



HAL
open science

Rôle du microenvironnement cellulaire de la mégacaryopoïèse

Camille Jost

► **To cite this version:**

Camille Jost. Rôle du microenvironnement cellulaire de la mégacaryopoïèse. Hématologie. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ015 . tel-02333479

HAL Id: tel-02333479

<https://theses.hal.science/tel-02333479v1>

Submitted on 25 Oct 2019

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR_S1255, EFS Grand Est, Université de Strasbourg

THÈSE présentée par :

Camille JOST

Soutenue le 29 Avril 2019

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

Discipline/S spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Rôle du microenvironnement cellulaire de la
mégacaryopoïèse**

THÈSE dirigée par :

Monsieur François LANZA

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Madame Michèle SOUYRI

DR2, INSERM, Université Paris Diderot

Monsieur Frédéric DESCHASEAUX

CR EFS, CNRS, Université de Toulouse

EXAMINATEUR :

Monsieur Philippe KASTNER

MCU-PH, IGMBC, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S1255

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

Directeur : Docteur Christian GACHET

Etablissement Français du Sang (EFS) Grand Est

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

Tel. : +33 3 88 21 25 25

Fax : +33 3 88 21 25 21

Directeur de thèse :

Docteur François LANZA

E-mail : francois.lanza@efs.sante.fr

A Margot,

A mon chef de C(h)oeur,

REMERCIEMENTS

La thèse signe la fin de mon parcours universitaire. Huit belles années que je n'ai pas vu passer, huit années d'apprentissage, d'accomplissements et aussi de rencontres. J'aimerais remercier ici toutes les personnes qui, de prêt ou de loin, ont contribué à ces années et à cette thèse. Ces remerciements ne seront sans doute pas exhaustifs et je présente mes excuses à celles ou ceux que j'aurais omis de citer ; c'est indépendant de ma volonté.

Ma reconnaissance s'adresse à madame Michèle Souyri et messieurs Frédéric Deschaseaux et Philippe Kastner pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Christian Gachet directeur de l'UMR_S1255 et de l'EFS Grand-Est, pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire et permis de faire ma thèse dans ce superbe environnement.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à François Lanza, mon directeur de thèse, pour sa disponibilité et sa confiance. Merci pour vos remarques, vos conseils, votre porte toujours ouverte. J'ai apprécié l'autonomie que vous m'avez laissé et nos discussions qui ont fait avancer ce projet.

Nathalie, tout simplement merci. Tu as été une encadrante fantastique ! Tu es toujours positive et optimiste. Tu as pris le temps pour me former et m'initier à la cytométrie et au tri. Tu as toujours été disponible pour toutes mes questions et tous mes doutes. J'ai apprécié ta confiance et ton soutien infailible. J'aurais aimé que ton nom soit également sur cette thèse.

Merci au Dr. Gastaud pour sa collaboration. Je vous suis infiniment reconnaissante pour votre implication dans la recherche et pour m'avoir permis de découvrir le bloc opératoire.

Et puisque je ne serai pas arrivée en thèse sans master j'aimerais remercier mes directeurs de stages. Merci à Jean-Etienne Fabre, directeur de mon stage de master 1, qui m'a toujours soutenue et conseillée. Merci à Gertraud Orend, ma directrice de master 2 qui m'a très bien préparée pour la thèse. J'ai une pensée pour la team « d'Hautepierre » : Patricia, Christiane, Annick, Caro et Isabelle, c'est toujours un plaisir de vous revoir.

Merci aux membres anciens et actuels de la team Nathalie. Ségolène, merci pour ton aide, pour tous les coating, changement de milieu et nos discussions de culture. Tu as été plus qu'une alliée sur cette fin de thèse ! David, ta tarte au citron était excellente, ça valait le coup

d'attendre ! Shérine, je te souhaite bonne chance pour la suite, et un bon master 2 ! Merci aussi à Sébastien qui m'a tout montré à mon arrivée.

Mes remerciements à tous les membres de l'UMR_S1255 avec qui j'ai pu échanger pendant ces trois, presque quatre années. A l'équipe 2 : Henri, Anita, Catherine S., Catherine L., Josiane, Fabienne, Jean-Yves, Léa, Sylvie, merci pour les discussions enrichissantes notamment lors des réunions d'équipe.

Même si nos réunions ne sont pas communes, pour les échanges au détour d'un couloir, lors de la journée des doctorants ou au Bischenberg j'aimerais remercier : Pierre, Béatrice, Blandine, Catherine R., Arnaud, Catherine A., Catherine B., Véro, Patricia, Stéphanie, Clarisse, Laurie, Nico et Amandine.

Au personnel de l'animalerie : Monique, Catherine Z., Ketty, Alain, Florian, Senay, merci de vous occuper si bien de nos petites souris.

Merci aussi à Valérie pour sa disponibilité et son organisation sans faille pour ma soutenance.

Pour leur sourire intarissable et leur gentillesse j'aimerais remercier Betty et Elizabeth du standard et plus anciennement Mireille et Danièle.

Parce qu'on a plaisir à recevoir un colis grâce à toi, merci Pascal. Tu es un rayon de soleil dans une journée de travail.

A tous les étudiants et post-doc, qu'ils soient actuels ou passés : Julie, Emily, Valentin, Mariane, Quentin, Cyril, Inès, Margot, Marie Angela, Élodie, Thao, Blandine, Gabrielle, Elmina, Morgane,.... et j'en oublie. Merci pour nos discussions de science, de cafet ou de cantine. Je vous souhaite à tous la réussite !

Alicia A. et Laura, vous avez été là dès le début de ma thèse, je vous souhaite respectivement un bon post-doc et une belle thèse.

Alicia B. et Marion, vous qui me supportez dans la dernière ligne droite, merci. Je sais que je peux compter sur vous, vous êtes de véritables amies.

A Marie-Belle et Reine, mes 2 libanaises (et Françaises aussi maintenant), mille mercis. Jamais je n'aurai pensé rencontrer des personnes aussi belles que vous. Une petite pensée pour nos

cafés du matin Marie-Belle, je ne t'ai pas remplacée. Je vous souhaite le meilleur, vous êtes plus que des collègues.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans financement alors merci à l'INSERM, la région Alsace, l'ARMESA et enfin la SFH pour avoir financé mon travail.

Au niveau personnel j'aimerais remercier mes amis et ma famille

A notre super groupe du master immuno, on a été la meilleure des promo.

Pour mes pharmaciennes préférées, Delphine et Elodie, 10 ans déjà et malgré le fait que j'ai fini en bio on ne s'est jamais perdue de vue.

A mes amis de licence et plus encore, Deb's, Margot et Emélie ces années restent de super souvenirs. J'ai hâte qu'on puisse être à nouveau réunies.

Au groupe discord du soir, qui m'a permis de bien décompresser même si je n'ai pas atteint le diamant : Julien, Aude, Floriane, Antoine, Guillaume, PJ et Clément je vais pouvoir tryhard après la soutenance.

J'aimerais remercier mes grands-parents, mes modèles, j'aimerais un jour vous ressembler.

Merci à ma famille, et plus précisément ma maman, qui m'a toujours soutenue, encouragée. Tu as toujours fait de nous une priorité et je te respecte pour ça. Même si ce n'est pas toujours facile, merci papa.

Merci Guillaume et Emilie, je me serais ennuyée sans vous. On forme une belle fratrie. Je vous souhaite le meilleur et de réaliser vos rêves.

Car sans toi tout aurait été bien plus difficile, merci Frank, mon âme sœur, mon mari. On a été deux dans la galère, dans le doute, à discuter de nos résultats en rentrant le soir et à rédiger côte à côte. Je pense qu'on a passé cette épreuve avec succès, plus unis que jamais. Merci tout simplement d'être toi.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	i
LISTE DES TABLEAUX	ii
LISTE DES ABREVIATIONS	iii
PRÉAMBULE.....	1
A. INTRODUCTION	1
I. Les plaquettes et le mégacaryocyte.....	1
1. Les plaquettes	1
a) Fonctions principales des plaquettes.....	1
i. En conditions physiologiques	1
ii. En conditions pathologiques	3
b) Structure générale de la plaquette	4
i. Les granules plaquettaires.....	5
ii. Le système canaliculaire.....	6
iii. Le cytosquelette	6
2. Le mégacaryocyte.....	8
a) Propriétés.....	8
i. La polyplôidie	9
ii. Le système de membrane invaginée.....	9
iii. Les corps multi-vésiculaires et les granules	10
b) Identification du mégacaryocyte.....	10
II. La mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse	11
1. L'hématopoïèse	11
a) Les cellules souches hématopoïétiques	11
b) Hétérogénéité du compartiment des CSH	14
2. Ontogénie de la lignée mégacaryocytaire.....	17
a) Mise en place du système hématopoïétique chez l'homme et la souris	17
b) Mise en place de la mégacaryopoïèse.....	18

3.	De la CSH au MK	20
a)	CSH : Autorenouvellement ou différenciation	20
b)	Engagement et différenciation.....	21
c)	Maturation du MK.....	22
4.	La thrombopoïèse	23
a)	Passage trans-endothélial	23
b)	La formation des proplaquettes et plaquettes	25
5.	Mécanismes contrôlant la mégacaryopoïèse.....	26
a)	Facteurs intrinsèques	26
b)	Facteurs extrinsèques.....	28
i.	La thrombopoïétine.....	28
ii.	Les interleukines 3, 6 et 9.....	31
iii.	Autre facteur de croissance : le SCF	32
6.	Production de plaquettes <i>in vitro</i>	32
III.	Les organes hématopoïétiques	34
1.	Le foie	34
a)	L'organe adulte.....	34
b)	Le foie au cours du développement.....	36
c)	Le foie fœtal : organe hématopoïétique	37
2.	La moelle osseuse.....	39
a)	Formation des os et de la moelle	39
b)	Structure de l'os et de la moelle	40
c)	Le réseau vasculaire de la moelle osseuse	42
i.	Vascularisation de la moelle.....	42
ii.	Un type de vaisseau particulier : le sinusoïde	44
d)	Composition cellulaire de la moelle osseuse	45
i.	Les cellules endothéliales.....	45
Fonctions des cellules endothéliales.....	45	

Les cellules endothéliales médullaires	46
ii. Cellules souches mésenchymateuses.....	47
Identification des MSC.....	48
Les MSC médullaires.....	49
e) Composants non cellulaires	49
f) Le vieillissement de la moelle.....	50
3. Le poumon.....	51
IV. Microenvironnement cellulaire de l'hématopoïèse et de la mégacaryopoïèse	52
1. Le microenvironnement hématopoïétique	52
a) Composition de la niche hématopoïétique	53
b) Le MK : un nouveau composant cellulaire de la niche	55
2. Microenvironnement de la mégacaryopoïèse	56
a) Localisation du MK dans la moelle osseuse	56
b) Régulation de la mégacaryopoïèse par la matrice extra-cellulaire	56
c) Régulation par des contraintes physiques	57
d) Composition cellulaire du microenvironnement du MK	58
Objectif du travail de thèse	61
B. Travail de thèse	63
I. Partie 1 : Rôle du foie foetal dans la mégacaryopoïèse.....	63
1. Introduction.....	63
2. Principaux résultats	64
Article 1 publié : A unique microenvironment in the developing liver supports the expansion of megakaryocyte progenitors.....	67
3. Données supplémentaires.....	99
a) Réensemencement des cellules hématopoïétiques obtenues par co-culture.....	99
i. Matériels et méthodes	99
ii. Résultats	100
b) Evaluation du potentiel proplaquetto-gène des cellules obtenues par co-culture.....	102
4. Discussion	104

II. Partie 2 : Rôle des cellules endothéliales médullaires dans la mégacaryopoïèse.....	107
1. Introduction.....	107
Article 2 en préparation : Unique properties of bone marrow primary endothelial cells in supporting final megakaryocyte maturation.....	109
2. Discussion.....	137
C. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	145
D. RÉFÉRENCES	153

LISTE DES FIGURES

Figure 13
Figure 25
Figure 38
Figure 412
Figure 518
Figure 621
Figure 729
Figure 835
Figure 937
Figure 1041
Figure 1143
Figure 1244
Figure 1359
Figure 1462
Figure 1565
Figure 16101
Figure 17103
Figure 18139
Figure 19140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 17
Tableau 213
Tableau 3143

LISTE DES ABREVIATIONS

(sh)ARN : (short hairpin) acide ribonucléique
AGM : Aorte Gonade Mésonéphros
Ahr : aryl hydrocarbon receptor
BAH1 : E3 ubiquitin-protein ligase
BEC : cellules épithéliales biliaires
BFU : Burst Forming Unit
BM : bone marrow
BMI1 : Polycomb Ring Finger
CCL5 : C-C motif ligand 5
CD : cluster of differentiation
CFU : colony forming unit
CK : cytokératine
CLEC-2 : protein C-type lectin-like receptor-2
CLP : progéniteur lymphoïde commun
CMP : progéniteur myéloïde commun
cMpl : Myeloproliferative leukemia protein
CSH : cellule souche hématopoïétique
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
Dlk1 : Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1
DMS : système de demarcation membranaire
EGM2(-MV) : endothelial growth medium 2 (microvascular)
Endo-MT : transition endothélio-mésenchymateuse
EpCam : epithelial cell adhesion molecule
EPCR : Endothelial protein C receptor
EPO : érythropoïétine
ES cell : embryonic stem cell
FF : foie foetal
FGF : fibroblast growth factor
FLI1 : Friend leukemia integration 1 transcription factor

Flt3 : Fms-like tyrosine kinase 3

GAG : glycosaminoglycanes

GFI1b : Growth factor independence-1

GFP : green fluorescent protein

GMP : progéniteur granulocytaire monocyttaire

GM-CSF : granulocyte macrophage- colony stimulating factor

GP : glycoprotéine

HBMEC : human bone marrow endothelial cells

HIAEC : human iliac artery endothelial cells

HLA : Human Leukocyte Antigen

HMVEC : human microvascular endothelial cells

HNP1 : Human Neutrophil Peptide 1

HUVEC : human umbilical vein endothelial cells

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1

Ig : Immunoglobuline

IL : interleukine

iPSC : induced Pluripotent Stem Cells

JAK/STAT : Just Another Kinase/ signal transducer and activator of transcription

Jam-C : junctional adhesion molecule 3

KuO : Kusabira Orange

LDL : Low Density Lipoprotein

LEPR : leptin receptor

Lin : lineage

LNGFR : low-affinity nerve growth factor receptor

LPS : lipopolysaccharide

LSK : Lin⁻ c-kit⁺ Sca-1⁺

LT-CSH : cellule couche hématopoïétique à long terme

LYVE-1 : lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1

Mac-1 : Macrophage-1 antigen

MCAM : Melanoma Cell Adhesion Molecule

MEP : mégacaryocyte érythroïde progéniteur

MK : mégacaryocyte
MKp : progéniteur MK
MMP : matrix metalloprotease
MPP : progéniteur multipotent
MSC : cellule souche mésenchymateuse
MVB : multivesicular body
NCS : Newborn Calf Serum
NF-E2 : nuclear factor, erythroid 2
NK : natural killer
NO : oxide nitrique
NOD/SCID : Non-Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency
PACSIN2 : protein kinase C and casein kinase II substrate 2
PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule
PF4 : platelet factor 4
PGI2 : prostaglandin I2
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PT : plateau tibial
Raf1/MAP : proto-oncogene serine/threonine-protein kinase/ Mitogen-activated protein kinase
ROCK : Rho-associated protein kinase
RT-qPCR : real time quantitative polymerase chain reaction
Runx1 : Runt-related transcription factor 1
Sca-1 : lymphocyte antigen 6 complex, locus A
SCF : stem cell factor
SLP-76 : H2 domain containing leukocyte protein of 76kDa
Smad : Small Mothers Against Decapentaplegic
SR1 : stem regenin 1
TAL1 : T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1
TGF β : transforming growth factor β
TLR : Toll-like récepteur
TPO : thrombopoïétine

Tyk2 : Non-receptor tyrosine-protein kinase

VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1

VE-Cadhérine : Vascular Endothelial Cadherin

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

VLA4 : Very Late Antigen-4

vWf : facteur von Willebrand

PRÉAMBULE

Les plaquettes sanguines ont comme rôle principal de prévenir les hémorragies et sont produites dans la lumière des sinusoides de la moelle osseuse à partir des mégacaryocytes. Au cours de la mégacaryopoïèse, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en progéniteurs puis subissent une maturation pour produire les mégacaryocytes capables de libérer des plaquettes. Les différentes étapes menant de la cellule souche hématopoïétique au mégacaryocyte mature sont soutenues par des microenvironnements particuliers, composés de cellules, de matrices extra-cellulaires et de cytokines. Bien que les connaissances aient beaucoup progressé, de nombreuses questions subsistent concernant le rôle et la nature des microenvironnements nécessaires aux différentes étapes de la mégacaryopoïèse.

Le but de cette thèse était de mieux comprendre l'influence du microenvironnement et plus particulièrement des cellules stromales (cellules mésenchymateuses et cellules endothéliales) dans la mégacaryopoïèse. Au-delà d'un aspect fondamental d'étude des mécanismes encore peu documentés qui participent à la libération des plaquettes, ce travail présente comme application possible d'améliorer les méthodes de culture des plaquettes, qui présentent encore de très faibles rendements, et seraient à même d'être utilisées en transfusion.

Les travaux réalisés pendant cette thèse ont permis premièrement d'identifier des cellules du microenvironnement du foie fœtal favorisant l'orientation des progéniteurs vers la voie mégacaryocytaire et deuxièmement d'aborder le rôle unique des cellules endothéliales de la moelle dans les étapes finales de la mégacaryopoïèse.

Cette introduction bibliographique est divisée en deux grandes parties. Dans la première sera présentée la mégacaryopoïèse en abordant le mégacaryocyte, les plaquettes, et les molécules connues pour être impliquées dans ce processus. Dans la seconde, sera abordée la notion de microenvironnement de la mégacaryopoïèse avec la description des deux tissus principaux capables de la soutenir: le foie fœtal et la moelle osseuse chez l'adulte. Les constituants de ces tissus et plus principalement les cellules mésenchymateuses et endothéliales seront décrites de manière générale et dans le contexte de la mégacaryopoïèse.

A. INTRODUCTION

I. Les plaquettes et le mégacaryocyte

1. Les plaquettes

Les plaquettes sanguines sont des petits éléments cellulaires (2-5 μm) anucléés du sang (Boneu, 1997). Elles ont été décrites pour la première fois en 1881 par G. Bizzozero comme des nouveaux éléments du sang nommés « Plättchen » et responsables des trombi (Bizzozero, 1882). En 1902, J.H. Wright les définit comme étant des corps ovales ayant la taille d'un demi ou d'un tiers de globule rouge (Wright, 1902). C'est également le premier, en 1906, à mettre en évidence leur origine mégacaryocytaire dans la moelle osseuse (Wright, 1906). Les plaquettes sont uniquement présentes chez les mammifères, chez les autres vertébrés sont retrouvés les thrombocytes qui sont eux, nucléés (Levin, 1997). En France, le nombre moyen de plaquettes est de 269×10^9 plaquettes par litre de sang chez les hommes et 394×10^9 chez les femmes, leur durée de vie est de 5 à 7 jours dans le sang (Troussard et al., 2014). Ce nombre diffère selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique (Balduini and Noris, 2014).

a) Fonctions principales des plaquettes

Leur rôle principal en physiologie est d'assurer l'hémostase. Lors du développement, leur présence est nécessaire à la bonne différenciation des vaisseaux sanguins et lymphatiques via CLEC-2 (protein C-type lectin-like receptor-2) (Bertozzi et al., 2010). Elles ont également été impliquées dans les mécanismes de l'immunité (Semple et al., 2011) et de l'extravasation leucocytaire (Zuchtriegel et al., 2016). Dans des conditions pathologiques elles contribuent principalement à la thrombose (Packham, 1994) mais aussi au cancer (Honn et al., 1992).

i. *En conditions physiologiques*

Les plaquettes assurent l'hémostase primaire, c'est-à-dire prévenir les hémorragies et permettre l'arrêt du saignement. En cas de brèche dans l'endothélium, le sous-endothélium constitué de matrice extra-cellulaire est exposé à la circulation sanguine. Les plaquettes peuvent alors reconnaître le collagène via le récepteur GPVI et le facteur Willebrand (vWf) via le complexe GPIb/V/IX (F. Lanza, 2008). Les plaquettes vont alors adhérer et s'activer entraînant leur changement de forme et leur étalement. Les plaquettes activées sécrètent

INTRODUCTION GÉNÉRALE

également le contenu de leurs granules dont l'ADP (adénosine diphosphate) et produisent du thromboxane A2 qui amplifient leur activation. Les plaquettes agrègent alors en recrutant d'autres plaquettes au sein du clou plaquettaire via l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb-IIIa) et le fibrinogène. Le clou ainsi formé permettra alors de combler la brèche et limiter l'hémorragie, c'est la première phase de l'hémostase. En parallèle de ce mécanisme est activée l'hémostase secondaire : la coagulation. L'exposition du sous-endothélium va, via l'exposition du facteur tissulaire, initier la voie extrinsèque de la coagulation permettant au final la conversion de la prothrombine en thrombine. La thrombine formée permet de stabiliser le clou hémostatique suite au clivage du fibrinogène plasmatique en fibrine qui forme un réseau insoluble. La thrombine est aussi un puissant activateur des plaquettes (Holinstat, 2017; Hou et al., 2015). Ce réseau de fibrine peut ensuite servir de matrice pour la reconstruction de l'endothélium lésé (van Hinsbergh et al., 2001). Les plaquettes activées exposent des phosphatidylsérines rendant leur surface chargée négativement. Ceci participe à la génération de thrombine (Wood et al., 2011) (Figure 1).

Semple et collaborateur ont rédigé une revue résumant les rôles des plaquettes dans l'immunité (Semple et al., 2011). Tout d'abord, les plaquettes peuvent être le lieu de stockage ou synthétiser des cytokines impliquées dans des mécanismes immunitaires tels que le TGF β 1 (Transforming Growth Factor β) (Blakytyn et al., 2004) et l'IL-1 (Sedlmayr et al., 1995). Elles expriment le CCL5 (C-C motif ligand 5) qui en association avec la molécule HNPI (Human Neutrophil Peptide 1) sécrétée par les neutrophiles permet le recrutement des monocytes (Alard et al., 2015). De plus, les plaquettes expriment les toll-like récepteurs (TLR) à leur surface (Shiraki et al., 2004) qui peuvent se lier dans le cas du TLR-4 aux lipopolysacharrides (LPS) des bactéries. Elles ont donc été directement impliquées dans l'inflammation liée à des maladies infectieuses telles que le sepsis (Claushuis et al., 2018).

Les plaquettes auraient également un rôle dans le développement vasculaire lors de l'embryogenèse. La molécule CLEC-2 exprimée à la surface plaquettaire interagit avec la podoplanine présente sur la surface des cellules endothéliales lymphatiques. Cette liaison active la voie de signalisation SLP-76 (H2 domain containing leukocyte protein of 76kDa) permettant le développement et le maintien des vaisseaux lymphatiques (Bertozi et al., 2010).

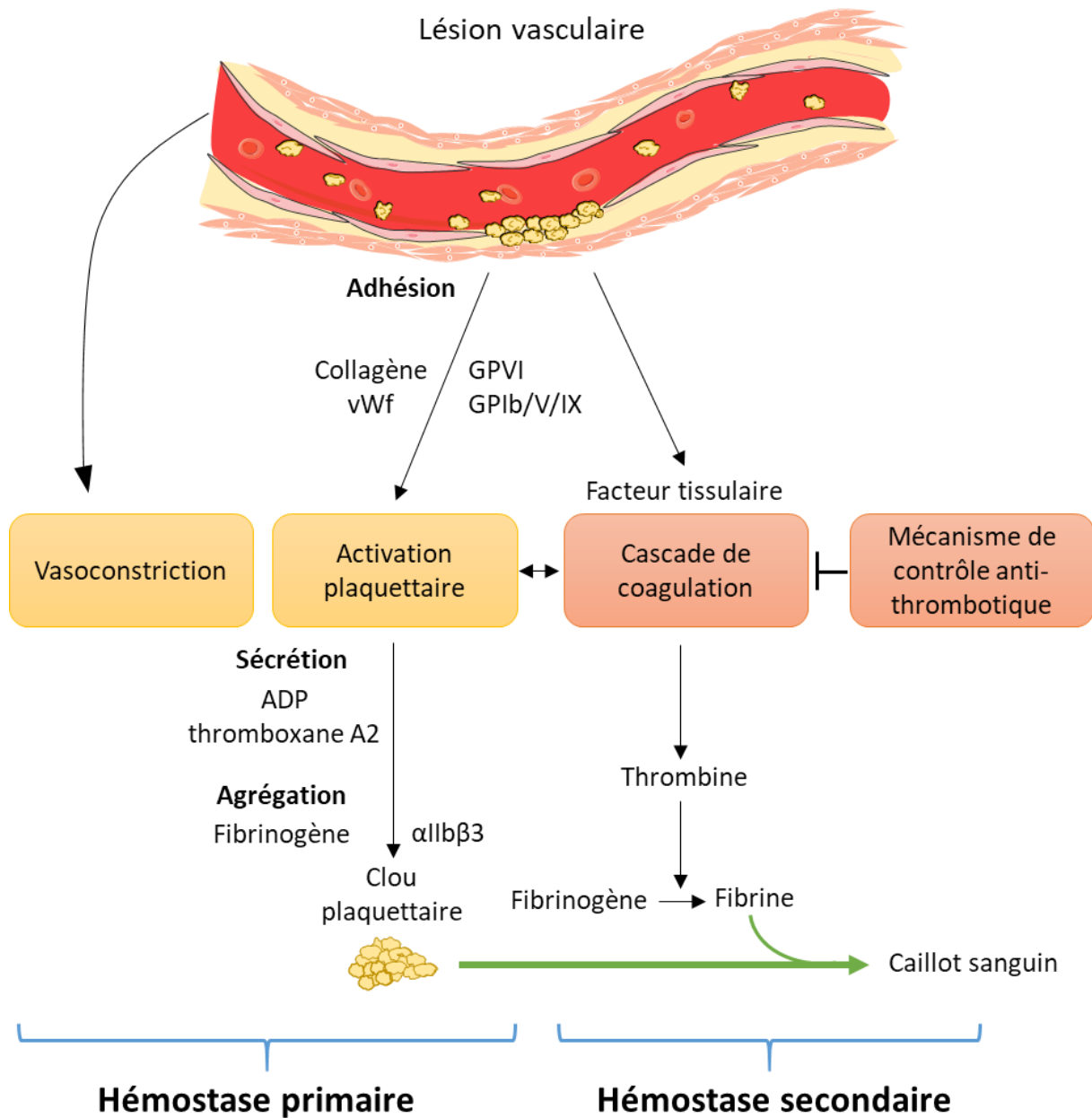


Figure 1 : Hémostases primaire et secondaire

ii. En conditions pathologiques

La thrombose correspond à la formation d'un thrombus pouvant obturer un vaisseau sanguin. La thrombose artérielle est un processus survenant généralement dans des vaisseaux présentant un épaissement de la paroi vasculaire suite à la formation de plaques d'athérosclérose en particulier au niveau des embranchements des artères. Elle peut conduire

INTRODUCTION GÉNÉRALE

à l'infarctus du myocarde ou à un accident vasculaire cérébral. Plusieurs molécules impliquées dans la thrombose artérielle ont été mises en évidence telles que : le collagène, le vWf, la thrombine (Hechler et al., 2010), la phospholipase C γ 2 (Nonne et al., 2005) ou encore le récepteur P2X1 (Hechler et al., 2003).

La thrombose veineuse a majoritairement lieu dans les membres inférieurs où les petites veines et veinules possèdent de nombreuses valves. De nombreux facteurs de risques existent tels que l'obésité, l'hypertension, le diabète ou les thérapies hormonales (Koupenova et al., 2017). La thrombose veineuse est à l'origine des embolies pulmonaires.

Des particularités anatomiques combinées à des facteurs de risque tels que l'immobilisation (entraînant une baisse de flux), une maladie plaquettaire, une hypercoagulation et/ou une perte de l'intégrité vasculaire pourraient être à l'origine de thrombi. Cependant, un seul de ces facteurs n'est pas suffisant pour induire un thrombus et l'origine de l'initiation de celui-ci est encore débattue (Aird, 2007).

Les plaquettes seraient également impliquées dans le cancer lors des différentes étapes des métastases. Lorsque les cellules tumorales échappent à la tumeur primaire et se retrouvent circulantes, les plaquettes les prennent en charge dans un thrombus afin de les protéger des cellules immunitaires et notamment des Natural Killer (NK) (Nieswandt et al., 1999). De plus, la thrombine favorise la prolifération des cellules tumorales et réduit l'apoptose (Adams et al., 2015; Chen et al., 2008). Les plaquettes faciliteraient également l'extravasation des cellules tumorales aux sites distants notamment via leurs nombreuses intégrines (Mammadova-Bach et al., 2015; Schlesinger, 2018).

b) Structure générale de la plaquette

Les plaquettes ont plusieurs spécificités dont la présence de différents granules, d'un système canaliculaire ouvert et d'une bande marginale composée de microtubules (Figure 2).

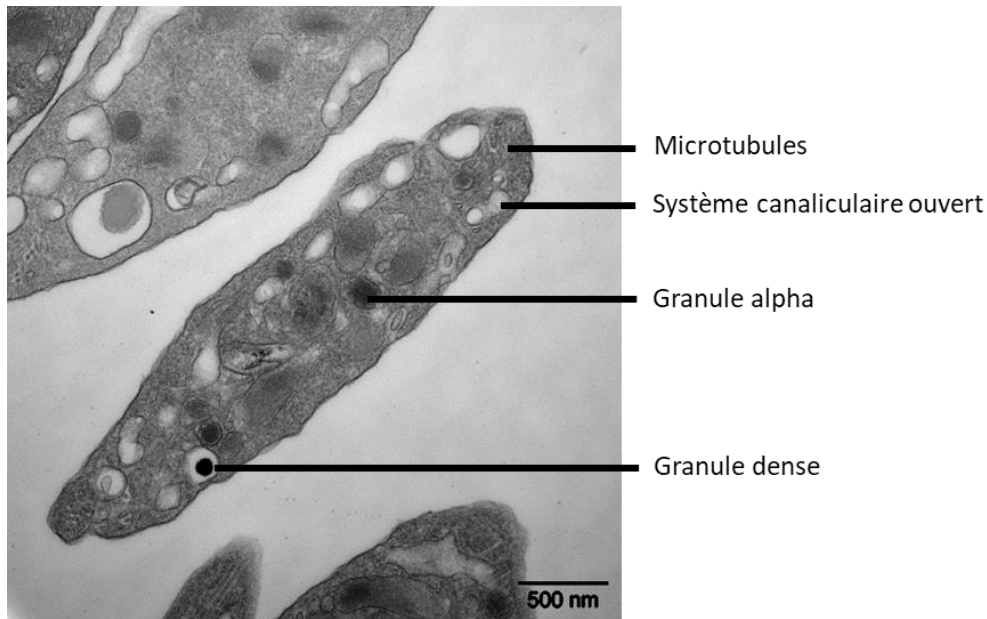


Figure 2 : Structure et organisation de la plaquette en microscopie électronique

Image : Anita ECKLY (UMR_S1255, EFS-Grand Est)

i. Les granules plaquettaires

Trois types de granules plaquettaires sont présents dans les plaquettes : les granules alpha, denses et les lysosomes. Ces granules sont facilement reconnaissables en microscopie électronique à transmission. Ces granules contiennent des facteurs/composés responsables des fonctions plaquettaires (Tableau 1). Il est suggéré que la libération du contenu des granules se fait notamment sous la dépendance des forces contractiles du squelette d'actomyosine (Léon et al., 2007).

- **Les granules alpha :**

Ces granules sont au nombre de 80 en moyenne dans les plaquettes et ont un diamètre moyen de 200 nm (Sixma et al., 1989). Ils contiennent des molécules nécessaires aux fonctions plaquettaires telles que le vWf, le fibrinogène, la P-sélectine ou encore le facteur de coagulation V (King and Reed, 2002).

- **Les granules denses :**

Ils sont facilement reconnaissables en microscopie électronique à transmission puisque le Ca^{2+} qui y est contenu est dense aux électrons. Le nombre moyen de granules par plaquette augmente avec l'âge avec en moyenne 1 granule par plaquette chez le nouveau-né puis 7 entre 20 et 30 ans pour un maximum de 10 granules par plaquettes à partir de 40 ans (Kessler

INTRODUCTION GÉNÉRALE

et al., 1995). Ces granules ont un diamètre proche des granules alpha avec une moyenne comprise entre 250 et 300 nm de diamètre. Ils contiennent la sérotonine, l'ATP (adénosine triphosphate), l'ADP, le calcium et du pyrophosphate (Holmsen and Weiss, 1979).

- **Les lysosomes :**

Ces granules contiennent principalement des glycohydrolases et des protéases telles que les cathepsines D et E ou la collagénase. Ils mesurent entre 175 et 250 nm.

ii. Le système canaliculaire

Les plaquettes possèdent un système canaliculaire ouvert décrit pour la première fois en 1967 par Behnke, qui est un réseau de membranes internes et interconnectées s'abouchant à la membrane plasmique de la plaquette (Behnke, 1967). Ce système assure le transport de molécules entrant ou sortant de la plaquette. De nombreuses protéines telles que le fibrinogène ou le facteur tissulaire sont importées du plasma via ce système canaliculaire pour être redirigées ensuite vers les granules (Escolar et al., 2008; Escolar and White, 1991; White and Clawson, 1980).

iii. Le cytosquelette

Le cytoplasme plaquettaire est riche en protéines du cytosquelette. La forme discoïde des plaquettes est maintenue grâce à la présence d'une bande marginale composée d'un enroulement de microtubule (8 à 12 spires) qui forme un anneau à sa périphérie et exerce une force de tension sous la membrane plasmique (Italiano et al., 2003; White, 1968). Outre les tubulines qui constituent les microtubules, leur cytosquelette est composé d'actine et de myosine IIA. Le cytoplasme plaquettaire contient aussi des mitochondries, du réticulum endoplasmique lisse (aussi appelé « système tubulaire dense »), occasionnellement du réticulum endoplasmique granulaire, que l'on retrouve notamment dans les plaquettes « jeunes », et plus rarement de l'appareil de golgi (Boneu, 1997; Kieffer et al., 1987).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Granules alpha	Granules Denses	Lysosomes
Albumine	Sérotonine	Cathepsine D et E
Fibrinogène	ATP	Carboxypeptidase A et B
Fibronectine	ADP	Proline carboxypeptidase
Vitronectine	Calcium	β -N-acétyl-D-hexoaminidase
Ostéonectine	Pyrophosphate	β -D-glucuronidase
Facteur de Willebrand		β -D-galactosidase
Thrombospondine		α -D-mannosidase
Facteur plaquettaire 4		α -L-arabinofuranosidase
IgG, IgA, IgM		α -D-galactosidase
Inhibiteur C1		α -L-fucosidase
Plasminogène		β -D-fucosidase
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1		β -D-glucosidase
Inhibiteur de la collagénase dérivé de la plaquette		α -D-glucosidase
Kininogène de haut poids moléculaire		Phosphatase acide
Protéine S		Arylsulphatase
α_2 -antitrypsine		
α_2 -macroglobuline		
α_2 -antiplasmine		
Multimérine		
Protéine basique plaquettaire		
β-thromboglobuline		
Glycoprotéine riche en histidine		
Facteur de croissance transformant β		
Protéine activatrice des tissus conjonctifs III		
Protéine activatrice des neutrophiles II		
Facteur de croissance dérivé des plaquettes		
Facteur de croissance des cellules endothéliales		
Facteur de coagulation V et VIII		

Tableau 1 : Composition des granules plaquettares

D'après (McNicol and Israels, 1999). En violet sont représentés les facteurs produits par le MK.

2. Le mégacaryocyte

Le mégacaryocyte (MK) est une cellule hématopoïétique de grande taille, d'un diamètre de 30 à 60 μm *in situ* chez l'Homme et de 20 à 30 μm chez la souris (Schmitt et al., 2001), présente dans la moelle osseuse chez l'adulte et dont le nom signifie cellule à gros noyau. Elle permet la production des plaquettes sanguines et leur libération dans le réseau vasculaire médullaire. C'est une cellule rare puisqu'elle représente seulement 0,01% des cellules nucléées de la moelle osseuse (Nakeff and Maat, 1974) avec une densité estimée à 9 MK/ mm^2 (Schmitt et al., 2001). Le MK a été observé pour la première fois en 1864 par Robin (Robin, 1864) et décrit ensuite par (Howell, 1890).

a) Propriétés

Le MK est caractérisé par un noyau polylobé et polyploïde. Son cytoplasme présente un système de démarcation membranaire (DMS) ainsi que les corps multi-vésiculaires ébauches des futurs granules. En dessous de la membrane plasmique se trouve la zone périphérique, dépourvue de DMS mais riche en filaments d'actine (Tablin et al., 1990) (Figure 3).

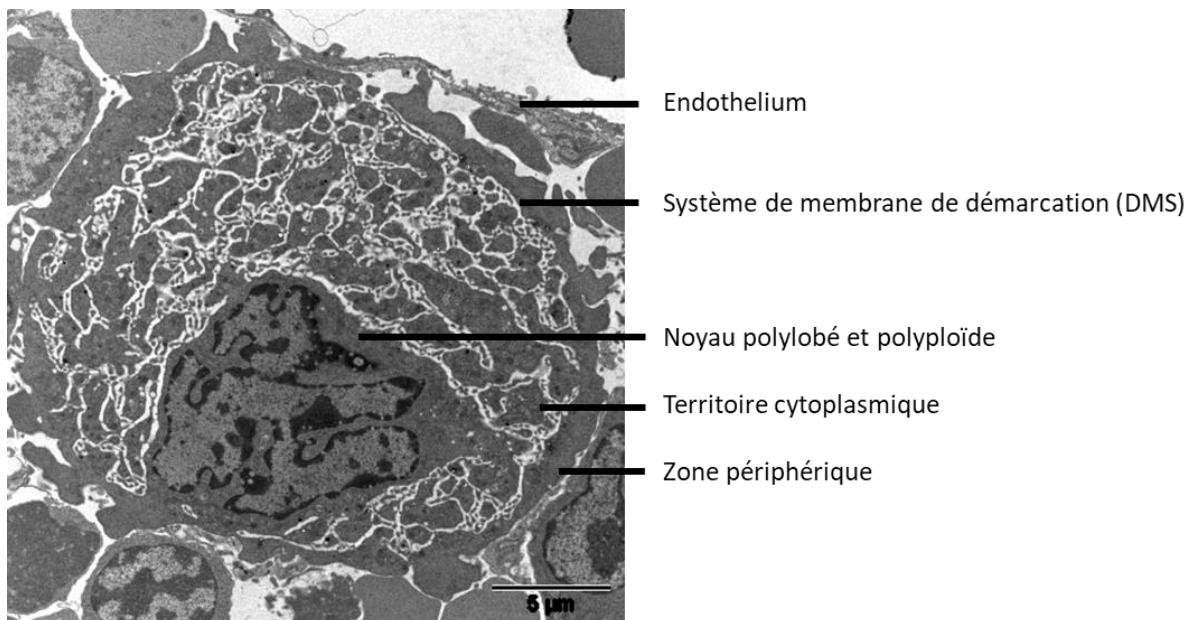


Figure 3 : Mégacaryocyte *in situ* en microscopie électronique

Image : Anita ECKLY (UMR_S1255, EFS-Grand Est)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

i. La polyploïdie

Le MK a comme caractéristique d'être une cellule polyploïde allant de 4 à 128N (Mazur et al., 1988) avec une ploïdie moyenne de 16N (Levine et al., 1982). Cette polyploïdie résulte d'endomitoses successives entraînant une réplication de l'ADN (acide désoxyribonucléique) du MK sans cytokinèse. Le degré de ploïdie du MK est directement relié à son état de maturation même si des MK de seulement 2N ou 4N sont également capables de produire des plaquettes. Ces MK sont déjà présents dans le sac vitellin (Potts et al., 2014). Il a été suggéré que la polyploïdisation du MK permettrait, pour une synthèse équivalente d'ADN, d'obtenir un volume plus important de cytoplasme que lors d'une mitose. Ce volume permettant ensuite une meilleure efficacité de production de plaquettes. Il n'y a pas de pathologie connue due uniquement à un défaut de polyploïdisation du MK. Cependant, les syndromes myélodysplasiques sont presque toujours associés à une hypoploïdie des MK. Dans les leucémies aigües mégacaryoblastiques, les MK sont diploïdes reflétant un arrêt de la maturation des MK (Mazzi et al., 2018).

ii. Le système de membrane invaginée

Une autre particularité du MK est la présence d'un système de membranes invaginées originellement appelé le DMS (figure 3). Cette membrane se forme par invagination de la membrane plasmique (Behnke, 1968) avec laquelle elle est en continuité (Mahaut-Smith et al., 2003) et croît ensuite via l'apport de membrane à partir de l'appareil de Golgi et éventuellement l'apport de lipides via le réticulum endoplasmique (Eckly et al., 2014). Le DMS forme le réservoir de membrane plasmique nécessaire à l'extension des proplaquettes par le MK et à la formation des plaquettes (Schulze et al., 2006). L'importance d'un DMS correctement structuré pour assurer les fonctions du MK est mise en évidence dans plusieurs modèles murins. Les souris déficientes pour la myosine IIA dans la lignée mégacaryocytaire sont thrombopéniques et présentent un DMS désorganisé, dilaté et contenant des structures de type vacuolaire. Ces MK présentent également un défaut de formation des plaquettes *in vitro* (Eckly et al., 2009). Il a également été montré un DMS moins développé ainsi qu'une zone périphérique plus épaisse dans les MK les plus matures d'un modèle murin du syndrome de Bernard-Soulier (Strassel et al., 2009).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

iii. Les corps multi-vésiculaires et les granules

Les granules des plaquettes sont déjà présents dans les MK matures. Il est maintenant admis que ces granules ont pour origine les corps multi-vésiculaires ou « multivesicular bodies » (MVB) (Heijnen et al., 1998; King and Reed, 2002). Les MVBs sont souvent localisés près du Golgi et plus précisément du trans-Golgi qui les alimente en protéines néosynthétisées (vWf, PF4 (platelet factor 4), β -thromboglobuline...). Les MVB se chargent également en protéines d'origine extra-cellulaire comme le fibrinogène qui est importé par endocytose via la GPIIb-IIIa car le MK possède une forte activité d'endocytose (Bentfeld-Barker and Bainton, 1982; Heijnen et al., 1998).

b) Identification du mégacaryocyte

Le MK est facilement reconnaissable en microscopie optique de par sa grande taille et son noyau polylobé. Historiquement les MK étaient enrichis par élutriation ou sur la base de leur vitesse de sédimentation dans un gradient d'albumine et identifiés par une réaction colorée de l'activité acétylcholinestérase chez la souris (Nakeff and Floeh, 1976). Chez l'homme, l'activité acétylcholinestérase ne permet pas d'identifier les MK, c'est alors l'expression de glycoprotéines essentielles aux fonctions plaquettaires comme la GPIIbIIIa (CD41 et CD61) qui est détectée à la surface des MK par des anticorps monoclonaux (Erber et al., 1987).

