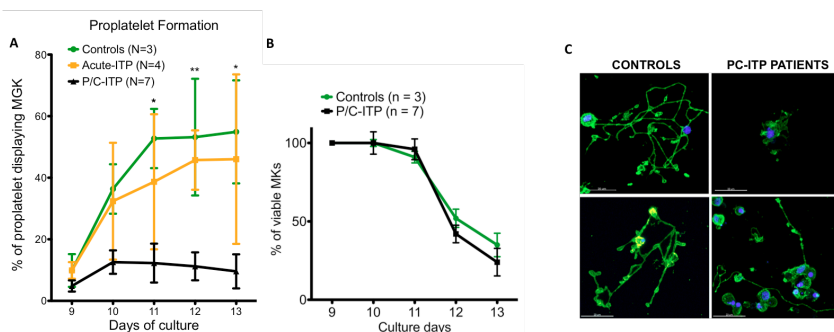


Figure 2. Caractérisation de la formation des proplaquettes chez les patients PTI-P/C ou PTI-A et les témoins.

A- Analyse de la formation des proplaquettes en plaque 96 puits au microscope optique (10X, test de Kruskal-Wallis). B- Viabilité des MK de J9 à J13 chez les patients PTI-P/C et les témoins. C- Formation des proplaquettes au microscope confocal après marquage CD41 et DAPI, chez les patients PTI-P/C et les témoins.

DISCUSSION

Nous n'avons donc pas observé de différence significative entre les patients PTI-P/C et les témoins en matière de prolifération, maturation membranaire (CD41/CD42) et ploïdie. En revanche, nous avons montré une altération de la formation des proplaquettes chez les patients PTI-P/C par rapport aux patients PTI-A et aux témoins avec moins de mégacaryocytes plaquettoïques chez les patients PTI-P/C. Par ailleurs, les mégacaryocytes plaquettoïques des patients PTI-P/C formaient moins de proplaquettes avec moins d'embranchements par proplaquette au microscope confocal.

CONCLUSION

Notre étude met en évidence un nouveau groupe de patients avec une thrombopénie acquise, modérée et peu évolutive, jusqu'alors appelés PTI chronique, et qui présentent une anomalie intrinsèque de la mégacaryopoïèse caractérisée par une altération de la formation de proplaquettes. Nous montrons donc dans cette étude que ces patients présentent en réalité une maladie hématologique acquise et non immunologique. Reste à déterminer les mécanismes moléculaires responsables de cette anomalie de formation des proplaquettes.

Communication affichée n°168 à la SFH 2015

Inserm

Institut national de la santé et de la recherche médicale

université de BORDEAUX

Implication de la voie Wnt au cours de la mégacaryopoïèse

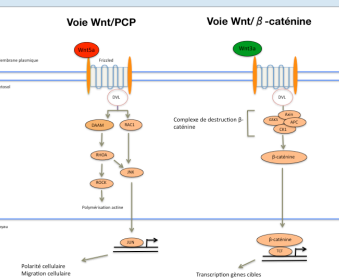
Alexandre Guy^{1,2}, Etienne Rivière^{1,2}, Mathieu Pernot^{1,2}, Badr Kilani^{1,2}, Jean François Viallard^{1,2}, Chloé James^{1,2,3}

1. Université de Bordeaux, Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, U1034, F-33600 Pessac, France
2. INSERM, Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, U1034, F-33600, Pessac, France
3. CHU de Bordeaux, Laboratoire d'hématologie, F-33600 Pessac, France



Introduction

La voie Wnt est impliquée dans de nombreux aspects du développement embryonnaire et dans de nombreux processus homéostatiques. Cette voie est nécessaire à la formation et à la fonction de nombreuses cellules sanguines. Wnt3a est le principal ligand activateur de la voie Wnt/ β -caténine, tandis que Wnt5a est le principal ligand de la voie Wnt/PCP. Dans de nombreuses cellules, il existe un antagonisme entre ces deux voies. Des études récentes suggèrent un rôle de la voie Wnt au sein des plaquettes humaines et au cours de la mégacaryopoïèse. En 2013, Macaulay et al. ont montré que la voie Wnt était fonctionnelle au sein d'une lignée mégacaryocytaire. Egalement, les auteurs mettaient en évidence un rôle de la voie Wnt dans la formation des pro-plaquettes: diminution de celle-ci lors de l'altération d'un récepteur de la voie Wnt (LRP6), et activation en présence de Wnt3a. Cependant, les études publiées sur le rôle de la voie Wnt dans la mégacaryopoïèse s'intéressaient principalement à des mégacaryocytes (MK) humains dérivés de sangs de cordon ainsi qu'à des mégacaryocytes murins dérivés de cellules souches hématopoïétiques (CSH) de foie fœtal, donc à la mégacaryopoïèse embryonnaire. Sachant que la voie Wnt a un rôle majeur au cours du développement, et que la mégacaryopoïèse embryonnaire diffère de la mégacaryopoïèse adulte, nous nous sommes demandé si son rôle était également important au cours de la mégacaryopoïèse adulte.

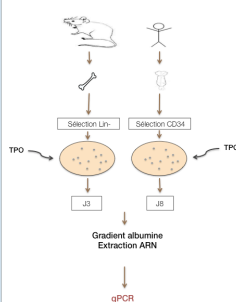


Objectifs

Confirmer le rôle de la voie Wnt au cours de la mégacaryopoïèse adulte, chez la souris et chez l'homme.

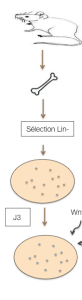
- Mise en évidence par qPCR des composants des voies Wnt/PCP et Wnt/ β -caténine dans des MK murins adultes et dans des MK humains adultes
- Etudier la formation de pro-plaquettes dans des MK murins adultes en présence des ligands activateurs des voies Wnt/PCP et Wnt/ β -caténine: respectivement Wnt5a et Wnt3a.

Recherche de composants Wnt par qPCR



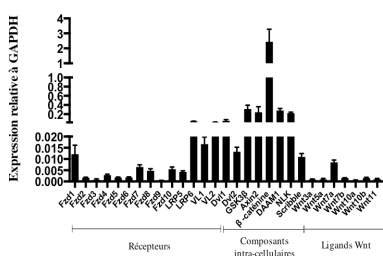
Chez la souris, les os sont prélevés et une sélection des cellules Lin⁻ est effectuée par tri magnétique. Ces cellules Lin⁻ sont mises en culture pour une différenciation mégacaryocytaire. A J3, les mégacaryocytes sont isolés sur gradient d'albumine pour une extraction d'ARN. Chez l'homme, des prélèvements médullaires ont été réalisés puis nous avons sélectionné les cellules CD34+ pour mise en culture. Les MK ont été isolés à J8 avant d'effectuer une extraction d'ARN.