Le développement d'anticorps monoclonaux, dirigés contre un nombre croissant de protéines de surface, et de la cytométrie en flux ont ainsi permis d'analyser plus en détail les populations de MK et de leurs progéniteurs. L'analyse de la quantité d'ADN nucléaire par cytométrie en flux est ainsi corrélée avec la maturité des MK (Nakeff et al., 1979).

Chez l'homme et la souris, le MK au stade avancé de différenciation est classiquement reconnu par l'expression du marqueur CD41 ou intégrine α IIb, une sous-unité du complexe GPIIb-IIIa et du marqueur CD42 ou GPIb une sous-unité du complexe GPIb-V-IX. Ces deux marqueurs apparaissent progressivement au cours de la mégacaryopoïèse puisque CD41 est déjà présent sur le progéniteur MK (MKp) (Miyawaki et al., 2017) et ont leur maximum d'expression dans le MK mature (Lepage et al., 2000; Vainchenker et al., 1982). Le MK exprime également d'autres marqueurs qu'il partage avec les autres cellules hématopoïétiques tels

INTRODUCTION GÉNÉRALE

que CD45, CD9 ou encore CD31 (pour revue chez la souris : (Huang and Cantor, 2009); chez l'homme : (Tomer, 2004).

II. La mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

Comme toutes les cellules hématopoïétiques, le MK dérive des cellules souches hématopoïétiques à l'issue d'un long processus cellulaire d'engagement, de différenciation, de prolifération et enfin de maturation.

1. L'hématopoïèse

a) Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules multipotentes capables d'autorenouvellement (Keller and Snodgrass, 1990) pouvant donner naissance à toutes les cellules sanguines de la lignée hématopoïétique (Figure 4). L'autorenouvellement correspond à leur capacité à se diviser en deux CSH filles dont l'une au moins, possède exactement les mêmes propriétés que la cellule mère sans se différencier. Un équilibre est maintenu entre les divisions symétriques permettant à une CSH de se diviser en deux CSH et les divisions asymétriques, où une CSH se divise en une autre CSH et une cellule plus engagée (Schroeder, 2007). La première démonstration expérimentale de la présence de CSH dans la moelle osseuse de souris a été réalisée en 1961 par Till et McCulloch (Till and McCulloch, 1961). Par la suite de nombreuses études se sont appliquées à identifier phénotypiquement les cellules de la moelle osseuse capables de reconstituer le système hématopoïétique de souris irradiées. En 1985, Bertoncello utilise le marqueur Rhodamine 123, un fluorochrome se liant aux mitochondries et reflétant l'activité métabolique des cellules. Une population Rhodamine-123^{low} est isolée, enrichie en CSH, qui sont alors identifiées de par leur quiescence (Bertoncello et al., 1985).

En 1988, Spangrude et al., sont les premiers à isoler les CSH de moelle osseuse de souris par les marqueurs Thy-1^{low}Lin⁻Sca-1⁺ (lineage⁻ : CD4, CD8, Mac-1, Gr-1 et B220). Avec seulement

INTRODUCTION GÉNÉRALE

30 CSH isolées et réinjectées il fût possible de reconstituer totalement une moelle de souris irradiée de manière létale et de sauver 50% de ces souris (Spangrude et al., 1988).

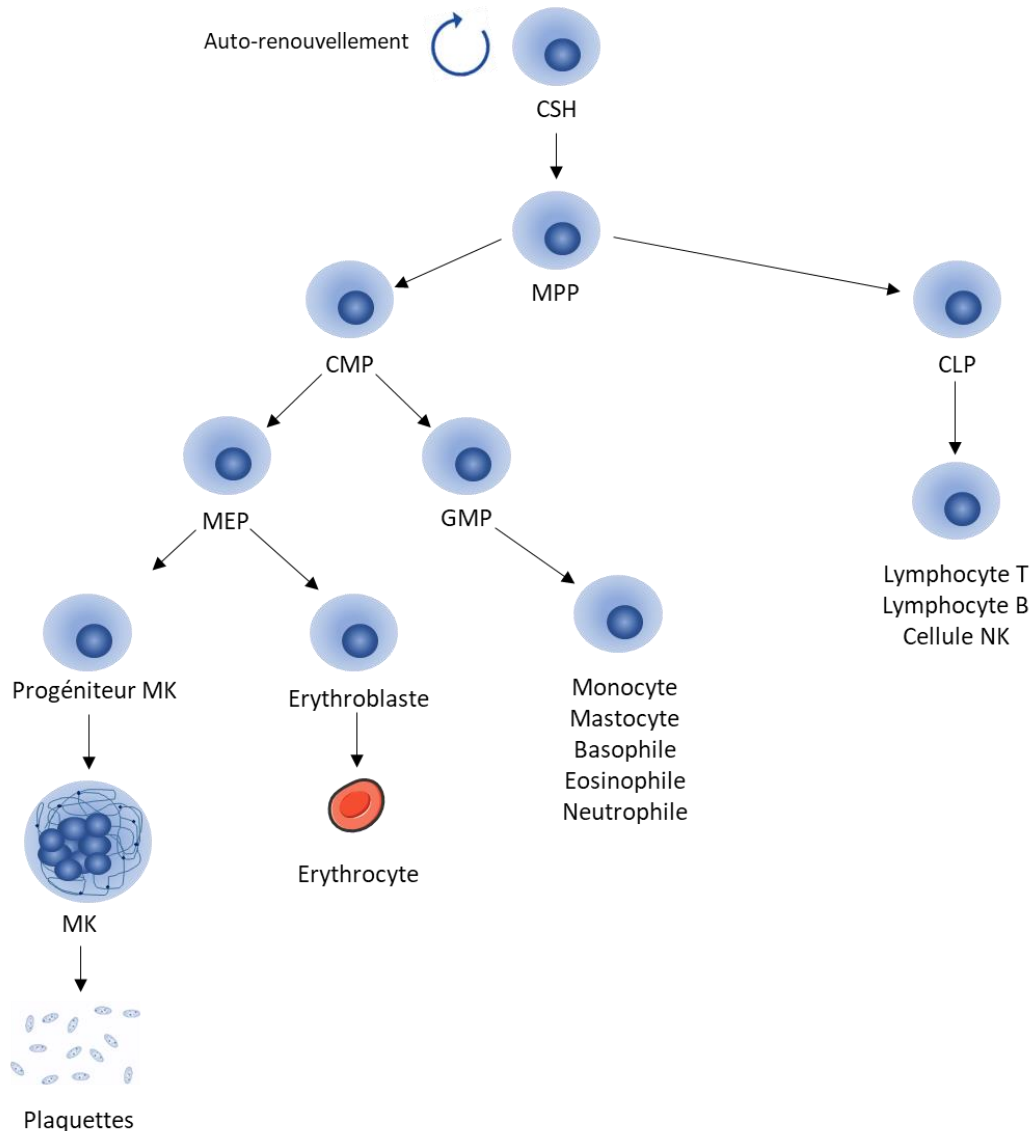


Figure 4 : Schéma « classique » de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse regroupe l'ensemble des processus menant de la CSH à une cellule hématopoïétique mature. La CSH est une cellule multipotente capable d'auto-renouvellement. Elle se différencie en progéniteur multipotent (MPP) et perd alors sa capacité d'auto-renouvellement. Le MPP se différencie à son tour en progéniteur commun myéloïde (CMP) et progéniteur commun lymphoïde (CLP), cellules respectivement à l'origine de la lignée myéloïde et lymphoïde. Le CLP se différencie en lymphocyte B ou T ou en cellule NK. Le CMP est à l'origine du progéniteur commun mégacaryocytaire érythroblastique (MEP) et du progéniteur commun granulocytaire monocyttaire (GMP). Le GMP permet la production des monocytes, mastocytes, basophiles, éosinophiles et neutrophiles. Les MEP donnent les érythrocytes et le progéniteur MK qui deviendra un MK mature capable d'émettre des proplaquettes libérant ainsi les plaquettes dans la circulation sanguine.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Par la suite de nombreux marqueurs tels que CD34^{/low} et c-Kit⁺ ont permis de mieux discriminer la population de CSH chez la souris (Osawa et al., 1996). Une autre approche n'utilisant pas d'anticorps a été mise au point. Elle se base sur l'utilisation du fluorochrome HOECHST 33342 et la visualisation de son émission dans le bleu et le rouge par cytométrie en flux. Apparaît alors une population appelée « side population » enrichie en CSH (Goodell et al., 1996). Pendant longtemps, la panoplie de marqueurs utilisables pour définir la CSH a été limitée par les techniques et réactifs disponibles. Ainsi le développement de nouveaux fluorochromes a permis d'augmenter le nombre de marqueurs et d'affiner le phénotype des CSH par cytométrie en flux. Aujourd'hui la population de CSH est définie par le phénotype Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺CD48⁻CD150⁺ (lin⁻: CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD11b, Ter119, et CD41) chez la souris (Kiel et al., 2005) et CD45⁺CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺CD49f⁺CD71⁻BAH1⁻ chez l'Homme (Notta et al., 2016). Une sélection des phénotypes utilisés pour les CSH est représentée dans le tableau 2. Dans de nombreuses études, le terme de CSH ne recouvre pas la même population avec le même degré de pureté puisque seule une partie de ces marqueurs sont utilisés pour les isoler. Ceci entraîne ainsi l'utilisation de populations contenant certes des CSH mais étant hétérogènes. Ces études réalisées sur des populations non pures conduisent aujourd'hui à réévaluer le modèle de hiérarchie hématopoïétique classiquement défini.

Année	Phénotype	Référence
1985	Rhodamine-123 ^{low}	Bertoncello et al., 1985
1988	Thy-1 ^{lo} Lin ⁻ Sca-1 ⁺	Spangrude et al., 1988
1996	CD34 ^{/low} c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺	Osawa et al., 1996
1996	« side population » (Hoechst red and blue)	Goodell et al., 1996
2005	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺ CD48 ⁻ CD150 ⁺	Kiel et al., 2005

Tableau 2 : Marqueurs historiquement utilisés pour isoler les CSH murines

INTRODUCTION GÉNÉRALE

b) Hétérogénéité du compartiment des CSH

Ces dernières années, la hiérarchie hématopoïétique classiquement représentée a été remise en question.

Le groupe de Connie Eaves a analysé la composition en cellules lymphoïdes et myéloïdes de descendance de greffe de CSH unique (triées sur la base du phénotype : ESLAM : CD45⁺ EPCR⁺ CD48⁻CD150⁺). Deux classes de CSH α et β sont ainsi proposées sur la base de l'équilibre lymphoïde/myéloïde. Ces deux classes de CSH sont présentes dans le foie fœtal mais également chez l'adulte. Les CSH β permettraient une meilleure production de la lignée lymphocytaire que les CSH α . Ceci ne viendrait pas d'un défaut d'engagement dans la CSH mais plutôt d'une déficience des CLP provenant des CSH α à produire la lignée lymphocytaire. La production de la lignée myéloïde est cependant équivalente dans les deux classes de CSH (Benz et al., 2012). Ces résultats suggèrent une complexité et une hétérogénéité dans la population de CSH contrairement au modèle classique de l'hématopoïèse.

Yamamoto et collaborateurs ont mis en évidence une population de CSH pré-orientée vers la lignée myéloïde. Pour cela des CSH provenant de souris transgénique Kusabira-Orange (KuO) permettant l'expression de cette protéine fluorescente ont été greffées en cellule unique. L'expression de KuO a permis de suivre le devenir des cellules et de mettre en évidence cette population biaisée vers la voie myéloïde. Deux cellules filles provenant d'une CSH en culture ont été chacune greffées en cellule unique. Une analyse de la progénie a montré que dans 20% des expériences une division asymétrique avait eu lieu avec une cellule fille CSH et une cellule fille biaisée vers la voie myéloïde. Cette étude suggère une coexistence de division symétrique et asymétrique lors de l'autorenouvellement des CSH dont une des populations est orientée vers la voie myéloïde remettant en cause l'existence des MPP (Yamamoto et al., 2013).

Plus récemment, ont également été identifiées dans des populations de CSH des cellules avec un biais de différenciation vers la voie MK (Haas et al., 2015; Nishikii et al., 2017; Shin et al., 2014). En 2015 Nishikii et al., ont mis en évidence une sous-population de cellules capables de donner directement des MKp à partir de cellules LSK (Lin⁻ c-kit⁺ Sca-1⁺ : qui regroupe les CSH et les MPP chez la souris) et représentant 8% des LSK. Cette sous-population qui exprime CD41⁺ produit un progéniteur unipotent permettant une production importante de MK. La

INTRODUCTION GÉNÉRALE

production de ce progéniteur ne passerait pas par l'intermédiaire du progéniteur bipotent MEP (mégacaryocyte érythroïde progéniteur). La présence de cette population semble être dépendante de la TPO puisque fortement réduite dans des souris déficientes pour le cMpl (Myeloproliferative leukemia protein) (Nishikii et al., 2017). Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette population (LSK CD41⁺CD42b⁺) constitue une « population d'urgence » qui permettra la production rapide de MK à partir du pool de CSH. Par la suite Haas et al., ont montré la présence d'une population CD41⁺ parmi les CSH (triées sur Lin⁻cKit⁺CD150⁺CD48⁻). Le modèle propose l'existence d'une sous-population de CSH quiescentes, ayant des propriétés de CSH mais pré-orientée dans la voie mégacaryocytaire. Cette population sert de réservoir pour une production rapide de MKp, de MK, puis de plaquettes suite à une inflammation (Haas et al., 2015).

Ces CSH pré-orientées vers la voie MK ont également été observées en absence d'inflammation ou de traitement, mettant en évidence leur présence à l'état basal. Ainsi Shin et al., ont démontré l'existence d'une population de CSH c-kit^{high} (les CSH sont normalement ckit^{low}). Leur phénotype de CSH a été démontré par des expériences de greffe de 400 CSH c-kit^{high} (CD45.2) avec 300 000 cellules CD45.1⁺ compétitrices. Le chimérisme constaté jusqu'à 18 semaines après greffe est comparable à celui observé lorsque des CSH c-kit^{low} sont utilisées. Cependant quand ces greffes ont été réalisées à partir de CSH GFP (green fluorescent protein), les auteurs ont observé deux fois plus de progéniteurs de type MEP et de MKp qu'avec les CSH c-kit^{low}. De ces expériences découle la conclusion d'une population de CSH biaisée vers la voie MK (Shin et al., 2014). La démonstration du potentiel CSH pose cependant encore question puisqu'aucune greffe secondaire n'a été effectuée pour établir définitivement la capacité de reconstitution à long terme des populations étudiées.

Les différentes études mettant en avant une voie biaisée vers la lignée mégacaryocytaire sont néanmoins à discuter quant à la définition de la population de CSH utilisée. En effet, dans ces études (Haas et al., 2015; Nishikii et al., 2017; Shin et al., 2014), les phénotypes utilisés ne correspondent pas nécessairement à une population pure de CSH. Les auteurs isolent une population de CSH ne correspondant pas au phénotype proposé par Kiel et al., (Kiel et al., 2005) (voir partie A.II.1.a). Dans aucune de ces études les cellules CD41⁺ ne sont exclues de la population de CSH or Kiel et al., ont montré que l'exclusion des cellules exprimant CD41 permettait un enrichissement maximum en CSH en excluant les progéniteurs engagés vers la

INTRODUCTION GÉNÉRALE

voie MK. CD41 n'est normalement pas exprimé par les CSH chez l'adulte même s'il l'est par les CSH dans l'embryon (Robin et al., 2011). Connaissant l'importance de ce marqueur dans la voie mégacaryocytaire il semble indispensable de l'utiliser afin d'éliminer toute cellule engagée dans cette voie. La population de CSH pré-orientée est souvent associée à une notion de population « d'urgence » pour production rapide de plaquettes suite à une inflammation ou une chimiothérapie. Cette hypothèse, tout à fait recevable devra être confirmée dans des expériences plus strictes en terme de phénotype utilisé.

Les résultats mentionnés ci-dessus ont tous été obtenus dans un modèle murin. Notta et al., ont redéfini la hiérarchie hématopoïétique chez l'homme en repositionnant en particulier la voie mégacaryocytaire par l'analyse du potentiel de différenciation à l'échelle unicellulaire des différentes populations de progéniteurs généralement identifiées dans le foie fœtal, le sang de cordon ombilical, ou la moelle osseuse. Ils proposent que les différentes voies (érythrocytaire, myéloïde et lymphoïde) proviennent d'un MPP alors que la voie MK se démarquerait des autres dès la CSH (Notta et al., 2016). Ce modèle remettrait donc en cause l'existence des CMP et CLP, et suggère aussi une évolution de la hiérarchie au cours du développement. Cette étude est principalement basée sur des cultures en cellules uniques. Un biais possible est le fait que les auteurs ont réalisé ces cultures sur des cellules stromales murines (MS-5) en supplément des cytokines utilisées. Or il a été démontré que ces cellules, en combinaison avec les mêmes cytokines que celles utilisées ici, favorisent l'engagement de cellules ES (Embryonic Stem cells) vers la voie myéloïde et plus précisément mégacaryocytaire (Berthier et al., 1997). Bien que cela ait été montré pour la souris, ceci implique de prendre les résultats de l'équipe de Notta et collaborateurs avec prudence. De plus, l'engagement vers la lignée lymphoïde par les CSH n'est pas abordé dans leur article, résultat nécessaire à leur conclusion sur l'existence des CLP.

Les populations de progéniteurs hématopoïétiques telles que MPP, CMP ou CLP ont été définies sur leurs propriétés clonogéniques ou leur potentiel de différenciation. Elles représentent cependant des populations encore très hétérogènes au vu des séparations de plus en plus sélectives avec une variété croissante de marqueurs. Par exemple S. Doulatov et collaborateurs ont montré la présence d'un progéniteur commun à la lignée lymphoïde et aux cellules dendritiques, macrophages et monocytes questionnant l'existence des progéniteurs CMP et CLP classiquement définis (Doulatov et al., 2010). D'autres études se concentrant sur

INTRODUCTION GÉNÉRALE

la lignée lymphoïde remettent également en cause la hiérarchie hématopoïétique classiquement représentée (Lai and Kondo, 2008).

2. Ontogénie de la lignée mégacaryocytaire

L'hématopoïèse et la mégacaryopoïèse ont lieu chez l'adulte dans la moelle osseuse, mais la mise en place du système hématopoïétique commence bien avant le développement de la moelle osseuse.

a) Mise en place du système hématopoïétique chez l'homme et la souris

Chez les mammifères, deux sites de génération hématopoïétique se mettent en place au cours du développement : un site extra-embryonnaire, le sac vitellin, où l'hématopoïèse dite primitive a lieu (Moore and Metcalf, 1970), et un site intra-embryonnaire, la région contenant l'Aorte, les Gonades et le Mésonéphros (AGM), où émerge l'hématopoïèse définitive (Medvinsky et al., 1993; Müller et al., 1994). Les premières cellules hématopoïétiques sont produites dans le sac vitellin à E7.25 (= jours de développement embryonnaire) chez la souris (Moore and Metcalf, 1970) et 21 jours chez l'Homme (Tavian et al., 1996). Ces cellules sont essentiellement des progéniteurs érythroïdes primitifs qui mûrissent en érythroblastes dit primitifs, mais également des macrophages (Palis et al., 1999). On parle d'hématopoïèse primitive.

L'hématopoïèse définitive émerge dans la splanchnopleure para-aortique (Sp-Pa) où sont générées entre 9.5 et 10 jours de développement chez la souris, des cellules capables de reconstituer toutes les lignées hématopoïétiques après transplantation et ceci, pendant 6 à 8 mois (Cumano et al., 2001). Ce sont les premières CSH à long terme (LT-CSH). Un facteur de transcription en particulier, Runx1 (Runt-related transcription factor 1), joue un rôle primordial puisque dans les souris déficientes pour Runx1, l'hématopoïèse définitive n'a pas lieu (Wang et al., 1996). A E10, les CSH vont migrer dans le foie fœtal (Cumano and Godin, 2007), lieu de leur expansion jusqu'à E15.5-E16.5, sous l'action des chimiokines SDF1 (stromal cell-derived factor 1) et SCF. Des progéniteurs hématopoïétiques sont présents dans la moelle osseuse à partir de E15.5 alors que les CSH n'y sont retrouvées qu'à E17.5 (Christensen et al.,

INTRODUCTION GÉNÉRALE

2004). Cependant, les CSH sont détectées dans la circulation sanguine déjà plusieurs jours avant. Ce délai dans la colonisation de la moelle osseuse par les CSH suggère que le microenvironnement de la moelle n'est pas capable, avant ce stade, d'attirer les CSH ni d'assurer leur renouvellement (Mikkola and Orkin, 2006). A nouveau, le facteur SDF1 est essentiel pour la migration des CSH et leur colonisation de la moelle osseuse (Ara et al., 2003) (figure 5).

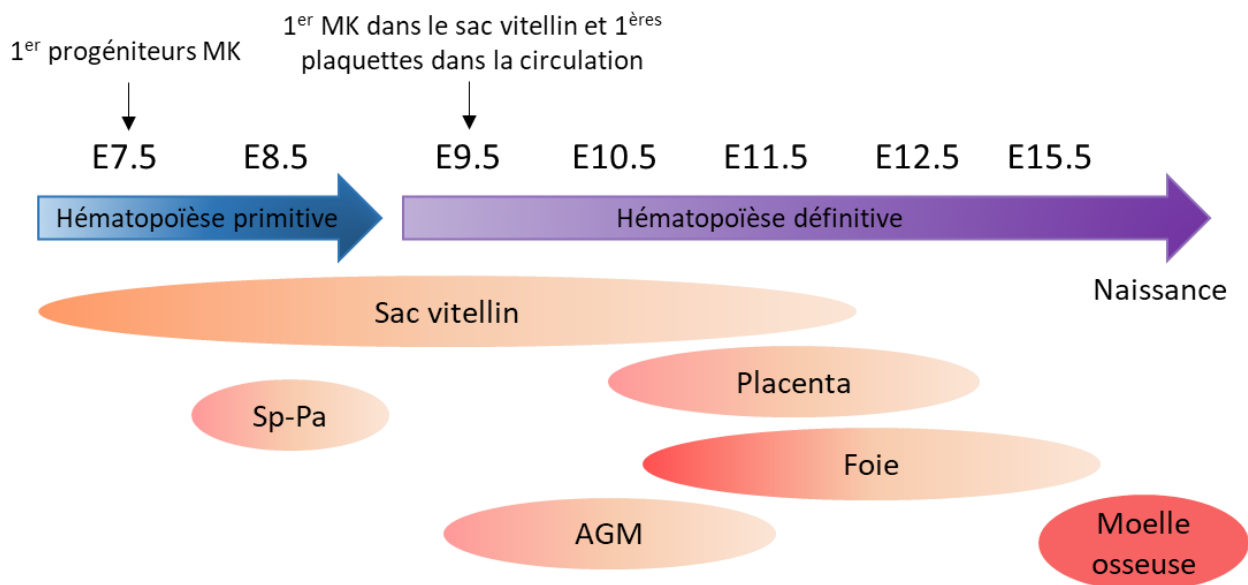


Figure 5 : L'hématopoïèse et la mégacaryopoïèse durant l'embryogenèse murine

Différents sites hématopoïétiques se succèdent au cours du développement de l'embryon murin: le sac vitellin, la splanchnopleure para-aortique, l'AGM, le placenta, le foie puis la moelle osseuse. Les premiers MK et les premières plaquettes apparaissent tôt dans le développement.

b) Mise en place de la mégacaryopoïèse

Alors que l'émergence des CSH au cours du développement et le développement de la lignée erythroïde ont fait l'objet d'un grand nombre d'études, la mise en place de la mégacaryopoïèse et la production de plaquettes au cours du développement embryonnaire ont été peu étudiées.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les données disponibles montrent que des MKp sont présents très tôt lors du développement. Chez la souris, dès E7.5 le sac vitellin contient des progéniteurs clonogéniques mégacaryocytaires (Tober et al., 2007; Xu et al., 2001). Le sac vitellin contient des MKp formant des colonies en présence de SCF (Stem Cell Factor), IL-3, IL-6, EPO (Erythropoïétine), TPO, et G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) qui sont capables d'émettre des proplaquettes en culture et possèdent des marqueurs de MK comme GPIb β (CD42c), GPIIb (CD41), et PF4 (Xu et al., 2001). Les hémangioblastes sont des précurseurs communs aux cellules hématopoïétiques et cellules endothéliales présents au niveau du mésoderme lors de la gastrulation (Choi et al., 1998). Ils sont capables dès E7.5, en culture, de se différencier en MK émettant des proplaquettes. A E10.5 les premiers MK colonisent le foie qui devient le siège principal de la mégacaryopoïèse à E11.5 et des plaquettes sont observées dans la circulation à ce stade avec une taille 1.6 fois plus grande que des plaquettes adultes. La cinétique d'apparition des MKp serait de plus corrélée à l'émergence des progéniteurs bipotents MEP. Comme pour la lignée erythroïde, on peut définir deux vagues de mégacaryopoïèse, la mégacaryopoïèse primitive d'origine vitelline et une mégacaryopoïèse définitive d'origine intra-embryonnaire (Tober et al., 2007).

Une autre étude suggère que les toutes premières plaquettes sont détectables dans le sang dès E9.5 (Potts et al., 2014) et il a été proposé qu'elles ne soient pas issues des MK provenant des progéniteurs hématopoïétiques CD45⁺CD41^{low} (HPC) du sac vitellin mais d'une nouvelle population CD45⁻CD41^{high}CD42d⁺ qui bien que diploïde, produit des proplaquettes *in vitro*. Cette population ne provient pas des HPC puisqu'elle reste présente dans les souris inactivées pour Runx1 qui ne produisent pas d'hématopoïèse définitive et ne développent donc pas d'HPC. Il semblerait que 2 types de MKp cohabitent dans le sac vitellin, l'un provenant de l'hématopoïèse primitive, source des premières plaquettes, et l'autre provenant des HPC produites lors de l'hématopoïèse définitive et assurant la production de plaquettes plus tardivement (Potts et al., 2014). Les études mentionnées ci-dessus ont toutes été réalisées chez la souris et par comparaison la mégacaryopoïèse dans l'embryon humain est très mal connue.

3. De la CSH au MK

a) CSH : Autorenewement ou différenciation

La plupart des cellules sanguines sont des cellules à courte durée de vie : 115 jours pour les érythrocytes (Franco, 2009), 13 jours en moyenne pour les leucocytes (Kline and Clifton, 1952) et 8 à 10 jours pour les plaquettes. Le pool de CSH produit donc des MPP qui sont dotés d'un très fort potentiel prolifératif et sont capables de produire plusieurs types de cellules hématopoïétiques. Ce processus fonctionne de manière équilibrée entre la différenciation des CSH en MPP et l'autorenewement des CSH (Seita and Weissman, 2010). La différenciation des CSH en MPP est très peu connue. Il est suggéré que des modifications épigénétiques participent à ce processus. En effet, l'absence d'ADN méthyltransférase 3a résulte en un fort renouvellement des CSH au détriment de leur différenciation (Challen et al., 2011). Comme vu précédemment (partie A.II.1.a) il est suggéré une coexistence de division symétrique et asymétrique lors de l'autorenewement des CSH (Yamamoto et al., 2013).

L'orientation du MPP en CLP ou CMP a été partiellement élucidée chez la souris. Il a été montré que des souris déficientes pour le ligand Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3) présentaient un nombre et un renouvellement des CSH comparables à des souris sauvages. La lignée myéloïde n'est pas impactée par cette déficience mais une baisse du nombre de CLP et des progéniteurs T et B a été observée mettant en évidence le rôle du ligand Flt3 dans l'orientation de la CSH vers la voie myéloïde (Sitnicka et al., 2002).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

b) Engagement et différenciation

La mégacaryopoïèse est le processus impliquant l'orientation d'une CSH vers la voie mégacaryocytaire, sa différenciation en MKp capables de proliférer, puis leur maturation en MK capable de libérer des plaquettes (Figure 6, les mécanismes sont détaillés parties A.II.4).

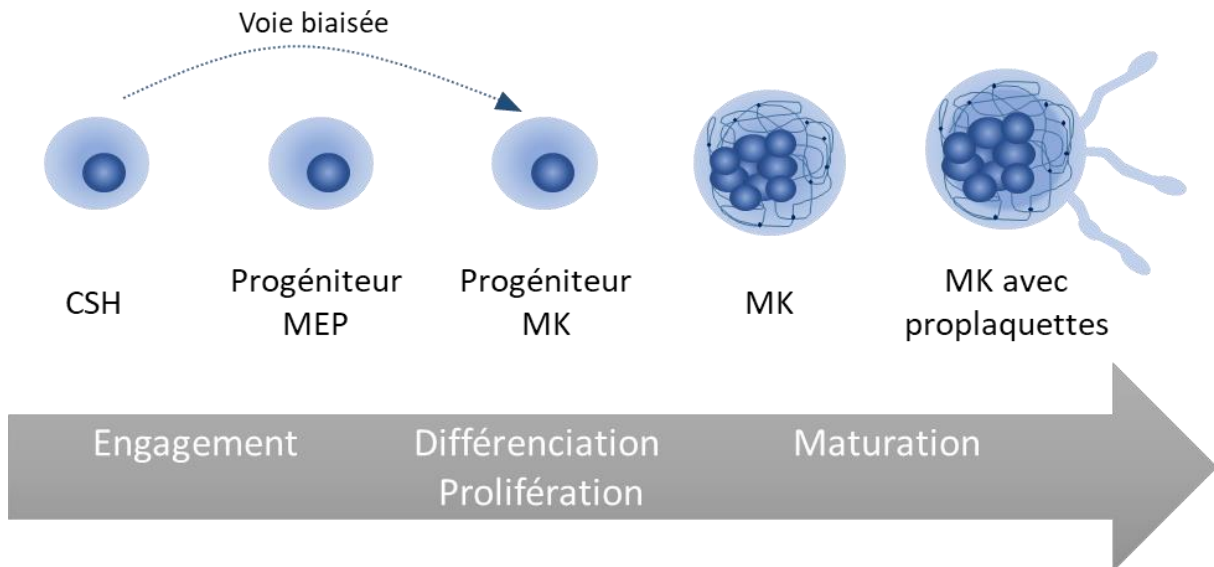


Figure 6 : Schéma de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse comprend l'ensemble des étapes menant de la CSH au MK mature capable d'émettre des proplaquettes. La première étape est l'engagement de la CSH dans la voie érythro-mégacaryocytaire pour donner un progéniteur bipotent MEP. Ce progéniteur se différencie alors en progéniteur MK qui va proliférer. Le MK passe alors par une étape de maturation comprenant l'endomitose permettant la polypléidisation du MK et le développement du DMS. Finalement, le MK mature, au contact de l'endothélium, va émettre des proplaquettes dans la circulation sanguine donnant naissance aux plaquettes.

Des études chez la souris ont cherché à identifier phénotypiquement un progéniteur bipotent ou MEP capable de produire les cellules matures de la lignée érythroïde et mégacaryocytaire (Nakorn et al., 2003; Ng et al., 2012). Ce progéniteur est de phénotype $\text{Lin}^- \text{CD9}^+ \text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{low}} \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{IL7R}\alpha^- \text{Thy1.1}^-$ (lin : CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1, Mac-1, TER119).

Le progéniteur unipotent MKp dérive quant à lui du MEP et est restreint dans la lignée mégacaryocytaire. Chez la souris il est défini par le phénotype $\text{Lin}^- \text{CD9}^+ \text{CD41}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{low}} \text{c-kit}^+ \text{Sca-}$

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1⁻IL7R α ⁻Thy1.1⁻ (lin : CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1, Mac-1, TER119). La différence entre MEP et MKp réside en l'expression de CD9 et CD34 (Nakorn et al., 2003).

Chez l'Homme, le CMP est identifié par le phénotype Lin⁻CD34⁺CD38⁺IL-3R α ^{lo}CD45RA⁻ et le MEP par le phénotype Lin⁻CD34⁺CD38⁺IL-3R α ⁻CD45RA⁺ comme démontré par des tests clonogéniques (lin : CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, et glycophorine A). Ces CMP et MEP n'expriment ni CD9 ni CD41 (Manz et al., 2002).

Par la suite le phénotype des MEP a été affiné notamment sur l'expression de CD38. Sanada et al., ont démontré que la population de MEP est en réalité CD38^{dim} et non CD38⁺ comme défini précédemment. Ces nuances s'expliquent par une expression de CD38 qui forme un gradient et ne définit pas de population positive et négative claire par cytométrie en flux (Sanada et al., 2016). Les MKp, restreint dans la lignée mégacaryocytaire, expriment quant à eux CD41 avec un phénotype Lin⁻CD34⁺CD38^{dim}FLT3⁻CD45RA⁻MPL⁺CD36⁻CD41⁺ (lin- : CD2, CD11b, CD14, CD15, CD20, and CD56) (Sanada et al., 2016).

c) Maturation du MK

Le MKp prolifère puis subit un processus de maturation préparant les éléments indispensables à la formation des futures plaquettes. Ceci implique la formation du DMS, le développement des granules et de leur contenu ainsi que de nombreuses endomitoses conduisant à la polyploïdie et l'augmentation du volume cytoplasmique (ces différents aspects ont également été abordés dans la partie propriétés du MK voir partie A.I.2.a). Le MK mature exprime également des marqueurs tels que CD41 et CD42 permettant son identification (voir partie A.I.2.b).

Lors de l'endomitose la mitose se poursuit normalement jusqu'à la fin de l'anaphase où la cytokinèse (séparation du cytoplasme entre les deux cellules filles) n'a pas lieu en plus d'un défaut dans la caryocinèse (séparation des deux noyaux fils) (Mazzi et al., 2018). Ces mécanismes particuliers résultent d'une faible activité de la voie Rho/Rock associée à une perte d'expression de la myosine IIB (Lordier et al., 2008; Mazzi et al., 2018). Ces endomitoses sont répétées entraînant la polyploïdie du MK. Il est suggéré que ces endomitoses successives permettent l'agrandissement du cytoplasme nécessaire à la production de quelques 3000 plaquettes par MK mais également l'amplification de certains gènes (Raslova et al., 2003).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

C'est également lors de ce processus de maturation que se forme le DMS, un système de membranes invaginées à partir de la membrane plasmique (Behnke, 1968). Le complexe protéique PACSIN2 (protein kinase C and casein kinase II substrate 2)-Filamine A participerait à l'initiation de l'invagination de la membrane plasmique et le DMS serait alimenté ensuite en membranes par l'appareil de Golgi (Begonja et al., 2015; Chitu and Stanley, 2015; Eckly et al., 2014). Ce réseau membranaire forme le réservoir de membrane plasmique nécessaire aux futures proplaquettes et plaquettes (Schulze et al., 2006). Enfin, les MVB mûrissent en granules et se chargent en protéines. Ils sont souvent localisés près du Golgi qui les alimente en protéines synthétisées par le MK (vWf, PF4,...) (Lambert et al., 2014; Schick Paul et al., 1997). Les granules intègrent également des protéines extra-cellulaire endocytées par le MK (par exemple en fibrinogène endocyté via son interaction avec la GPIIb-IIIa) (Handagama et al., 1993; Heijnen et al., 1998).

4. La thrombopoïèse

a) Passage trans-endothélial

Le passage trans-endothélial peut se faire dans les deux sens : de la lumière du vaisseau vers le tissu adjacent c'est-à-dire l'extravasation ou bien du tissu vers la lumière, c'est l'intravasation. La plupart des données concernant l'extravasation ont été obtenues dans le contexte du cancer, lors du processus métastatique, ou de l'immunité avec la diapédèse et l'infiltration des leucocytes au site inflammatoire (Strell and Entschladen, 2008). Plusieurs molécules ont été mises en jeu dans ce processus telles que Jam-C (junctional adhesion molecule 3) (Woodfin et al., 2011), CXCR7 (Zabel et al., 2011), VLA4 (Very Late Antigen-4), VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1), SDF1 (Imai et al., 1999) ou encore ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1)(Sakamoto et al., 2018). Lors des greffes de CSH, leur « homing » (adressage) dans la moelle est également un phénomène d'extravasation. Les mécanismes intervenant sont proches de ceux de la diapédèse des leucocytes et regroupent notamment SDF1, des sélectines, et différentes intégrines (Sahin and Buitenhuis, 2012).

Lors de la mégacaryopoïèse les proplaquettes sont émises au travers du vaisseau vers sa lumière, c'est de l'intravasation. Cette différence au regard de la métastase ou du homing est notable et les mécanismes mis en jeu sont sans doute différents. Lors de l'extravasation les

INTRODUCTION GÉNÉRALE

cellules adhèrent aux cellules endothéliales par la face apicale, passent l'endothélium puis la lame basale. Pour l'intravasation, les cellules doivent en premier passer la lame basale puis l'endothélium puis se retrouvent dans un milieu liquide et sous l'influence du flux.

En 1978, Lichtman a observé en microscopie électronique les MK au contact des sinusoides et mis en évidence des protrusions de MK dans le cytoplasme des cellules sinusoidales. Par analogie avec l'intravasation des leucocytes de la moelle vers le vaisseau (Lichtman et al., 1978) il a alors été proposé un mécanisme de fusion-fission des membranes des cellules endothéliales pour le passage des MK (Tavassoli, 1981). Une autre hypothèse est que les proplaquettes puissent passer entre deux cellules endothéliales puisqu'il n'est observé aucune jonction serrée au niveau des sinusoides (Tavassoli and Shaklai, 1979). Deux mécanismes distincts ont donc été proposés pour le passage des proplaquettes dans la circulation, un mécanisme transcellulaire ou paracellulaire, sans que l'on ait définitivement conclu à ce jour.

Il a été décrit que les proplaquettes sont émises au niveau des sinusoides, qui présentent une seule couche de cellules endothéliales et une lame basale discontinue (Inoue and Osmond, 2001). Une hypothèse serait que les MK émettent les proplaquettes au niveau de ces régions sans lame basale facilitant ainsi leur passage.

Des études ont essayé de modéliser le passage trans-endothélial *in vitro* dans un système de Transwell. T. Hamada et al., ont ainsi montré la formation de plaquettes dans la chambre inférieure après mise au contact de MK avec des cellules endothéliales médullaires et utilisation de SDF1 (Hamada et al., 1998). Une deuxième étude suggère un mécanisme impliquant VLA4 et VCAM-1 (Imai et al., 1999). La localisation du passage au niveau de l'endothélium n'a cependant pas été définie dans ces études. Une question importante se pose sur ces modèles en culture qui est leur capacité à reproduire la polarisation des cellules endothéliales décrites *in vivo*. Il est suggéré que la face adhérente au support reproduise la face basale et que la partie au contact du milieu représente la face apicale. Cette notion provient d'études montrant que la sécrétion de certaines molécules est polarisée *in vitro* par exemple pour le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Blaauwgeers et al., 1999); le vWf (van Buul-Wortelboer et al., 1989) et l'endothéline 1 (Wagner et al., 1992). L'étude de l'orientation de cellules épithéliales de thyroïdes (cellules polarisées *in vivo*) *in vitro* a confirmé la conservation apico-basale des cellules avec le pôle basal au contact de la surface adhérente.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Néanmoins, cette polarisation est relative puisque modulable selon la composition du milieu (Mauchamp et al., 1987). Une étude plus approfondie de l'orientation des cellules endothéliales primaires en culture reste nécessaire en vue de mimer au mieux *in vitro* le passage trans-endothélial des proplaquettes.

b) La formation des proplaquettes et plaquettes

La thrombopoïèse est la génération de plaquettes à partir des MK. Plusieurs théories ou modèles de formation des plaquettes par le MK ont été proposés sur la base d'études *in situ*, *in vivo* et *in vitro*.

Le premier modèle proposait l'existence de plaquettes préformées à l'intérieur du MK, c'est la théorie des « territoires plaquettaires ». Ce modèle a été construit autour d'observations en microscopie électronique à transmission de MK *in situ* dans la moelle osseuse, montrant une fragmentation du cytoplasme par le DMS dans le MK mature. Ces territoires de la taille d'une plaquette et contenant des organelles (proche de celles retrouvées dans la plaquette) suggéraient la pré-formation des plaquettes dans le MK (Yamada, 1957).

Par la suite un deuxième modèle a été proposé basé cette fois sur l'observation de MK par microscopie électronique à balayage. Il a été observé *in situ*, que ceux-ci émettaient des fragments dans la lumière du vaisseau au travers des sinusoides médullaires. Ces fragments ont une longueur variable allant jusqu'à 120 μm et une largeur comprise entre 1,5 et 3,5 μm . Il a également été décrit une constriction de ces fragments, faisant penser à une délimitation des futures plaquettes. Les fragments ainsi émis dans la circulation ont un cytoplasme de composition comparable à celle des futures plaquettes et ont été appelés « proplaquettes ». Cette théorie des proplaquettes a remis en cause la théorie précédente des territoires plaquettaires préformés (Becker and De Bruyn, 1976).

La microscopie électronique permet une résolution importante mais nécessite un tissu fixé empêchant d'observer la dynamique de ces structures. Junt et al., ont confirmé la théorie des proplaquettes *in vivo* par microscopie intravitale chez la souris. Ils ont mis en évidence la présence de MK apposés aux sinusoides médullaires et émettant des proplaquettes dans la circulation. Ces proplaquettes sont libérées avec des tailles variables et impliquent un dernier remodelage des proplaquettes dans la circulation pour aboutir aux plaquettes matures (Junt

INTRODUCTION GÉNÉRALE

et al., 2007). Il est suggéré que ce remodelage aurait lieu dans la microvasculature pulmonaire (Lefrançois et al., 2017) (Cette notion sera rediscutée dans la partie A.III.3).

La notion de proplaquette a ensuite été reprise pour des observations *in vitro*. L'analyse par cinématographie a mis en évidence l'élongation de proplaquettes fines et ramifiées (Thiery and Bessis, 1956a, b). Ces données ont été confirmées dans des MK différenciés en culture à partir de progéniteurs Lin⁻ (souris) ou CD34⁺ (Homme) (Italiano et al., 1999; Patel et al., 2005a). Il a été suggéré que les proplaquettes sont émises à partir de la réserve de membrane plasmique que constitue le DMS (Radley and Haller, 1982). Les proplaquettes produites en culture ont des similitudes en terme d'expression de marqueurs et de composition de cytoplasme avec les plaquettes. Elles expriment toutes deux les glycoprotéines GPIb (CD42b), GPIIb (CD41a) et le fibrinogène et possèdent des granules denses (Choi et al., 1995).

Les mécanismes aboutissant à l'émission de proplaquettes ont été majoritairement étudiés dans ces systèmes *in vitro*. Ainsi il a été mis en évidence que l'extension des proplaquettes est dépendante des glissements de microtubules et que les branchements dépendent du cytosquelette d'actine (Bender et al., 2015; Italiano et al., 1999; Patel et al., 2005b). Les études *in vivo* suggèrent un mécanisme distinct où les microtubules sont répartis de manière hétérogène, isolée et sont assemblés en faisceau le long des proplaquettes. L'extension du fragment de MK *in vivo* se ferait alors par fusion de la membrane plasmique et du DMS rendue possible par la perte de la zone périphérique (Brown et al., 2018).

5. Mécanismes contrôlant la mégacaryopoïèse

a) Facteurs intrinsèques

Les mécanismes de régulation intrinsèque de la mégacaryopoïèse s'appliquent principalement au niveau transcriptionnel. Un certain nombre de facteurs de transcription ont été identifiés qui agissent à différentes étapes de la mégacaryopoïèse mais qui sont souvent également impliqués dans d'autres lignées hématopoïétiques (Figure 7).

GATA1 (GATA binding protein 1) est une protéine à doigt de zinc liant l'ADN et dont le gène est présent sur le chromosome X. Il est nécessaire à la lignée érythro-mégacaryocytaire. En effet, des souris mâles déficientes pour GATA1 présentent une anémie sévère avec une lignée

INTRODUCTION GÉNÉRALE

érythrocytaire bloquée au stade pro-érythroblaste et meurent précocement (entre E10.5 et E11.5) (Fujiwara et al., 1996). Par ailleurs, le knock-out de GATA1 dans la lignée mégacaryocytaire entraîne une baisse du nombre plaquettaire, un arrêt de la maturation des MK et une accumulation de MK immatures (DMS désorganisé et quasi absence de granules) (Shivdasani et al., 1997). De plus, les MK déficients pour GATA1, expriment peu les marqueurs mégacaryocytaires GPIb α (CD42b), GPIb β (CD42c) et PF4 (Vyas et al., 1999). Les souris GATA1^{low} dans lesquelles l'expression de GATA1 est diminuée sont thrombopéniques. Les cellules sont partiellement bloquées au stade MEP et les MK présentent un défaut de maturation du cytoplasme.

FLI1 (Friend leukemia virus integration 1) est une protéine à structure hélicoïdale dont le knock-out est létal lors de l'embryogenèse. Les MKp des souris FLI1^{-/-} purifiés à partir du foie foetal sont plus nombreux mais ont un cytoplasme moins développé que les MKp des souris sauvages. Leurs granules alpha sont également moins nombreux et le DMS est désorganisé. La délétion d'une partie du chromosome 11 chez l'homme, contenant FLI1, est responsable du syndrome de Jacobsen où les patients présentent notamment une thrombopénie (Dalm et al., 2015) et du syndrome de Paris-Trousseau (Favier et al., 2003).

GFI1b (Growth factor independence-1) est un facteur de transcription à doigt de zinc particulièrement impliqué dans l'axe érythro-mégacaryocytaire. Les souris déficientes pour GFI1b meurent à E15 de développement du fait de l'absence d'érythropoïèse définitive (arrêt au stade BFU-E). Afin d'étudier son action il a été éteint par shARN (short hairpin Acide RiboNucléique) dans des progéniteurs hématopoïétiques humains CD34⁺. On observe alors une baisse de prolifération des progéniteurs MEP ainsi qu'une inhibition de la différenciation des cellules CD34⁺ en érythrocyte ou MK. GFI1b agit donc sur des étapes précoces de la mégacaryopoïèse : la production de MEP puis leur différenciation en MK et érythrocyte. Un des mécanismes proposé est que GFI1b réprime la transcription du récepteur III au TGF β (TGF β RIII) inhibant ainsi la signalisation en aval, notamment la phosphorylation des Smad (Randrianarison-Huetz et al., 2010).

NF-E2 (nuclear factor, erythroid 2) est une protéine formée de 2 sous-unités : p45 et p18. Les souris déficientes pour NF-E2 présentent une thrombopénie sévère malgré un nombre de MK important dans la moelle. La différenciation en MK et l'endomitose sont normales indiquant une action tardive de NF-E2 (Shivdasani et al., 1995). Ces MK présentent des anomalies

INTRODUCTION GÉNÉRALE

cytoplasmiques notamment un nombre réduit de granules, un DMS désorganisé et l'absence d'émission de proplaquettes en culture (Lecine et al., 1998). Bien que cette protéine semble essentielle pour la mégacaryopoïèse chez la souris, aucune mutation n'a, à ce jour, été associée à une pathologie plaquettaire chez l'Homme.

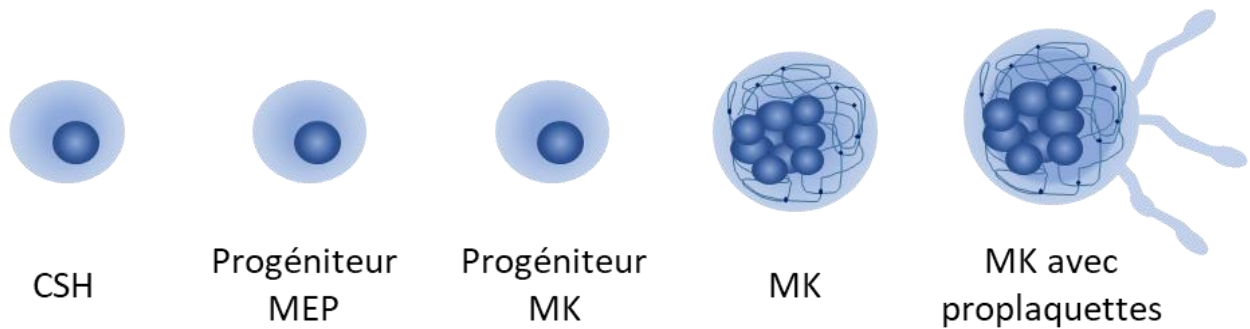
b) Facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques agissant sur le MK sont multiples. Des signaux chimiques venant de cytokines ou de la matrice extra-cellulaire ainsi que les contraintes physiques environnantes sont autant de facteurs qui influencent la mégacaryopoïèse. La thrombopoïétine (TPO), qui est la cytokine principale de la mégacaryopoïèse mais également les interleukines 3, 6 et 9 ainsi que le SCF qui sont très largement utilisées *in vitro* seront détaillées ci-après.

i. La thrombopoïétine

Le terme TPO a été utilisé pour la première fois en 1958 pour désigner la substance permettant une augmentation du nombre de plaquettes suite à un stimulus thrombocytopénique mais il a fallu attendre 1994 pour que cette protéine soit clonée et purifiée pour la première fois (Bartley et al., 1994; de Sauvage et al., 1994; Lok et al., 1994; Sohma et al., 1994). Son identification a permis très rapidement de montrer que la liaison de la TPO à son récepteur, le cMpl, est essentielle dans le processus de mégacaryopoïèse (Bartley et al., 1994).

La TPO est une glycoprotéine de 85 kDa produite par le foie et les reins et dont l'ARN messager a également été détecté dans la rate et les cellules stromales de la moelle osseuse (Sungaran et al., 1997). Ainsi les hépatocytes produisent de manière constitutive la TPO (Jelkmann, 2001). Il a été montré une production compensatoire de TPO par le foie et la moelle osseuse en cas d'insuffisance rénale chronique où la production de TPO par les reins est diminuée (Kazama et al., 2011). Les concentrations de TPO dans le sérum humain sont habituellement entre 0.55 et 0.97 pmol/L (Kosugi et al., 1996).



Facteurs de transcription



Cytokines



Figure 7 : Facteurs de transcription et cytokines intervenant dans la mégacaryopoïèse

De nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques interviennent durant la mégacaryopoïèse. Sont ici représentés les principaux facteurs de transcription et cytokines impliqués. A cela il faut ajouter l'implication des protéines de la matrice extra-cellulaire et les forces physiques appliquées aux cellules (Figure 14).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Sa partie N-terminale de 155 résidus possède 21% de séquences identiques et 46% de séquences similaires à l'érythropoïétine. C'est le domaine N-terminal qui va permettre la liaison de la TPO à son récepteur, le cMpl qui est exprimé par les précurseurs MK, les MK matures, les plaquettes mais aussi les CSH (Kaushansky, 1998; Kuter, 1996). La TPO permet l'autorenouvellement des CSH à court et long terme chez la souris (Yagi et al., 1999) ; (Kaushansky, 2005). Elle favorise l'engagement des progéniteurs murins et CD34⁺ humains dans la voie mégacaryocytaire avec la formation *in vitro* de colonies mégacaryocytaires ainsi que leur maturation (Banu et al., 1995; Nichol et al., 1995). La TPO intervient également dans la maturation du MK en augmentant la polyploïdisation, la taille du MK et l'expression de marqueurs de différenciation (Kaushansky et al., 1994). La liaison de la TPO à son récepteur induit l'activation de la voie JAK/Stat, les kinases JAK2 et TYK2 (Non-receptor tyrosine-protein kinase) étant directement couplées au cMpl. L'activation de ces kinases entraîne l'activation de STAT3 et STAT5 puis la phosphorylation en cascade de différentes voies de signalisation stimulant la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) et la voie Raf-1/MAP (mitogen-activated protein) kinase (Besancenot et al., 2014; Deutsch and Tomer, 2006). Elle agit en synergie avec d'autres cytokines telles que le SCF, l'interleukine 11 et l'EPO pour stimuler la différenciation des MKp. La TPO ne semble néanmoins pas jouer de rôle dans la libération des plaquettes (Kaushansky and Drachman, 2002; Nagahisa et al., 1996).

La régulation des niveaux de TPO se fait à deux niveaux. Tout d'abord, par sa liaison au récepteur cMpl sur les plaquettes et les MK qui va entraîner l'internalisation du ligand et de son récepteur. Ainsi, la concentration circulante de TPO est inversement corrélée à la masse mégacaryocyto-plaquettaire (Vainchenker et al., 2013). Une étude plus récente implique également la sénescence des plaquettes dans la régulation de la production de TPO par le foie. Lorsque les plaquettes perdent l'expression de l'acide sialique à leur surface elles entrent en sénescence et sont éliminées au niveau hépatique via le récepteur Ashwell-Morrell. Ce mécanisme d'élimination entraîne alors une production de l'ARNm de la TPO *in vivo* et *in vitro* via JAK2 et Stat3 afin d'augmenter la production de nouvelles plaquettes (Grozovsky et al., 2015).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

ii. Les interleukines 3, 6 et 9

L'interleukine 3 est une des premières cytokines identifiées capable de stimuler la prolifération de l'ensemble des progéniteurs hématopoïétiques (Metcalf et al., 1986). Elle agit à des stades précoces de la mégacaryopoïèse mais également sur les cellules matures (Carrington et al., 1991; Metcalf et al., 1986). Il a été montré chez l'homme que l'IL-3 favorisait la production des progéniteurs MKp et érythroïdes à partir d'une suspension de cellules médullaires enrichies en progéniteurs hématopoïétiques (Emerson et al., 1988; Quesenberry et al., 1985). L'IL-3 agit principalement en synergie avec d'autres cytokines telles que l'IL-6 (Ishibashi et al., 1989b) ou le GM-CSF (granulocyte macrophage- colony stimulating factor) et l'IL-1 (Briddell and Hoffman, 1990).

L'interleukine 6 (IL-6) est une glycoprotéine de 26 kDa qui joue un rôle dans les phases finales de la mégacaryopoïèse. L'utilisation d'IL-6 *in vitro* permet une augmentation de la taille et de la ploïdie des MK murin et humain (Ishibashi et al., 1989b; Kimura et al., 1990; Tajika et al., 1998). Néanmoins, l'utilisation seule de l'IL-6 dans des tests clonogéniques de cellules non adhérentes de moelle osseuse ne permet pas d'augmenter le nombre de MKp. Bien que cela n'ait pas été démontré spécifiquement dans le MK, l'action de l'IL-6 sur son récepteur entraîne l'activation des voies de signalisation JAK-STAT3 et des MAP kinases, des voies impliquées dans la différenciation et la maturation du MK (Tanaka et al., 2014). Des études menées *in vivo* ont montré une augmentation du compte plaquettaire chez des souris traitées à l'IL-6 sans augmentation du nombre de MKp ou de MK. La taille des MK ainsi que leur ploïdie étaient par ailleurs augmentées confirmant le rôle de l'IL-6 dans la maturation des MK. Ces résultats ont été obtenus chez la souris mais également le primate (Asano et al., 1990; Ishibashi et al., 1989a; Kimura et al., 1990).

L'interleukine 9 est une cytokine sécrétée principalement par les lymphocytes T (Goswami and Kaplan, 2011). Il a cependant été montré que les ostéoblastes la sécrétaient également. L'IL-9 favorise l'expansion des MKp murins via la voie Stat3 *in vitro* (Xiao et al., 2017). Chez l'homme il favorise également la production et la différenciation des MKp de type CFU-MK en combinaison avec d'autres facteurs comme l'EPO ou le SCF. Enfin, en combinaison avec ces mêmes facteurs, il favorise la production de proplaquettes en culture (Fujiki et al., 2002). *In vivo*, l'utilisation d'IL-9 permet une récupération plus rapide du compte plaquettaire après une thrombopénie induite par chimiothérapie (Xiao et al., 2017).

iii. Autre facteur de croissance : le SCF

Le SCF participe au maintien des CSH mais également à la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques quel que soit le lignage et plus précisément les MKp (Erickson-Miller et al., 1993; Hassan and Zander, 1996; Imai and Nakahata, 1994). Le SCF intervient peu dans la maturation du cytoplasme et la polyploïdisation du MK (ni dans les stades tardifs tels que l'émission de proplaquettes) mais plus précocement dans la mégacaryopoïèse (Tajika et al., 1998). *In vitro*, l'action du SCF a surtout été étudiée en combinaison avec d'autres cytokines telles que l'IL-3, l'IL-6 ou la TPO pour augmenter ou compléter leur activité (Debili et al., 1993; Luskey et al., 1992; Tajika et al., 1998; Williams and Allan, 1996).

6. Production de plaquettes *in vitro*

Dans certaines pathologies, des transfusions de plaquettes sanguines sont nécessaires de manière curative ou préventive (Tiberghien et al., 2016). Ces transfusions de concentrés plaquettaires sont dépendantes des dons de sang de volontaires bénévoles. Les besoins en plaquettes sont nombreux alors que la durée de stockage des concentrés plaquettaires est limitée à 5 jours seulement ce qui conduit à une forte pression sur les réseaux logistiques (Thon et al., 2015). La production de plaquettes sanguines *in vitro* représente donc un enjeu important pour la transfusion.

A l'heure actuelle, bien que de nombreux facteurs impliqués dans la mégacaryopoïèse soient connus, les méthodes de culture *in vitro* ne permettent pas de produire un nombre comparable de plaquettes à celui produit *in vivo*. En effet, il est estimé qu'un seul MK produit entre 3000 et 4000 plaquettes *in vivo*, alors que les conditions de culture actuelles permettent quant à elles une production d'à peine 100 à 150 plaquettes par MK (Heazlewood et al., 2017; Thon et al., 2017). Pour améliorer les rendements de production de plaquettes tout en complétant les connaissances sur la mégacaryopoïèse, plusieurs approches de culture sont possibles.

Plusieurs sources de cellules sont envisageables. Les premiers travaux ont fait appel aux progéniteurs CD34⁺ souvent appelés CSH par abus de langage. Les cellules CD34⁺ constituent un ensemble hétérogène de progéniteurs plus ou moins engagés mais également de CSH. Ces cellules peuvent être isolées à partir de moelle osseuse, de sang périphérique ou encore de

INTRODUCTION GÉNÉRALE

sang de cordon ombilical (Van Epps et al., 1994). Les CD34⁺ sont les cellules de choix pour une greffe autologue dans le traitement de nombreuses pathologies hématopoïétiques par exemple les lymphomes. Elles sont alors « mobilisées » par traitement du patient par le G-CSF permettant leur migration de la moelle osseuse vers le sang périphérique (Horwitz, 2007). Des conditions de culture appropriées permettent au CD34⁺ de s'engager dans la voie mégacaryocytaire et d'étudier les différentes étapes de la mégacaryopoïèse (Bruno et al., 2003; Norol et al., 1998).

De nombreuses méthodes et milieux de culture ont été mis en place pour différencier les cellules CD34⁺ après l'identification et le clonage de la TPO avec comme difficulté de pouvoir combiner la production d'un grand nombre de MK, assuré par une forte prolifération des progéniteurs hématopoïétiques en particulier des MKp, et une maturation complète des MK menant à la production efficace de plaquettes. Récemment, Strassel et al., ont développé un modèle de culture basé sur l'utilisation de CD34⁺ de sang périphérique, des cytokines hématopoïétiques classiquement utilisées (IL-6, IL-9, SCF, et TPO) auxquelles ils ont ajouté SR1 (stem regenin 1 : un antagoniste du récepteur à l'aryl d'hydrocarbure). Ce système de culture permet une première phase de prolifération des CD34⁺ puis une différenciation et maturation en MK capables d'émettre des proplaquettes. L'émergence d'une population CD34⁺CD41^{dim} étant à l'origine des MK émettant les proplaquettes a été mise en évidence (Strassel et al., 2016). Une extension de ce travail est en cours en vue de produire des plaquettes de culture utilisables en transfusion.

D'autres cellules comme les iPSC (induced Pluripotent Stem Cells) ont aussi été utilisées pour étudier la mégacaryopoïèse et la production de plaquettes *in vitro* (Borst et al., 2017; Liu et al., 2015; Takayama et al., 2010). Une lignée de MK établie à partir d'iPSC a été établie par Nakamura et collaborateurs. Cette lignée obtenue en surexprimant c-MYC, BMI1, et BCL-X permet l'obtention de MK immatures. L'extinction des gènes c-MYC, BMI1, et BCL-X permet par la suite la maturation de ces MK puis l'émission de proplaquettes et de plaquettes (Nakamura et al., 2014). L'avantage présenté ici est la longue conservation des MK immatures en culture (4 à 5 mois) même après cryoconservation (contrairement à des cellules primaires) et leur pouvoir important de prolifération ce qui permet une bonne production de plaquettes. Une seconde approche a été la surexpression des facteurs de transcription GATA1, FLI1 et TAL1 (T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1) permettant ici encore la production d'un

INTRODUCTION GÉNÉRALE

grand nombre de MK puis de plaquettes (Moreau et al., 2016). Néanmoins, le nombre de plaquettes produites par MK reste faible avec moins de 15 plaquettes par MK (Ito et al., 2018; Moreau et al., 2016).

La production de plaquettes *in vitro* nécessite une bonne compréhension de la mégacaryopoïèse à tous les stades : de la production d'un nombre suffisant de MK à la mise en place d'un système permettant d'optimiser la libération de plaquettes. De plus en plus de bio-réacteur sont développés dans le but d'optimiser la production de plaquettes (pour revue : (Thon et al., 2017)). Néanmoins notre compréhension des mécanismes impliqués étant encore limitée, les méthodes de culture des MK eux-mêmes restent à affiner.

III. Les organes hématopoïétiques

Au cours du développement l'hématopoïèse a lieu dans plusieurs organes : le foie chez l'embryon et puis la moelle osseuse chez l'adulte. Ces organes comprennent des microenvironnements qui participent au contrôle de l'hématopoïèse. Le poumon est aussi un site qui chez l'adulte participerait à la mégacaryopoïèse. La notion de niche et de microenvironnement sera abordée dans le contexte de la CSH et du MK.

1. Le foie

a) L'organe adulte

Chez l'adulte, le foie possède essentiellement des fonctions métaboliques, exocrines et endocrines. Il assure la production de la bile, la détoxification, la régulation de la concentration de glucose et la production de facteurs de coagulation et de protéines plasmatiques comme l'albumine. Différents types cellulaires le composent : les hépatocytes (70%), les cellules épithéliales biliaires (BEC) (3%), les cellules mésenchymateuses, les cellules étoilées (1.4%) (impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes et le stockage de la vitamine A), les cellules de Kupffer (macrophages résidents, 2%), les cellules endothéliales sinusoidales (2.5%) et les autres cellules endothéliales (artère, veine, artériole et veinule) (Pascale Grenard, 2005; Si-Tayeb et al., 2010) (Figure 8).

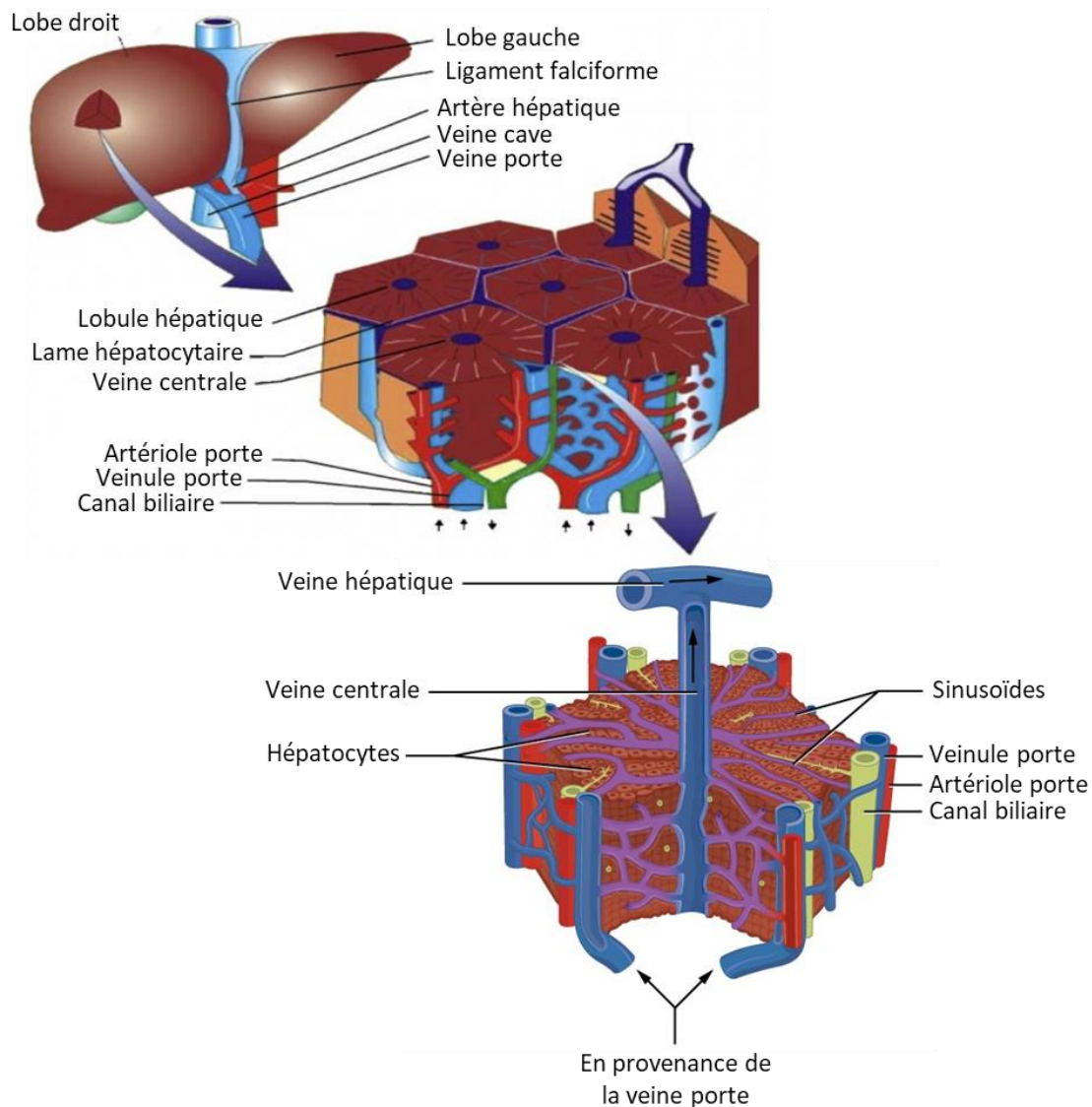


Figure 8 : Organisation et structure du foie adulte

Le foie représente 2 à 3% du poids total du corps humain et est composé d'une multitude de lobules hépatiques. Il possède un réseau de vaisseaux lymphatiques et une vaste vascularisation permettant de nombreux échanges avec le sang. Le foie reçoit le sang de la veine porte et de l'artère hépatique. Ces gros vaisseaux se ramifient ensuite en artériole et veinules dans les lobules hépatiques. Le sang provenant de ces vaisseaux se mélange au niveau des sinusoides pour ressortir au niveau des veines hépatiques puis de la veine cave retournant au cœur (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). Les hépatocytes sont polarisés avec un pôle basal présent le long des sinusoides et un pôle apical le long des canalicules biliaires assurant ainsi l'échange de molécules (Gissen and Arias, 2015).

Figure adaptée à partir de (Biomox, 2018).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

b) Le foie au cours du développement

Les différents types cellulaires hépatiques ont deux types d'origine chez l'embryon. Ainsi les hépatocytes et les BEC dérivent de l'endoderme alors que les autres types cellulaires dérivent du mésoderme.

La première structure du foie est appelée diverticule hépatique et provient de l'épithélium de l'intestin antérieur à E9 de développement chez la souris (Zorn, 2008). A E9.5, apparaissent les hépatoblastes, à l'origine des futurs hépatocytes et des BEC (Bort et al., 2006) qui commencent à se différencier à E13 (Zorn, 2008). Ces hépatoblastes peuvent être isolés sur l'expression de différents marqueurs tels que : cytokératines 18 et 19 (CK18 et CK19), EpCam (epithelial cell adhesion molecule), E-cadhérine ou Dlk1 (Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1) (Tanimizu et al., 2003). Il a été montré chez l'homme que les hépatoblastes à proximité de la veine porte se différencient en BEC alors que ceux qui sont plus éloignés se différencient en hépatocytes (Ruebner et al., 1990). Les BEC tout comme les hépatocytes ne seront complètement différenciés qu'après la naissance (Gordillo et al., 2015) (Figure 9).

Le développement veineux a lieu avant le développement artériel. La veine ombilicale est la principale veine afférente du foie embryonnaire. Après la naissance elle laisse place à la veine porte (Si-Tayeb et al., 2010). Les souris déficientes pour Flk-1 (ou VEGFR2) qui sont dépourvues de cellules endothéliales matures meurent précocement durant l'embryogenèse et ne présentent aucun développement hépatique. Elles présentent néanmoins également un défaut d'hématopoïèse avec un défaut des îlots sanguins (Fong et al., 1995).

Les premières ébauches sinusoides sont observées à partir de E9.5 chez la souris (Matsumoto et al., 2001) et après 5 semaines de gestation chez l'Homme. Les sinusoides ne seront entièrement formés qu'entre la 6^{ème} et 8^{ème} semaine de gestation (Enzan et al., 1983) et ne présenteront des caractéristiques adultes qu'après la semaine 17 (Couvelard et al., 1996). Les sinusoides du foie présentent plusieurs caractéristiques telles que la présence de fenestrations (Wisse, 1972) et l'expression du récepteur LYVE-1 (lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1) marqueur des vaisseaux lymphatiques (Carreira et al., 2001). Il a été démontré que dans le foie fœtal (FF) entre E12.5 et E14, 40% des CSH sont localisées à moins de 20 µm des vaisseaux de la veine porte et associées aux péricytes (Khan et al., 2016).

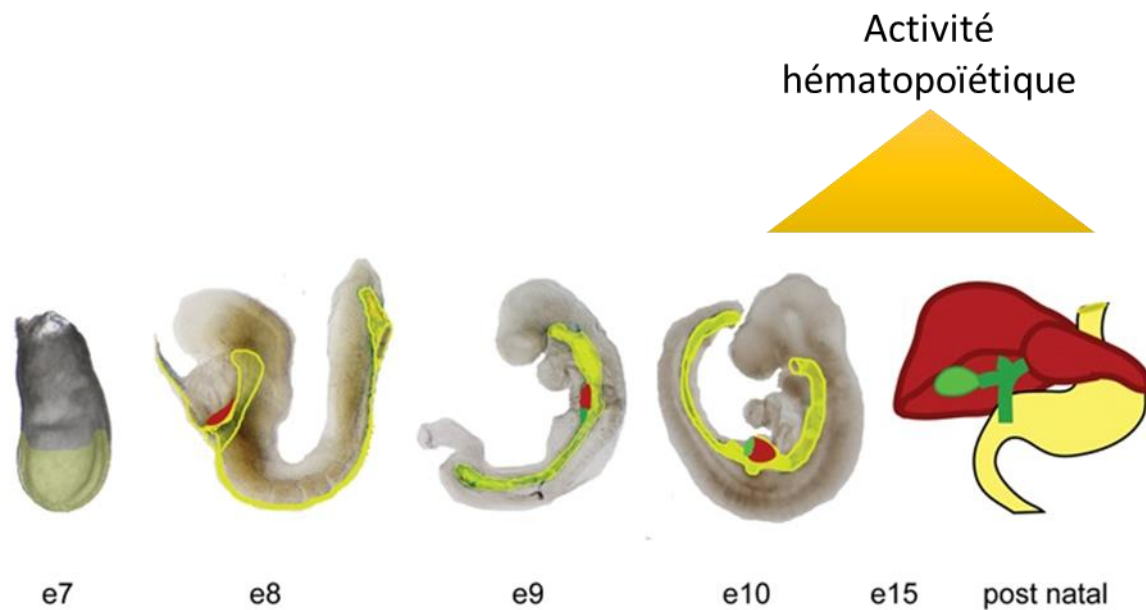


Figure 9 : Développement embryonnaire du foie chez la souris

Schéma des différents stades de développement du foie dans l'embryon de souris. L'endoderme est représenté en jaune, le foie en rouge et la vésicule biliaire en vert. L'endoderme se forme pendant la gastrulation (E7-8.5). A 8.5 le foie commence à se développer. Le diverticulum hépatique se forme à E9 et continue de se développer jusqu'au bourgeon hépatique à E10. A partir de E15 les hépatoblastes se différencient en hépatocytes et cellules biliaires. La maturation définitive du foie est graduelle et se termine après la naissance. Figure modifiée à partir de (Zorn, 2008).

c) Le foie foetal : organe hématopoïétique

Au cours du développement embryonnaire, le foie est au départ un organe hématopoïétique, puis vers 14 jours de développement chez la souris le programme de différenciation des cellules hépatiques s'engage. Lorsque les premières cellules hématopoïétiques colonisent le foie celui-ci n'est pas encore entièrement constitué. Il a été suggéré que l'expansion et la croissance des hépatoblastes puisse être influencées par des molécules sécrétées par les cellules hématopoïétiques. Ainsi, il a été montré que l'oncostatine M (membre de la famille de l'IL-6), qui est sécrétée par les cellules hématopoïétiques chez la souris, favorisait la prolifération des hépatoblastes *in vitro*. De plus, les souris déficientes pour une sous-unité du récepteur à l'oncostatine M présentent un défaut de maturation du foie (Kamiya et al., 1999).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Inversement, plusieurs études montrent l'importance des cellules du foie dans l'hématopoïèse. En effet, des co-cultures entre cellules non hématopoïétiques provenant du FF à E14.5 ou E15.5 favorisent la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺ du FF ou de la moelle osseuse. Ces relations évoluent dans le temps puisque la même co-culture réalisée avec des cellules stromales provenant d'un FF à E18.5 ne permet plus la prolifération des progéniteurs (Kinoshita et al., 1999). Cette relation dynamique est retrouvée pour les fonctions hépatiques lors de l'embryogenèse. Une étude transcriptomique et protéomique chez la souris a montré que durant la phase d'expansion hématopoïétique (environ de E11.5 à E14.5) les molécules liées aux fonctions hépatiques étaient réprimées. À l'inverse, après E15.5 des fonctions telles que le métabolisme des lipides, l'oxydation des acides gras ou encore la production des facteurs du complément et de coagulation augmentent (Guo et al., 2009).

Une lignée fibroblastique immortalisée par le SV40 a été isolée du FF entre E14 et E14.5 de développement. Cette lignée stromale permet le maintien des MPP humains et des CSH murines *in vitro* (Kokkaliaris et al., 2016; Nolte et al., 2002; Punzel et al., 2002). Ces résultats corroborent les observations *in vivo* sur l'importance du microenvironnement du FF dans l'hématopoïèse.

Le foie fœtal est donc un organe hématopoïétique transitoire. Quand les fonctions hépatiques (métaboliques) se mettent place il devient moins favorable à l'hématopoïèse qui à ce stade se développe dans la moelle osseuse (Ciriza et al., 2013).

2. La moelle osseuse

La moelle osseuse est l'organe définitif de l'hématopoïèse. Les premières CSH y sont détectées à E16.5 chez la souris (Coşkun et al., 2014).

a) Formation des os et de la moelle

Au cours du développement embryonnaire, la formation des os longs passe tout d'abord par une structure cartilagineuse qui est ensuite envahie par des vaisseaux sanguins et par les premières cellules hématopoïétiques qui colonisent les logettes composées de tissu conjonctif. Ces logettes disparaissent ensuite pour laisser place à l'os (Charbord et al., 1996).

L'os se forme par ossification (minéralisation) :

- Soit du cartilage (ex : pour les os longs des membres) = ossification endochondrale
- Soit du tissu conjonctif classique (ex : pour la formation d'os plat comme le crâne) = ossification endoconjonctive

Lors de l'ossification endochondrale, l'os se forme à partir du cartilage hyalin et nécessite plus de temps que l'ossification endoconjonctive. Dans le cartilage, les chondrocytes différenciés à partir des cellules souches mésenchymateuses (MSC), sécrètent de la matrice extracellulaire. Lorsque la matrice produite se minéralise, elle isole les chondrocytes qui s'hypertrophient puis meurent par apoptose. Ils laissent alors place à la formation de vaisseaux qui entraînent avec eux des cellules ostéogéniques permettant l'ossification de l'espace, et des cellules hématopoïétiques qui vont coloniser la cavité pour développer la moelle osseuse. La région centrale des os longs est perfusée à partir de 16.5 jours de développement chez la souris (Coşkun et al., 2014). Ces mécanismes de croissance du cartilage puis destruction et ossification se poursuivent jusqu'à l'âge adulte au niveau de la ligne épiphysaire des os longs, assurant leur croissance (Mackie et al., 2008).

Lors de l'ossification endoconjonctive, des cellules mésenchymateuses se différencient en cellules ostéogéniques qui se regroupent au niveau d'un centre d'ossification pour donner les ostéoblastes. L'os croît alors par apposition des ostéocytes. L'ossification endoconjonctive

INTRODUCTION GÉNÉRALE

commence durant l'embryogenèse et se termine en même temps que l'adolescence lorsque les os plats de la face atteignent leur taille définitive (Safadi et al., 2009).

b) Structure de l'os et de la moelle

Les os longs sont composés d'une partie centrale longue et creuse appelée diaphyse. Les extrémités des os sont appelées épiphyses et sont situées au-dessus de la ligne épiphysaire responsable de la croissance des os longs. Enfin, les métaphyses désignent la partie entre la diaphyse et la ligne épiphysaire. Chez l'adulte, l'épiphysaire se soude à la métaphysaire suite à l'ossification de la ligne épiphysaire (Figure 10A).

La moelle osseuse est située dans les cavités centrales des os longs tels que le fémur, le tibia ou l'humérus et des os plats tels que le sternum, les côtes ou la crête iliaque. Elle est également présente dans les métaphyses et épiphyses qui sont dites trabéculées (Clarke, 2008). La moelle représente 3% du poids total d'un rat adulte et 5% du poids total d'un Homme (Picker, 1999). La moelle est composée de nombreux types cellulaires : hématopoïétiques, osseux, mésenchymateux, adipeux et endothéliaux mais également d'éléments non cellulaires : la matrice extra-cellulaire. Les cellules de la moelle osseuse subissent également de nombreuses contraintes physiques notamment de par la rigidité extrême du tissu.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

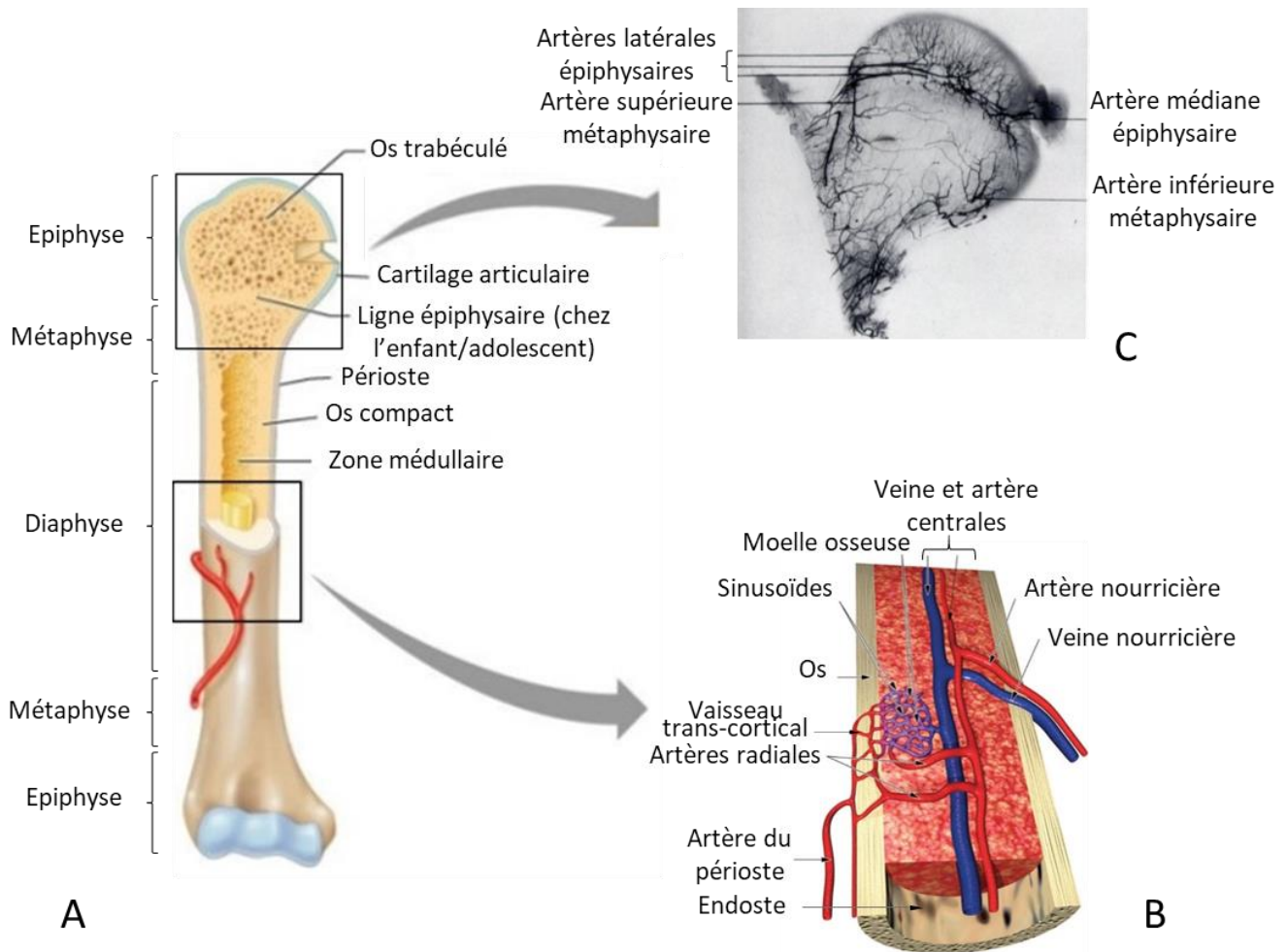


Figure 10 : Structure et vascularisation d'un os long

A. L'os long est divisé en trois régions : la diaphyse au centre puis les métaphyses et enfin les épiphyses aux extrémités. Il est entouré d'une membrane conjonctive le périoste. Selon la région de l'os, celui-ci sera dit compact ou trabéculé en fonction de son organisation. **B.** L'os est vascularisé dans toutes les régions qui le composent. Les vaisseaux principaux sont l'artère et la veine nourricière localisées de manière centrale. La présence de petits vaisseaux appelés sinusoïdes permet une grande surface d'échange entre la moelle osseuse et le sang. L'endoste est une membrane conjonctive tapissant l'intérieur de la cavité médullaire **C.** Angiogramme d'une tête de fémur d'un sujet de 20 ans avec injection de Barium. Les vaisseaux médullaires s'anastomosent entre eux et relient ainsi les différentes régions de l'os. On peut observer une forte vascularisation et ramification des vaisseaux au niveau de l'épiphysaire.