Etude de l'effet de la voie Wnt sur la formation de pro-plaquettes

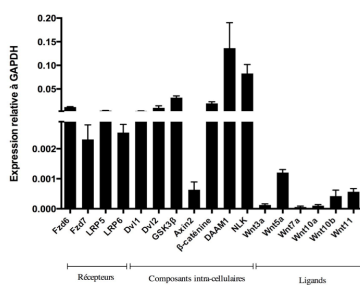


Après mise en culture des cellules Lin⁻ pour différenciation mégacaryocytaire, les MK sont sélectionnés par gradient d'albumine et mis en culture dans différentes conditions: en présence de Wnt3a, en présence de Wnt5a, en présence des deux ligands, ou en absence de ces deux ligands. La formation des pro-plaquettes a été étudiée à J5 et J6 dans les différentes conditions.

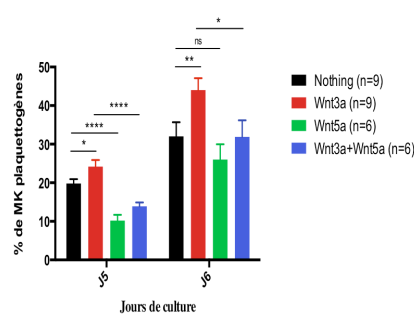
Résultats



Expression des composants de la voie Wnt dans les mégacaryocytes (MK) murins adultes. Nous avons identifié de nombreux composants de la voie Wnt dans des MK murins dérivés de cellules Lin⁻. La majorité des récepteurs de la voie Wnt sont présents, tout comme de nombreux composants intra-cellulaires. Enfin, nous avons identifié certains ligands Wnt dans ces MK.



Expression des composants de la voie Wnt dans les MK humains adultes. Dans des MK humains dérivés de cellules CD34+, nous retrouvons plusieurs composants de la voie Wnt. Les composants des deux voies principales (Wnt/ β -caténine, Wnt/PCP) sont représentés au sein de ces MK humains adultes.



Etude de l'effet de Wnt3a et Wnt5a sur la formation de pro-plaquettes chez la souris. En présence de Wnt3a, ligand principal de la voie Wnt/ β -caténine, les MK murins ont une formation des pro-plaquettes augmentée. Il semble que l'activation de la voie Wnt/PCP par Wnt5a, inhibe la formation des pro-plaquettes. Ces résultats suggèrent que la voie Wnt est fonctionnelle dans les MK murins adultes.

Conclusion

Au total, nous confirmons la présence de la voie Wnt dans des mégacaryocytes adultes humains et murins. De plus, nous retrouvons un effet pro-plaquetto-gène induit par l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Ces résultats suggèrent que la voie Wnt serait impliquée dans la régulation de la mégacaryopoïèse adulte.

Introduction

A ce jour, la présence d'ARN et de machinerie traductionnelle dans les plaquettes est discutée, et il semble qu'il y ait très peu d'ARN dans les plaquettes¹. Cependant l'étude de l'expression génique plaquettaire permettrait de mieux comprendre les pathologies plaquettaires. L'objectif de ce travail est la **mise au point d'une méthode de purification plaquettaire permettant de s'affranchir des leucocytes et d'obtenir une quantité d'ARN plaquettaire suffisante.**

Matériels et méthodes

Le sang total est prélevé sur tube ACDA (témoin : 20 à 30 ml, patient thrombopénique : 80 à 120ml). A partir du plasma riche en plaquettes (PRP) préalablement lavé, les plaquettes sont purifiées selon la méthode décrite sur la Figure 1².

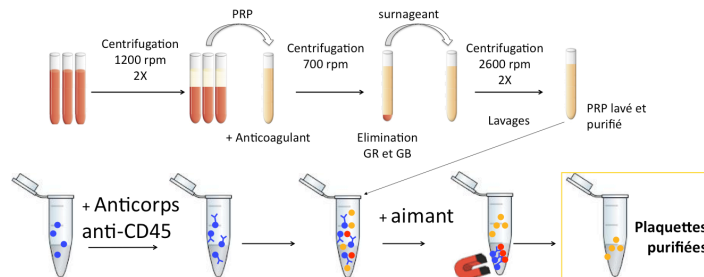


Figure 1. Déplétion en leucocytes (•) de plasma riche en plaquettes PRP à l'aide de billes magnétiques (•) (Dynabead Invitrogen®, Lifetechnologies) couplées à l'anticorps anti-CD45 (•) (purified mouse anti-human CD45 BD biosciences).

Les plaquettes purifiées sont lysées en trizol, et l'ARN extrait converti en ADNc. Une **PCR quantitative est réalisée relative à PPIA** (gène de ménage). Deux gènes sont étudiés :

↳ **GPIIB** (fortement et uniquement exprimé dans les plaquettes) :

témoin de la présence d'ARN plaquettaire.

↳ **CXCR4** (fortement exprimé dans les leucocytes) :

témoin de la contamination d'ARN leucocytaire³.

Résultats

Population :

- ↳ **10 témoins**, avec un taux de plaquettes normal
- ↳ **5 patients thrombopéniques** avec un **taux de plaquettes médian de 38 (±19) G/L**

Dosage ARN: (médiane [Q1;Q3])

- ↳ **Chez les témoins : 1492 ng [1237 ; 3013], ratio (260/280) 1.96**
- ↳ **Chez les patients thrombopéniques : 1260 ng [900 ; 7750], ratio (260/280) 2.11.**

Quantification GPIIB et CXCR4 : (moyenne (± écart type) ratios gène d'intérêt/PPIA)

↳ Chez les témoins, la moyenne **GPIIB/PPIA est à 2.35 (± 1,7)** ; elle est significativement différente de celle de **CXCR4/PPIA qui est à 0.028 (± 0,02)** [p<0.0001, test de Mann Whitney]. [Figure 2A]

↳ Chez les patients thrombopéniques, la moyenne **GPIIB/PPIA est à 7,25 (± 5,7)** ; elle est significativement différente de celle de **CXCR4/PPIA qui est à 0.26 (± 0,52)** [p<0.0079, test de Mann Whitney]. [Figure 2B]

Les rapports médians des ratios de **GPIIB/CXCR4** sont donc très supérieur à 1 (respectivement 112 et 137), **témoignant d'une quantification de l'ARN issu des plaquettes**. Par ailleurs, **CXCR4** a récemment été mis en évidence à la surface des plaquettes³, ce qui signifie que la quantification de **CXCR4** pourrait éventuellement être issue des plaquettes et non des leucocytes.