Figure adaptée à partir de (Spence, 1995) (a), (Travlos, 2006) (b) et (Trueta and Harrison, 1953) (c).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

c) Le réseau vasculaire de la moelle osseuse

Il existe une organisation particulière des vaisseaux sanguins dans la moelle osseuse qui est commune aux os longs. Ainsi, le sang est distribué du centre de la moelle vers la périphérie puis revient vers le centre avant d'en sortir. Pour les os longs (chez l'homme et la souris) on distingue au niveau de la diaphyse deux types d'artères qui s'anastomosent dans l'artère centrale se trouvant au centre de la cavité médullaire. Premièrement, les artères provenant du périoste (membrane conjonctive recouvrant la partie externe des os) irriguent l'os compact avant d'entrer dans la moelle osseuse. Elles se ramifient en petites artères et artérioles qui vont, pour certaines, s'anastomoser avec un plexus de sinus veineux relié à la veine centrale et pour d'autre s'anastomoser à l'artère centrale. Deuxièmement, les artères nourricières provenant du canal nourricier et qui entrent de manière oblique à l'os dans la moelle sans se ramifier. Ces vaisseaux se ramifient ensuite en artérioles et capillaires puis en sinusoides et veinules qui reviendront s'aboucher à la veine nourricière centrale (Travlos, 2006). La vascularisation de l'épiphyse est séparée du reste de la circulation médullaire chez l'enfant en raison de la ligne épiphysaire. Chez l'adulte les vaisseaux de l'épiphyse, de la métaphyse et de la diaphyse s'anastomosent entre eux au sein de la moelle osseuse (Trueta, 1997) (Figure 10B et C). Dans les os plats, de nombreux vaisseaux de tailles différentes entrent dans la moelle par l'intermédiaire de canaux nourriciers plus ou moins grands tout autour de l'os. Récemment il a été montré chez la souris et dans les os des membres chez l'homme la présence de vaisseaux reliant la moelle osseuse au périoste. Ces vaisseaux sont des capillaires pouvant être d'origine veineuse ou artérielle et sortent de la moelle de manière perpendiculaire à l'os cortical. Il est suggéré que ces vaisseaux soient les voies de sorties principales des cellules immunitaires de la moelle (Grüneboom et al., 2019).

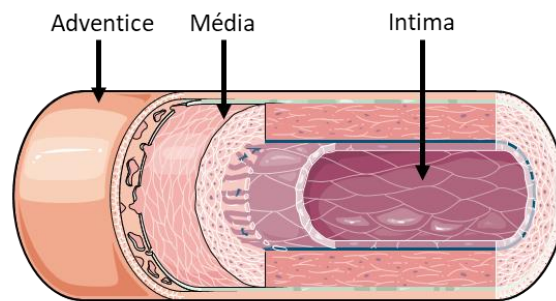
i. Vascularisation de la moelle

Les vaisseaux sont distingués en fonction de leur taille et leur composition (Figure 11). Au niveau apical se trouve l'intima qui comprend un endothélium unistratifié pavimenteux c'est-à-dire composé d'une seule couche de cellules endothéliales allongées. La définition d'un endothélium se fait par sa morphologie et inclut : la présence d'une lame basale et d'une lumière impliquant des cellules polarisées mais aussi des cellules jointives présentant des jonctions spécifiques (serrées et adhérentes). Les cellules endothéliales ne présentent pas de

INTRODUCTION GÉNÉRALE

jonction de type desmosome contrairement aux épithéliums. Les jonctions sont dynamiques et peuvent être organisées différemment selon l'organe où est présent le vaisseau (Bazzoni and Dejana, 2004).

Les vaisseaux peuvent être recouverts partiellement de péricytes qui sont des cellules de type mésenchymateux. Ces cellules sont définies principalement par leur localisation à proximité des vaisseaux. Leur phénotype et leur activité sont hétérogènes et cette population n'a pas de définition précise (Armulik et al., 2011; Attwell et al., 2016).



Types de vaisseaux					
Macrovaisseaux		Microvaisseaux			
Artère	Veine	Artériole	Veinule	Capillaires	
				- Continu	
				- Fenestré	
				- Sinusoïde	
Composition	Intima/Média/Adventice			Intima	

Figure 11 : Les différents types de vaisseaux

Les vaisseaux peuvent être séparés en macro- et microvaisseaux. Les artères et veines sont des macrovaisseaux. Les microvaisseaux comprennent les artérioles, veinules et capillaires. Les sinusoides sont une spécialisation des capillaires. Les vaisseaux sont composés de 3 couches : l'intima, la média et l'adventice sauf les capillaires qui sont uniquement composés de l'intima.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

ii. *Un type de vaisseau particulier : le sinusoïde*

Une des particularités de la moelle osseuse (particularité partagée avec le foie et la rate) est la présence de sinusoides qui ont un diamètre minimum de 50 μm et qui recueillent le sang des artérioles. Ces vaisseaux sont composés d'une seule couche de cellules endothéliales et sont partiellement recouverts de péricytes (Bianco, 2011) (Figure 12). Il a été suggéré que l'endothélium des sinusoides ne comporte pas ou peu de jonctions serrées et une lame basale discontinue, facilitant ainsi la transmigration des leucocytes et érythrocytes au travers de l'endothélium (Tavassoli and Shaklai, 1979). La lame basale des sinusoides serait de composition différente de celle d'autres vaisseaux (Inoue and Osmond, 2001). Elle est constituée principalement de chondroïtine-sulfate (peu présente habituellement), de laminine et de collagène de type IV. L'héparan-sulfate, participant à la stabilisation de la lame basale et habituellement présent, est ici absent (Inoue and Osmond, 2001). Les cellules endothéliales se recouvrent à certains endroits de manière parallèle entre elles laissant des espaces de 15 à 20 nm entre les membranes plasmiques avec peu de jonctions serrées. Les sinusoides du foie sont fenêtrés (Braet and Wisse, 2002). La présence ou non de fenestrations dans les sinusoides de la moelle est encore discutée. Les sinusoides murins et humains semblent avoir une organisation similaire (Wickramasinghe, 1991). Leur morphologie particulière permet une identification facile par imagerie mais nous manquons de marqueurs spécifiques pour les isoler.

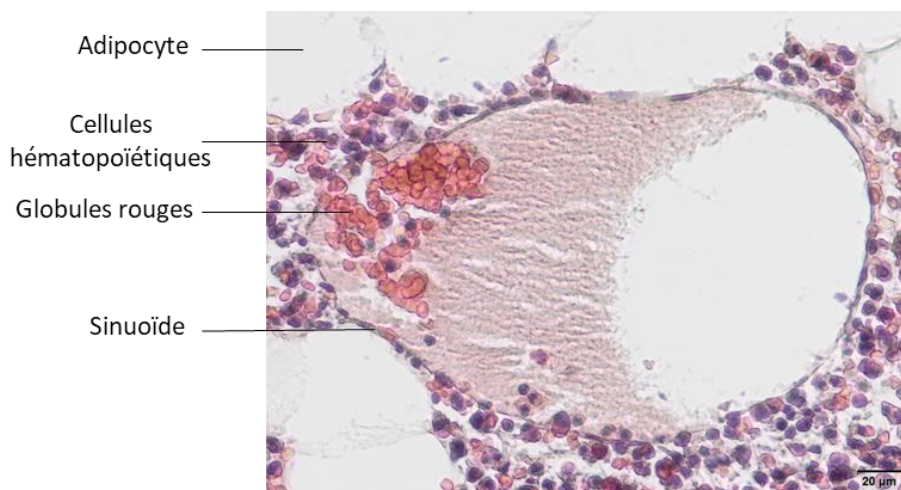


Figure 12 : Coupe histologique au niveau d'une tête de fémur humaine

Sur cette coupe histologique en paraffine nous retrouvons au centre, un sinusoides. Il se compose d'une simple et fine couche de cellules endothéliales très allongées et la lumière du vaisseau a un diamètre compris entre 150 et 200 μm . En son centre sont retrouvés des globules rouges. Il est entouré de cellules hématopoïétiques et d'adipocytes.

Image : Camille Jost, UMR_S1255 Inserm, EFS Grand-Est

INTRODUCTION GÉNÉRALE

d) Composition cellulaire de la moelle osseuse

La moelle osseuse est composée d'une grande variété de types cellulaires y compris : les CSH et leur descendance, les MSC, les cellules osseuses, les cellules endothéliales, les fibres neuronales, les chondrocytes et les adipocytes (Shen and Nilsson, 2012). Ces cellules forment des microenvironnements locaux dont la composition influence le devenir des CSH et des progéniteurs présents au sein de ces environnements. Au cours de ma thèse je me suis intéressée plus particulièrement aux cellules endothéliales et mésenchymateuses qui sont décrites plus en détail ci-dessous.

i. Les cellules endothéliales

Ces cellules sont polarisées, le pôle apical est dirigé vers la lumière du vaisseau et le pôle basal est au contact de la lame basale de l'endothélium. Elles expriment un certain nombre de marqueurs permettant de les identifier et de les isoler tels que CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1) (Albelda et al., 1990), CD106 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) (Bevilacqua et al., 1987), CD34 (une phosphoglycoprotéine transmembranaire) (Fina et al., 1990), CD144 (Vascular Endothelial Cadherin, VE-cadhérine) (Lampugnani et al., 1992). Ces marqueurs sont exprimés par l'ensemble des cellules endothéliales, mais d'autres ne sont exprimés que sur les cellules endothéliales artérielles, veineuses ou lymphatiques. Deux essais fonctionnels sont classiquement utilisés pour les caractériser *in vitro*. Le premier utilise la capacité d'incorporation du LDL (Low Density Lipoprotein) acétylé des cellules endothéliales (Voyta et al., 1984). Le second met à profit la réorganisation tridimensionnelle des cellules endothéliales dans un gel de Matrigel® et la formation de structures ressemblant à des tubes (Kubota et al., 1988).

Fonctions des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ont comme fonction première d'être à la fois une barrière et une surface d'échange entre le sang et le tissu environnant. Leur rôle de barrière est particulièrement décrit au niveau du cerveau où l'endothélium est nommé « barrière hémato-encéphalique ». L'endothélium est néanmoins une surface d'échange moléculaire et cellulaire avec des mécanismes de passage trans- et para-cellulaire (Galley and Webster, 2004; Rodrigues and Granger, 2015). Les mécanismes d'intra- et d'extravasation ont été abordés

INTRODUCTION GÉNÉRALE

dans la partie A.II.4.a. Les cellules endothéliales participent également à la vasoconstriction et dilatation et aux réactions immunitaires (non détaillés ici, pour revue : (Galley and Webster, 2004)).

La surface des cellules endothéliales leur confère physiologiquement des propriétés à la fois anti-plaquettaire et anti-coagulante. Elles sécrètent de la prostacycline (PGI₂) et de l'oxyde nitrique (NO) (Cines et al., 1998) qui empêchent l'activation plaquettaire en augmentant respectivement l'AMP (Adenosine MonoPhosphate) cyclique et le GMP (Guanosine MonoPhosphate) cyclique (de Graaf et al., 1992; Weksler et al., 1978). Les cellules endothéliales expriment également une ecto-ADPase (CD39) à leur surface qui métabolise l'ADP libéré par les plaquettes activées (Marcus et al., 2001). Une brèche dans l'endothélium ou l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires peut conférer aux cellules endothéliales des propriétés pro-thrombotique et pro-coagulante (Michiels, 2003), par exemple en exprimant le facteur tissulaire initiant ainsi la cascade de coagulation (Stern et al., 1985).

Les cellules endothéliales médullaires

Très peu de données sont disponibles concernant spécifiquement les cellules endothéliales médullaires. Les méthodes généralement utilisées pour isoler et cultiver les cellules endothéliales d'autres organes ne semblent pas être très efficaces pour ces cellules. Les données disponibles ont été principalement obtenues dans la souris où elles ont pu être isolées en utilisant les marqueurs comme CD31 mais leur mise en culture reste problématique avec les milieux de culture classiquement utilisés pour ce type de cellules.

Les cellules endothéliales médullaires, bien que présentant des caractéristiques communes avec les autres cellules endothéliales, semblent posséder quelques propriétés spécifiques. Ces cellules présentent notamment une capacité à assurer le « homing » (adressage) c'est-à-dire le retour des CSH circulantes dans la moelle osseuse. Dans des expériences de co-culture en Transwell Imai et al., ont montré que les cellules endothéliales pulmonaires ne permettaient pas de passage transendothélial contrairement aux cellules endothéliales de moelle osseuse. Le passage transendothélial stimulé par le chimioattractant SDF1 passe par un mécanisme impliquant les récepteurs VLA4 et VCAM-1 (Imai et al., 1999).

Chez l'homme, il a été montré que les cellules endothéliales des sinusoides, tout comme celles des artérioles, des capillaires et des veinules, expriment CD31, CD34 et le vWf (Pusztaszeri et

INTRODUCTION GÉNÉRALE

al., 2006). L'analyse par microscopie d'une coupe de fémur entier de souris a mis en évidence des marqueurs plus spécifiques en fonction des différents types de vaisseaux. Ainsi les cellules endothéliales des sinusoides exprimeraient peu ou pas CD90, Sca-1, CD34 ou le vWf (contrairement à l'homme pour ce dernier) et expriment CD31, CD105 ainsi que VCAM-1. Une combinaison appropriée de ces marqueurs pourrait permettre de mieux trier les cellules endothéliales de sinusoides (Coutu et al., 2017b). Des marqueurs différentiels artério/veineux ont également été proposés dans l'embryon de souris où l'Ephrin B2 marque les vaisseaux artériels et l'Ephrin B4 les vaisseaux veineux (Wang et al., 1998). De même la protéine Sca-1 serait spécifiquement exprimée par les vaisseaux artériels alors que les sinusoides ne l'expriment pas (Nombela-Arrieta et al., 2013). Il semble qu'en fait l'expression de Sca-1 qui est négative en imagerie microscopique et faiblement positive (dim) en cytométrie en flux. Enfin, les sinusoides exprimeraient la podoplanine contrairement aux artérioles (Xu et al., 2018). Plusieurs revues récapitulent ces différents marqueurs permettant une distinction artério-veineuse (Aitsebaomo et al., 2008; Kume, 2010). Ces marqueurs ont tous été mis en évidence *in situ* mais leur expression pourrait être modifiée en culture compliquant ainsi leur séparation à partir de cultures cellulaires (communication personnelle, Nathalie Brouard).

ii. Cellules souches mésenchymateuses

Les MSC ou « colony forming unit-fibroblast » ont été en premier lieu décrites *in vitro* comme les cellules adhérentes de la moelle osseuse ayant une apparence fusiforme et un fort pouvoir de prolifération (Friedenstein et al., 1976). Elles représentent 0.001 à 0.01% des cellules de la moelle (Pittenger et al., 1999). Le terme de mésenchyme dérive du grec meso (milieu) et réfère au fait que les cellules mésenchymateuses se dispersent et migrent entre l'endoderme et l'ectoderme durant le développement embryonnaire (Caplan, 1991). Elles peuvent être localisées autour des vaisseaux sanguins et sont alors appelées péricytes (Caplan, 2008; Crisan et al., 2008).

Les MSC sont présentes dans la moelle osseuse mais également dans une multitude de tissus : sang de cordon ombilical (Wagner et al., 2005), tissu dentaire (Huang et al., 2009), endomètre (Schuring et al., 2011), derme (Bartsch et al., 2005), ... (pour revue (Crisan et al., 2012)).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Plusieurs travaux comparant les propriétés des MSC isolées à partir de différents tissus ont montré des différences fonctionnelles ou de capacité proliférative (Bieback et al., 2008; Chen et al., 2015). Par exemple, une étude a mis en évidence des différences de prolifération et de différenciation entre des MSC de cordon ombilical, tissu adipeux, ligament parodontal ou dentaire (Trivanovic et al., 2015). Une certaine prudence s'impose cependant car ces différences pourraient également être dues aux diverses méthodes d'isolement et de sélection de ces cellules (Wagner and Ho, 2007).

Identification des MSC

En 1977, Dexter et al., ont démontré que la présence de cellules stromales adhérentes provenant de la moelle osseuse était nécessaire au maintien des CSH murines *in vitro* (Dexter et al., 1977). A la suite de ces travaux de nombreux marqueurs ont été proposés pour identifier et isoler les MSC. Ainsi l'anticorps Stro-1 permet d'isoler les MSC humaines. L'isolement de cellules de moelle Stro-1 positives et Glycophorine A négatives (marqueur des érythrocytes) définit une population de cellules permettant le maintien de l'hématopoïèse *in vitro* à partir de CD34⁺ (Simmons and Torok-Storb, 1991). Par la suite, le récepteur LNGFR (low-affinity nerve growth factor receptor) a été mis en évidence pour identifier les MSC médullaires. Ces cellules LNGFR⁺ de la moelle ont été davantage caractérisées, elles expriment le collagène III, la réticuline et la vimentine mais sont négatives pour les marqueurs endothéliaux vWf, CD34 et les marqueurs hématopoïétiques CD45 et CD68 (Cattoretti et al., 1993). Enfin, la molécule d'adhésion MCAM (Melanoma Cell Adhesion Molecule) ou CD146 a également été utilisée pour identifier les MSC et plus précisément des MSC localisées au niveau périvasculaire au niveau de la moelle osseuse (Sacchetti et al., 2007).

Au vu des nombreux marqueurs utilisés pour définir et isoler les MSC, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire a proposé des critères minimums pour définir les MSC (Dominici et al., 2006) :

- Elles doivent adhérer au plastique en culture
- Elles doivent exprimer CD105, CD73 et CD90 et ne pas exprimer CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 alpha, CD19 et HLA-DR.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

- Elles doivent être capables de se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro*.

Cependant, cette classification n'est pas universelle et certaines cellules appelées MSC n'obéissent pas à tous ces critères par exemple celles du cordon ombilical (Bieback et al., 2008). Malgré les critères mis en place en 2006 il est admis que les MSC sont une population hétérogène dont les capacités de différenciation et de prolifération sont variables (Bianco et al., 2013; Delorme et al., 2008; Ho et al., 2008; Phinney, 2012).

Les MSC médullaires

Les MSC de la moelle ont été les premières à être caractérisées et étudiées (Dexter et al., 1977). La relation entre les MSC et les cellules hématopoïétiques sera développée dans la partie A.IV.2.d.

Tout comme les MSC d'autres organes, les MSC de moelle peuvent se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Chamberlain et al., 2007). Il a également été montré qu'*in vitro*, les MSC peuvent se différencier en neurones (Woodbury et al., 2000) ou en myocytes (Wakitani et al., 1995). Les marqueurs proposés pour isoler ces cellules comprennent Stro-1, CD73 ou CD90 et un marquage négatif pour les cellules hématopoïétiques (CD45⁻) et endothéliales (CD31⁻) (Chamberlain et al., 2007). Les premiers marqueurs utilisés pour définir les MSC ont d'ailleurs tous été observés sur des MSC médullaires (Cattoretti et al., 1993; Sacchetti et al., 2007; Simmons and Torok-Storb, 1991). Les MSC médullaires expriment les marqueurs définis par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire c'est-à-dire CD73, CD90 et CD105 (Rojewski et al., 2008).

e) Composants non cellulaires

Les composants non cellulaires participant à la mégacaryopoïèse comprennent la matrice extra-cellulaire, les contraintes physiques (voir partie A.IV.2.c) et les facteurs solubles (voir partie A.II.5).

La matrice extra-cellulaire est composée de protéines synthétisées par les cellules stromales mais également par les cellules hématopoïétiques dont les MK (Malara et al., 2014;

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Zuckerman and Wicha, 1983). Ces protéines incluent la fibronectine, le collagène de type I, III et IV, la laminine, la thrombospondine et les protéoglycanes.

La fibronectine est présente au niveau de l'os, du périoste et de l'endoste au sein du stroma de la moelle et dans les MK. Aucun marquage n'est spécifiquement retrouvé au niveau des vaisseaux (Coutu et al., 2017a; Nilsson et al., 1998).

Le collagène de type I est réparti dans l'os compact, les trabécules osseux et au niveau de l'endoste (Coutu et al., 2017a; Nilsson et al., 1998). Les collagènes III et IV sont retrouvés dans le périoste mais le collagène IV est également présent autour des vaisseaux (Coutu et al., 2017b; Nilsson et al., 1998).

La laminine quant à elle est fortement exprimée dans le périoste. Elle est également retrouvée autour des artères mais de manière discontinue autour des sinusoides (Coutu et al., 2017b; Nilsson et al., 1998).

La thrombospondine est synthétisée par de nombreuses cellules de la moelle dont les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et possiblement les MK. Sa localisation n'est pas exactement déterminée (Long and Dixit, 1990; McLaren, 1983).

Enfin, le fibrinogène est localisé au niveau de la paroi des sinusoides mais également dans le MK qui le synthétise (Belloc et al., 1985; Larson and Watson, 2006).

D'autres constituants comme les glycosaminoglycanes (GAG) sont présents dans la matrice extra-cellulaire. Ce sont des sucres à longues chaînes composés de 1 à 25000 répétitions de disaccharides. A l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAG sont liés à un « core » protéique et sont sulfatés, ils sont alors appelés protéoglycanes (Handel et al., 2005). Dans la moelle on retrouve l'héparan-sulfate, la chondroïtine-sulfate et le dermatan-sulfate (Klein, 1995).

f) Le vieillissement de la moelle

Deux types de moelle osseuse sont généralement décrits chez l'Homme : la moelle rouge et la moelle jaune. La moelle rouge est la moelle active et est la plus représentée chez le nouveau-né et l'enfant. Elle est caractérisée par une forte présence de cellules hématopoïétiques et une hématopoïèse très active. Au cours du vieillissement la moelle rouge est peu à peu remplacée par la moelle jaune composée à 95% d'adipocytes de graisse blanche (Hartsock et al., 1965). Le mécanisme de ce remplacement est encore incompris et a

INTRODUCTION GÉNÉRALE

principalement lieu dans les os longs et non dans les os plats (Gurevitch et al., 2007). Cette transition de la moelle rouge à la moelle jaune a été visualisée par imagerie médicale (scintigraphie et imagerie par résonance magnétique) chez l'homme. Ainsi, 50% de la moelle osseuse de l'Homme adulte est de la moelle jaune et est principalement localisée dans le squelette appendiculaire alors que les 50% de moelle rouge sont localisés dans le squelette axial et les régions proximales des membres (ex : tête du fémur) (Blebea et al., 2007). Cependant, la moelle jaune constitue également une réserve de l'hématopoïèse puisqu'elle peut être à nouveau convertie en moelle rouge sous certaines conditions de stress (Wickramasinghe and Bain, 1986). Ce processus de vieillissement a également lieu chez le rat et la souris. Ainsi dans un rat jeune de 2 mois, la cellularité moyenne (pourcentage de la surface de moelle osseuse occupée par les cellules hématopoïétiques) est de 80% alors qu'elle est diminuée à 66% à 24 mois (Cline and Maronpot, 1985).

3. Le poumon

Bien que la moelle osseuse soit classiquement décrite comme le siège de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse chez l'adulte, il semblerait que le poumon ait également un rôle à jouer. Cette notion est ancienne, le poumon serait un organe hématopoïétique secondaire intervenant dans la mégacaryopoïèse (Aschoff, 1893).

Il a également été proposé que la microcirculation pulmonaire servirait de « filtre » permettant le remodelage des MK et des fragments de MK en plaquettes. Cette proposition s'appuie sur l'observation de MK et de MKp dans l'espace extravasculaire. En 1937, Howell et Donahue, suggéraient que des MK pouvaient être localisés dans les poumons et y produire des plaquettes en visualisant des frottis sanguins provenant de l'artère pulmonaire ainsi que des sections de poumons de chats (Howell and Donahue, 1937).

Il a été montré chez l'homme la présence en faible nombre de MK matures dans la circulation; présentant un noyau polylobé, des granules alpha et un DMS (visualisé par microscopie électronique à transmission). Il a également été constaté une numération plaquettaire plus importante dans la circulation en aval des poumons (artérielle) qu'en amont (veineuse) alors que l'inverse est observé pour les rares MK présents dans la circulation (Kallinikos-Maniatis, 1969). En effet, 98% des MK circulants quittant les poumons ne possèderaient plus de

INTRODUCTION GÉNÉRALE

cytoplasme indiquant la libération de plaquette au niveau pulmonaire (Levine et al., 1993). L'hypothèse, reprise à maintes reprises, est que ces MK proviendraient de la moelle osseuse ou de la rate et se retrouveraient ensuite bloqués dans les capillaires pulmonaires (Kaufman et al., 1965; Pedersen, 1978; Scheinin and Koivuniemi, 1963).

Récemment ces deux notions ont été reprises et confirmées par Lefrançais et al., 2017 par imagerie intravitale dans la souris. Cette étude montre que des MK provenant de la moelle migreraient jusqu'aux poumons et libèreraient les plaquettes directement dans la microcirculation pulmonaire. Ainsi, 50% des plaquettes seraient produites dans le poumon (Lefrançais et al., 2017). De plus, des MKp et des MK ont été observés dans l'espace extravasculaire où ils assureraient une production locale de plaquettes. Cependant ces résultats ne sont peut-être pas représentatifs de la situation physiologique car ils ont nécessité une chirurgie importante que ce soit pour l'imagerie intravitale ou pour les greffes de poumons susceptible d'entraîner une inflammation. Or il a été décrit que l'inflammation des poumons conduit à une augmentation du nombre de MK dans la circulation et au niveau pulmonaire (Scheinin and Koivuniemi, 1963).

Au vu de ces études, l'hypothèse que des MK ou de gros fragments de MK sortent de la moelle et soient piégés dans la micro-circulation pulmonaire pour y libérer des plaquettes est de plus en plus admise.

IV. Microenvironnement cellulaire de l'hématopoïèse et de la mégacaryopoïèse

1. Le microenvironnement hématopoïétique

Dans les années 70, les bases du concept de microenvironnement hématopoïétique ont été posées (Allen and Dexter, 1976; Friedenstein et al., 1976). Le terme de microenvironnement désigne des éléments cellulaires ou non qui participent à la régulation de l'hématopoïèse (Adams and Scadden, 2006; Charbord, 2010; Lemischka, 1997; Torok-Storb et al., 1999; Wilson and Trumpp, 2006). Les travaux de T. Dexter, ont démontré que la moelle osseuse contenait une population de cellules capables de former des couches adhérentes *in vitro* qui permettent

INTRODUCTION GÉNÉRALE

le maintien des CSH (Dexter et al., 1977). Ces cellules ont été nommées cellules stromales et comprennent des cellules capables de former des colonies fibroblastiques en culture : CFU-F (Castro-Malaspina et al., 1980), et des cellules endothéliales.

Le microenvironnement hématopoïétique comprend les cellules endothéliales ou mésenchymateuses, des cytokines et facteurs de croissance et la matrice extra-cellulaire (Barthes et al., 2014; Bentley, 1982). En 1978 R. Schofield propose alors le terme de niche pour décrire le microenvironnement particulier de la CSH (Schofield, 1978). Selon la définition, la niche est composée des cellules environnantes à la CSH et des facteurs qu'elles sécrètent. Elle permet de maintenir les caractéristiques de la CSH.

Dans les années qui suivirent de nombreuses équipes ont essayé de mieux définir la localisation et la composition de la niche.

a) Composition de la niche hématopoïétique

Historiquement, les CSH ont été localisées à proximité de l'endoste (Lambertsen and Weiss, 1984) suggérant que les ostéoblastes constituent la niche. Des expériences *in vitro* de co-culture ont montré l'importance des ostéoblastes pour l'hématopoïèse et le maintien des CSH (Taichman and Emerson, 1994; Taichman et al., 1996). Des études plus récentes confirment cette localisation proche de l'endoste (Sugiyama et al., 2006; Zhang et al., 2003). Les ostéoblastes, présents au niveau de l'endoste, participeraient au maintien des CSH à et leur rétention dans la moelle osseuse en sécrétant localement du CXCL12 (SDF1) (Broxmeyer et al., 2005; Sugiyama et al., 2006), de l'ostéopontine (Stier et al., 2005), de l'angiopoïétine 1 (Arai et al., 2004) et de la TPO (Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007). Le contact direct entre CSH et ostéoblastes participe également au maintien des CSH via la N-cadhérine (Zhang et al., 2003).

L'étude de la localisation des CSH et de leur niche a longtemps été limitée par le peu de techniques disponibles. En effet, le phénotype permettant d'identifier la CSH requiert la combinaison d'un grand nombre d'anticorps ce qui complique leur visualisation par immunomarquage. En 2005, l'étude de MJ. Kiel a permis d'établir un phénotype basé sur les marqueurs $CD150^+CD41^-CD48^-CD244^-$ qui identifie simplement les CSH, permettant leur localisation par immunomarquage (Kiel et al., 2005). Ainsi il a été montré que les CSH et leur

INTRODUCTION GÉNÉRALE

niche seraient situées à proximité des sinusoides médullaires (Acar et al., 2015; Kiel et al., 2005; Kunisaki et al., 2013). D'autres études ont localisé les CSH près des vaisseaux indépendamment de leur nature artérielle ou sinusoidale (Chen et al., 2016; Nombela-Arrieta et al., 2013).

L'étude de Y. Kunisaki démontre que les CSH sont principalement situées près des sinusoides même si environ 10% d'entre elles sont situées près des artérioles. De manière intéressante, ils observent que la distance entre les CSH et les sinusoides est en moyenne beaucoup plus faible et homogène en comparaison à la distance avec les artérioles qui est hétérogène et qui peut être plus éloignée. L'espace péri-vasculaire des sinusoides et des artérioles diffère par leur teneur en O₂, la perméabilité vasculaire et le nombre de péricytes suggérant deux types de niches distinctes. Il est supposé que les CSH présentes dans la niche artériolaire seraient plus quiescentes que celles présentes à proximité des sinusoides (Kunisaki et al., 2013). Les cellules endothéliales sinusoidales, participeraient à la maintenance des CSH via la voie Notch (Butler et al., 2010), la voie Akt et l'expression de facteurs angiocrines (Kobayashi et al., 2010) et enfin l'expression de SCF (Ding et al., 2012). En conclusion et au vu des études les plus récentes il semblerait que la niche des CSH ne soit pas spécifiquement située près de l'endoste mais principalement à proximité des vaisseaux et plus précisément des sinusoides (Sugiyama et al., 2006). Une faible proportion des CSH est circulante (Goodman and Hodgson, 1962) et les CSH à proximité des sinusoides, vaisseaux perméables, pourraient être à l'origine de ces CSH circulantes (Itkin et al., 2016). Cette capacité à circuler peut être mise à profit pour mobiliser les CSH dans la circulation et les collecter dans un but thérapeutique ou de recherche (Horwitz, 2007).

Les cellules réticulaires CAR, exprimant fortement le CXCL12 (qui ont les caractéristiques des MSC), participent également à la maintenance des CSH. Ces cellules sont localisées à proximité des sinusoides que ce soit dans la région de l'endoste ou non (Sugiyama et al., 2006). Une étude a confirmé la proximité des CSH avec des cellules périvasculaires exprimant le CXCL12 sans pour autant citer les cellules CAR. Ces cellules expriment également le récepteur à la leptine (Acar et al., 2015). Il a également été décrit que les MSC exprimant la nestine participeraient au maintien des CSH au sein de la moelle osseuse (Méndez-Ferrer et al., 2010).

Des péricytes particuliers, NG2⁺ (chondroïtin sulphate proteoglycan-4, Cspg4), seraient localisés exclusivement autour des artérioles et permettraient la quiescence des CSH (Kunisaki

INTRODUCTION GÉNÉRALE

et al., 2013). Les péricytes localisés au niveau des sinusoides sont quant à eux LEPR⁺ (leptin receptor) et permettent la maintenance des CSH via l'expression de SCF (Ding et al., 2012).

b) Le MK : un nouveau composant cellulaire de la niche

Des études récentes ont suggéré que le MK faisait également partie de la niche de la CSH. Ce rôle a été dévoilé par l'étude de souris exprimant le récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur du PF4 permettant la déplétion des MK de la moelle après injection de la toxine. Dans cette condition les auteurs ont observé une augmentation des CSH en prolifération et des MPP ainsi qu'une forte diminution de TGFβ1 au sein de la moelle. L'injection de TGFβ1 dans les souris déplétées en MK restaure la quiescence des CSH. Ces résultats suggèrent que les MK participent à la quiescence des CSH via la sécrétion du TGFβ1 (Zhao et al., 2014). Au regard des données indiquant l'existence de CSH préorientées vers la mégacaryopoïèse (partie A.II.1.b) il serait intéressant de vérifier si cette population particulière est activée dans ce contexte.

La même année, l'équipe de T. Suda a confirmé l'importance du MK pour la quiescence des CSH avec une approche similaire de déplétion des MK. L'absence de MK entraîne une diminution significative du nombre de CSH quiescentes ou CSH à long terme. Les auteurs mettent en évidence une forte expression de la TPO dans les MK et la restauration du nombre de CSH après administration de TPO (Nakamura-Ishizu et al., 2014). Ils en concluent que le MK participe à la quiescence des CSH via la production de TPO de manière locale. Par la suite ils ont mis en évidence que cette production de TPO était dépendante du récepteur CLEC-2 (Nakamura-Ishizu et al., 2015).

Afin d'établir si ces résultats ne sont pas simplement le reflet d'une mobilisation des CSH pour rétablir le pool de MK il serait judicieux de réaliser des expériences de déplétion d'autres lignées hématopoïétiques et d'évaluer l'effet sur la quiescence des CSH.

2. Microenvironnement de la mégacaryopoïèse

L'engagement des CSH vers une voie de différenciation va mettre en œuvre un microenvironnement propre qui aura pour rôle l'orientation vers les différentes lignées hématopoïétiques. Pour identifier et comprendre le microenvironnement de la mégacaryopoïèse, il faut d'abord prendre en compte la localisation des MK et de leurs progéniteurs dans le tissu hématopoïétique.

a) Localisation du MK dans la moelle osseuse

En 1978, Lichtman et al., ont étudié la relation entre les MK et les sinusoides chez la souris. Pour cela ils ont comparé 30 photographies issues de coupes de moelle osseuse de 10 souris et ont pu démontrer que la position du MK par rapport au sinusoides n'était pas aléatoire mais bien déterminée (Lichtman et al., 1978). Le fait que les MK étaient principalement situés à proximité des vaisseaux a été confirmé dans plusieurs publications (Avecilla et al., 2004; Tavassoli and Aoki, 1989). Compte tenu de la localisation des CSH près de l'endoste, il était alors supposé une migration des MKp à partir de l'endoste vers les vaisseaux sanguins lors de la mégacaryopoïèse (Avecilla et al., 2004) qui serait sous le contrôle de SDF1 (Niswander et al., 2014). Ce modèle est maintenant remis en question au vu de la localisation périvasculaire des CSH. Par ailleurs la localisation des MK au sein de la moelle étudiée par microscopie sur coupe de moelle et intravitale a démontré une faible mobilité du MK au sein de la moelle et la localisation des MKp majoritairement à proximité des sinusoides (moins de 2 μm). Les auteurs notent néanmoins la forte densité du réseau vasculaire dans la moelle comme pouvant favoriser cette proximité mais concluent que la position des MK par rapport à celui-ci n'est pas aléatoire (Stegner et al., 2017).

b) Régulation de la mégacaryopoïèse par la matrice extra-cellulaire

La fibronectine participe à la prolifération des progéniteurs et à la formation des proplaquettes. Cependant, elle aurait un rôle inhibiteur sur la maturation et plus particulièrement sur la polyploïdisation du MK (Malara et al., 2014). Le collagène de type I inhibe la formation des proplaquettes (Malara et al., 2011; Semeniak et al., 2016) en favorisant

INTRODUCTION GÉNÉRALE

l'adhésion du MK au stroma et la formation de fibre de stress d'actine au sein de la cellule (Sabri et al., 2004). Il est néanmoins favorable à la différenciation et la maturation du MK (Pallotta et al., 2009). Bien que le collagène IV soit également présent autour de tous les vaisseaux de la moelle osseuse il ne semble pas jouer de rôle dans la formation des proplaquettes (Coutu et al., 2017b; Nilsson et al., 1998; Semeniak et al., 2016). Enfin, le fibrinogène est localisé au niveau de la paroi des sinusoides (Larson and Watson, 2006). Il favorise l'émission de proplaquettes et la formation des plaquettes (Balduini et al., 2008; Larson and Watson, 2006).

Le rôle des GAG est encore mal connu mais tout comme les protéines de matrice ils participeraient à l'hématopoïèse. Ainsi les GAG permettent une meilleure prolifération des cellules hématopoïétiques *in vitro* (Sponcer et al., 1983) et participeraient à la mobilisation de CSH *in vivo* (Albanese et al., 2009). Le perlecan (un héparan sulfate) a des propriétés anti-adhésives induisant plutôt la migration des cellules hématopoïétiques. Cependant il peut également présenter des facteurs de croissance participant à la différenciation et la prolifération des progéniteurs (Klein, 1995; Klein et al., 1995).

c) Régulation par des contraintes physiques

La moelle osseuse est un tissu en 3 dimensions constitué en particulier de l'os, des vaisseaux, des cellules hématopoïétiques et de la matrice extra-cellulaire. Plusieurs types de forces s'appliquent donc lors de la mégacaryopoïèse, de la CSH à la libération de plaquettes. La moelle est un tissu présentant une forte densité de cellules, qui sont donc toutes soumises à des forces d'étirement et de compression de la part des cellules environnantes. Lorsque le MK émettra les proplaquettes au travers de l'endothélium, celui-ci sera sous l'influence des forces de cisaillement créées par le flux sanguin. Enfin, toutes les cellules de la moelle sont soumises à la rigidité du tissu (Charras and Sahai, 2014).

Ces forces peuvent être ressenties par la cellule, comme le MK, par mécanotransduction et se traduire par un signal intracellulaire influençant le devenir du MK (Soves et al., 2014). Un article récent a mis en évidence l'influence de la rigidité du milieu *in vitro* sur le degré de différenciation des MK. Ainsi la culture de MK dans un milieu semi-solide de rigidité contrôlée, par comparaison avec la culture en milieu liquide, permet une meilleure production de

INTRODUCTION GÉNÉRALE

proplaquettes suite à la resuspension des MK en milieu liquide. Ces MK présentent une morphologie et structure plus proches de celles observées pour les MK *in situ* ainsi qu'une ploïdie augmentée (Aguilar et al., 2016).

d) Composition cellulaire du microenvironnement du MK

Assez peu d'études ont analysé le rôle du microenvironnement cellulaire dans le contrôle de la mégacaryopoïèse. Il a été montré que les MSC de moelle osseuse humaine favorisaient la production de MK émettant des proplaquettes à partir de progéniteurs hématopoïétiques de type CD34⁺ (Cheng et al., 2000). De plus la co-transplantation de MSC avec des cellules CD34⁺ permet une meilleure reprise de la mégacaryopoïèse et une meilleure production de plaquettes dans des souris NOD/SCID (Non-Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency) par rapport à une transplantation de CD34⁺ seules (Angelopoulou et al., 2003).

Le groupe de S. Rafii a étudié le rôle des cellules endothéliales médullaires sur la mégacaryopoïèse *in vitro*. Il a pu mettre en évidence l'importance de l'origine médullaire de ces cellules par rapport aux cellules HUVECs (cellules endothéliales de veine de cordon ombilical) dans leur capacité à favoriser la mégacaryopoïèse à partir de progéniteurs CD34⁺ (Rafii et al., 1995). Les chimiokines sécrétées par les cellules endothéliales médullaires permettraient la localisation des MKp à proximité de l'endothélium pour les dernières étapes de la mégacaryopoïèse (Avecilla et al., 2004). Les péricytes, localisés autour des artérioles de la moelle participent à la maturation du MK et l'émission de proplaquettes via une interaction CLEC2/Podoplanine (Tamura et al., 2016). Bien que l'interaction cellule endothéliale/MK soit évidente *in situ*, il n'y a pour le moment que peu d'étude sur les mécanismes d'interaction entre ces deux types cellulaires.

De même peu de données existent sur l'interaction entre les ostéoblastes et les MK. Il a été montré qu'ils jouent un rôle dans la mégacaryopoïèse en permettant à la CSH d'aller jusqu'au stade de MK mature dans un système de co-culture via VCAM-1 (Pallotta et al., 2009). Une autre étude implique la production d'IL-9 par les ostéoblastes ce qui favorise la mégacaryopoïèse (Xiao et al., 2017). Le microenvironnement du MK et de la CSH sont repris dans la figure 13.

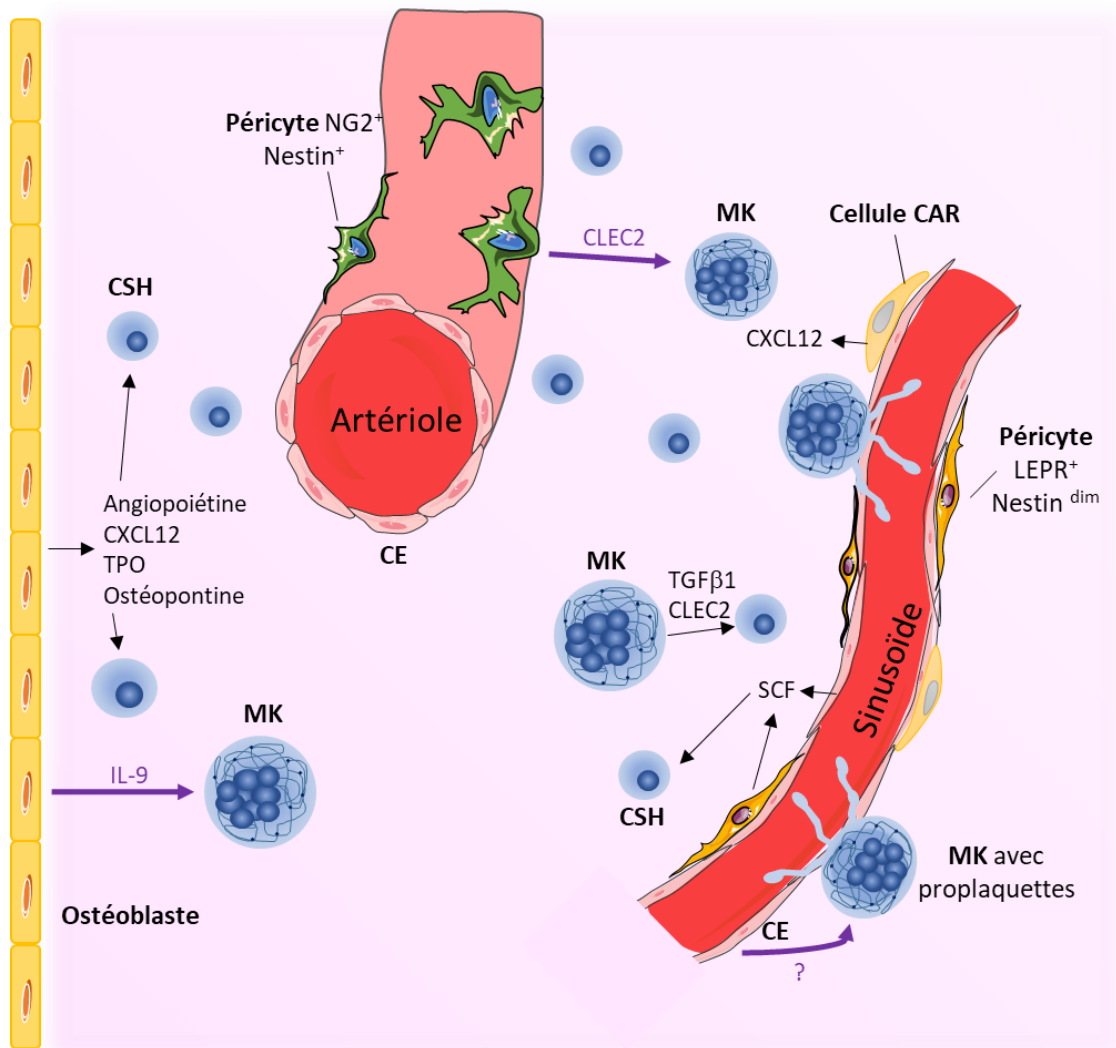


Figure 13 : Résumé des connaissances sur le microenvironnement des CSH et des MK
 Sur le schéma sont représentés en noir les facteurs impliqués et interactions connues entre les cellules du microenvironnement et les CSH et en violet ceux connus pour les MK. Les mécanismes intervenant entre les cellules stromales et la mégacaryopoïèse sont restreints et méconnus. CE : cellule endothéliale

Objectif du travail de thèse

L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer le rôle du microenvironnement cellulaire dans le cadre de la mégacaryopoïèse. A la fois lors de l'embryogenèse et chez l'adulte, la mégacaryopoïèse est régulée par les cytokines et les cellules présentes dans le microenvironnement. Une meilleure compréhension de ces interactions permettra de mettre en évidence des mécanismes encore inconnus.

Pour cela nous avons choisi de travailler *in vitro* avec des cellules primaires murines et humaines dans des systèmes de co-cultures, les cellules primaires permettant d'être plus proche de la situation *in vivo*. Ma thèse se divise en deux parties (figure 14) :

Partie 1

La première partie de ma thèse est présentée sous forme d'un article publié (partie 1, Article 1). Elle s'intéresse à la mégacaryopoïèse au cours du développement. Nous avons isolé une population de progéniteurs hépatocytaires particuliers au sein du foie fœtal murin. Ces cellules, présentes de manière transitoire lors du développement, favorisent la production de MK à partir de CSH murines et humaines.

Partie 2

Lors des phases finales de la mégacaryopoïèse, les MK sont à proximité des vaisseaux sinusoides de la moelle. Cette position n'étant pas aléatoire, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les MK et les cellules endothéliales médullaires et aux conséquences sur la maturation des MK. Cette étude a été réalisée sur des co-cultures de cellules primaires humaines et démontre l'importance des cellules endothéliales médullaires dans la mégacaryopoïèse. Elle fait l'objet d'un article en préparation présenté dans la partie 2.

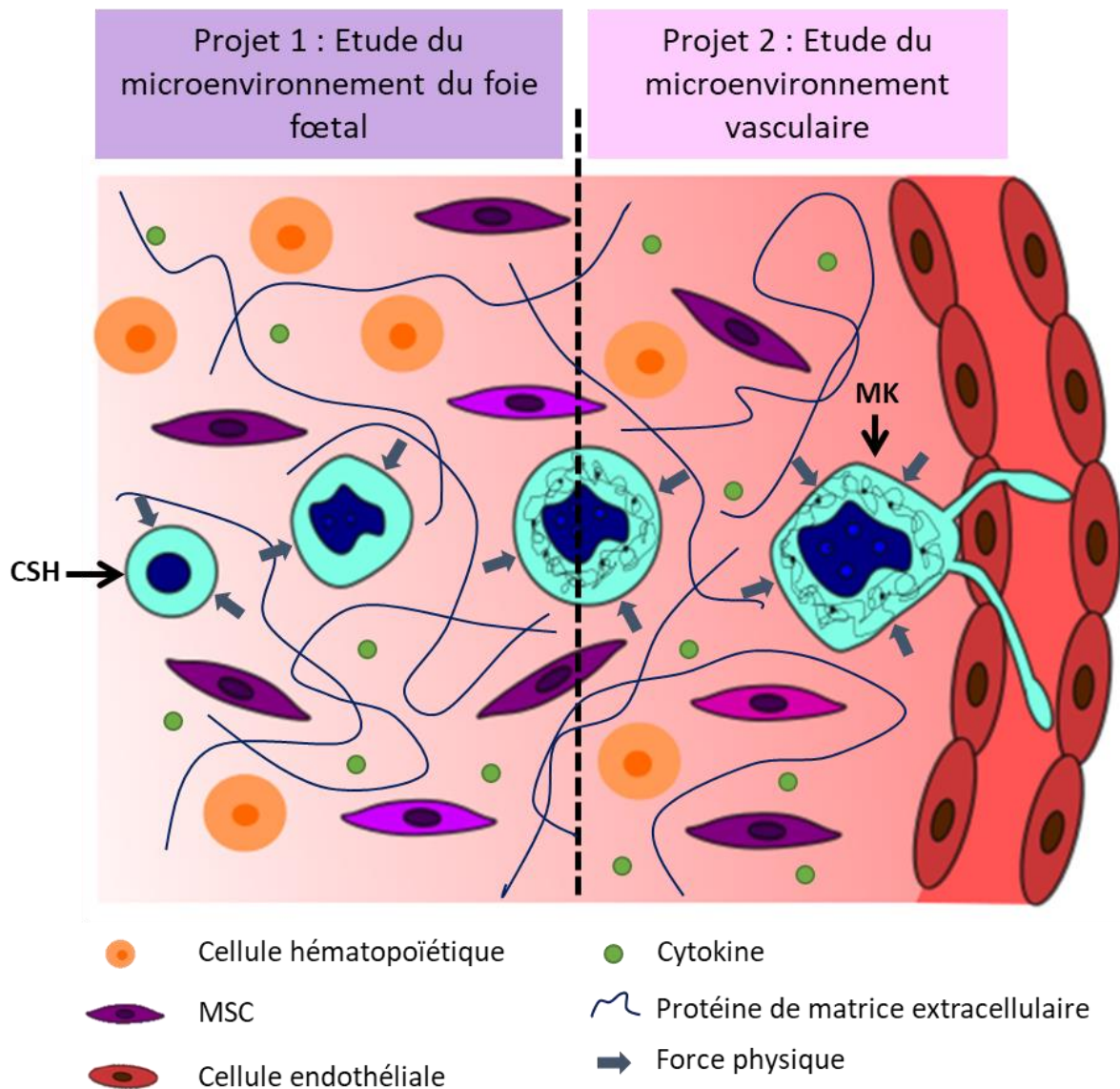


Figure 14 : Thèmes abordés lors de la thèse

Mon projet de thèse se divise en deux parties qui toutes deux portent sur le microenvironnement de la mégacaryopoïèse. Dans le projet 1 je me suis intéressée au microenvironnement présent dans le foie fœtal et à son interaction avec les CSH puis les progéniteurs aux stades précoces de la différenciation en MK. Dans le projet 2 je me suis consacrée aux phases finales de la mégacaryopoïèse et plus principalement à l'interaction entre les MK et les cellules endothéliales.

B. Travail de thèse

I. Partie 1 : Rôle du foie fœtal dans la mégacaryopoïèse

1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans la partie III.A de l'introduction générale, de nombreuses interactions entrent en jeu lors de l'embryogenèse entre les cellules du foie fœtal et les cellules hématopoïétiques. L'expansion des cellules hématopoïétiques dans le FF a lieu principalement entre J12.5 et J15.5 chez la souris (Mikkola and Orkin, 2006). Nous avons postulé que le foie fœtal contiendrait à ces stades un microenvironnement particulier qui favorise l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques, et en particulier celle des progéniteurs mégacaryocytaires. Le but de cette étude a été de déterminer quelles cellules et mécanismes étaient impliqués dans l'expansion observée *in vivo*.

A mon arrivée au laboratoire il avait déjà été montré qu'une population particulière de cellules stromales de foies fœtaux murins, la population V^+P^- , favorisait la différenciation de CSH murines en MK. Mon objectif a été d'évaluer si cette population stromale présentait les mêmes propriétés vis-à-vis des cellules hématopoïétiques humaines au vu notamment de différences possibles avec la souris, modèle le plus fréquemment utilisé pour étudier l'hématopoïèse.

Pour se rapprocher des travaux déjà réalisés dans la souris, où des CSH bien caractérisées avaient été utilisées, un protocole a été mis en place permettant d'obtenir en nombre suffisant une population la plus enrichie possible en CSH humaines. Les CSH classiquement utilisées chez l'Homme pour la différenciation des MK *in vitro* sont des cellules $CD34^+$, une population hétérogène de progéniteurs plus ou moins engagés contenant peu de véritables CSH. Celles-ci ont été récemment mieux définies par Notta et al., (2016) sur la base d'un phénotype $CD34^+CD38^-CD45RA^-Thy1^+CD49f^+CD71^-BAH1^-$. Cette population représente 5,4% des $CD34^+$ dans le FF, 1,5% des $CD34^+$ dans le sang de cordon et 1,2% des $CD34^+$ dans la moelle osseuse (Notta et al., 2016). Dans notre étude cette population a été purifiée à partir de filtres de leuco-déplétion utilisés lors de la préparation des produits sanguins pour transfusion (plaquettes, globules rouges, plasma). Ces filtres permettent de retenir les leucocytes à partir

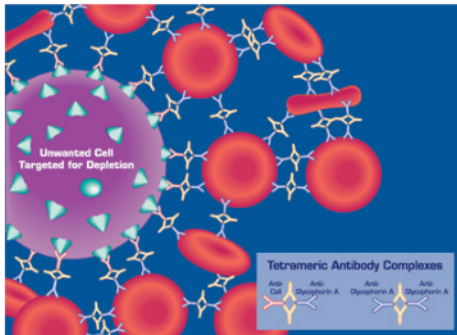
d'un pool de 5 dons de sang total. Les cellules extraites de ces filtres sont déplétées en cellules engagées par une méthode de « rosetting » (Figure 15). Suite à cette étape nous avons isolé les cellules $CD45^+CD34^+CD38^-CD45RA^-$ qui représentent en moyenne 6% des $CD34^+$ et qui correspondent à des CSH et MPP (Notta et al., 2016). Cette population a été triée par FACS selon un phénotype moins stringent que dans l'étude de Notta et al., afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules enrichies en CSH pour les expériences à réaliser.

Pour limiter l'influence des cytokines ajoutées au milieu de culture et permettre de révéler les propriétés intrinsèques des cellules stromales, les cultures ont été réalisées avec des concentrations faibles en cytokines. Ces concentrations ont été définies pour permettre d'assurer a minima la survie des cellules hématopoïétiques ainsi qu'une faible prolifération mais peu d'engagement. Ainsi, les résultats obtenus au terme des co-cultures sont principalement le reflet de l'influence des cellules stromales sur les CSH avec peu d'interférence des molécules présentes dans le milieu.

2. Principaux résultats

J'ai pu montrer que des stroma cellulaires d'origine murine pouvaient également soutenir la mégacaryopoïèse à partir de CSH d'origine humaine. Plus précisément, la population de progéniteurs hépatiques V^+P^- a démontré une capacité importante à favoriser la mégacaryopoïèse à partir de CSH avec une efficacité supérieure aux cellules stromales V^+P^+ et V^-P^+ . Ce tapis cellulaire a non seulement permis une production importante de MKp à fort pouvoir proplaquetogène ($CD34^+CD41^{dim}$) mais également de MK polyploïdes $CD41^+CD42c^+$. Ainsi, l'ensemencement de 500 CSH sur le stroma V^+P^- a permis d'obtenir en moyenne 100 000 cellules hématopoïétiques $CD45^+$ dont 35 000 MK. Ces résultats sont présentés dans la figure 7 du manuscrit Brouard et al., 2017.

A



B

CD2/CD3	Lymphocytes T
CD14/CD16	Cellules immunité innée
CD19	Lymphocytes B (LB)
CD24	Granulocytes Lymphocytes B
CD56	Cellules NK
CD66b	Neutrophiles Eosinophiles
CD61	LB, macrophages, mastocytes, monocytes, MK, plaquettes
Glycophorine A	Erythrocytes

Figure 15 : Méthode de « rosetting » utilisée pour éliminer les cellules engagées

A. Cette méthode s'appuie sur une sélection négative des cellules les plus primitives présentes dans la suspension de cellules mononuclées obtenue à partir de filtres de leucodéplétion. Adaptée de (Soler et al., 2017). Le mélange d'anticorps présents dans cette solution (**B**) va reconnaître l'ensemble des cellules engagées. Ces anticorps sont couplés à des anticorps anti-glycophorine A ciblant les érythrocytes permettant un phénomène de type « rosetting » et l'élimination des cellules engagées par sédimentation.

Article 1 publié : A unique microenvironment in the developing liver supports the expansion of megakaryocyte progenitors

A unique microenvironment in the developing liver supports the expansion of megakaryocyte progenitors

Nathalie Brouard,^{1,2} Camille Jost,¹ Nadine Matthias,² Camille Albrecht,¹ Sébastien Egard,¹ Poojabahen Gandhi,² Catherine Strassel,¹ Tomoko Inoue,³ Daisuke Sugiyama,³ Paul J. Simmons,^{2,4} Christian Gachet,¹ and Francois Lanza¹

¹Université de Strasbourg, INSERM, Etablissement Français du Sang-Alsace, Biologie et Pharmacologie des Plaquettes Sanguines Unité Mixte de Recherche-S 949, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France; ²Center for Stem Cell Research, Brown Foundation Institute of Molecular Medicine, University of Texas Health Science Center, Houston, TX; ³Center for Clinical and Translational Research, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan; and ⁴Mesoblast Ltd., Melbourne, VIC, Australia

Key Points

- Two types of fetal liver stromal cell populations are identified: mesenchymal cells and prehepatic cells.
- The prehepatic stromal cell population exhibits a unique capacity to support the production of megakaryocytes from human and mouse HSCs.

The fetal liver is the site of a major expansion of the hematopoietic stem cell (HSC) pool and is also a privileged organ to study megakaryocyte progenitor differentiation. We identified in the mouse fetal liver at day 13.5 a discrete stromal cell population harboring a CD45⁻TER119⁻CD31⁻CD51⁺VCAM-1⁺PDGFR α ⁻ (V⁺P⁻) phenotype that lacked colony-forming unit fibroblast activity and harbored an hepatocyte progenitor signature. This previously undescribed V⁺P⁻ population efficiently supported megakaryocyte production from mouse bone marrow HSC and human peripheral blood HSC-myeloid progenitors cultured in the presence of limited cytokine concentrations. Megakaryocytes obtained in V⁺P⁻ cocultures were polyploid, positive for CD41/CD42c, and efficiently produced proplatelets. Megakaryocyte production appeared to be mediated by an expansion of the progenitor compartment through HSC-stromal cell contact. In conclusion, the fetal liver contains a unique cellular microenvironment that could represent a platform for the discovery of regulators of megakaryopoiesis.

Introduction

The proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) are regulated by a microenvironment combining cellular and extracellular components, such as extracellular matrices, growth factors, and other biomolecules, which collectively exert their influence on HSC maintenance and differentiation. A particular microenvironment that regulates the self-renewal and the maintenance of HSCs is also referred as the stem cell niche, a concept first proposed by R. Schofield.¹ The cellular elements constituting the niche were first identified among the fibroblastic cells that form colonies in the appropriate conditions (colony-forming unit fibroblast [CFU-F]).² CFU-F initiating cells and their progeny are also referred to as mesenchymal stem cells or stromal precursor cells.

While significant progress in understanding the mechanisms involved in the maintenance of a self-renewing HSC has been achieved, very few studies have focused on the identification of the microenvironment regulating the commitment toward a given lineage, particularly the megakaryocytic lineage. This question is of great interest when considering our limited ability to reproduce in culture the megakaryopoiesis and thrombopoiesis efficiencies of the native environment. Reports considering the role of bone marrow stromal cells are conflicting with respect to their capacity to support megakaryopoiesis. Some studies suggest that contact with stromal cell precursors negatively controls megakaryocytic differentiation of the human hematopoietic cell line K562^{3,4} or human CD34 progenitors,^{5,6} whereas other studies suggest that stromal cells support or enhance megakaryopoiesis.⁷⁻⁹ This apparent contradiction may reside in differences in experimental design and in the complexity of the processes involved in the

generation of megakaryocytes (MKs) from HSCs. Indeed, MKs are generated from HSCs through multiple steps of committed MK progenitors, including a bipotent megakaryocytic erythroid progenitor (MEP), leading to the production of a unipotent MK precursor, which will then mature into large polyploid MKs that will extend proplatelets in the circulation. How, where and which stromal precursor cells intervene in this complex but well-orchestrated process is still subject to questions.

Stromal cells produce a number of hematopoietic cytokines and other soluble factors regulating megakaryopoiesis.¹⁰ The major cytokine regulating megakaryopoiesis, thrombopoietin (TPO), stimulates the production of MKs, but not the final maturation: proplatelet production.¹¹ This highlights the fact that the factors or cellular elements controlling the different steps of megakaryopoiesis are bound to be different from the commitment of HSCs toward the MK lineage and during the maturation of MK progenitors and precursors. Similarly, it is likely that different stages of MK expansion and maturation are regulated by distinct cellular microenvironments, and different hematopoietic tissues can be considered to explore this question.

Megakaryopoiesis mainly occurs in the bone marrow in adults but is also observed during embryogenesis. In the embryo, megakaryopoiesis proceeds following colonization of the fetal liver by HSCs originating in the aorta-gonad-mesonephros and possibly also by MK progenitors already present in the yolk sac.¹² Large mature MKs are observed in the fetal liver from around 13 days of development in the mouse¹³ (Manuela Tavian, INSERM UMR S949, oral communication, 16 November 2015). The fetal liver therefore represents an attractive tissue to study the microenvironment supporting the different stages of megakaryopoiesis.

In this study, we characterized and isolated different stromal cell populations from mouse fetal liver with different functional properties. We found that a particular population with a hepatocyte progenitor signature supported efficient expansion of MK-committed progenitors able to produce fully mature MKs.

Materials and methods

Isolation of fetal liver stromal cells

Pregnant females from timed breeding protocol were killed using CO₂ inhalation followed by cervical dislocation. Fetuses were harvested, and the fetal liver was dissected under a binocular microscope. Fetal liver cell suspensions were obtained after digestion with 3 mg/mL collagenase I (Worthington Biochemical, Freehold, NJ) for 10 min at 37°C, dilution with PBS-2% newborn serum, and filtration through a 70 μm cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA). Fetal liver hematopoietic cells were depleted after labeling with biotinylated TER119 and anti-mouse CD45 antibodies using sheep anti-rat antibodies Dynabeads (Life Technologies AS, Oslo, Norway). The nonmagnetic fraction is referred to as the Hem⁻ fraction and represents between 10% and 20% of the number of input cells. Hem⁻ cells were labeled with allophycocyanin-Cy7-conjugated streptavidin, allophycocyanin-conjugated anti-CD140a, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD31, phycoerythrin-conjugated anti-CD51, and phycoerythrin-Cy7-conjugated anti-CD106 antibodies. Acquisition of data for analysis was performed on a BD LSR II or a Fortessa-X20 flow cytometer (BD Biosciences), and cell sorting was performed on a BD Aria I or a BD Aria II flow cytometer (BD Biosciences). Flow cytometry data analyses were conducted using

BD FACSDiva software (BD Biosciences). Stromal cells were sorted as Hem⁻CD31⁻CD51⁺VCAM-1⁺PDGFRα⁻ (V⁻P⁻), Hem⁻CD31⁻CD51⁺VCAM-1⁻PDGFRα⁺ (V⁻P⁺), and Hem⁻CD31⁻CD51⁺VCAM-1⁺PDGFRα⁺ (V⁺P⁺) as described in Figure 1A. A detailed list of antibodies used is provided in supplemental Table 1.

Establishment of cocultures with stromal cells and mouse HSC or MK progenitors

The sorted stromal cell populations were cultured in 24-well plates in α-minimal essential medium supplemented with 20% fetal calf serum (Hyclone, South Logan, UT) or with EGM-2 BulletKit (catalog no. CC-3162; Lonza, Walkersville, MD) as indicated. Confluent layers were gently washed and hematopoietic cells seeded onto the stromal layers in StemsSpan (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) supplemented with a low cytokine cocktail (7.5 ng/mL recombinant mouse [rm] stem cell factor, 5 ng/mL rmFlt3L, 10 ng/mL rmTPO, and 1 ng/mL recombinant human interleukin-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN) previously determined to be suboptimal for stimulating the proliferation of single Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺ cells plated in the absence of stromal cells (data not shown). Cultures were maintained in 5% CO₂, 5% O₂, humidified air at 37°C for 3 to 13 days as indicated. For noncontact coculture experiments, HSCs were seeded into a Transwell insert with a 0.3-μm-pore polyester membrane.

Analyses of MKs produced in cocultures

For simultaneous analysis of the phenotype and ploidy, Hoechst 33342 (BD Biosciences) was added to the coculture medium at a final concentration of 1 μg/mL, and the culture was maintained at 37°C for 2 hours. Then, nonadherent cells were harvested, washed, and labeled with anti-CD41 and anti-CD42c antibodies. Cells were washed twice and resuspended in PBS-2% newborn serum supplemented with 2.5 μg/mL 7-aminoactinomycin D (Sigma, St Louis, MO) for dead cell exclusion. MKs were identified as cellular events expressing both CD41 and CD42c antigens, among the viable cellular events and the large cellular events of high ploidy as presented in supplemental Figure 1. These large cellular events permeable to 7-aminoactinomycin D are observed only in cultures where large cells (MKs) are visible (supplemental Figure 1Ai-ii). These events were sorted, and the observation of Giemsa-stained cells confirmed that the culture contained only large, mature MKs (supplemental Figure 1Bi-iii). Therefore, these large events involve mature MKs and were consequently included in the analysis.

Results

Isolation and characterization of different stromal cell populations from mouse fetal livers

A flow cytometry sorting strategy was devised to identify functionally distinct stromal cell populations in embryonic day 13.5 (E13.5) mouse fetal liver cell suspensions (Figure 1A). Preliminary experiments showed that CFU-Fs were restricted to the CD45⁻TER119⁻CD31⁻CD51⁺ fraction (data not shown). To further characterize the stromal cell population identified by CD51 expression, we performed magnetic depletion of the hematopoietic fraction (Hem⁺) of the cell suspension, which represented 80.4% of the viable cells (Figure 1Ai-ii). Following screening of a panel of antibodies, further subdivision of the Hem⁻CD31⁻CD51⁺ population relied on differential expression of VCAM-1 and PDGFRα. Four discrete subpopulations of cells could be resolved: Hem⁻CD31⁻CD51⁺VCAM-1⁻PDGFRα⁻ (V⁻P⁻),

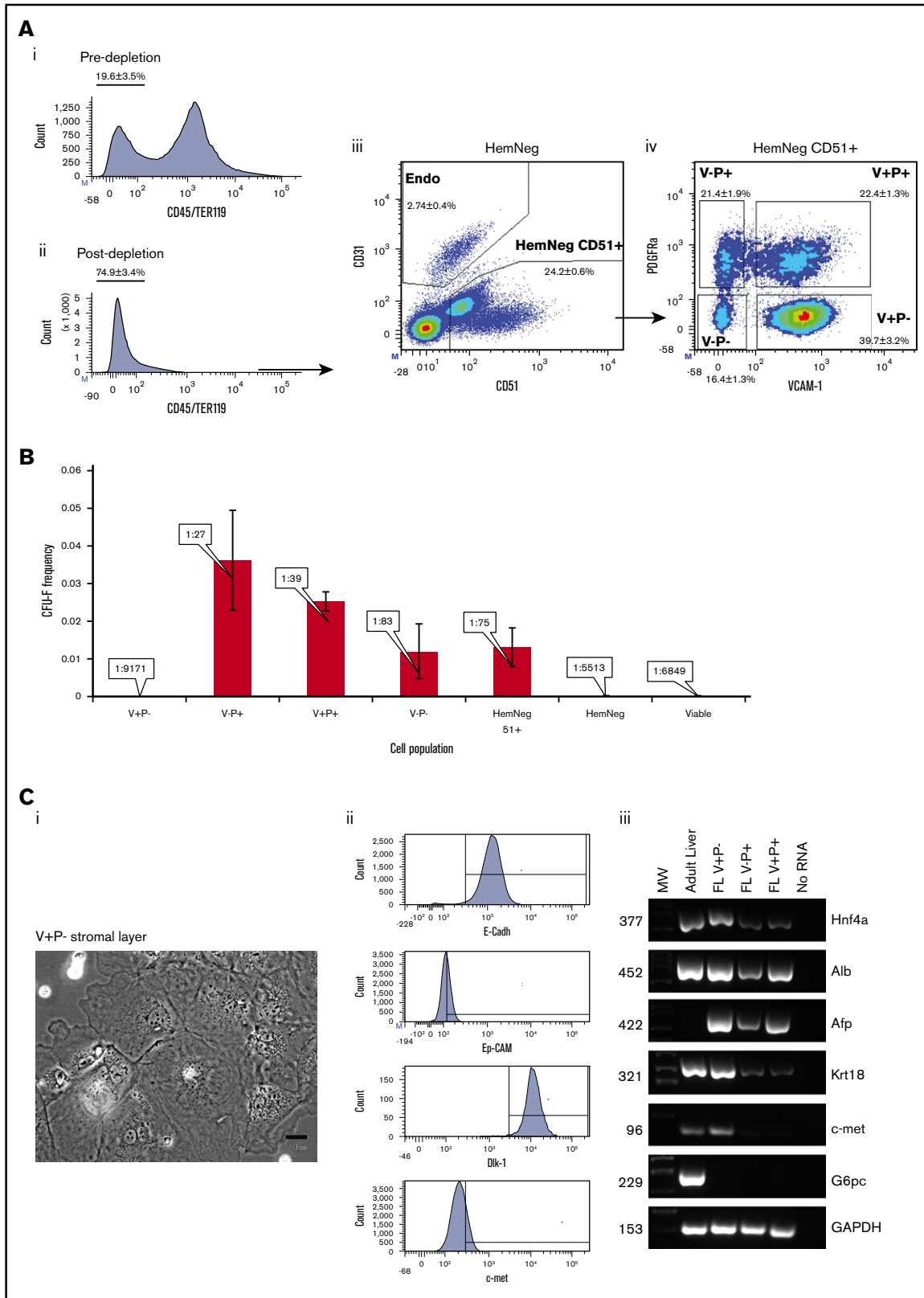


Figure 1. Isolation and characterization of different stromal cell populations from mouse fetal livers. Fetal liver cell suspensions obtained following enzymatic digestion of dissected E13.5 fetal liver were subjected to fluorescence-activated cell sorting analysis and CFU-F assays. (A) Fluorescence-activated cell sorting analysis before (i) and after (ii) magnetic depletion of CD45/TER119 hematopoietic cells, and the gating strategy used for the sorting of the different cell populations tested for CFU-F content (iii-iv). Dot plots and histograms are representative figures with the mean \pm standard error of the mean (SEM) from 27 independent experiments. (B) Sorted cell populations

Hem⁻CD31⁻CD51⁺VCAM-1⁻PDGFR α ⁺(V⁻P⁺), Hem⁻CD31⁻CD51⁺VCAM⁺PDGFR α ⁺(V⁺P⁺), and Hem⁻CD31⁻CD51⁺VCAM-1⁻PDGFR α ⁻(V⁺P⁻) (Figure 1Aiii-iv). Following sorting, these 4 subpopulations were evaluated for CFU-F activity, which was observed for all subpopulations except V⁺P⁻ cells (Figure 1B). However, this population formed adherent layers when grown in EGM-2 medium and displayed a distinct morphology (Figure 1Ci), indicating a unique property of this cell population. Further flow cytometry and reverse transcription polymerase chain reaction analyses demonstrated the expression of Hnf4a, Alb, Afp, Krt18, epithelial cell adhesion molecule, E-cadherin, c-met, and Dlk-1 (Figure 1Cii-iii) and the absence of expression of G6pc, suggesting that this population contains hepatic progenitors, but not mature hepatocytes.^{14,15} A detailed phenotypic characterization by flow cytometry of the stromal cell populations is provided in supplemental Figure 2. In agreement with this, the number of V⁺P⁻ cells per liver was significantly increased in livers from E16.5 embryos, a developmental stage at which the hepatic development is fully underway¹⁶⁻¹⁸ (supplemental Figure 3). Moreover, V⁺P⁻ cells were absent or barely detected in the rest of the embryo at E13.5 or in livers from adult or newborn mice (supplemental Figure 4).

V⁺P⁻ stromal cells are unable to support long-term repopulating HSCs

We evaluated the capacity of fetal liver-derived stromal cells to support HSC maintenance. Stromal cells were cocultured with 20 HSCs isolated from adult bone marrow of PTPRC (CD45.1⁺) mice as Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺CD48⁻CD150⁺ cells (SLAM) and serially transplanted into double congenic (CD45.1⁺/CD45.2⁺) recipient mice (Figure 2A). Multilineage donor contribution in the bone marrow of all secondary recipient mice was observed only in presence of V⁻P⁺ stromal layers. The V⁺P⁻ stromal layers supported the proliferation of hematopoietic cells but failed to maintain either short-term (supplemental Figure 5D) or long-term repopulating cells (Figure 2B). Light microscopy observation of the cocultures at 2 weeks revealed the presence of large cells (~30 μ m in diameter) in the V⁺P⁻ condition, suggesting that this stromal cell population has the unique ability to support megakaryopoiesis (Figure 2C).

Fetal liver V⁺P⁻ stroma supports the production of MKs from murine HSCs

The capacity to support MK production was further evaluated by analyzing CD41 and CD42c expression and ploidy levels. While the total number of cells produced from 50 HSCs showed a similar increase in the 3 stromal cocultures when compared with no stroma (Figure 3B), clear differences were observed for MK production. A CD41⁺CD42c⁺ population was identified at days 7 and 9 of coculture for the 3 stromal layers, but a striking increase was observed in the V⁺P⁻ coculture at day 13. An average of 10⁵ MKs

per 50 HSCs was produced, which was 100 times greater than in the absence of stroma (Figure 3C). By comparison, V⁻P⁺ and V⁺P⁺ cocultures showed a 17- and 6-fold increase, respectively. No hematopoietic cells were produced from any of the established stromal layers when grown for 13 days in coculture medium (data not shown). The CD41⁺CD42c⁺ cells from the 3 coculture conditions were polyploid. A representative histogram of the ploidy analysis is presented in Figure 3D. Myeloid and lymphoid lineages identified using CD11b and Gr-1 markers and CD3 and B220, respectively, were equivalent in all stromal conditions (data not shown).

The expression of CD42c and polyploidy indicated that these MKs were well differentiated. This was confirmed following replating of cells from a 9- to 13-day coculture in a TPO-rich medium to favor full MK maturation.¹⁹ Under this condition, MKs derived from HSC/V⁺P⁻ cocultures efficiently developed proplatelet extensions after 3 days with typical shafts and platelet swellings that were positive for β 1-tubulin labeling (Figure 3E-F). The proplatelet capacity was quantified using a limiting dilution scheme that allowed for a comparison of the frequency of cells capable of producing proplatelets in cells generated in the different coculture conditions. Whereas the cells produced in the absence of stroma or in the presence of V⁻P⁺ and V⁺P⁺ stromal layers displayed a frequency of proplatelet-forming MKs of 1:36 217, 1:265 999, and 1:86 339 cells, respectively, the cells produced in the presence of V⁺P⁻ stromal layers exhibited a frequency of proplatelet-forming MKs of 1:1288 cells (Figure 3G).

These results indicate that stromal layers derived from V⁺P⁻ cells provide a unique microenvironment favoring the production of mature MKs from HSCs.

The V⁺P⁻ stromal layers promote MK differentiation via cell contact with hematopoietic progenitors

Having established that V⁺P⁻ stromal cells supported MK production, we evaluated whether this was mediated by secreted factors, cell-cell contact, or both. The role of secreted factors was first assessed by culturing HSCs in low-cytokine medium supplemented with an increasing proportion (5% to 20%) of conditioned media collected from V⁺P⁻ stromal cells. The number of CD41⁺CD42c⁺ cells produced after 9 days of culture was not increased in the presence of conditioned media compared with the control, suggesting minimal implication of secreted factors (Figure 4A). In agreement with this, the potential importance of cell-cell contact was suggested in Transwell assays where the number of MKs produced from 50 HSCs seeded in the upper chamber, but not in contact with V⁺P⁻ cells (16 170.4 \pm 5759 MKs at day 13), was only slightly increased compared with the increase observed at day 13 in the standard coculture (96 414.4 \pm 43 902.5) (Figure 4B). TPO, an essential cytokine of MK lineage

Figure 1. (continued) were plated in α -minimal essential medium 20% fetal calf serum, and CFU-F frequencies were determined in limiting dilution assays using L-Calc software. Values represent mean \pm SEM from 3 independent experiments. (C) Hem⁻CD51⁺VCAM-1⁺PDGFR α ⁻(V⁺P⁻) cells that failed to produce CFU-F were sorted and plated in EGM-2. (i) Phase contrast images of the adherent layers constituted of large spread cells. Scale bar represents 40 μ m. (ii) Expression of E-cadherin (E-Cadh), c-met, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), and Dlk-1 for the V⁺P⁻ cell population. Shown is a representative histogram from 3 independent experiments. All histogram markers are based upon fluorescence-minus-one controls. (iii) Expression of Hnf4a, Alb, Afp, Krt18, c-met, G6pc, and GAPDH transcripts in sorted cells from the fetal liver and total adult liver. Figures on the left side of the panel indicate amplicon size. FL, fetal liver; MW, molecular weight; Neg, negative.