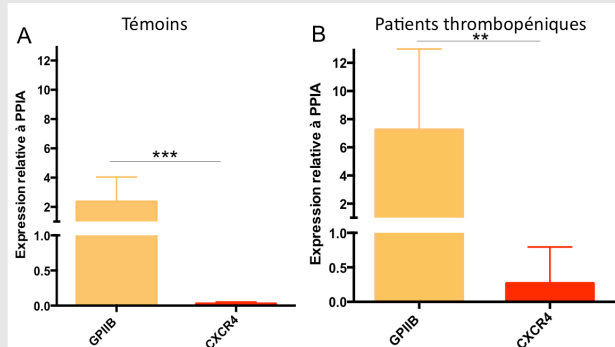


Figure 2 : Quantification relative à PPIA de l'ARNm de GPIIB (orange) et CXCR4 (rouge) dans les plaquettes purifiées
A. chez des témoins. B. chez des patients thrombopéniques

Notre technique de purification plaquettaire a permis d'obtenir un échantillon de plaquettes suffisamment purifiées pour obtenir de l'ARN strictement plaquettaire et ce en quantité suffisante.

¹ C. Angélieux et al. RNA in platelets, no more than a relic. European Platelet Network EUPLAN. 2014

² S. Amisten A rapid and efficient platelet purification protocol for platelet gene expression studies. Methods Mol Bio 2012

³ Rath D et al. Platelet surface expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 is associated with clinical outcomes in patients with coronary artery disease. J Thromb Haemost. 2015

BIBLIOGRAPHIE

1. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007;317(5845):1767–70.
2. Harker LA, Finch CA. Thrombokinetik in man. *J Clin Invest* 1969;48(6):963–74.
3. Radley JM, Haller CJ. Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br J Haematol* 1983;53(2):277–87.
4. Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, Srour EF, Hoffman R. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* 1989;74(1):145–51.
5. Hamada T, Möhle R, Hesselgesser J, et al. Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J Exp Med* 1998;188(3):539–48.
6. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol* 2010;191(4):861–74.
7. Handagama PJ, Feldman BF, Jain NC, Farver TB, Kono CS. Circulating proplatelets: isolation and quantitation in healthy rats and in rats with induced acute blood loss. *Am J Vet Res* 1987;48(6):962–5.
8. Raslova H, Roy L, Vourc'h C, et al. Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood* 2003;101(2):541–4.
9. Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, et al. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* 2002;99(3):888–97.
10. Ebbe S, Stohlman F. MEGAKARYOCYTOPOIESIS IN THE RAT. *Blood* 1965;26:20–35.
11. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, et al. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* 1998;91(10):3711–23.
12. Odell TT, Jackson CW. Polyploidy and maturation of rat megakaryocytes. *Blood* 1968;32(1):102–10.
13. Geddis AE, Fox NE, Tkachenko E, Kaushansky K. Endomitotic megakaryocytes that form a bipolar spindle exhibit cleavage furrow ingression followed by furrow regression. *Cell Cycle Georget Tex* 2007;6(4):455–60.
14. Lordier L, Jalil A, Aurade F, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* 2008;112(8):3164–74.
15. Maupin P, Phillips CL, Adelstein RS, Pollard TD. Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 11):3077–90.
16. Glotzer M. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 2005;307(5716):1735–9.
17. Wadsworth P. Cytokinesis: Rho marks the spot. *Curr Biol CB* 2005;15(21):R871–4.
18. Piekny A, Werner M, Glotzer M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol* 2005;15(12):651–8.
19. Gao Y, Smith E, Ker E, et al. Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev Cell* 2012;22(3):573–84.
20. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun* 2012;3:717.

21. Mazharian A, Mori J, Wang Y-J, et al. Megakaryocyte-specific deletion of the protein-tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 causes abnormal megakaryocyte development, platelet production, and function. *Blood* 2013;121(20):4205–20.
22. Lordier L, Chang Y, Jalil A, et al. Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. *Blood* 2010;116(13):2345–55.
23. Gilles L, Guièze R, Bluteau D, et al. P19INK4D links endomitotic arrest and megakaryocyte maturation and is regulated by AML-1. *Blood* 2008;111(8):4081–91.
24. Italiano JE Jr, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost JTH* 2003;1(6):1174–82.
25. Breton-Gorius J, Reyes F. Ultrastructure of human bone marrow cell maturation. *Int Rev Cytol* 1976;46:251–321.
26. Larsen TE. Emperipolesis of granular leukocytes within megakaryocytes in human hemopoietic bone marrow. *Am J Clin Pathol* 1970;53(4):485–9.
27. Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol* 2010;47(3):220–6.
28. Tronik-Le Roux D, Roullot V, Schweitzer A, Berthier R, Marguerie G. Suppression of erythro-megakaryocytopoiesis and the induction of reversible thrombocytopenia in mice transgenic for the thymidine kinase gene targeted by the platelet glycoprotein alpha IIb promoter. *J Exp Med* 1995;181(6):2141–51.
29. Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins: a historical review. *Semin Thromb Hemost* 2014;40(5):577–84.
30. Debili N, Robin C, Schiavon V, et al. Different expression of CD41 on human lymphoid and myeloid progenitors from adults and neonates. *Blood* 2001;97(7):2023–30.
31. López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998;91(12):4397–418.
32. Andrews RK, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome: an update. *Semin Thromb Hemost* 2013;39(6):656–62.
33. Leven RM. Megakaryocyte motility and platelet formation. *Scanning Microsc* 1987;1(4):1701–9.
34. Leven RM, Yee MK. Megakaryocyte morphogenesis stimulated in vitro by whole and partially fractionated thrombocytopenic plasma: a model system for the study of platelet formation. *Blood* 1987;69(4):1046–52.
35. Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci* 1990;97 (Pt 1):59–70.
36. Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995;85(2):402–13.
37. Italiano JE, 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):1299–312.
38. Tavassoli M, Aoki M. Localization of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood Cells* 1989;15(1):3–14.
39. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004;10(1):64–71.

40. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 1976;145(2):183–205.
41. Schulze H, Korpál M, Hurov J, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 2006;107(10):3868–75.
42. Chen Y, Aardema J, Kale S, et al. Loss of the F-BAR protein CIP4 reduces platelet production by impairing membrane-cytoskeleton remodeling. *Blood* 2013;122(10):1695–706.
43. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* 2014;123(6):921–30.
44. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 2005;115(12):3348–54.
45. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, et al. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 2005;106(13):4076–85.
46. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* 2008;111(9):4605–16.
47. Sabri S, Jandrot-Perrus M, Bertoglio J, et al. Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by $\alpha 2\beta 1$ integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood* 2004;104(10):3117–25.
48. Pan J, Lordier L, Meyran D, et al. The formin DIAPH1 (mDia1) regulates megakaryocyte proplatelet formation by remodeling the actin and microtubule cytoskeletons. *Blood* 2014;124(26):3967–77.
49. Chang Y, Auradé F, Larbret F, et al. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood* 2007;109(10):4229–36.
50. Suzuki A, Shin J-W, Wang Y, et al. RhoA is essential for maintaining normal megakaryocyte ploidy and platelet generation. *PloS One* 2013;8(7):e69315.
51. Kunishima S, Saito H. Advances in the understanding of MYH9 disorders. *Curr Opin Hematol* 2010;17(5):405–10.
52. Gieger C, Radhakrishnan A, Cvejic A, et al. New gene functions in megakaryopoiesis and platelet formation. *Nature* 2011;480(7376):201–8.
53. Shi DS, Smith MCP, Campbell RA, et al. Proteasome function is required for platelet production. *J Clin Invest* 2014;124(9):3757–66.
54. 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):453–66.
55. Hanson SR, Slichter SJ. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood* 1985;66(5):1105–9.
56. Gernsheimer T. Pathophysiology and thrombokines in autoimmune thrombocytopenia. *Blood Rev* 2002;16(1):7–8.
57. Dettke M, Hlousek M, Kurz M, et al. Increase in endogenous thrombopoietin in healthy donors after automated plateletpheresis. *Transfusion* 1998;38(5):449–53.
58. Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM, et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371(9610):395–403.
59. Bussel JB, Cheng G, Saleh MN, et al. Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2007;357(22):2237–47.

60. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005;121(2):295–306.
61. Debili N, Coulombel L, Croisille L, et al. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* 1996;88(4):1284–96.
62. Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(18):11872–7.
63. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 2005;15(3):146–55.
64. Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 2006;134(5):453–66.
65. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 2004;10(3):299–304.
66. Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* 2003;101(11):4333–41.
67. Huang H, Yu M, Akie TE, et al. Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development. *Mol Cell Biol* 2009;29(15):4103–15.
68. Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, Graf T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* 2000;95(8):2543–51.
69. Chou ST, Khandros E, Bailey LC, et al. Graded repression of PU.1/Sfpi1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood* 2009;114(5):983–94.
70. Eisbacher M, Holmes ML, Newton A, et al. Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol Cell Biol* 2003;23(10):3427–41.
71. Starck J, Cohet N, Gonnet C, et al. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol Cell Biol* 2003;23(4):1390–402.
72. Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, et al. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 2000;20(15):5643–52.
73. Raslova H, Komura E, Le Couédic JP, et al. FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *J Clin Invest* 2004;114(1):77–84.
74. Yamada H, Sekikawa T, Iwase S, et al. Segregation of megakaryocytic or erythroid cells from a megakaryocytic leukemia cell line (JAS-R) by adhesion during culture. *Leuk Res* 2007;31(11):1537–43.
75. Hodge D, Coghill E, Keys J, et al. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood* 2006;107(8):3359–70.
76. Drissen R, von Lindern M, Kolbus A, et al. The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. *Mol Cell Biol* 2005;25(12):5205–14.
77. Frontelo P, Manwani D, Galdass M, et al. Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. *Blood* 2007;110(12):3871–80.

78. Bouilloux F, Juban G, Cohet N, et al. EKLf restricts megakaryocytic differentiation at the benefit of erythrocytic differentiation. *Blood* 2008;112(3):576–84.
79. Metcalf D, Carpinelli MR, Hyland C, et al. Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. *Blood* 2005;105(9):3480–7.
80. Zarif MN, Soleimani M, Abolghasemi H, Amirizade N, Arefian E, Rahimian A. Megakaryocytic differentiation of CD133+ hematopoietic stem cells by down-regulation of microRNA-10a. *Hematol Amst Neth* 2013;18(2):93–100.
81. Muntean AG, Pang L, Poncz M, Dowdy SF, Blobel GA, Crispino JD. Cyclin D-Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization. *Blood* 2007;109(12):5199–207.
82. Chagraoui H, Kassouf M, Banerjee S, et al. SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis. *Blood* 2011;118(3):723–35.
83. Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, et al. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 1995;81(5):695–704.
84. Lecine P, Villeval JL, Vyas P, Swencki B, Xu Y, Shivdasani RA. Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood* 1998;92(5):1608–16.
85. Lecine P, Italiano JE, Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* 2000;96(4):1366–73.
86. Tiwari S, Italiano JE, Barral DC, et al. A role for Rab27b in NF-E2-dependent pathways of platelet formation. *Blood* 2003;102(12):3970–9.
87. Kerrigan SW, Gaur M, Murphy RP, Shattil SJ, Leavitt AD. Caspase-12: a developmental link between G-protein-coupled receptors and integrin alphaIIb beta3 activation. *Blood* 2004;104(5):1327–34.
88. Nagata Y, Yoshikawa J, Hashimoto A, Yamamoto M, Payne AH, Todokoro K. Proplatelet formation of megakaryocytes is triggered by autocrine-synthesized estradiol. *Genes Dev* 2003;17(23):2864–9.
89. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol CB* 2001;11(8):579–86.
90. Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood* 2009;113(2):458–61.
91. Shiraga M, Ritchie A, Aidoudi S, et al. Primary megakaryocytes reveal a role for transcription factor NF-E2 in integrin alpha IIb beta 3 signaling. *J Cell Biol* 1999;147(7):1419–30.
92. Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, et al. AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 2008;283(44):30045–56.
93. Sevinsky JR, Whalen AM, Ahn NG. Extracellular signal-regulated kinase induces the megakaryocyte GPIIb/CD41 gene through MafB/Kreisler. *Mol Cell Biol* 2004;24(10):4534–45.
94. Romania P, Lulli V, Pelosi E, Biffoni M, Peschle C, Marziali G. MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors. *Br J Haematol* 2008;143(4):570–80.

95. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 2008;205(3):585–94.
96. Lu J, Guo S, Ebert BL, et al. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell* 2008;14(6):843–53.
97. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol* 1958;20(6):350–5.
98. Wendling F, Varlet P, Charon M, Tambourin P. MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. *Virology* 1986;149(2):242–6.
99. Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 1990;63(6):1137–47.
100. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, et al. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(12):5640–4.
101. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994;369(6481):565–8.
102. Harker LA, Marzec UM, Hunt P, et al. Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. *Blood* 1996;88(2):511–21.
103. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;369(6481):568–71.
104. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 1994;265(5177):1445–7.
105. Kuter DJ, Beeler DL, Rosenberg RD. The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(23):11104–8.
106. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005;115(12):3339–47.
107. Kirito K, Kaushansky K. Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol* 2006;13(3):151–6.
108. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nuñez G, Fernández-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 1996;88(5):1576–82.
109. Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1996;87(12):4998–5005.
110. Kirito K, Fox N, Kaushansky K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;102(9):3172–8.
111. Kirito K, Fox N, Kaushansky K. Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: potential mechanism by which the hormone favorably affects hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 2004;24(15):6751–62.

112. Kirito K, Fox N, Komatsu N, Kaushansky K. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1 α . *Blood* 2005;105(11):4258–63.
113. Odell TT, McDONALD TP, Detwiler TC. Stimulation of platelet production by serum of platelet-depleted rats. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* 1961;108:428–31.
114. Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995;85(10):2720–30.
115. Bartocci A, Mastrogiannis DS, Migliorati G, Stockert RJ, Wolkoff AW, Stanley ER. Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(17):6179–83.
116. McCarty JM, Sprugel KH, Fox NE, Sabath DE, Kaushansky K. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* 1995;86(10):3668–75.
117. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996;87(10):4068–71.
118. de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 1996;183(2):651–6.
119. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(16):5884–9.
120. Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* 1997;89(1):101–7.
121. Wolber EM, Jelkmann W. Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res* 2000;20(5):499–506.
122. Wolber EM, Fandrey J, Frackowski U, Jelkmann W. Hepatic thrombopoietin mRNA is increased in acute inflammation. *Thromb Haemost* 2001;86(6):1421–4.
123. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001;98(9):2720–5.
124. Mouthon MA, Vandamme M, Gourmelon P, Vainchenker W, Wendling F. Preferential liver irradiation enhances hematopoiesis through a thrombopoietin-independent mechanism. *Radiat Res* 1999;152(4):390–7.
125. McIntosh B, Kaushansky K. Transcriptional regulation of bone marrow thrombopoietin by platelet proteins. *Exp Hematol* 2008;36(7):799–806.
126. Solanilla A, Déchanet J, Andaloussi A El, et al. CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells. *Blood* 2000;95(12):3758–64.
127. Sungaran R, Chisholm OT, Markovic B, Khachigian LM, Tanaka Y, Chong BH. The role of platelet alpha-granular proteins in the regulation of thrombopoietin messenger RNA expression in human bone marrow stromal cells. *Blood* 2000;95(10):3094–101.

128. Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med* 2015;21(1):47-54.
129. Scott CL, Robb L, Mansfield R, Alexander WS, Begley CG. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is not responsible for residual thrombopoiesis in mpl null mice. *Exp Hematol* 2000;28(9):1001-7.
130. Chen Q, Solar G, Eaton DL, de Sauvage FJ. IL-3 does not contribute to platelet production in c-Mpl-deficient mice. *Stem Cells Dayt Ohio* 1998;16 Suppl 2:31-6.
131. Asano S, Okano A, Ozawa K, et al. In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood* 1990;75(8):1602-5.
132. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, et al. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 1989;74(4):1241-4.
133. van Gameren MM, Willemse PH, Mulder NH, et al. Effects of recombinant human interleukin-6 in cancer patients: a phase I-II study. *Blood* 1994;84(5):1434-41.
134. Williams N, De Giorgio T, Banu N, Withy R, Hirano T, Kishimoto T. Recombinant interleukin 6 stimulates immature murine megakaryocytes. *Exp Hematol* 1990;18(1):69-72.
135. Mei RL, Burstein SA. Megakaryocytic maturation in murine long-term bone marrow culture: role of interleukin-6. *Blood* 1991;78(6):1438-47.
136. Avraham H, Vannier E, Cowley S, et al. Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells. *Blood* 1992;79(2):365-71.
137. Ebbe S, Phalen E, Stohlman F. Abnormalities of megakaryocytes in S1-S1d mice. *Blood* 1973;42(6):865-71.
138. Ramsfjell V, Borge OJ, Veiby OP, et al. Thrombopoietin, but not erythropoietin, directly stimulates multilineage growth of primitive murine bone marrow progenitor cells in synergy with early acting cytokines: distinct interactions with the ligands for c-kit and FLT3. *Blood* 1996;88(12):4481-92.
139. Piacibello W, Garetto L, Sanavio F, et al. The effects of human FLT3 ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol* 1996;24(2):340-6.
140. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185(1):111-20.
141. Wang JF, Liu ZY, Groopman JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* 1998;92(3):756-64.
142. Kuter DJ, Gminski DM, Rosenberg RD. Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood* 1992;79(3):619-26.
143. Jeanpierre S, Nicolini FE, Kaniewski B, et al. BMP4 regulation of human megakaryocytic differentiation is involved in thrombopoietin signaling. *Blood* 2008;112(8):3154-63.
144. Fattovich G, Giustina G, Favaro S, Ruol A. A survey of adverse events in 11,241 patients with chronic viral hepatitis treated with alfa interferon. *J Hepatol* 1996;24(1):38-47.
145. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2011;29(5):573-82.