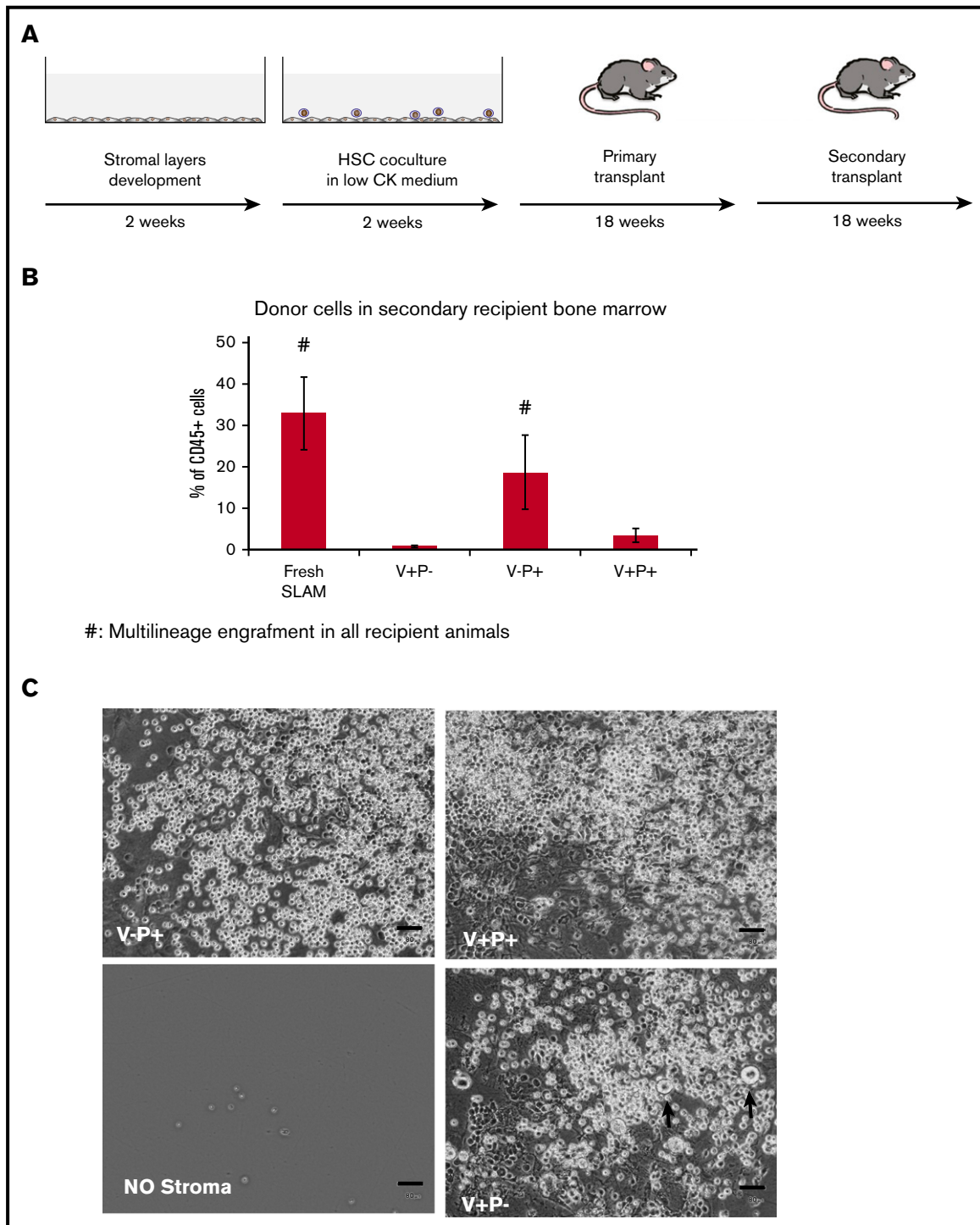


Figure 2. V⁺ P⁻ stromal cells do not support maintenance of long-term repopulating HSCs. (A) Outline of the long-term HSC repopulating assay. Bone marrow–derived CD45.1⁺ SLAM cells cultured in low-cytokine medium onto stromal layers were transplanted into F1 double congenic CD45.1⁺/CD45.2⁺ irradiated mice. Bone marrow cells from primary recipient mice were transplanted into F1 secondary recipient mice. (B) Percentage of donor cells in the bone marrow of secondary recipient mice 18 weeks posttransplant are presented (# indicates groups for which all recipient animals displayed multilineage engraftment). Values represent mean ± standard deviation (SD) from 2 independent experiments. (C) Representative images of the cocultures after 14 days. Arrows point to putative MKs. Scale bars represent 80 μm. CK, cytokine.

differentiation, was expressed in all the fetal stromal layers tested (Figure 4Di). These data suggest that direct HSC–stromal cell contact could be the primary determinant or factor supporting the production of a large number of MKs. Additional support

for the contact-dependency hypothesis came from the observation of clusters of large cells adhering to the top of the stromal layer (Figure 4Ci). These clusters were observed from day 7 in all the cocultures with V⁺P⁻ cells, but only on rare instances

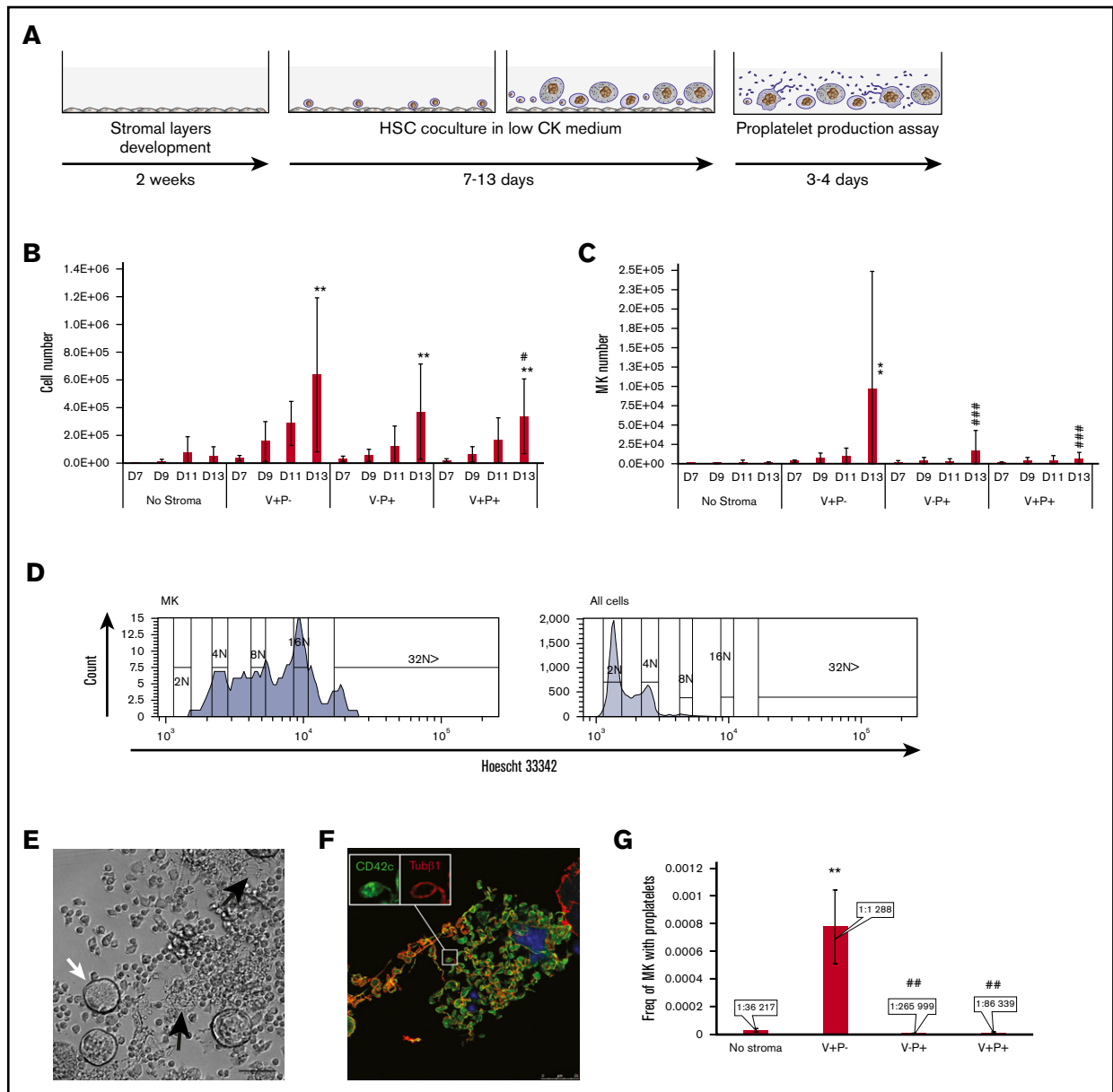


Figure 3. HSC culture with V⁺ P⁻ stromal cells supports the expansion of CD41⁺ CD42⁺ polyloid MKs that efficiently produce proplatelets. (A) Fetal liver stromal cells were sorted confluent adherent layers developed over 2 weeks. HSCs (50 SLAM cells) were cocultured with sorted stromal cells for 7 to 13 days and assayed for MK production. At days 9 to 13, a fraction of the cells were subcultured in proplatelet medium. (B) Total number of cells produced from 50 SLAM cells in the absence of stroma or with the different stroma. Values represent mean \pm SD from 5 independent experiments. * $P < .01$ vs the nonstroma group for the same day; # $P < .05$ vs stroma V⁺ P⁻ for the same day. Other comparisons were not statistically significant. (C) Total number of MKs, identified as cells expressing CD41 and CD42c, produced from 50 SLAM cells. Values represent mean \pm SD from 5 independent experiments * $P < .01$ vs the nonstroma group for the same day; # $P < .001$ vs stroma V⁺ P⁻ for the same day. Other comparisons were not statistically significant. (D) Representative histogram of the DNA content analysis of MKs (CD41⁺ CD42c⁺) top and all cells (bottom) produced during a 13-day coculture on V⁺ P⁻ cells. (E) Representative phase contrast image of cells first cultured on V⁺ P⁻ cells and replated for 3 to 4 days in proplatelet medium. White arrows indicate MKs, and black arrows indicate proplatelet extension. Scale bar represents 100 μ m. (F) Immunostaining confirmed the presence of tubulin β 1 in the proplatelet extension. Scale bar represents 25 μ m. (G) Cells from day 11 coculture were harvested and plated in proplatelet medium using a limiting dilution scheme. The frequency of cells produced from day 11 cocultures capable of producing proplatelet-bearing MKs is presented. Values represent mean \pm SD from 4 independent experiments * $P < .01$ vs the nonstroma group for the same day; # $P < .01$ vs stroma V⁺ P⁻ for the same day. Other comparisons were not statistically significant. CK, cytokine; D, day.

with V⁺ P⁺ stromal layers and never with V⁻ P⁺ cells. Immunostaining for CD42c expression confirmed that these adherent cells were indeed MKs (Figure 4Cii). Considering that Notch signaling has been implicated in MK erythroid commitment,²⁰⁻²²

we investigated the expression of Notch ligands in stromal cells. While Dll1, Dll4, and Jag 1 are expressed by the 3 stromal layers, Jag2 is only detected in V⁺ P⁻-derived stromal layers (Figure 4Dii).

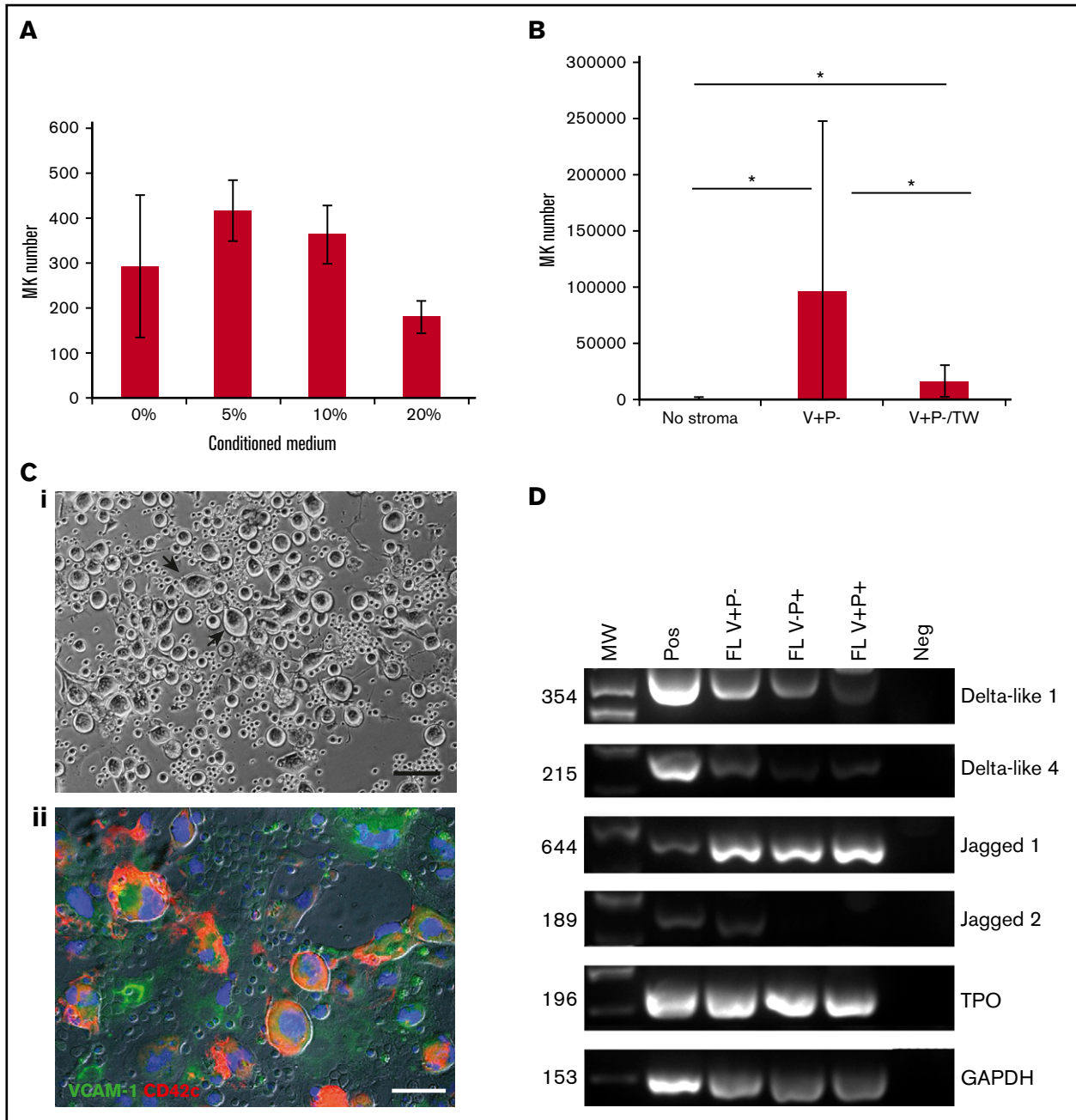


Figure 4. V⁺P⁻ stromal cells promote MK expansion via a contact-dependent mechanism. (A) HSCs (50 SLAM cells) were plated in low-cytokine serum-free medium in the presence of increasing proportions (vol/vol) of conditioned medium from a V⁺P⁻ stromal cell layer. The bar graph represents the number of MKs produced per 50 SLAM cells plated. The mean values ± SD from 2 independent experiments were not statistically different. (B) Coculture of HSC and stromal layers were established in a noncontact setup using Transwell insert (V⁺P⁻/TW) with 0.3- μ m pores and analyzed for MK content after 13 days of coculture in comparison with cultures without stroma and cocultures with a V⁺P⁻ layer. Values represent mean ± SD of MKs produced per 50 SLAM cells from 3 independent experiments. **P* < .01. (C*i*) Phase contrast image of a cluster of large cells adherent on the stromal layers observed only during the coculture of HSC with V⁺P⁻-derived stromal layers. Representative image from a day 9 coculture is presented. Scale bar represents 100 μ m. (C*ii*) Immunofluorescence analysis of the expression of CD42c (red) by the large cells forming clusters on V⁺P⁻ stromal layers identified by the expression of VCAM-1 (green). Scale bar represents 30 μ m. (D) Expression of Jag1, Jag2, Dll1, Dll4, TPO, and GAPDH transcripts in fetal liver stromal cells from adherent layers. Figures on the left side of the panel indicate amplicon size.

Considering the importance of the cellular contact between hematopoietic progenitors and stromal cells for the stimulation of megakaryopoiesis, we performed immunolocalization of the different stromal cells, hematopoietic progenitors, and MKs

(supplemental Figure 6A-C). MKs were identified as cells expressing CD42c²³ and CD150. We observed that 98% of MKs were in contact with VCAM-1–positive cells (supplemental Figure 6E).

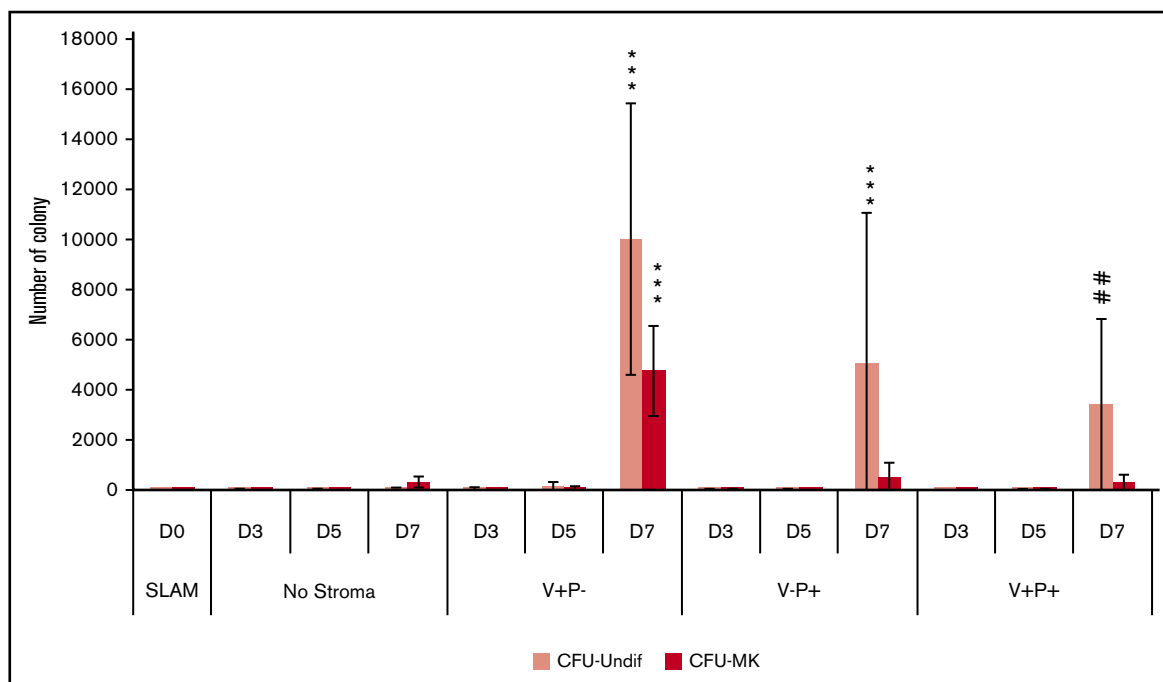


Figure 5. V^+P^- stromal cells promote the expansion of hematopoietic progenitors. HSCs (50 SLAM cells) were plated in low-cytokine serum-free medium in the presence or absence of stromal layers. After 3, 5, and 7 days, the cells produced were subjected to a clonogenic assay for CFU-MKs. The graph bar represents the number of CFU-MKs (dark red) and undifferentiated CFU colonies (light red) produced per 50 SLAM cells. Values represent mean \pm SD from 3 independent experiments. *** $P < .001$ vs the nonstroma group for the same day; ## $P < .01$ comparison for the number of CFU-MKs at day 7 in the stroma V^+P^- vs other stroma groups. Other comparisons were not statistically significant. D, day.

V^+P^- stromal cells support the production of MK-committed progenitors

The increase in the number of MKs produced from HSCs cocultured with V^+P^- stromal layers could result from an increase in the commitment of HSCs toward the MK lineage or the expansion of MK progenitors. We therefore performed clonogenic assays to quantify the CFU-MKs produced in the coculture of HSCs with the different stromal layers from day 3 to day 7. We observed that V^+P^- -derived stromal layers promoted the production of a larger number of CFU-MKs at day 7 (4759.4 ± 1042.4) compared with the culture in the absence of stroma (322.6 ± 128.2) or in the presence of stromal layers derived from V^+P^+ (494.9 ± 334.4) or V^+P^+ (301.7 ± 175.9) cells (Figure 5). In addition, we also observed an increase in the number of undifferentiated colonies produced in presence of V^+P^- stromal layers. This would suggest that the action of the stromal cells was not restricted to the MK lineage. Thus, we also quantified early progenitors (colony-forming unit [CFU] granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage) from day 3 to day 7, as well as CFU erythroid at days 5 and 7 of coculture (supplemental Figure 7). We observed an increased number of CFU granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophages generated in the V^+P^- coculture from day 5 and all CFUs at day 7. These data suggest that V^+P^- cells stimulate the production of MKs through an expansion of the hematopoietic progenitor compartment.

V^+P^- stromal cells provide lesser support to the more committed cells

To investigate the role of the stromal layers in the later steps of MK differentiation/maturation, we performed cocultures using sorted MK

progenitors. Two populations representing different levels of commitment to the MK lineage were evaluated.^{24,25} The $Lin^-CD16/32^-Sca-1^-c-kit^+CD9^{bright}CD150^+$ cell population represents a population of unipotent MK precursors, and the $Lin^-CD16/32^-Sca-1^-c-kit^+CD9^{dim}CD150^+$ cell population contains MK erythroid bipotent progenitors (MEPs) (Figure 6A). Cocultures were established in serum-free medium in the presence of low cytokine levels, as for HSC-initiated cocultures (Figure 6B). All stromal layers supported an approximately eightfold proliferation of the plated cells (MEP and MK precursors), while in the absence of stroma, proliferation was less than twofold (Figure 6C). The number of MKs produced from MEPs was not increased in the presence of stromal layers, while in MK precursors, we observed a slight increase in the number of mature MKs produced only in the presence of V^+P^- stromal layers (Figure 6D). Therefore, when cocultures were initiated with MK-committed cells, all stromal layers provided similar support for MK differentiation and maturation.

Murine fetal liver stromal layers support the production of human MKs and MK progenitors

We evaluated whether the stromal cell populations isolated from mouse fetal liver exerted similar effects on human hematopoietic cells. Human HSCs/multipotent progenitors isolated from peripheral blood as $CD34^+CD38^{-/low}CD45RA^-$ cells (supplemental Figure 8) were cultured for up to 14 days in the presence of stromal layers using a low-cytokine-containing medium, as in the mouse studies. Similar to the results obtained with mouse HSC, we observed a strong increase in the total number of cells in the presence of the 3 stromal cell populations compared with no

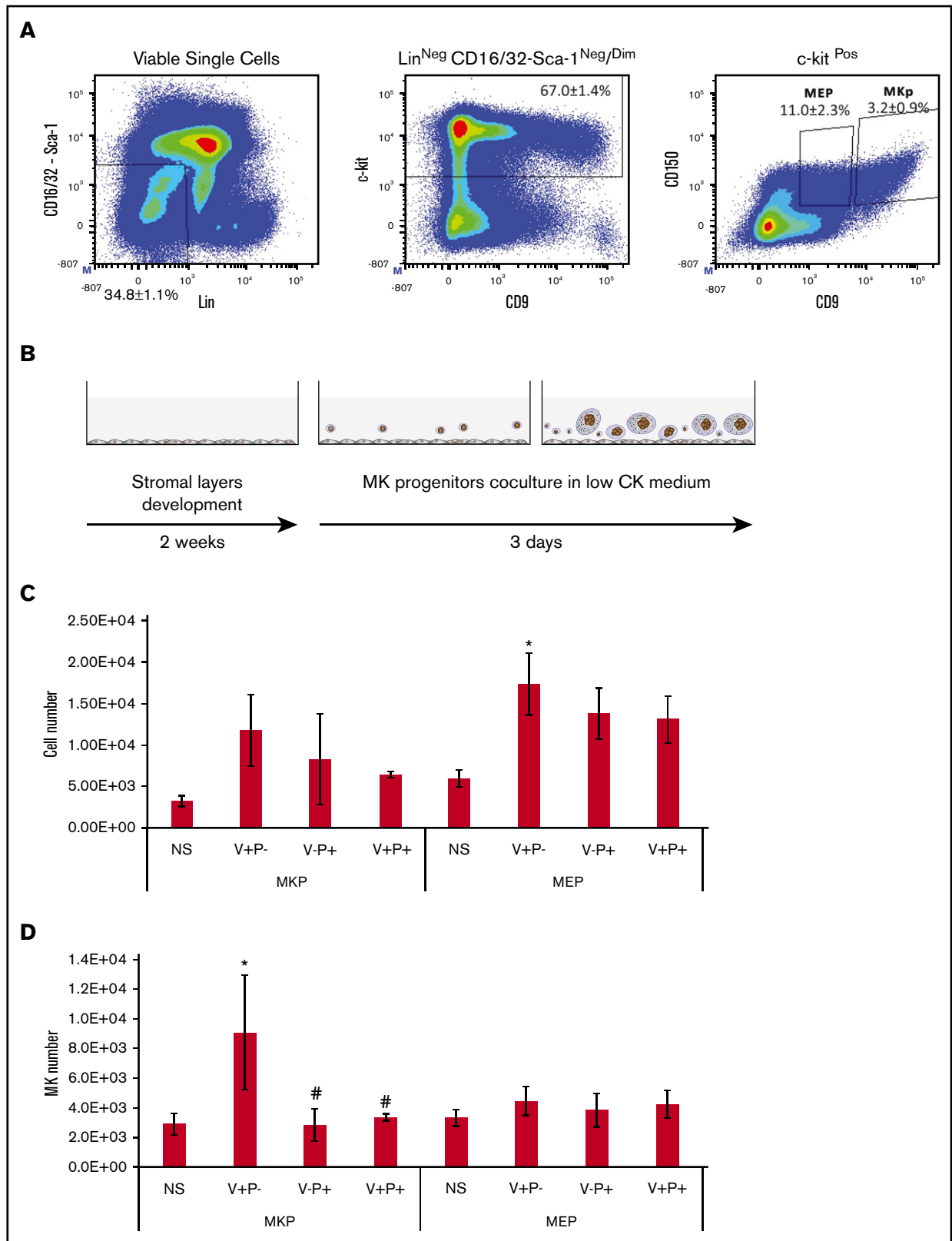


Figure 6. All stromal layers support the proliferation and differentiation of MK-committed progenitors. (A) Gating strategy for the isolation of 2 populations of MK-committed progenitors. Bone marrow Lin-depleted cells were labeled for sorting of a population enriched in MK erythroid bipotent progenitor (MEP) identified as Lin⁻CD16/32⁻Sca-1⁻ckit⁺CD150⁺CD9^{dim} and a population of unipotent MK precursor (MKP) cells identified as Lin⁻CD16/32⁻Sca-1⁻ckit⁺CD150⁺CD9^{bright}. Dot plots are representative figures with the mean \pm SEM from 5 independent experiments. (B) MEP or MK precursors were plated in low-cytokine medium onto stromal layers and cultured

stroma, which appeared to be faster in V^+P^- cocultures (Figure 7A). Phenotypic analysis of the cells produced also revealed a strong expansion of MKs (Figure 7B) identified as $CD41^+CD42c^+$ cells (supplemental Figure 9) in the V^+P^- coculture compared with other stromal cells. Furthermore, as observed in mouse cocultures, this appeared to be due to an increase in the production of MK-committed progenitors identified as $CD41^+CD34^{dim}$ cells (Figure 7C).

Discussion

The present report provides new data on the cellular microenvironment in the developing mouse fetal liver during the critical period of MK differentiation. The major outcome is the delineation of a sorting strategy to obtain a new stromal cell population harboring a hepatocyte progenitor phenotype contributing a favorable microenvironment for MK progenitor expansion.

Recent studies aiming to identify the cellular components of the niche in the bone marrow have revealed its phenotypic and functional heterogeneity.^{26,27} In comparison, less is known about the niche in the developing liver. It has been suggested that the fetal liver hematopoietic microenvironment consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition.²⁸ Our sorting strategy allowed discrimination between epithelial and mesenchymal components of the fetal liver stroma, where the V^+P^- population presents a phenotype compatible with an epithelial/hepatic identity.^{14,15} The presence of such a population in the fetal liver at E13.5 is consistent with the literature reporting the time of emergence of the first hepatic progenitors.^{18,29-32} This hypothesis is further supported by the large increase in V^+P^- cells at E16.5, a stage at which the hepatic program is well underway.^{16,17} By comparison V^+P^- cells are absent or rarely observed in the rest of the embryo at the same developmental stage or in the liver from newborn and adult mice. It would be relevant to test whether a population of this phenotype can increase in a regenerating liver or an ectopic site of megakaryopoiesis.

Although V^+P^- stromal layers did not support HSC maintenance, they favored the expansion of MK progenitors. In the literature, there is an apparent contradiction pertaining to the role of stromal cells in the regulation of megakaryopoiesis,³⁻⁹ which most likely reflects the complexity of this process. Transition from an HSC to a mature MK involves a number of steps that likely require different elements of the microenvironment, and it is possible that discrepancies in previous studies could reside in the type of stromal cells that have been used. Our sorting strategy allowed us to discriminate stromal cells and delineate a population with a clear positive effect on megakaryopoiesis. Clonogenic assays provided evidence for a role of V^+P^- cells in the early stages rather than on more committed MK progenitors. On the other hand, 2 other populations (V^+P^+ and V^-P^+) did not stimulate the production of CFUs. This observation suggests that the mesenchymal stromal layers may repress or delay the production of the highly proliferative progenitors identified by the CFU assay.

Another possible cause for discrepancies in previous coculture studies could be the use of different types of hematopoietic progenitors. Here, we observed that the V^+P^- stromal cells, which supported massive expansion of MK progenitors from mouse HSCs, only minimally increased the number of MK produced from more committed progenitors. Therefore, it is possible that previous reports of a negative role of mesenchymal cells in megakaryopoiesis could stem from the type or degree of commitment of the hematopoietic cells used in the cocultures. For example, human $CD34^+$ cells comprise a large proportion of committed progenitors that could mask the effect of the stroma on a more primitive population.^{5,6} Using a $CD34^+CD38^{low}CD45RA^-$ population corresponding to less committed cells, we observed a very similar capacity of V^+P^- stromal layer to support MK expansion, illustrating the importance of progenitor selection for correct interpretation.

Other factors to consider are the type, timing, and concentration of cytokines added to the media. We chose to use suboptimal concentrations of cytokines and growth factors, including TPO, the essential factor for MK commitment and differentiation. This allowed us to reveal the potential effect provided by stromal cells, an effect that could have been masked by cocktails of cytokines already optimized to favor proliferation or MK differentiation.

Considering the hepatic identity of V^+P^- cells, a mode of action via the secretion of TPO could have been anticipated. However, TPO transcripts were detected in the 3 types of stromal layers. Furthermore, the addition of condition media and Transwell assays indicated that the main factor stimulating MK production was cell-cell contact and not secreted factors. The observation of some colonies of adherent MK also favors contact-dependent mechanisms and additionally raises the possibility of distinct properties of this particular population of MKs. Whether the contact is mediated by cell-surface receptors, membrane-bound growth factors, or secreted components of an extracellular matrix remains to be clarified. Notch signaling has been implicated in the commitment toward the MK lineage.²² We investigated whether differential expression of Notch ligands by stromal cells could shed light on the specific effect of the V^+P^- stromal cell population. *Jag2* was only detected in stromal layers derived from the V^+P^- stromal population and could therefore mediate the action of the stromal population.

VCAM-1 has been used in the sorting scheme to discriminate between different stromal cells. Previous work suggested that this marker could also have functions in the fetal liver microenvironment. A role of VCAM-1 in the HSC niche has long been suspected, and studies have demonstrated that the expression of VCAM-1 by bone marrow stromal cells mediates the adhesion and expansion of early hematopoietic progenitors.^{33,34} However, later studies showed that adherence of hematopoietic progenitors to fetal liver-derived stromal cells lines was not mediated by VCAM-1, contrary to cell lines derived from the bone marrow.³⁵ This is in agreement with our observation that VCAM-1-negative cells (V^-P^+) provided better

Figure 6. (continued) for 3 days. (C) The bar graph represents the total number of cells produced. Values represent mean \pm SD from 10 independent experiments. * $P < .01$ vs the nonstroma group. Other comparisons were not statistically significant. (D) The bar graph represents the total number of mature MKs. Values represent mean \pm SD produced from 10 independent experiments. * $P < .05$ vs the nonstroma group; # $P < .05$ vs stroma V^+P^- . Other comparisons were not statistically significant. CK, cytokine; NS, no stroma.

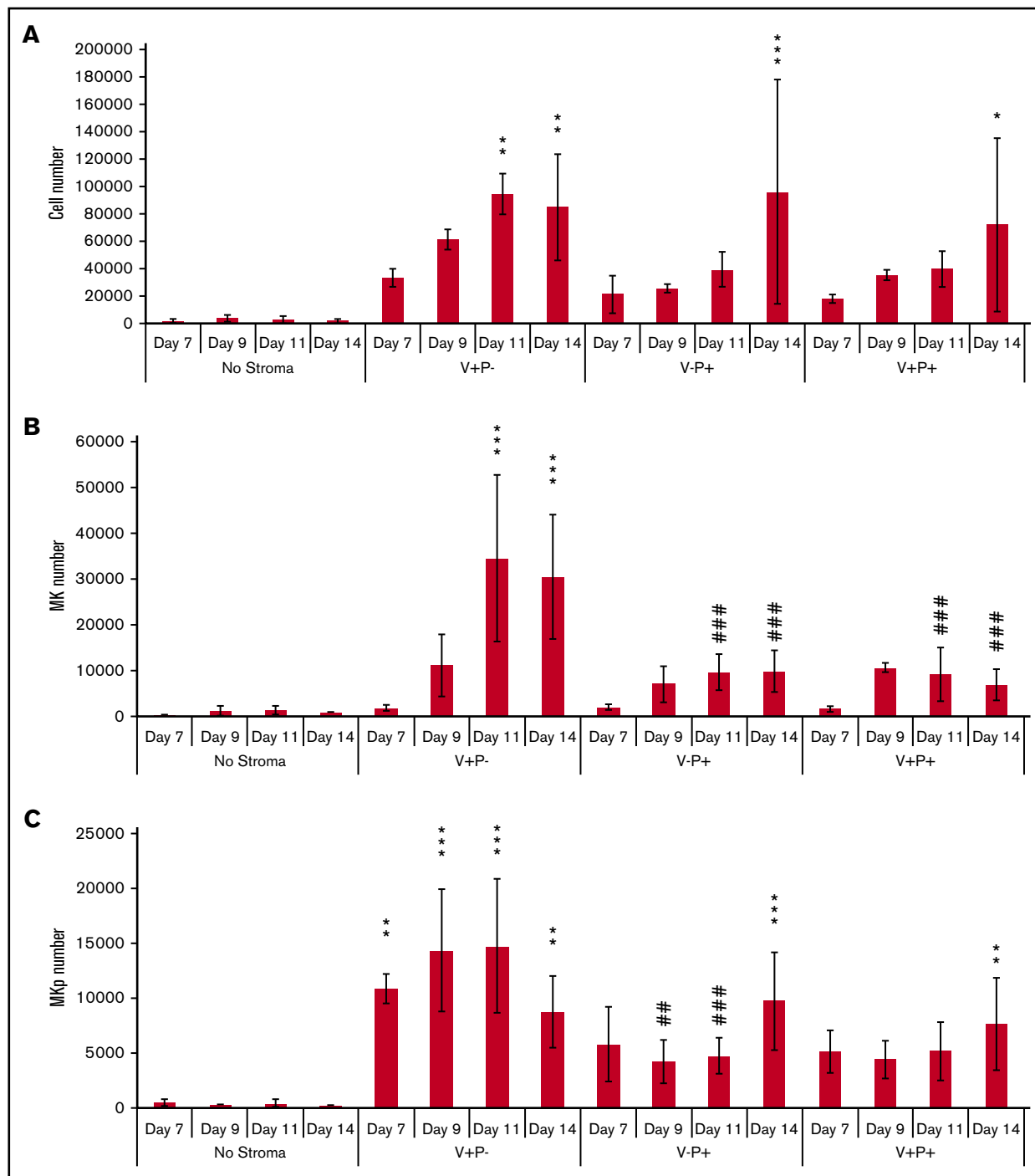


Figure 7. Mouse fetal liver V⁺P⁻ stromal cells support the expansion of CD41⁺CD42⁺ MKs from human HSCs. Human HSCs (500 CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻) were cocultured with sorted stromal cells for 7, 9, 11, and 14 days and assayed for MK production. MKs were identified as CD41⁺CD42c⁺ cells, and MK progenitors were identified as CD34⁺CD41^{dim} cells. (A) Total number of cells produced from 500 HSCs in the absence of stroma or with the different stroma. Values represent mean \pm SD from 4 independent experiments. (B) Total number of MKs, identified as cells expressing CD41 and CD42c, produced from 500 HSCs. Values represent mean \pm SD from 4 independent experiments. (C) Total number of MK progenitors, identified as CD34⁺CD41^{dim} cells, produced from 500 HSCs. **P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .001 vs no stroma; ##*P* < .01 and ###*P* < .001 vs V⁺P⁻. Other comparisons were not statistically significant. MKp, MK progenitor.

support for the maintenance of long-term repopulating cells than the V⁺P⁺ cells. However, the role of VCAM-1 expression in the V⁺P⁻ fetal liver population remains to be investigated.

Considering the recent studies suggesting a role for MKs as a HSC niche,³⁶⁻⁴⁰ it is tempting to postulate that MKs generated upon the influence of hepatic progenitors could in turn contribute to the

expansion of the HSC pool that occurs in the fetal liver through factors such as PF4/CXCL4 that control HSC quiescence.³⁹ MKs could represent a feedback loop mechanism that maintains stemness and quiescence in the highly proliferative context of the fetal liver. The existence of this amplification loop in the fetal liver remains to be demonstrated. We observed that the MKs produced from mouse bone marrow progenitors exhibited all the expected features (cell-surface receptor expression, polyploidy, capacity to produce proplatelets in vitro), but it cannot be excluded that MKs produced in the fetal liver have different properties. This would also be relevant in the light of studies demonstrating different waves of MK production in the developing liver.¹³

In conclusion, this study provides direct demonstration that one distinct cellular component of the fetal liver supports expansion of MKs. The strong support of murine megakaryopoiesis shown in this study could also have applications in the culture of human progenitors to improve the yield of platelets produced in vitro. Our observation that the unique effects of the V⁺P⁻ stromal cell

population also applies to human HSCs could open doors to such applications.

Authorship

Contribution: N.B., C.J., N.M., C.A., P.G., and S.E. performed experiments; T.I. and D.S. performed Dlk1 phenotypic analysis; N.B. designed the study, analyzed results, and made the figures; N.B. and F.L. wrote the paper; and C.S., P.J.S., C.G., and F.L. helped design the study and contributed to writing.

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

ORCID profiles: N.B., 0000-0003-0727-9377; C.G., 0000-0003-1303-4210.

Correspondence: Nathalie Brouard, UMR_S949, INSERM, Etablissement Français du Sang-Alsace, 10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France; e-mail: nathalie.brouard@efs.sante.fr.

References

1. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
2. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980;56(2):289-301.
3. Delehanty LL, Mogass M, Gonias SL, Racke FK, Johnstone B, Goldfarb AN. Stromal inhibition of megakaryocytic differentiation is associated with blockade of sustained Rap1 activation. *Blood*. 2003;101(5):1744-1751.
4. Goldfarb AN, Delehanty LL, Wang D, Racke FK, Hussaini IM. Stromal inhibition of megakaryocytic differentiation correlates with blockade of signaling by protein kinase C-epsilon and ERK/MAPK. *J Biol Chem*. 2001;276(31):29526-29530.
5. Zweegman S, Veenhof MA, Debili N, Schuurhuis GJ, Huijgens PC, Dräger AM. Megakaryocytic differentiation of human progenitor cells is negatively influenced by direct contact with stroma. *Leukemia*. 1999;13(6):935-943.
6. Zweegman S, Veenhof MA, Huijgens PC, Schuurhuis GJ, Dräger AM. Regulation of megakaryocytopoiesis in an in vitro stroma model: preferential adhesion of megakaryocytic progenitors and subsequent inhibition of maturation. *Exp Hematol*. 2000;28(4):401-410.
7. Strassel C, Brouard N, Mallo L, et al. Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood*. 2016;127(18):2231-2240.
8. Gao L, Chen XH, Feng YM, et al. Human umbilical cord blood-derived stromal cells: multifaceted regulators of megakaryocytopoiesis. *Cell Cycle*. 2010;9(7):1342-1353.
9. Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2000;184(1):58-69.
10. Vitrat N, Cohen-Solal K, Norol F, et al. Compared effects of Mpl ligand and other cytokines on human MK differentiation. *Stem Cells*. 1998;16(suppl 2):37-51.
11. Nagahisa H, Nagata Y, Ohnuki T, et al. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. *Blood*. 1996;87(4):1309-1316.
12. Tober J, McGrath KE, Palis J. Primitive erythropoiesis and megakaryopoiesis in the yolk sac are independent of c-myc. *Blood*. 2008;111(5):2636-2639.
13. Tober J, Koniski A, McGrath KE, et al. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*. 2007;109(4):1433-1441.
14. Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol*. 2002;156(1):173-184.
15. Tanimizu N, Saito H, Mostov K, Miyajima A. Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk+ hepatoblasts. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 26):6425-6434.
16. Houssaint E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ*. 1980;9(5):269-279.
17. Hata S, Nishina M, Nishina H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ*. 2007;49(2):163-170.
18. Boulter L, Lu WY, Forbes SJ. Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *J Clin Invest*. 2013;123(5):1867-1873.
19. Strassel C, Eckly A, Léon C, et al. Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp Cell Res*. 2012;318(1):25-32.
20. Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, et al. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4929-4939.

21. Weiss-Gayet M, Starck J, Chaabouni A, Chazaud B, Morlé F. Notch stimulates both self-renewal and lineage plasticity in a subset of murine CD9High committed megakaryocytic progenitors. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153860.
22. Mercher T, Cornejo MG, Sears C, et al. Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):314-326.
23. Perrault C, Moog S, Rubinstein E, et al. A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb/IIIa modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost*. 2001;86(5):1238-1248.
24. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, Di Rago L, Hyland CD, Alexander WS. Characterization of thrombopoietin (TPO)-responsive progenitor cells in adult mouse bone marrow with in vivo megakaryocyte and erythroid potential. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(7):2364-2369.
25. Nakorn TN, Miyamoto T, Weissman IL. Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(1):205-210.
26. Birbrair A, Frenette PS. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1370(1):82-96.
27. Nakamura-Ishizu A, Suda T. Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(2):2404-2409.
28. Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*. 2003;101(8):2973-2982.
29. Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, et al. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology*. 2000;32(6):1230-1239.
30. Taniguchi H, Kondo R, Suzuki A, et al. Clonogenic colony-forming ability of flow cytometrically isolated hepatic progenitor cells in the murine fetal liver. *Cell Transplant*. 2000;9(5):697-700.
31. Crawford LW, Foley JF, Elmore SA. Histology atlas of the developing mouse hepatobiliary system with emphasis on embryonic days 9.5-18.5. *Toxicol Pathol*. 2010;38(6):872-906.
32. Zorn AM. Liver Development. Cambridge, MA: StemBook; 2008.
33. Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1992;80(2):388-395.
34. Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood*. 1995;85(4):997-1005.
35. Koenig JM, Ballantyne CM, Kumar AG, Smith CW, Yoder MC. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and hematopoietic supportive capacity of immortalized murine stromal cell lines derived from fetal liver and adult bone marrow. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2002;38(9):538-543.
36. Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T. CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med*. 2015;212(12):2133-2146.
37. Zhao M, Perry JM, Marshall H, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2014;20(11):1321-1326.
38. Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Fujioka M, Suda T. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454(2):353-357.
39. Bruns I, Lucas D, Pinho S, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*. 2014;20(11):1315-1320.
40. Olson TS, Caselli A, Otsuru S, et al. Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood*. 2013;121(26):5238-5249.