146. Olson TA, Levine RF, Mazur EM, Wright DG, Salvado AJ. Megakaryocytes and megakaryocyte progenitors in human cord blood. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992;14(3):241-7.
147. Liu Z-J, Italiano J, Ferrer-Marin F, et al. Developmental differences in megakaryocytopoiesis are associated with up-regulated TPO signaling through mTOR and elevated GATA-1 levels in neonatal megakaryocytes. *Blood* 2011;117(15):4106-17.
148. Ma DC, Sun YH, Chang KZ, Zuo W. Developmental change of megakaryocyte maturation and DNA ploidy in human fetus. *Eur J Haematol* 1996;57(2):121-7.
149. Ferrer-Marin F, Stanworth S, Josephson C, Sola-Visner M. Distinct differences in platelet production and function between neonates and adults: implications for platelet transfusion practice. *Transfusion* 2013;53(11):2814-21; quiz 2813.
150. Tiscornia G, Vivas EL, Belmonte JCI. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* 2011;17(12):1570-6.
151. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-76.
152. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385(6619):810-3.
153. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005;309(5739):1369-73.
154. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol CB* 2001;11(19):1553-8.
155. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5):861-72.
156. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448(7151):318-24.
157. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448(7151):313-7.
158. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007;1(1):55-70.
159. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008;454(7200):49-55.
160. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 2008;6(10):e253.
161. Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009;460(7251):49-52.
162. Guo S, Zi X, Schulz VP, et al. Nonstochastic reprogramming from a privileged somatic cell state. *Cell* 2014;156(4):649-62.
163. Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells Dayt Ohio* 2009;27(3):543-9.
164. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, et al. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells Dayt Ohio* 2010;28(1):64-74.

165. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 2010;24(20):2239–63.
166. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009;458(7239):766–70.
167. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85(8):348–62.
168. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, et al. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem* 2011;286(6):4760–71.
169. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010;7(5):618–30.
170. Mandal PK, Rossi DJ. Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nat Protoc* 2013;8(3):568–82.
171. Okabe M, Otsu M, Ahn DH, et al. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 2009;114(9):1764–7.
172. Dowey SN, Huang X, Chou B-K, Ye Z, Cheng L. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nat Protoc* 2012;7(11):2013–21.
173. Loh Y-H, Agarwal S, Park I-H, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009;113(22):5476–9.
174. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 2009;5(4):353–7.
175. Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2009;5(4):434–41.
176. Hirata S, Takayama N, Jono-Ohnishi R, et al. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *J Clin Invest* 2013;123(9):3802–14.
177. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 2010;207(13):2817–30.
178. Mills JA, Wang K, Paluru P, et al. Clonal genetic and hematopoietic heterogeneity among human-induced pluripotent stem cell lines. *Blood* 2013;122(12):2047–51.
179. Ng ES, Davis RP, Azzola L, Stanley EG, Elefanty AG. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* 2005;106(5):1601–3.
180. Ng ES, Davis R, Stanley EG, Elefanty AG. A protocol describing the use of a recombinant protein-based, animal product-free medium (APEL) for human embryonic stem cell differentiation as spin embryoid bodies. *Nat Protoc* 2008;3(5):768–76.
181. Boitano AE, Wang J, Romeo R, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 2010;329(5997):1345–8.
182. Woods N-B, Parker AS, Moraghebi R, et al. Brief report: efficient generation of hematopoietic precursors and progenitors from human pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dayt Ohio* 2011;29(7):1158–64.

183. Takayama N, Eto K. In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2012;788:205–17.
184. Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, et al. In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood* 2013;121(8):1255–64.
185. Gori JL, Butler JM, Chan Y-Y, et al. Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2015;125(3):1243–54.
186. Gori JL, Chandrasekaran D, Kowalski JP, et al. Efficient generation, purification, and expansion of CD34(+) hematopoietic progenitor cells from nonhuman primate-induced pluripotent stem cells. *Blood* 2012;120(13):e35–44.
187. Pick M. Generation of Megakaryocytes and Platelets from Human Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2013;
188. Pick M, Azzola L, Osborne E, Stanley EG, Elefanty AG. Generation of megakaryocytic progenitors from human embryonic stem cells in a feeder- and serum-free medium. *PloS One* 2013;8(2):e55530.
189. Sullivan SK, Mills JA, Koukouritaki SB, et al. High-level transgene expression in induced pluripotent stem cell-derived megakaryocytes: correction of Glanzmann thrombasthenia. *Blood* 2014;123(5):753–7.
190. Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, et al. Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp Hematol* 2013;
191. Nakamura S, Takayama N, Hirata S, et al. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014;14(4):535–48.
192. Feng Q, Shabrani N, Thon JN, et al. Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2014;3(5):817–31.
193. Bedel A, Taillepierre M, Guyonnet-Duperat V, et al. Metabolic correction of congenital erythropoietic porphyria with iPSCs free of reprogramming factors. *Am J Hum Genet* 2012;91(1):109–21.
194. Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci CMLS* 1999;55(1):96–107.
195. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(1):47–59.
196. Lamkanfi M, Dixit VM. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* 2010;8(1):44–54.
197. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13(15):1899–911.
198. Boise LH, González-García M, Postema CE, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74(4):597–608.
199. Motoyama N, Wang F, Roth KA, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 1995;267(5203):1506–10.
200. Falcieri E, Bassini A, Pierpaoli S, et al. Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat Rec* 2000;258(1):90–9.