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Animals

C57BL/6 (CD45.2⁺); B6.SJL-Ptprca Pep3b/BoyJ (herein referred to as PTPRC; CD45.1⁺) mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) and bred in our animal barrier facility. Transplant recipient were F1 double congenic CD45.1⁺/CD45.2⁺ obtained from breeding female C57BL/6 with male PTPRC or from breeding female PTPRC with male C57BL/6. Animals were caged under standard conditions and fed a laboratory diet and acidified water ad libitum. Animals were housed and handled according to the Animal Welfare Act. In order to obtain fetal tissues, timed breeding was established. The day on which the vaginal plug was found was designated as day 0.5 of gestation. Fetuses were collected at day 13.5 of gestation (E13.5) unless otherwise indicated. All procedures were reviewed and approved by the University of Texas-Houston Medical School Animal Welfare Committee.

Alternatively wild type C57BL/6J mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Pregnant female from timed breeding protocol were purchased from Charles River Laboratories. The day on which the vaginal plug was found was designated as day 0.5 of gestation. Animals were used in accordance with the European laws and the EFS Review Board regarding animal care.

CFU-F assay

For CFU-F assay, the bone marrow or fetal liver cell suspension were plated in medium comprising alpha-MEM supplemented with 20% of a lot-selected fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT, USA), 5 mM sodium pyruvate, 1% L-Glutamine 2 mM, 1% penicillin-streptomycin (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) (α -MEM 20%FCS). All cultures were maintained in 5% CO₂, 5% O₂, humidified air at 37°C for 14 days after which, colonies were fixed and stained in 2% formalin supplemented with 0.01% toluidine blue. Colonies larger than 1 mm diameter were scored. The CFU-F frequencies in candidate populations were measured using Limit Dilution Assay (LDA). Cells were plated in 96 well plates, in α -MEM 20%FCS at a cell dose ranged from 3 to 5000 cells per well depending on the cell population tested. All cultures were maintained in 5% CO₂, 5% O₂, humidified air at 37°C for 14 days after which, colonies were

fixed and stained in 2% formalin supplemented with 0.01% toluidine blue and negative wells were scored. Frequencies were calculated using L-Calc software (STEMCELL Technologies).

Isolation of mouse HSC and MK progenitor cells

The femur, tibia and iliac crest were collected from 6-10 weeks old mice. Bone marrow cells were flushed with 1ml syringe from the bone using PBS-2%NBS and filtered through a 70 μ m cell strainer.

For HSC isolation, the lineage committed cells were labeled with biotinylated antibodies directed to CD3, CD4, CD8, CD5, B220, Gr-1, CD11b, Ter119 and CD41 and depleted using sheep anti-rat antibodies Dynabeads®. The resulting lineage depleted cells (Lin^-) cells were labeled with APC-Cy7 conjugated streptavidin, APC-conjugated anti-CD116, FITC-conjugated anti Sca-1, PE-conjugated anti CD48, PE-Cy7-conjugated anti CD150 antibodies and HSC cells were isolated as $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+ \text{CD48}^- \text{CD150}^+$ cells (SLAM) by sorting on a BD Aria I or BD Aria II flow cytometer.

For MK progenitor isolation, the lineage committed cells were labeled with biotinylated antibodies directed to CD3, CD4, CD8, CD5, B220, Gr-1, CD11b, Ter119 and CD127 and depleted using sheep anti-rat antibodies Dynabeads®. The resulting lineage depleted cells (Lin^-) cells were labeled with APC-Cy7 conjugated streptavidin, APC-conjugated anti-CD116, PE-conjugated anti Sca-1, PE-conjugated anti CD16/32, PE-Cy7-conjugated anti CD150, FITC-conjugated anti-CD9 antibodies. As shown in Figure 6A, two populations containing hematopoietic progenitors committed to MK lineage were isolated using phenotypes previously described ^{1,2}. The population $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{CD16/32}^- \text{c-kit}^+ \text{CD9}^+ \text{CD150}^+$ cells contains MK precursors (MKP), and the $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{CD16/32}^- \text{c-kit}^+ \text{CD9}^{\text{dim}} \text{CD150}^+$ cells population contains megakaryocyte erythroid progenitor (MEP). A detailed list of antibodies used is provided in Table S1.

Transplantation

For transplant, F1 crossbreeds from C57Bl/6 x PTPRC mice ($\text{CD45.1}^+/\text{CD45.2}^+$) mice were used as recipients. F1 mice were lethally irradiated using split dose of 1200 cGy in a gamma cell 40 irradiator (Best Theratronics, Ottawa, Ontario, Canada). 200 or 20 freshly isolated HSC (CD45.1^+) or the product of their co-cultures onto stromal layers were injected intravenously (IV) via retro-orbital sinus together with $3 \cdot 10^5$ congenic CD45.2^+ BM cells into each lethally

irradiated recipient (4 mice per group). Mice were assessed for CD45.1⁺ donor cell and contribution to lymphoid (B220, CD3e) and myeloid (CD11b, Gr-1) lineages in peripheral blood (PB) at 6, 12 and 18 weeks post-transplant, and at week 18 post-transplant in the BM (Figure S6A-B). For secondary transplants from experiments with 200 SLAM cells, 1.10⁶ total unfractionated mononuclear BM cells from primary recipient mice were injected I.V. into lethally irradiated F1 recipient mice. For secondary transplants from experiments with 20 SLAM cells, unfractionated mononuclear BM cells were isolated from primary recipient mice 18 weeks after the primary transplant and injected I.V. (1.10⁶ total BM plus 1/3 of the CD45-1⁺ sorted cells from primary recipient mice) into lethally irradiated F1 recipient mice (4 mice per group). Mice were assessed for CD45.1⁺ donor cell and contribution to lymphoid and myeloid lineages in PB at 6, 12 and 18 weeks post-transplant, and at week 18 post-transplant in BM.

Proplatelet formation Assay

Non-adherent cells were harvested at day 9 to 11 and re-suspended in DMEM containing 10% FCS, 50 ng/ml rmTPO (R&D systems) and 100 U/ml of hirudin (Transgène, Strasbourg, France) (Proplatelet medium) as previously described³. Evaluation of the frequency of MK capable of producing proplatelets in the cell population produced at the end of the co-culture, was analyzed by standard limiting-dilution assay techniques. Non-adherent cells from Day 9 co-cultures were plated in 96 well plates in proplatelet medium at a cell dose ranging from 3 to 60 000 cell per well depending on the cell population tested. The cultures were maintained at 37°C in a 5% CO₂, fully humidified atmosphere, for 3 days after which wells negative for the presence of proplatelet bearing MK were scored and frequencies were calculated using L-Calc software (STEMCELL Technology).

Clonogenic assays

Non-adherent cells were harvested and plated in MethoCult® M3434 in presence of rmSCF, rmIL-3, rhIL-6, rhEpo (STEMCELL Technologies) according to manufacturer instructions. Total number of colonies were scored after 14 days of incubation at 37°C, in 5% CO₂, humidified atmosphere. Assay for erythroid progenitors were performed using MethoCult® M3334 in presence of 4U/ml of huEpo (STEMCELL Technologies) according to manufacturer instructions. CFU-E were scored after 3-4 days of incubation at 37°C in a 5% CO₂, fully

humidified atmosphere. Assay for megakaryocytic progenitors were performed using MegaCult™-C (STEMCELL Technologies) supplemented with TPO (50 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), SCF (7.5 ng/mL) according to manufacturer instructions. CFU-MK were identified using acetylcholinesterase activity.

Preparation of conditioned medium

Following sorting the stromal cells were plated in T25 or T75 in their respective media and grown to confluence. Stromal layers were washed with warm PBS and incubated for 24 h with the minimal volume of co-culture medium necessary to cover the stromal layers. The supernatant (conditioned media, CM) was then harvested, filtered through 0.22 µm filter and frozen at -80°C. This harvesting procedure was repeated for up to 5 days.

Isolation of human hematopoietic progenitors and co culture with mouse fetal liver-derived stromal cells.

MNC were recovered from leukodepletion filters obtained from the Etablissement Français du Sang-ALCA. Human hematopoietic early progenitor were sorted from human hematopoietic progenitor enriched population using RosetteSep™ Human Hematopoietic Progenitor Enrichment Kit#15066 (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) in a modified protocol. Briefly, MNC were incubated 20min at RT with the cell enrichment cocktail, then diluted with volume/volume of Dextran 2% (Sigma-Aldrich) and after sedimentation human hematopoietic progenitors were isolated by a Ficoll density gradient (STEMCELL Technologies). Human hematopoietic progenitor were labeled FITC-conjugated CD45RA, PE-conjugated CD45, PeCy7-conjugated CD34 and APC-conjugated CD38 antibodies and early hematopoietic progenitors (HSC-enriched) were isolated as CD45⁺CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻ cells (Figure S8). A detailed list of antibodies used is provided in Table S1.

The sorted HSC-enriched cells were cultured in 24 well plates in StemSpan SFEM™ (STEMCELL Technologies) supplemented with 10 ng/ml hSCF, 10 ng/ml hFlt3L (R&D systems) and 10 ng/ml hTPO (STEMCELL Technologies). This cytokine concentration were previously determined to be suboptimum for stimulating the proliferation of CD34⁺CD38⁻ cells in the absence of stromal cells (data not shown). Cultures were maintained in 5% CO₂, humidified air at 37°C for 7 to 14 days as indicated.

For simultaneous analysis of the phenotype and ploidy Hoechst 33342 (BD Biosciences, San Jose, CA) was added to the co-culture medium at a final concentration of 1 µg/ml and the culture were maintained at 37°C for 2h. Then, non-adherent cells were harvested, washed and labeled with anti-mVCAM1-PE-Cy7, Alexa 488-conjugated anti-huCD41 (ALMA.17), APC-conjugated anti-CD42c-APC (RAM.1) {Perrault, 2001 #14028}, PE-conjugated anti-huCD34, PE-CF594-conjugated anti-hu-CD45

Cells were washed twice and re-suspended in PBS-2% NBS supplemented with 2.5 µg/ml of 7AAD (Sigma) for dead cell exclusion. MK were identified as cellular events expressing both CD41 and CD42c antigens, amongst the viable hematopoietic cells as presented in Figure S9. As we observed for mice cells, large cellular events permeable to 7AAD are observed only in cultures where large size cells (MK) are visible and are not detected in cultures where no identifiable MK are present therefore these large events correspond to mature MK and were included in the analysis.

RT-PCR

Sorted cells were lysed and homogenized following the QIAshredder procedure, and total RNA was isolated by using RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). RT-PCR were performed from 100ng of RNA using Qiagen OneStep RT-PCR according to manufacturer instructions. The list of primers used is in supplementary Table S2.

Immunofluorescence staining of mouse fetal liver sections

Freshly dissected mouse embryos were embedded in OCT. For immunostaining, 5-8 µm cryosections were prepared on a Microm HM525 cryostat (Microm, Walldorf, Germany). Sections were dried overnight, rehydrated in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde and washed in PBS-0.05% tween-10 (PBS-T), and incubated in blocking buffer (5% BSA, 5% skim milk powder, 0.05% Triton-X100, in 4x SSC) supplemented with 2% normal donkey serum for 30-45 minutes. Sections were then incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with purified primary antibodies (listed in Table S1) diluted in blocking buffer, then washed in PBS-T. Sections were then incubated with secondary antibodies overnight at 4°C in a humidified chamber, and washed again in PBS-T. Slides were then incubated with purified rat anti-CD16/32 for 30-45 min at room temperature and then incubated for 2hrs at room temperature with rat anti-mouse conjugated antibodies.

Images were visualized and acquired using a Leica TCS SP5 confocal microscope and processed with the Leica LAS AF software. Z-stacked images were collected in 0.1 μm slices.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism Software version 5.02. Significant differences were determined using 1 way ANOVA using Bonferroni's multiple comparison test for Figure 2B, 3G,4A-B,and S6c-D and 2way ANOVA using Bonferroni posttests for Figures 3B-C,5, 6C-D, 7 and S7.

Supplementary References

1. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, Di Rago L, Hyland CD, Alexander WS. Characterization of thrombopoietin (TPO)-responsive progenitor cells in adult mouse bone marrow with in vivo megakaryocyte and erythroid potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2364-2369.
2. Nakorn TN, Miyamoto T, Weissman IL. Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):205-210.
3. Strassel C, Eckly A, Leon C, et al. Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp Cell Res*. 2012;318(1):25-32.
4. Perrault C, Moog S, Rubinstein E, et al. A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb/IIIa modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost*. 2001;86(5):1238-1248.

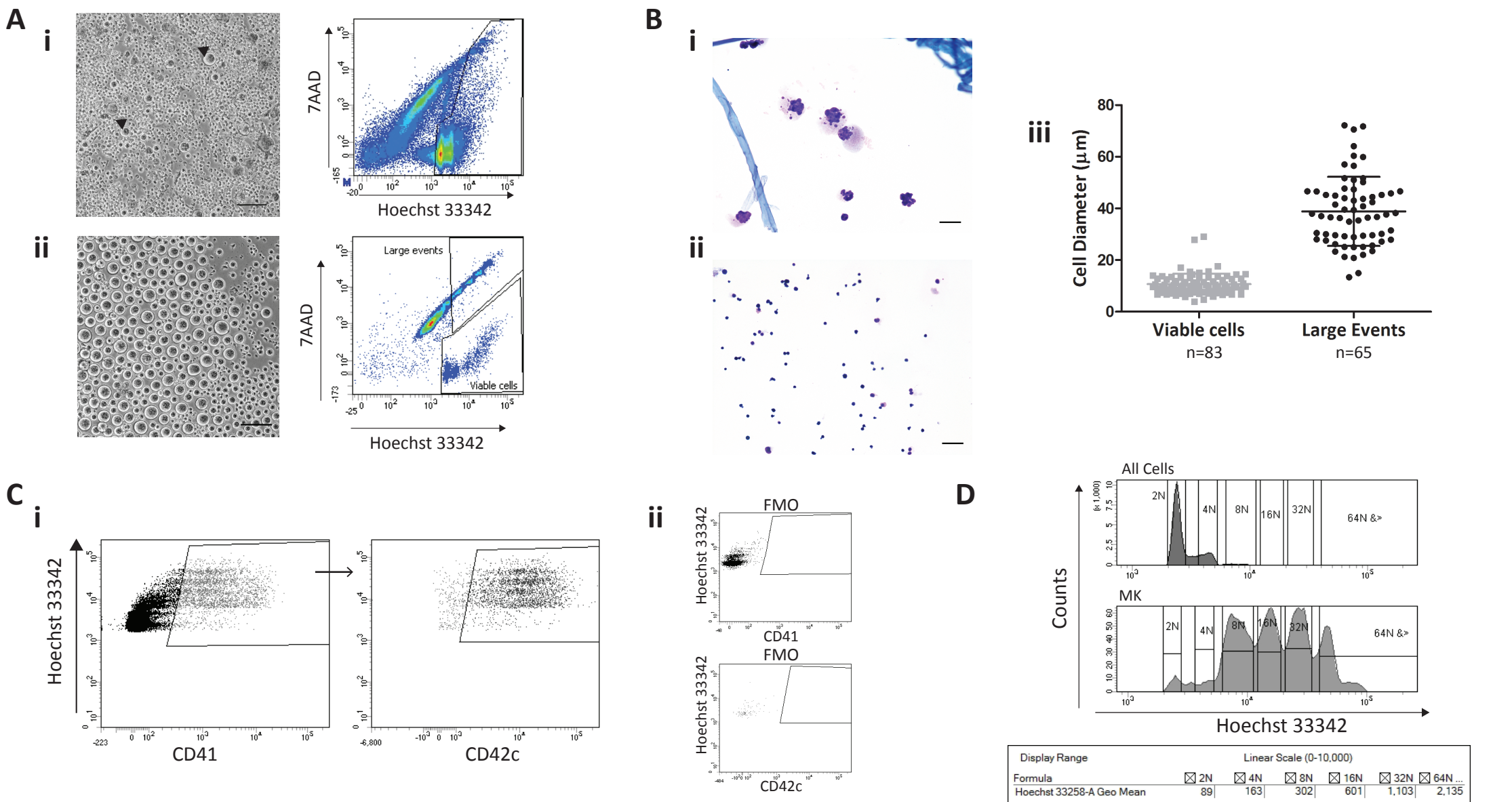


Figure S1: FACS gating strategy for the identification and quantification of MK in the co-culture. The nuclear dye Hoechst 33342 was added to the culture medium and the cultures were maintained at 37°C for 2.5h. The non-adherent cells were harvested, labelled with fluorescent-conjugated antibodies and resuspended in 7ADD supplemented buffer for dead cells exclusion. A) Representative phase contrast image and Dot plot for the Ho33342 vs 7AAD signal are presented for i) a day 9 co-culture of HSC on V+P- stromal layers containing low number of MK and ii) a day 3 culture of MEP containing large number of mature MK. (Scale bar 100µm). The large events positive for Ho33342 and 7AAD and viable cells were sorted. B) A representative image of Giemsa stained cells sorted for the i) large events ii) viable cells gates are presented (Scale bar 50µm) and iii) the diameter of the cells was measured. The large events positive for 7AAD correspond to large megakaryocyte that are permeable to 7AAD after immunostaining, therefore only cells exhibiting 7AAD signal and less than 4N Hoechst intensity signal were excluded as dead cells. C) Representative dot plots for i) selection of MK were identified as cells expressing CD41 and CD42c, ii) corresponding FMO controls. D) Representative histograms for the analysis of the ploidy are presented for all cells or for the MK population. The position of the histogram markers are based on the Hoechst 33342 Geometric mean fluorescence intensity.

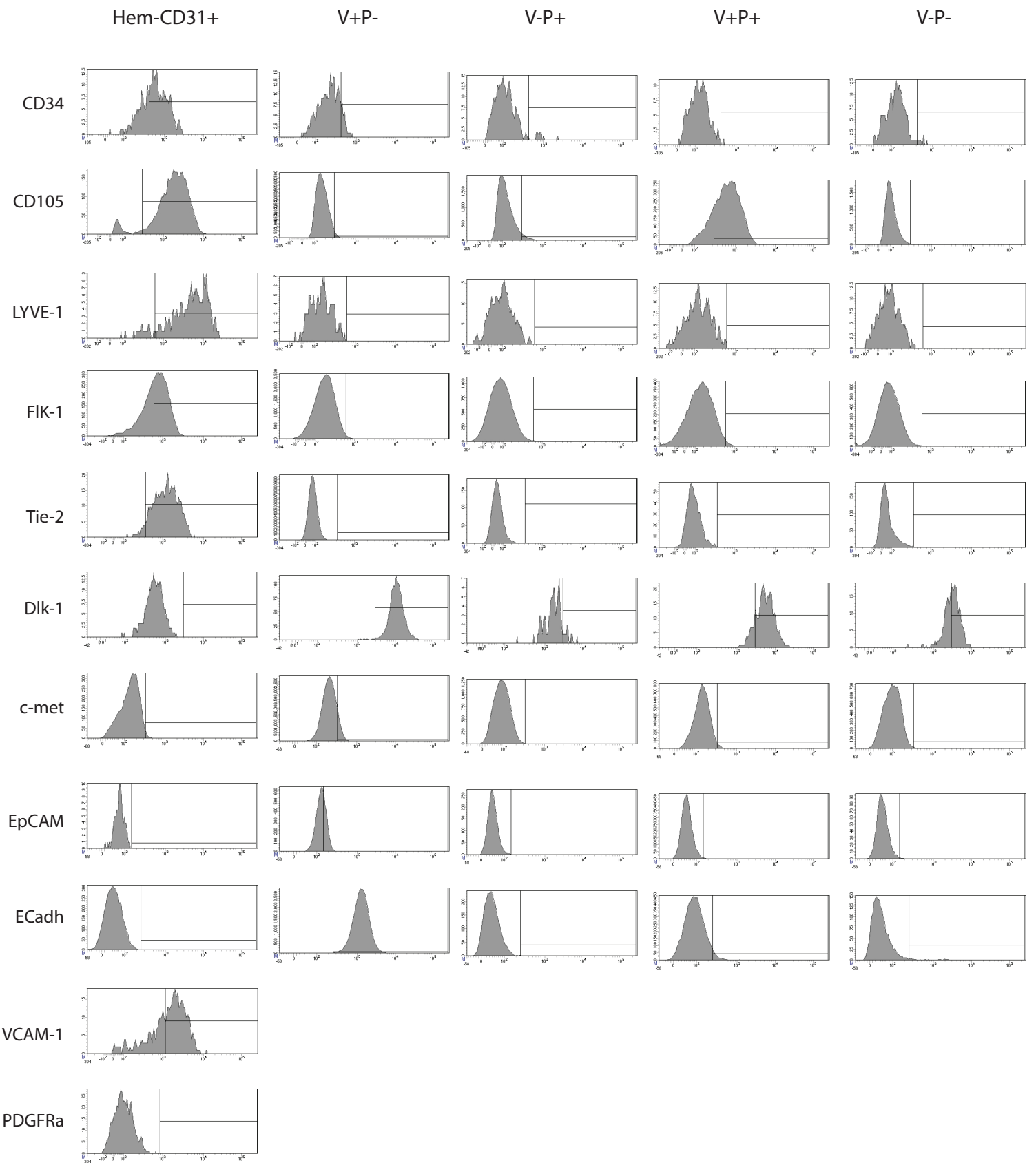


Figure S2: Phenotype of the fetal liver non hematopoietic cells. Fetal liver cell suspensions obtained following enzymatic digestion of dissected E13.5 fetal livers were subjected to FACS analysis. Hem-CD31+, V+P-, V-P+, V+P+ and V-P- population were determined as in figure 1. Representative histograms from 2-5 independent experiments are presented. All histogram markers are based upon FMO controls.

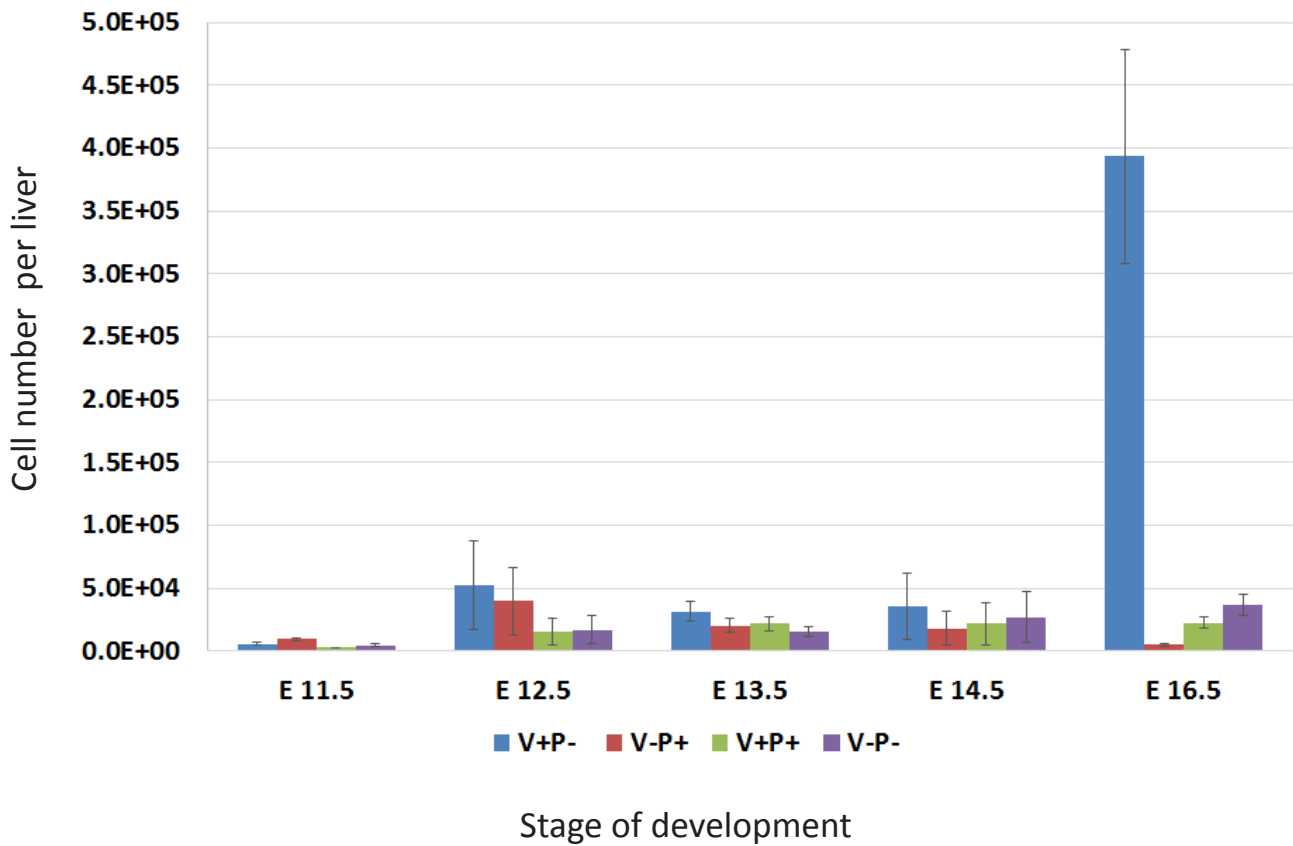


Figure S3: Stromal cell population representation during development. Fetal liver cell suspensions were obtained following enzymatic digestion of dissected E11.5, E12.5, E13.5, E14.5 and E16.5 fetal livers. Cell suspensions were subjected to FACS analysis and the mean \pm SD number of Hem-CD31-CD51+VCAM-1-PDGFRa+ (V-P+), Hem-CD31-CD51+ VCAM-1+PDGFRa+ (V+P+), Hem-CD31-CD51+ VCAM-1+PDGFRa- (V+P-) and Hem-CD31-CD51+ VCAM-1+PDGFRa- (V-P-) cells per liver from 5 independent experiments are represented.

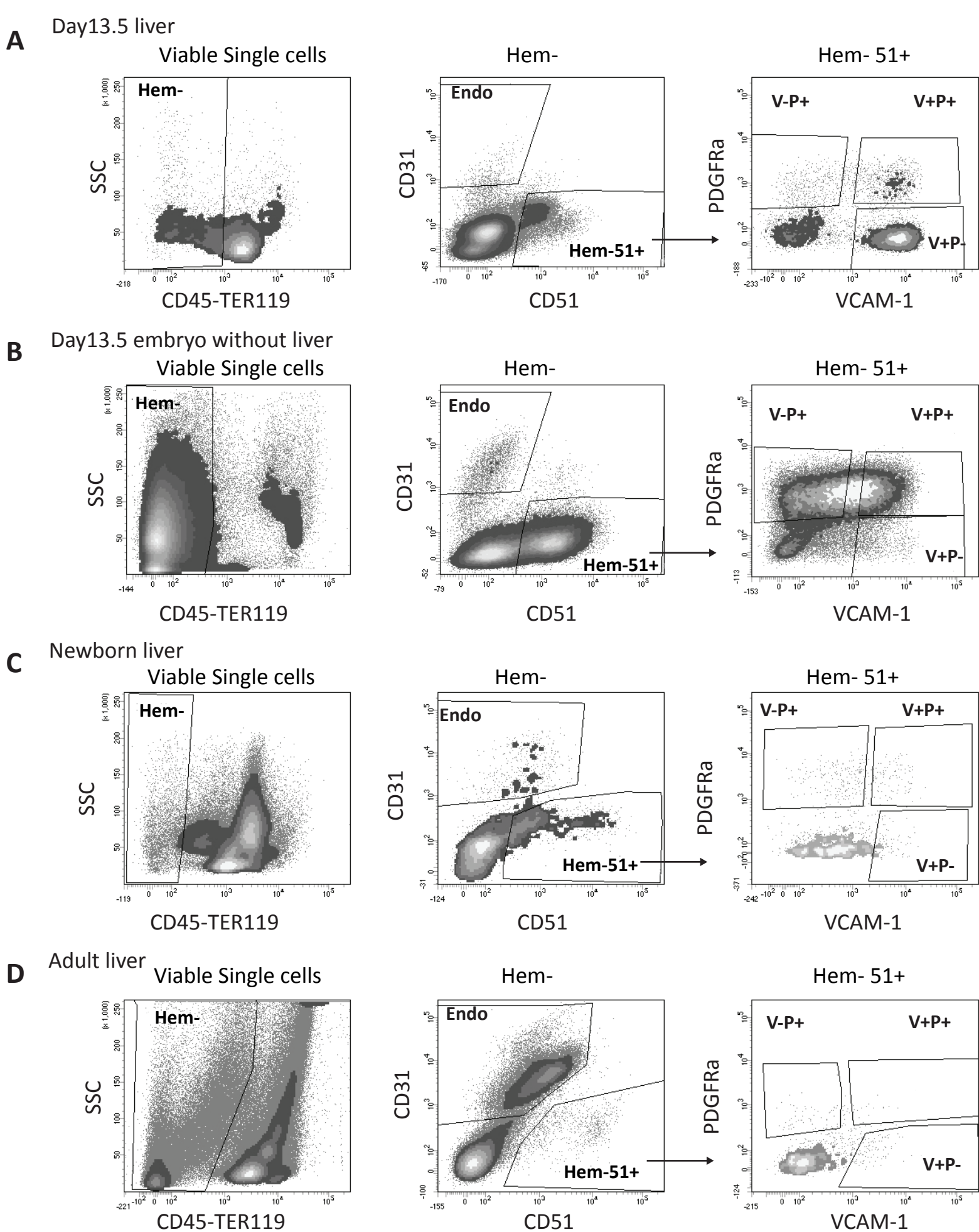


Figure S4: The V+P- population is not detected in the rest of the embryo or the liver of neonate and adult mice. Cell suspensions from A) a liver from E13.5 embryo, B) a liver-less E13.5 embryo, C) a newborn liver and D) an adult liver, were labeled with fluorescent conjugated antibodies. Representative dot plots of the gating strategy used for cell sorting are presented for each tissue. Gates are based upon FMO controls.

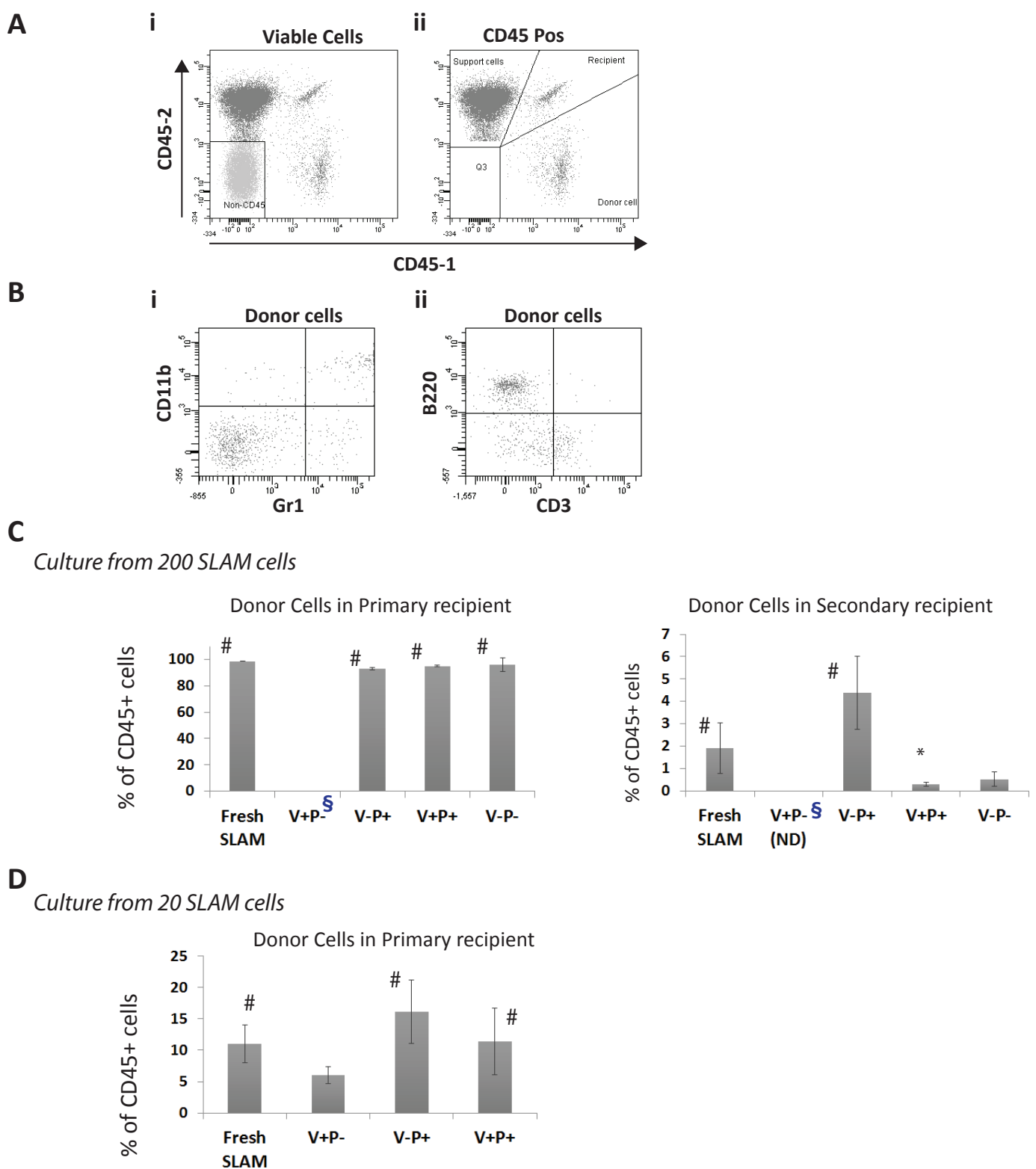
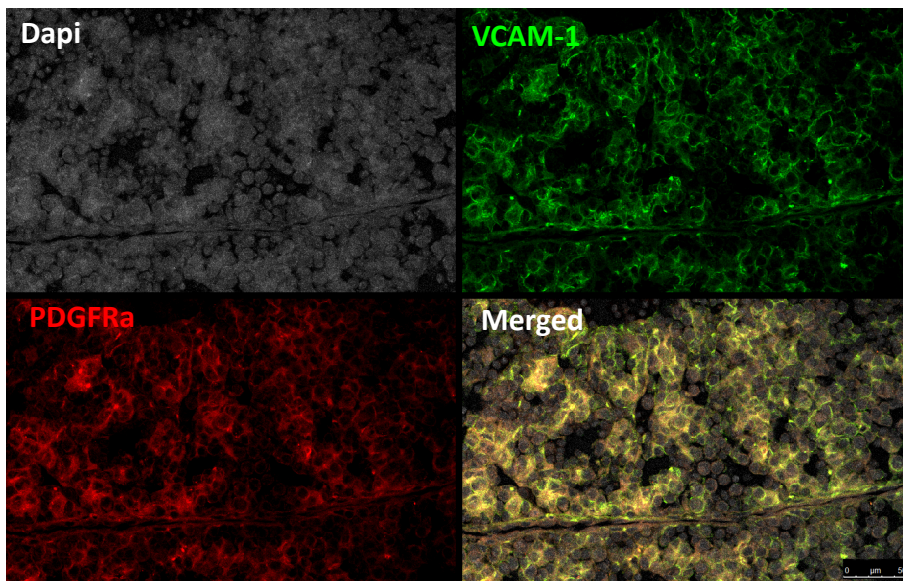
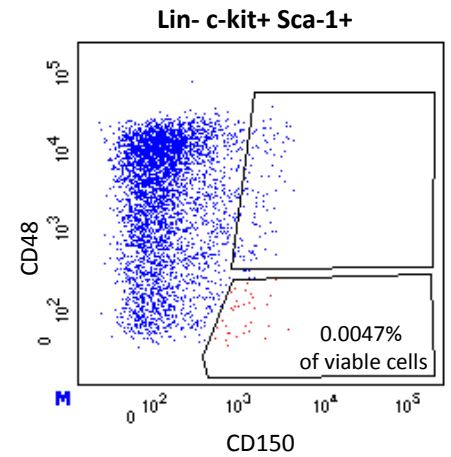


Figure S5: HSC support by E13.5 fetal liver stromal cells. Lin-Sca-1+c-kit+CD48-CD150+ (SLAM) cells were isolated from the bone marrow of CD45.1+ mice and cultured in serum free medium supplemented with 7.5 ng/ml of rmSCF, 5 ng/ml rmFlt3L, 10 ng/ml rmTPO and 1 ng/ml rhIL-6, onto adherent layers derived from different fetal liver subpopulations isolated from CD45.2+ mice. The cells produced in co-cultures were transplanted into F1: CD45.1+/CD45.2+ irradiated mice. A) Representative dot plots of the gating strategy used to analyze the proportion of donor cells and their lineage profile are presented. i) non-CD45 expressing cells are excluded, ii) the proportion of Donor (CD45-1+CD45-2-), Support (CD45-1-CD45-2+), and Recipient (CD45-1+CD45-2+) cells is determined. B) The lineages amongst Donor cells are determined using i) Gr-1 or CD11b expression to identify the myeloid compartment and ii) B220 and CD3 expression to identify B lymphoid and T lymphoid compartments. C) Bar graphs of the percentages of donor (CD45.1+) cells in the bone marrow of primary and secondary recipient mice that received cells produced from co-culture initiated with 200 SLAM cells. (Mean±SD from 2 independent experiments). **S**: V+P- cells were grown in a-MEM 20%FCS D) Bar graphs of the percentages of donor (CD45.1+) cells in the bone marrow of primary recipient mice that received cells produced from co-culture initiated with 20 SLAM cells. (Mean±SD from 2 independent experiments). # indicates groups for which all recipient animals displayed multi-lineage engraftment and * indicates groups for which some recipient animals displayed multi-lineage engraftment. (ND): Not Done.