201. Ogilvy S, Metcalf D, Print CG, Bath ML, Harris AW, Adams JM. Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(26):14943-8.
202. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999;286(5445):1735-8.
203. Sanz C, Benet I, Richard C, et al. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp Hematol* 2001;29(6):728-35.
204. Kaluzhny Y, Yu G, Sun S, et al. BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood* 2002;100(5):1670-8.
205. De Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002;100(4):1310-7.
206. Clarke MCH, Savill J, Jones DB, Noble BS, Brown SB. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *J Cell Biol* 2003;160(4):577-87.
207. Morison IM, Cramer Bordé EM, Cheesman EJ, et al. A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nat Genet* 2008;40(4):387-9.
208. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007;128(6):1173-86.
209. Josefsson EC, James C, Henley KJ, et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J Exp Med* 2011;208(10):2017-31.
210. Debrincat MA, Josefsson EC, James C, et al. Mcl-1 and Bcl-x(L) coordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood* 2012;119(24):5850-8.
211. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, et al. Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages. *Cell Death Differ* 2012;19(11):1856-69.
212. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJJ, et al. Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. *Blood* 2005;105(9):3472-9.
213. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJJ, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103(2):500-6.
214. Melloni E, Secchiero P, Celeghini C, et al. Functional expression of TRAIL and TRAIL-R2 during human megakaryocytic development. *J Cell Physiol* 2005;204(3):975-82.
215. Yang L, Wang L, Zhao C-H, et al. Contributions of TRAIL-mediated megakaryocyte apoptosis to impaired megakaryocyte and platelet production in immune thrombocytopenia. *Blood* 2010;116(20):4307-16.
216. Josefsson EC, Burnett DL, Lebois M, et al. Platelet production proceeds independently of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Nat Commun* 2014;5:3455.
217. Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002;346(13):995-1008.
218. Segal JB, Powe NR. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *J Thromb Haemost JTH* 2006;4(11):2377-83.

219. Moulis G, Palmaro A, Montastruc J-L, Godeau B, Lapeyre-Mestre M, Sailer L. Epidemiology of incident immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in France. *Blood* 2014;124(22):3308–15.
220. Abrahamson PE, Hall SA, Feudjo-Tepie M, Mitrani-Gold FS, Logie J. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review. *Eur J Haematol* 2009;83(2):83–9.
221. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L Jr, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011;117(16):4190–207.
222. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood* 2009;113(26):6511–21.
223. Hadjadj J, Michel M, Chauveheid M-P, Godeau B, Papo T, Sacre K. Immune thrombocytopenia in chronic myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2014;93(6):521–6.
224. Aster RH, Bougie DW. Drug-induced immune thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2007;357(6):580–7.
225. Verma V, Ayalew G, Sidhu G, et al. An analysis of the relationship between severe iron deficiency anemia and thrombocytopenia. *Ann Hematol* 2015;94(3):535–7.
226. Cunha V, Ferreira M, Barosa R, Fonseca AG, Delerue F, Carvalho C. Iron-induced thrombocytopenia in severe iron-deficiency anemia. *Expert Rev Hematol* 2015;8(2):247–51.
227. Sarpatwari A, Provan D, Erqou S, Sobnack R, David Tai FW, Newland AC. Autologous 111 In-labelled platelet sequestration studies in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP) prior to splenectomy: a report from the United Kingdom ITP Registry. *Br J Haematol* 2010;151(5):477–87.
228. HARRINGTON WJ, SPRAGUE CC, MINNICH V, MOORE CV, AULVIN RC, DUBACH R. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 1953;38(3):433–69.
229. Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann N Y Acad Sci* 1965;124(2):499–542.
230. McMillan R, Wang L, Tani P. Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost JTH* 2003;1(3):485–91.
231. Cines DB, McMillan R. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol* 2007;14(5):511–4.
232. McMillan R, Longmire RL, Yelenosky R, Donnell RL, Armstrong S. Quantitation of platelet-binding IgG produced in vitro by spleens from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1974;291(16):812–7.
233. McMillan R, Longmire RL, Tavassoli M, Armstrong S, Yelenosky R. In vitro platelet phagocytosis by splenic leukocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1974;290(5):249–51.
234. Roark JH, Bussel JB, Cines DB, Siegel DL. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood* 2002;100(4):1388–98.
235. Liu X, Ma S, Sun J, et al. High-dose dexamethasone shifts the balance of stimulatory and inhibitory Fcγ receptors on monocytes in patients with primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2011;117(6):2061–9.

236. Clarkson SB, Bussel JB, Kimberly RP, Valinsky JE, Nachman RL, Unkeless JC. Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with an anti-Fc gamma-receptor antibody. *N Engl J Med* 1986;314(19):1236–9.
237. Peerschke EIB, Andemariam B, Yin W, Bussel JB. Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2010;148(4):638–45.
238. Deckmyn H, De Reys S. Functional effects of human antiplatelet antibodies. *Semin Thromb Hemost* 1995;21(1):46–59.
239. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004;103(4):1364–9.
240. Panitsas FP, Theodoropoulou M, Kouraklis A, et al. Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. *Blood* 2004;103(7):2645–7.
241. Emmerich F, Bal G, Barakat A, et al. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007;136(2):309–14.
242. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010;32(1):129–40.
243. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2006;176(2):705–10.
244. Li X, Zhong H, Bao W, et al. Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 2012;120(16):3318–25.
245. Stasi R, Del Poeta G, Stipa E, et al. Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2007;110(8):2924–30.
246. Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* 1998;102(7):1393–402.
247. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Immunol Baltim Md* 1950 2002;168(7):3675–82.
248. Olsson B, Andersson P-O, Jernås M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 2003;9(9):1123–4.
249. Zhang F, Chu X, Wang L, et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2006;76(5):427–31.
250. Chow L, Aslam R, Speck ER, et al. A murine model of severe immune thrombocytopenia is induced by antibody- and CD8+ T cell-mediated responses that are differentially sensitive to therapy. *Blood* 2010;115(6):1247–53.
251. Fillion MC, Proulx C, Bradley AJ, et al. Presence in peripheral blood of healthy individuals of autoreactive T cells to a membrane antigen present on bone marrow-derived cells. *Blood* 1996;88(6):2144–50.
252. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133(5):775–87.
253. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203(7):1693–700.

254. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol Baltim Md* 1950 2000;164(1):183–90.
255. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188(2):287–96.
256. Ling Y, Cao X-S, Yu Z-Q, et al. [Alterations of CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2007;28(3):184–8.
257. Liu B, Zhao H, Poon M-C, et al. Abnormality of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2007;78(2):139–43.
258. Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood* 2008;112(4):1147–50.
259. Sakakura M, Wada H, Tawara I, et al. Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 2007;120(2):187–93.
260. Yu J, Heck S, Patel V, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008;112(4):1325–8.
261. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y, et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1996;93(3):704–6.
262. Nichol JL. Thrombopoietin levels after chemotherapy and in naturally occurring human diseases. *Curr Opin Hematol* 1998;5(3):203–8.
263. Scheduling S, Bergmann M, Shimosaka A, et al. Human plasma thrombopoietin levels are regulated by binding to platelet thrombopoietin receptors in vivo. *Transfusion* 2002;42(3):321–7.
264. Ballem PJ, G M Segal, Stratton JR, Gernsheimer T, Adamson JW, Slichter SJ. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest* 1987;80(1):33–40.
265. Gernsheimer T, Stratton J, Ballem PJ, Slichter SJ. Mechanisms of response to treatment in autoimmune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1989;320(15):974–80.
266. Kuter DJ, Gernsheimer TB. Thrombopoietin and platelet production in chronic immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(6):1193–211.
267. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 2003;102(3):887–95.
268. Olsson B, Ridell B, Carlsson L, Jacobsson S, Wadenvik H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood* 2008;112(4):1078–84.
269. Cortelazzo S, Finazzi G, Buelli M, Molteni A, Viero P, Barbui T. High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1991;77(1):31–3.
270. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113(11):2386–93.

271. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010;115(2):168–86.
272. Balduini CL, Gugliotta L, Luppi M, et al. High versus standard dose methylprednisolone in the acute phase of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a randomized study. *Ann Hematol* 2010;89(6):591–6.
273. Ghanima W, Godeau B, Cines DB, Bussel JB. How I treat immune thrombocytopenia: the choice between splenectomy or a medical therapy as a second-line treatment. *Blood* 2012;120(5):960–9.
274. Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, George JN. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood* 2004;104(9):2623–34.
275. Rodeghiero F, Ruggeri M. Short- and long-term risks of splenectomy for benign haematological disorders: should we revisit the indications? *Br J Haematol* 2012;158(1):16–29.
276. Auger S, Duny Y, Rossi JF, Quittet P. Rituximab before splenectomy in adults with primary idiopathic thrombocytopenic purpura: a meta-analysis. *Br J Haematol* 2012;158(3):386–98.
277. Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2007;146(1):25–33.
278. Khellaf M, Charles-Nelson A, Fain O, et al. Safety and efficacy of rituximab in adult immune thrombocytopenia: results from a prospective registry including 248 patients. *Blood* 2014;124(22):3228–36.
279. Patel VL, Mahévas M, Lee SY, et al. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood* 2012;119(25):5989–95.
280. Nazi I, Kelton JG, Larché M, et al. The effect of rituximab on vaccine responses in patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 2013;122(11):1946–53.
281. Carson KR, Evens AM, Richey EA, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood* 2009;113(20):4834–40.
282. Godeau B, Porcher R, Fain O, et al. Rituximab efficacy and safety in adult splenectomy candidates with chronic immune thrombocytopenic purpura: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood* 2008;112(4):999–1004.
283. Ghanima W, Khelif A, Waage A, et al. Rituximab as second-line treatment for adult immune thrombocytopenia (the RITP trial): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2015;385(9978):1653–61.
284. Nurden AT, Viallard J-F, Nurden P. New-generation drugs that stimulate platelet production in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Lancet* 2009;373(9674):1562–9.
285. Bussel JB, Provan D, Shamsi T, et al. Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2009;373(9664):641–8.

286. Saleh MN, Bussel JB, Cheng G, et al. Safety and efficacy of eltrombopag for treatment of chronic immune thrombocytopenia: results of the long-term, open-label EXTEND study. *Blood* 2013;121(3):537–45.
287. Bussel JB, Kuter DJ, Pullarkat V, Lyons RM, Guo M, Nichol JL. Safety and efficacy of long-term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP. *Blood* 2009;113(10):2161–71.
288. Kuter DJ, Mufti GJ, Bain BJ, Hasserjian RP, Davis W, Rutstein M. Evaluation of bone marrow reticulin formation in chronic immune thrombocytopenia patients treated with romiplostim. *Blood* 2009;114(18):3748–56.
289. Ghanima W, Geyer JT, Lee CS, et al. Bone marrow fibrosis in 66 patients with immune thrombocytopenia treated with thrombopoietin-receptor agonists: a single-center, long-term follow-up. *Haematologica* 2014;99(5):937–44.
290. Kuter DJ, Bussel JB, Newland A, et al. Long-term treatment with romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenia: safety and efficacy. *Br J Haematol* 2013;161(3):411–23.
291. Imbach P, Crowther M. Thrombopoietin-receptor agonists for primary immune thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2011;365(8):734–41.
292. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77(7):1117–24.
293. Harker LA, Roskos LK, Marzec UM, et al. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood* 2000;95(8):2514–22.
294. Kirito K, Watanabe T, Sawada K, Endo H, Ozawa K, Komatsu N. Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways. *J Biol Chem* 2002;277(10):8329–37.
295. Kozuma Y, Kojima H, Yuki S, Suzuki H, Nagasawa T. Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL. *J Thromb Haemost JTH* 2007;5(6):1274–82.
296. Debrincat MA, Josefsson EC, James C, et al. Mcl-1 and Bcl-xL co-ordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood* [Internet] 2012 [cited 2012 May 17]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22374700>
297. Debrincat MA, Pleines I, Lebois M, et al. BCL-2 is dispensable for thrombopoiesis and platelet survival. *Cell Death Dis* 2015;6:e1721.
298. Schmitt A, Guichard J, Massé JM, Debili N, Cramer EM. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 2001;29(11):1295–302.
299. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001;413(6851):74–8.
300. Vandenabeele P, Vanden Berghe T, Festjens N. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2006;2006(358):pe44.
301. Chauvier D, Ankri S, Charriaut-Marlangue C, Casimir R, Jacotot E. Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ* 2007;14(2):387–91.
302. Avanzi MP, Izak M, Oluwadara OE, Mitchell WB. Actin Inhibition Increases Megakaryocyte Proplatelet Formation through an Apoptosis-Dependent Mechanism. *PloS One* 2015;10(4):e0125057.

303. Konishi H, Kikuchi S, Ochiai T, et al. Latrunculin a has a strong anticancer effect in a peritoneal dissemination model of human gastric cancer in mice. *Anticancer Res* 2009;29(6):2091-7.
304. Martin SS, Leder P. Human MCF10A mammary epithelial cells undergo apoptosis following actin depolymerization that is independent of attachment and rescued by Bcl-2. *Mol Cell Biol* 2001;21(19):6529-36.
305. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012;30(5):488-96.
306. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol* 2010;11(12):1149-59.
307. Rivière É, Viallard J-F, Guy A, et al. Intrinsically impaired platelet production in some patients with persistent or chronic immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2015;170(3):408-15.