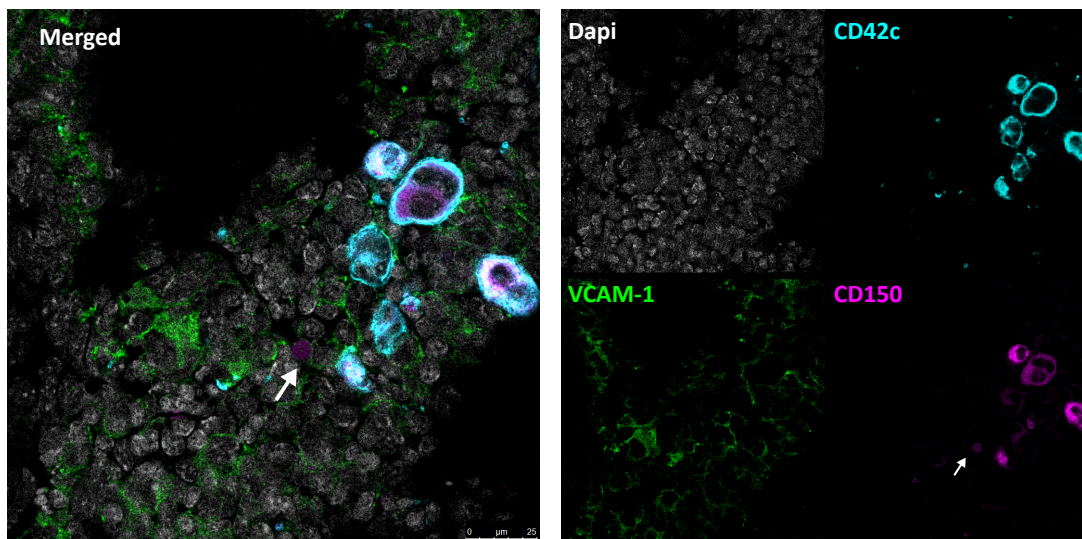
A



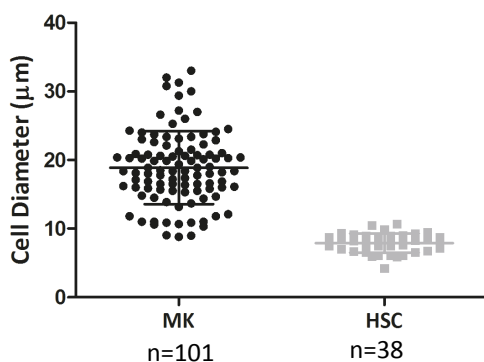
B



C



D



E

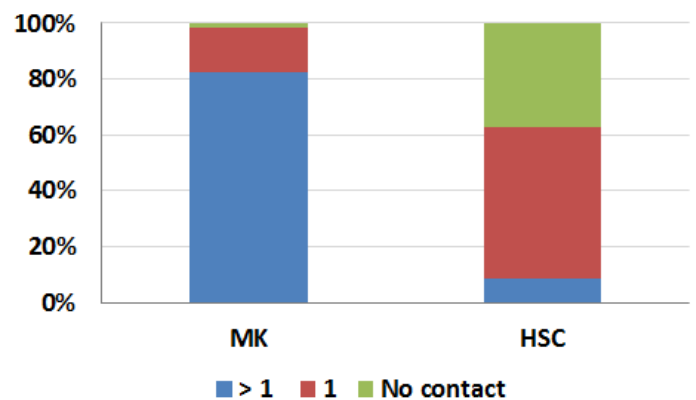
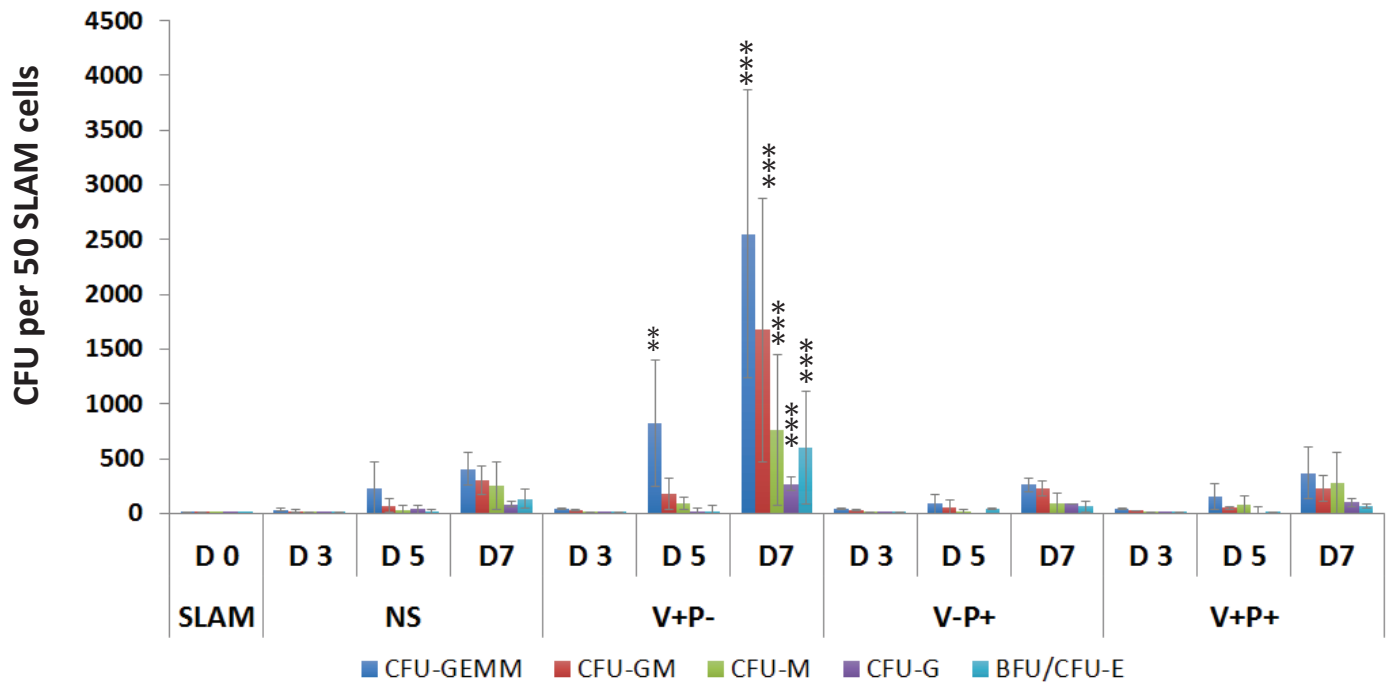


Figure S6: Immunolocalization of fetal liver stromal elements, MK and HSC. A) Immunostaining were performed on day 13.5 mouse embryo frozen sections. VCAM-1 positive cells were identified using monoclonal antibody revealed with donkey anti-Rabbit-Alexa 488; rat anti-PDGFRa revealed with donkey anti-Rat-Alexa 594. (Scale bar = 50 μm) B) Cells with the phenotype of HSC are present in the fetal liver at day 13.5 and represent 0.0047% of viable cells. (Lin= CD3, CD4, CD5, CD8, Gr-1, B220, TER119) C) HSC were identified on mouse embryo day13.5 section as CD150+CD42c- cells of diameter <10 μm (white arrow). MK were identified as cells positive for CD150 and CD42c staining. Scale bar = 25 μm) D) Diameter of MK and HSC were determined for all cells identified from scanning of 10 sections E) Cell contact with VCAM-1 positive cells was determined for each identified cells. MK: n= 101, HSC: n=38.

A



B

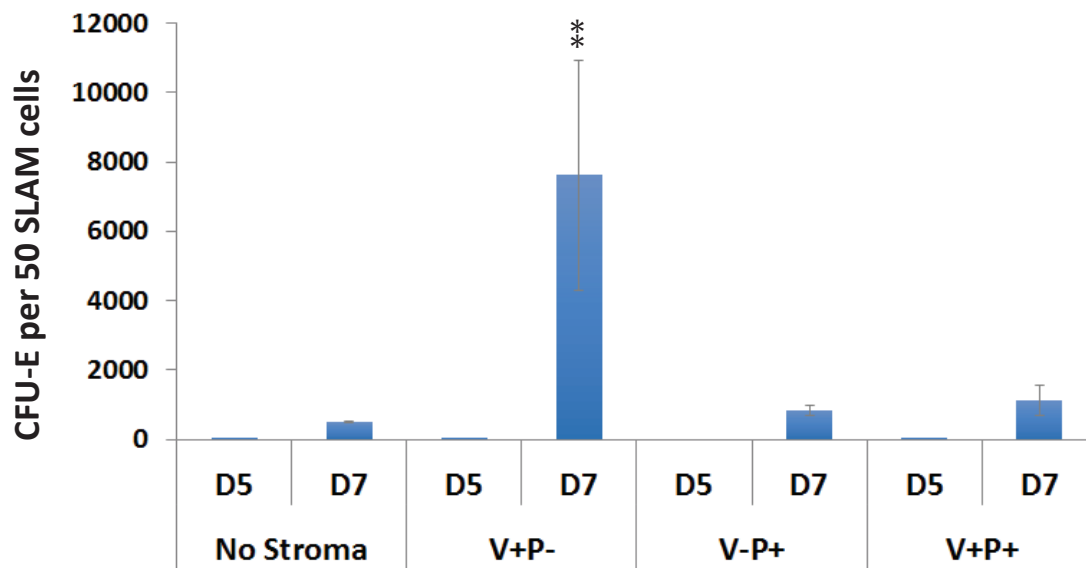


Figure S7: BFU-E and CFU production during the co-culture. 50 SLAM cells were plated in low cytokine serum free medium in the presence of absence of stromal layers. A) After 3, 5 and 7 days the cells produced were subjected to clonogenic assay using MethoCult® M3434 in the presence of rm SCF, rm IL-3, rh IL-6, rh Epo (STEMCELL Technologies). The mean±SD of CFU produced per 50 SLAM plated in triplicate from four independent experiments are presented. B) After 5 and 7 days the cells produced were subjected to clonogenic assay using MethoCult® M3334 in the presence of 4 U/ml of huEpo (STEMCELL Technologies). The mean±SD of BFU-E produced per 50 SLAM plated in triplicate from two independent experiments are presented. ** p < 0.01, *** p < 0.001 comparison to non-stroma group for the same day. Other comparison were not statistically significant.

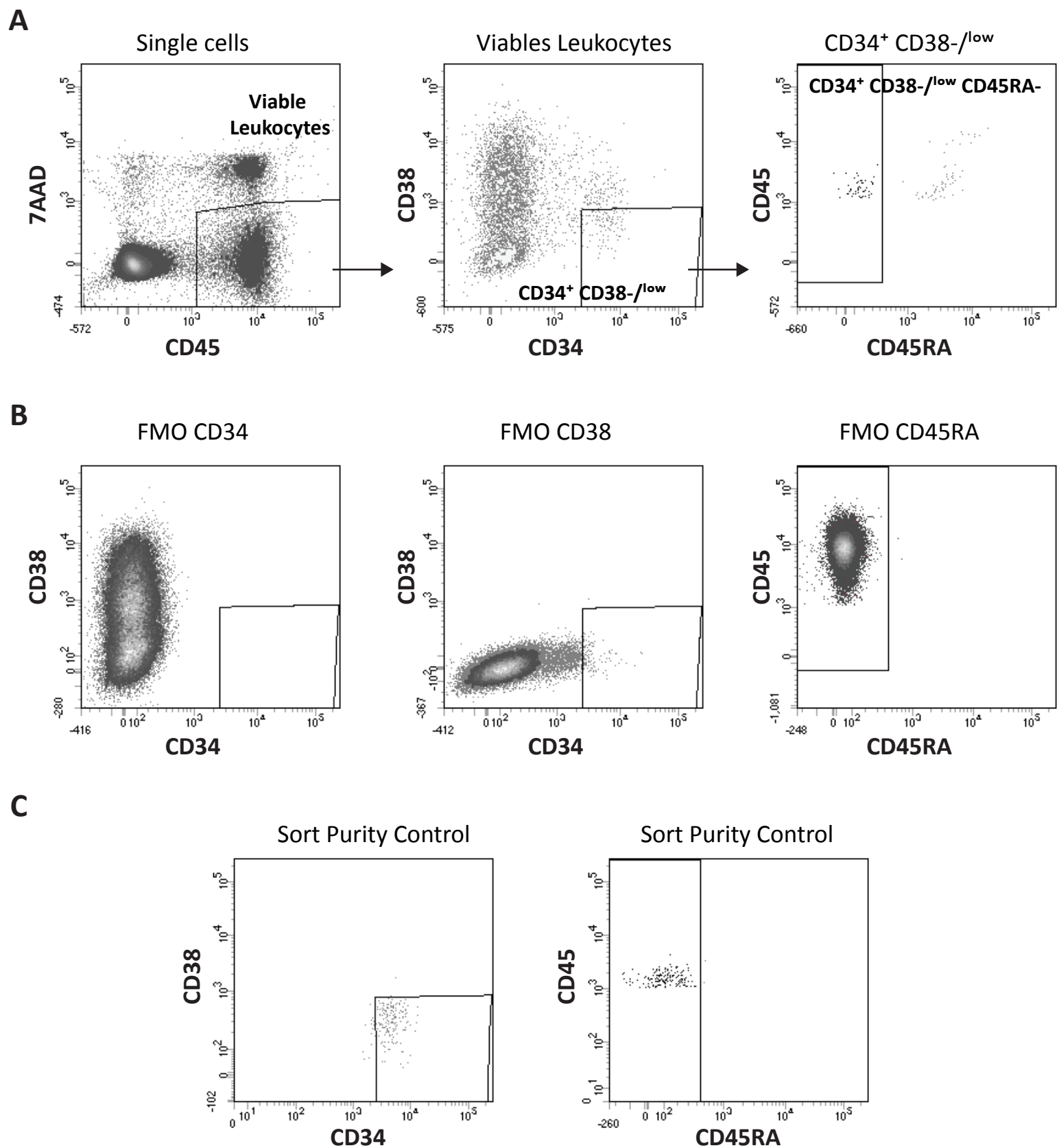


Figure S8: Isolation of human early progenitors. A) Representative dot plots of the gating strategy used to sort early hematopoietic progenitors from hematopoietic progenitor pre-enriched cell populations. The CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻ population is highly enriched in human HSC. B) Representative dot plots for FMO controls are presented. C) Representative dot plots for purity controls performed post cell sorting are presented.

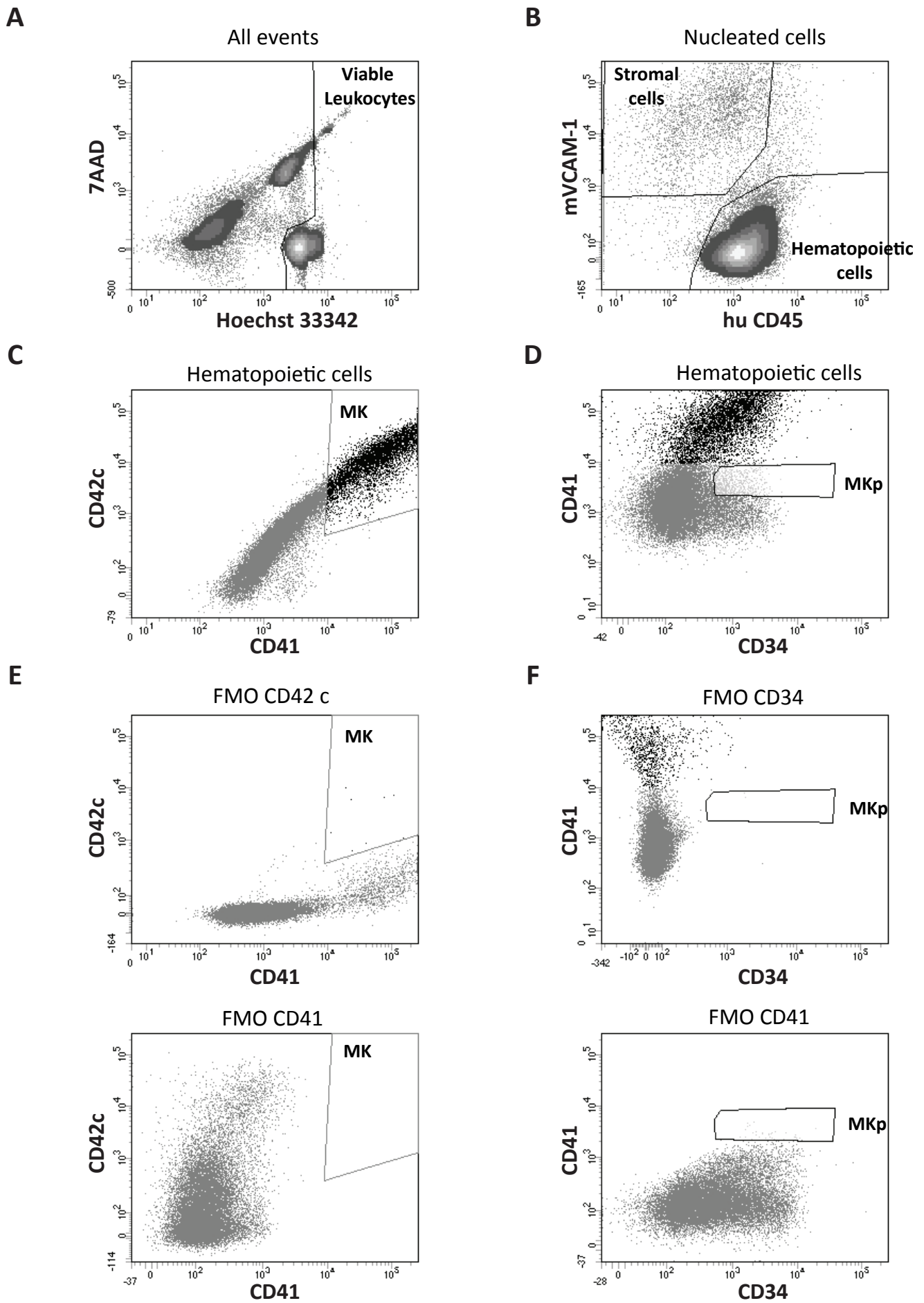


Figure S9: FACS gating strategy for the identification and quantification of hu MK produced in the co-culture. The nuclear dye Hoechst 33342 was added to the culture medium and the co-cultures were maintained at 37°C for 2.5h. The non-adherent cells were harvested and labelled with fluorescent-conjugated antibodies and resuspended in 7ADD supplemented buffer for dead cells exclusion. A) As for mice cells, large megakaryocytes are permeable to 7AAD after immunostaining, therefore only cells exhibiting 7AAD signal and with less than 4N Hoechst intensity signal were excluded as dead cells B) Stromal cells identified as mVCAM-1 positive cells were excluded from the analysis and huCD45 positive cells selected. C) MK were identified as cells expressing CD41 and CD42c. Representative dot plots are presented. D) MKp were identified as CD34+CD41dim cells. Representative dot plots are presented. E) Corresponding dot plots for FMO controls are presented.

Table S1 : Antibodies used in the study

Description	Clone	Supplier
Fetal liver cell sorting/analysis		
Biotin / APC-Cy7 Anti-mouse CD45	30-F11	BD Biosciences s/ eBioscience / Biolegend
Biotin / APC-Cy7 Anti-mouse Ter119	TER-119	BD Biosciences s/ eBioscience / Biolegend
FITC Anti-mouse CD31	MEC 13.3	BD Biosciences
APC Anti-mouse CD140a (PDGFRa)	APA5	eBioscience / Biolegend
PE Anti-mouse CD51 (integrin α v)	RMV-7	eBioscience
PE-Cy7 Anti-mouse CD106 (VCAM-1)	429 (MVCAM)	Biolegend
Biotin Anti-mouse LYVE-1	ALY7	eBioscience
FITC Anti-mouse E-Cadherin	DECMA-1	eBioscience
FITC Anti-mouse Ep-CAM	G8.8	Santa Cruz
FITC Anti-mouse c-met	eBioclone 4	eBioscience
Biotin Anti-mouse Tie2	TEK4	Biolegend
Hematopoietic cells sorting		
Biotin Anti-mouse CD3e	145-2C11	BD Biosciences / Biolegend
Biotin Anti-mouse CD4	H129.19	BD Biosciences
Biotin Anti-mouse CD8a	53-6.7	BD Biosciences
Biotin Anti-mouse CD5	53-7.3	BD Biosciences
Biotin Anti-mouse CD41	MWReg30	eBioscience
Biotin Anti-mouse Ly-6G and Ly6-C (Gr-1)	RB6-8C5	BD Biosciences
Biotin Anti-mouse CD11b (Mac-1)	M1/70	BD Biosciences
Biotin Anti-mouse CD45R/B220	RA3-6B2	BD Biosciences
Biotin Anti-mouse Ter119	TER-119	BD Biosciences
FITC Anti-mouse Ly6A/E (Sca-1)	E13-1617	BD Biosciences
APC Anti-mouse CD117 (c-kit)	2B8	Biolegend
PE Anti-mouse CD48	HM48-1	Biolegend
PE-Cy7 Anti-Mouse CD150	TC15-12F12.2	Biolegend
FITC Anti-mouse CD9	eBioKMC8	eBioscience
PE Anti-mouse Sca-1	E13-1617	eBioscience / Biolegend
PE Anti-mouse CD16/32	93	eBioscience / Biolegend
PE Anti-human CD45	HI30	Biolegend
PE-Cy7 Anti-human CD34	581	Biolegend
APC Anti-human CD38	HIT2	Biolegend
BB515 Anti-human CD45RA	HI100	BD Horizon
Alexa-488 Anti-human/mouse CD42c	RAM-1	Produced and conjugated in house
Alexa-647Anti-human CD41	RAM-2	Produced and conjugated in house
Transplant analysis		
FITC Anti-Mouse CD45.2	104	BD Biosciences
PE Anti-Mouse CD45.1	A20	BD Biosciences
PE-Cy7 Anti-Mouse CD3e	145-2C11	eBioscience
APC Anti-Mouse CD45R/B220	RA3-6B2	Biolegend
PerCP-Cy5.5 Anti-Mouse CD11b	M1/70	Biolegend
APC- Anti-Mouse Gr-1	RB6-8C5	Biolegend
Coculture analysis		
Alexa-488 Anti-human/mouse CD42c	RAM-1	Produced and conjugated in house
Alexa-647Anti-human CD41	RAM-2	Produced and conjugated in house
PE-Cy7 Anti-human CD34	581	Biolegend
PE-CF594 Anti-human CD45	HI30	BD Biosciences
PE-Cy7 Anti-Mouse CD106 (VCAM-1)	429 (MVCAM)	Biolegend
PE-Cy7 Anti-Mouse CD41	MWReg30	eBioscience
APC Anti-Mouse CD11b (Mac-1)	M1/70	eBioscience
PE Anti-Mouse Ly-6G and Ly6-C (Gr-1)	RB6-8C5	eBioscience
APC-eFluor-780 Anti-Mouse CD45R/B220	RA3-6B2	eBioscience
APC-eFluor-780 Anti-Mouse CD3e	145-2C11	eBioscience
Immuno-histology		
Purified Rabbit Monoclonal anti-Mouse VCAM1	EPR5047	Epitomics
Purified Anti-Mouse CD140a (PDGFRa)	APA5	eBioscience
Alexa-647 anti-mouse CD150	TC15-12F12.2	Biolegend
Alexa-555 anti-human/mouse CD42c	RAM-1	Produced and conjugated in house
Alexa488 F(ab') ₂ Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)		Jackson Immunoresearch
Alexa-594 Donkey Anti-Rat IgG (H+L)		Jackson Immunoresearch
Purified anti-mouse CD16/32	93	Biolegend
Donkey serum		Jackson Immunoresearch

Table S2 : Primers used in the study

Gene Symbol	Forward	Reverse	Product size
Hnf4a	CTCTTCTGATTATAAGCTGAGGATG	CCACAGGAAGGTGCAGATTGATCTG	377
Alb	CATGACACCATGCCTGCTGAT	CTCTGATCTTCAGGAAGTGAC	452
Afp	ACTCACCCCAACCTTCCTGTC	CAGCAGTGGCTGATACCAGAG	422
Krt18	GAGGGCTCAGATCTTTGCGA	TGAGATTTGGGGGCATCCAC	321
G6pc	GGATTCCGGTGTTTGAACGTC	ATCCAAGCGCGAAACCAAAC	229
Met	GGAAGTGGCTACTGCTCTG	GAGTTGATCACATGCCAAGC	96
Jag1	CGCCTCAAAGAAGCGATCAG	AAAGTGTAGGACCTCGGCCA	644
Jag2	GGGTGGCAACTCCTTCTACC	AGCTCCTCATCTGGAGTGGT	189
DII1	TGGGGCTACCCAGATCAAGA	CCATCTTACACCTCAGTCGCT	354
DII4	CGCCCAGCTCAAAAACACAA	GACACTCTGGCTTCTCACTGT	215
TPO	AAACCCAGACGGAACAGAGC	CTGCCCTGTAGAGGAAGCTG	196
Gapdh	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG	153

3. Données supplémentaires

Au-delà du soutien de la mégacaryopoïèse j'ai également étudié la capacité des cellules stromales V^+P^- à maintenir une prolifération des cellules les moins engagées. J'ai également évalué le pouvoir proplaquetogène de la population $CD34^+CD41^{dim}$ produite sur différents stroma cellulaires en la comparant à la population $CD34^+CD41^{dim}$ produite sans co-culture en présence de SR1 (Strassel et al., 2016).

a) Réensemencement des cellules hématopoïétiques obtenues par co-culture

Les données obtenues sur les différents stroma cellulaires de FF démontrent un soutien de la mégacaryopoïèse par les progéniteurs hépatiques V^+P^- agissant à la fois sur la prolifération et la différenciation des MK. Afin de disséquer ces deux propriétés, des CSH co-cultivées sur stroma V^+P^- ont été repiquées à différents jours de la co-culture dans un milieu contenant de la TPO et SR1. Ce milieu a été décrit pour favoriser la différenciation de MKp (Strassel et al., 2016). Ces conditions permettent d'évaluer si la prolifération et la différenciation surviennent de manière séquentielle au contact du stroma V^+P^- , on s'attendrait dans ce cas à un enrichissement important en MK dans une culture en 2 étapes en présence de stroma (proprolifératif) puis sans stroma en milieu TPO+SR1 (optimal pour la différenciation).

i. Matériels et méthodes

Certaines cellules hématopoïétiques étant adhérentes, la co-culture a été traitée à J9 ou J11 par ajout de trypsine-EDTA (Life Technologies, Carlsbad, Californie, USA) pendant 5 min, puis les cellules hématopoïétiques ont été séparées des cellules stromales par tri magnétique. Pour cela les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-mVCAM-1 couplé au PeCy7 (Clone 429, Biolegend, San Diego, Californie, USA) pendant 45 min à 4°C. Après lavage, les cellules ont été incubées pendant 30 min avec des billes magnétiques Dynabeads® couplées à des anticorps de mouton anti-rat (Life Technologies). La suspension cellulaire a été mise sur colonne aimantée afin de sélectionner les cellules mVCAM positives, correspondant aux cellules stromales murines. Les cellules de la fraction négative ont ensuite été mises en culture dans un milieu contenant du Stemspan (StemCell Technologies, Vancouver Canada), 50 ng/mL

de TPO (Stemcell Technologies), 20 µg/mL de hLDL (human Low Density Lipoprotein) (Stemcell Technologies), 1 µM de SR1 (Cellagen Technology, San Diego, CA) et de la Pénicilline, Streptomycine, Glutamine 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) comme décrit précédemment (Strassel et al., 2016) à raison de 50 000 cellules par puits de plaque 24 puits (Figure 16.A).

ii. Résultats

Le réensemencement des cellules obtenues par co-culture dans le milieu contenant de la TPO et SR1 réduit le nombre total de cellules CD45⁺ produites par rapport à une culture réalisée entièrement sur les stroma de FF. Plus le réensemencement est effectué tôt dans la co-culture, plus le nombre de cellules CD45⁺ à J14 est faible (Figure 16.B). Ceci indique que le stroma V⁺P⁻ participe amplement à la prolifération des cellules CD45⁺ tout au long de la co-culture. Ce constat est également fait sur les stroma V⁺P⁺ et V⁻P⁺ (non montrés).

Le réensemencement entraîne également une baisse du nombre de progéniteurs CD34⁺CD41⁻ et CD34⁺CD41^{dim} confirmant une action du stroma V⁺P⁻ sur la production de progéniteurs jusqu'au terme de la co-culture (Figure 16.B). Enfin, le réensemencement ne permet pas un nombre plus important de MK au terme des 14 jours malgré le milieu favorisant la différenciation. Cette observation est due à la baisse de prolifération des cellules après réensemencement. La balance entre prolifération et différenciation explique ce nombre équivalent de MK dans les différentes conditions.

Les résultats obtenus suggèrent que le réensemencement en TPO et SR1 favorise la différenciation et la maturation des cellules présentes en MK, mais ceci au détriment de l'amplification des MKp par « épuisement du pool » de cellules peu engagées et prolifératives de type CD34⁺CD41⁻ induisant une baisse du nombre de cellules hématopoïétiques totales à J14. Le stroma V⁺P⁻ participe donc à toutes les étapes de la mégacaryopoïèse de la CSH à la production de MK et ceci de manière non séquentielle.

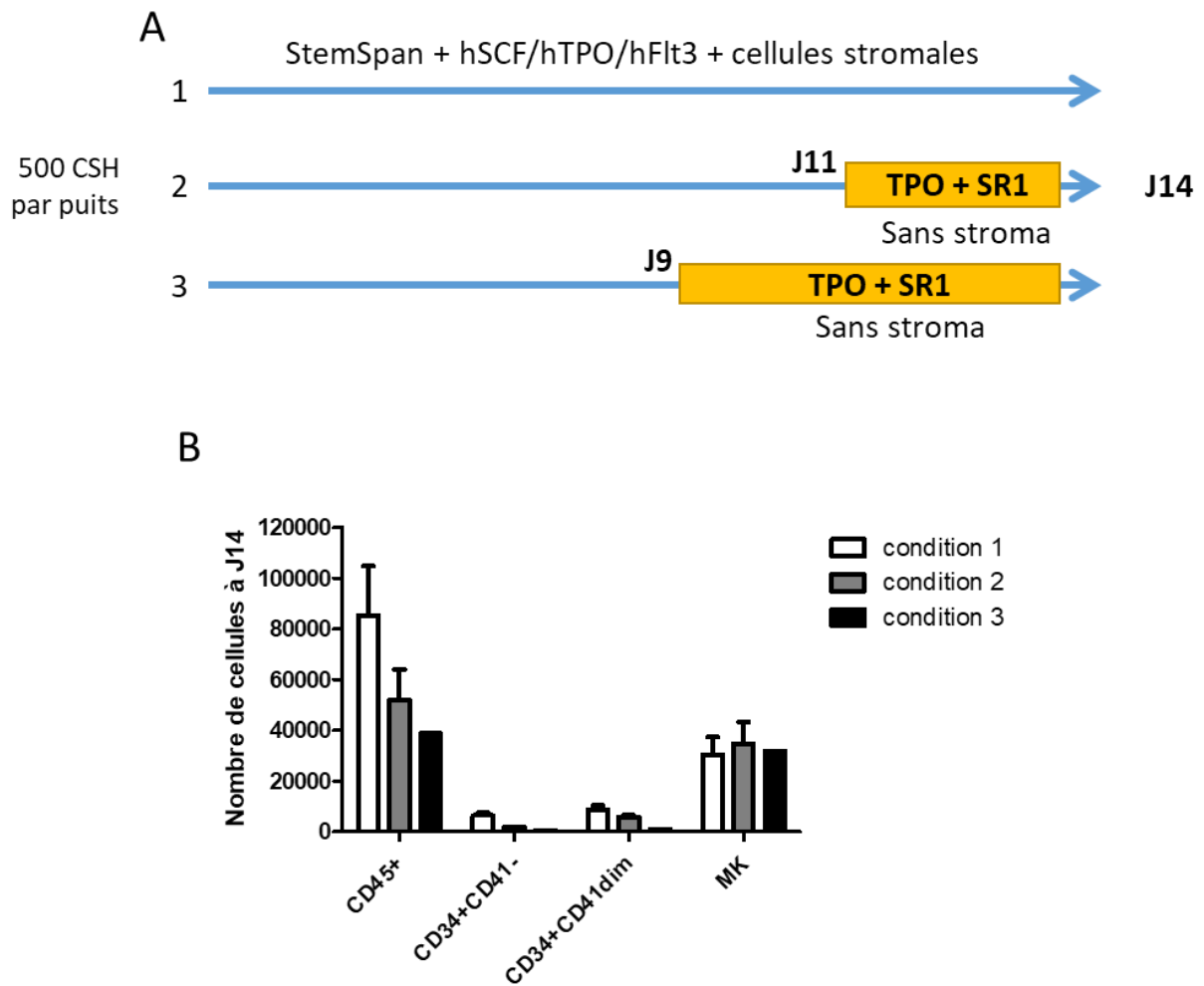


Figure 16 : Effet du réensemencement en milieu TPO+SR1 de CSH co-cultivées sur le stroma V⁺P⁻

A. Protocole de réensemencement des cellules hématopoïétiques à J9 ou J11 après co-culture sur la population V⁺P⁻ de cellules stromales de FF de souris. Les CSH sont cultivées en milieu pauvre en cytokines comme décrit dans Brouard et al., 2017 puis réensemencées dans un milieu contenant de la TPO et du SR1 sans stroma, selon Strassel et al. 2016 **B.** Nombre de cellules dans les différentes populations à J14 de culture avec (2-3) ou sans (1) réensemencement à partir du stroma V⁺P⁻. N=1 à 4 expériences indépendantes.

b) Evaluation du potentiel proplaquetto-gène des cellules obtenues par co-culture

La population $CD34^+CD41^{dim}$ produite en présence de SR1 a été décrite comme présentant un potentiel important à produire des MK capables d'émettre des proplaquettes (Strassel et al., 2016). Par ailleurs, l'article 1 a montré que la culture de CSH sur stroma V^+P^- produit efficacement une population présentant ce même phénotype. Afin de vérifier si cette population présente les mêmes propriétés fonctionnelles, les cellules hématopoïétiques obtenues durant les co-cultures sur le stroma V^+P^- ont été triées à J10 par FACS sur leur expression de CD34 et CD41 puis mises en culture en présence de TPO+SR1 à raison de 4000 à 18000 cellules par puits (en fonction du nombre de cellules totales triées) en plaque 24 puits (Figure 17.A). Après 7 jours de culture, on observe respectivement 21 et 20,3% de MK avec des proplaquettes suite au réensemencement des populations $CD34^+CD41^{dim}$ et $CD34^{+/-}CD41^+$ et pas de proplaquettes à partir de la population $CD34^+CD41^-$ (Figure 17.B). La population $CD34^+CD41^{dim}$ obtenue à partir des co-cultures présente donc des propriétés équivalentes à celle obtenue en absence de stroma mais en présence de SR1, suggérant la mise en jeu d'un mécanisme commun. Par ailleurs, la population $CD34^{+/-}CD41^+$ présente un potentiel similaire à produire des proplaquettes. Ceci suggère un certain recouvrement des populations qui nécessiterait d'affiner la méthode de tri.

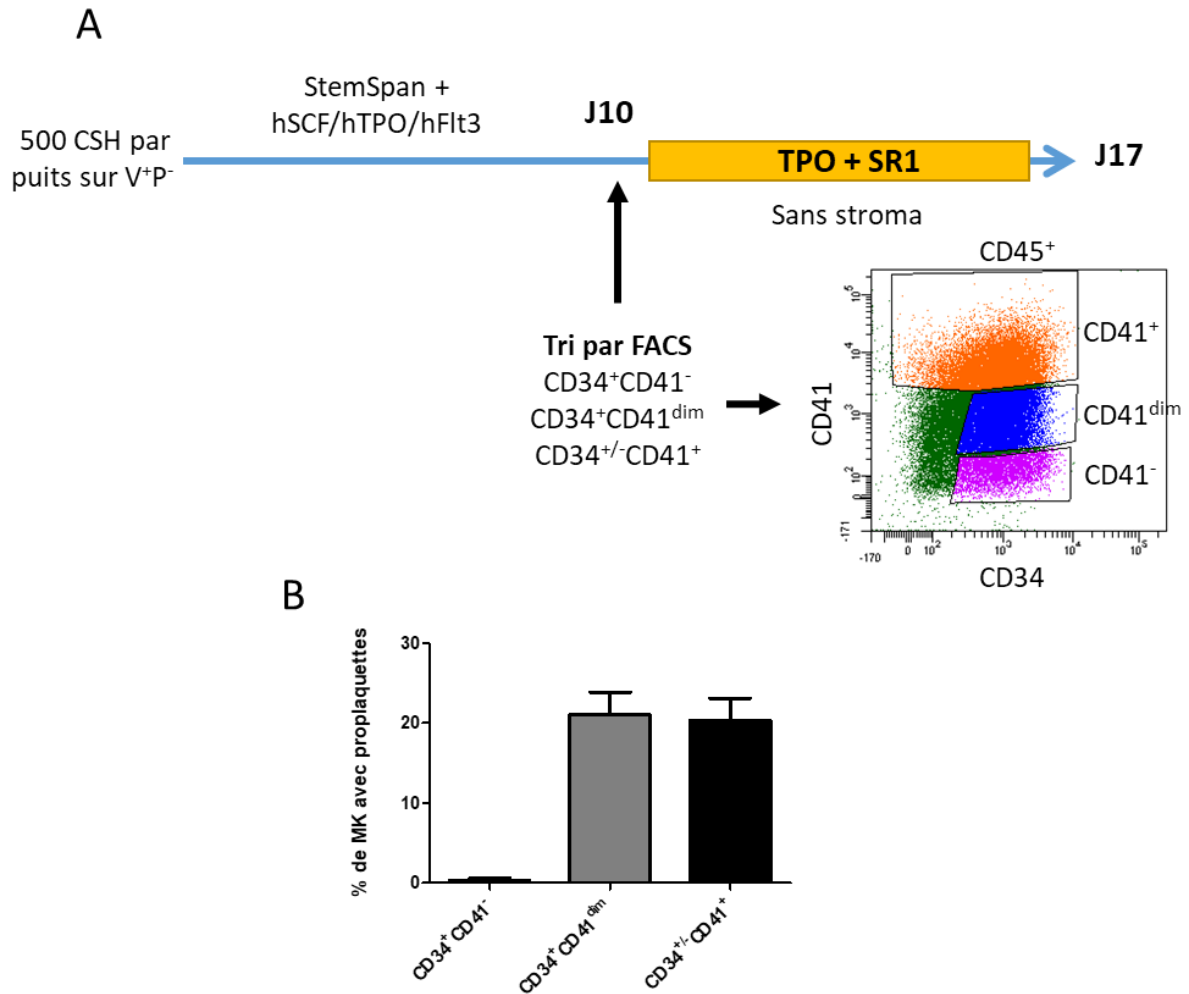


Figure 17 : Production de proplaquettes à partir de différentes populations de progéniteurs MK obtenus par co-culture V⁺P⁻

A. Protocole expérimental pour évaluer le potentiel à émettre des proplaquettes de trois populations de cellules hématopoïétiques triées après 10 jours de co-culture sur la population V⁺P⁻. Les cellules triées sont réensemencées sans stroma dans le milieu TPO+SR1 pendant 7 jours, selon Strassel et al. 2016. **B.** Graphe représentant le pourcentage de MK émettant des proplaquettes à J17 sur le nombre de cellules totales à partir des trois populations de cellules hématopoïétiques triées à J10. N=2 expériences indépendantes.

4. Discussion

Les données de l'article 1 ont mis en évidence une population cellulaire particulière du FF définie par le phénotype V⁺P⁻ favorisant la production de MK à partir de CSH murines. Cette population, présente à E13.5 de développement chez la souris, est constituée de progéniteurs hépatiques. Leur présence transitoire et restreinte à un stade précis de développement embryonnaire suggère des cellules en cours de développement et de différenciation. Mon objectif était d'examiner si les propriétés de ces cellules stromales n'étaient pas restreintes à la souris mais s'appliquaient également aux CSH humaines. Comme chez la souris, les co-cultures ont été réalisées en présence de concentrations faibles de cytokines en vue de limiter l'influence des cytokines exogènes et de révéler l'effet directement lié aux cellules stromales.

Le choix de cocultiver des cellules de deux espèces différentes (souris-homme) pourrait poser question mais a déjà été validé par des travaux précédents dans le domaine de l'hématopoïèse (Kusadasi et al., 2002; Punzel et al., 1999a; Punzel et al., 1999b) et par le fait que nos résultats en culture mixte, corroborent ceux observés entièrement chez la souris. Ces résultats suggèrent que les molécules impliquées dans ce mécanisme sont conservées entre l'homme et la souris et l'existence d'une population stromale chez l'homme présentant les mêmes propriétés que les cellules V⁺P⁻ murines.

Dans cette étude nous sommes principalement intéressés au rôle des cellules stromales dans la mégacaryopoïèse au regard de l'effet prédominant des cellules V⁺P⁻ sur ce lignage. Les cellules CD45⁺ présentes appartiennent en effet majoritairement à la lignée mégacaryocytaire. Cependant d'autres lignages sont vraisemblablement présents dans nos co-cultures et il serait intéressant de le vérifier en utilisant des marqueurs tels que CD3, CD4, CD8 ou CD19 pour les lignées lymphocytaire T ou B, CD14 pour les cellules dendritiques ou encore CD11 pour les monocytes (Maecker et al., 2012). Les données déjà obtenues avec les CSH murines indiquent cependant que les différents stroma ne présentent pas de différences entre eux quant au soutien des autres lignées hématopoïétiques.

Au niveau mécanistique les cultures réalisées entièrement en système murin, montrent que le soutien de la mégacaryopoïèse dépend du contact entre les cellules stromales et CSH, ceci par expérience de type Transwell et utilisation de milieu conditionné. Il est vraisemblable, mais encore à évaluer, que les co-cultures mixtes obéissent aux mêmes mécanismes. A ce jour

il reste encore à déterminer si ces effets sont uniquement dus à des contacts directs entre les cellules ou via la sécrétion d'une matrice extra-cellulaire ou bien même via des cytokines qui seraient présentées à la surface des cellules. Il existe en effet des données de la littérature qui suggèrent que la forme de SCF liée à la membrane plasmique était beaucoup plus efficace pour stimuler la prolifération des cellules hématopoïétiques (Avraham et al., 1992; Toksoz et al., 1992).

Les molécules intervenant dans ce mécanisme n'ont pas été identifiées. L'effet particulier du stroma V^+P^- qui correspond à un progéniteur hépatique en comparaison aux deux autres stroma qui sont de type mésenchymateux suggère l'implication de molécules spécifiques à la lignée hépatique. Un transcriptome différentiel des protéines de surface exprimées par ces différents stroma pourrait être réalisé pour essayer d'identifier des effecteurs spécifiques à la lignée V^+P^- , permettant ensuite d'envisager des études fonctionnelles et une amélioration du rendement de progéniteurs mégacaryocytaires en culture.

Au vu du stade embryonnaire où la population V^+P^- est présente, ces cellules pourraient être des hépatoblastes, cellules bi-potentes pouvant se différencier en cellules épithéliales biliaires et cellules hépatiques (voir partie III.1.b de l'introduction générale). Il existe un test de différenciation *in vitro* des hépatoblastes (Rogler, 1997) qui pourrait être appliqué aux cellules V^+P^- afin de vérifier leur degré d'engagement dans la voie hépatique ainsi que des protocoles *in vivo* pour vérifier le caractère « souche » hépatique (Oertel et al., 2008).

Les expériences supplémentaires ont démontré la capacité proplaquetto-gène de la population $CD34^+CD41^{dim}$ produite au contact du stroma V^+P^- , par un mécanisme qui reste à définir. Etant donné que cette même population $CD34^+CD41^{dim}$ a été mise en évidence en réponse à un ligand du récepteur AhR (aryl hydrocarbon receptor) (Strassel et al., 2016) il serait intéressant d'évaluer l'implication de cette voie de signalisation. Une population $CD34^+CD41^-$ a également été observée dans les co-cultures sur V^+P^- qui s'est avérée incapable de produire des proplaquettes. Cette population ne semble pas représenter un stade conduisant au phénotype $CD34^+CD41^{dim}$ car la prolongation de la culture des cellules $CD34^+CD41^-$ au-delà de 7 jours en milieu contenant de la TPO et SR1 n'a pas permis d'observer de MK capables d'émettre des proplaquettes.

En conclusion, nous avons isolé et caractérisé une population particulière du foie fœtal favorisant la production de progéniteurs mégacaryocytaires et MK matures à la fois chez la souris et chez l'Homme. Le stroma V⁺P⁻ semble constituer un microenvironnement favorisant les premières étapes de la mégacaryopoïèse avec une action sur l'engagement et la prolifération des MKp ainsi que leur différenciation. Un autre type de microenvironnement est vraisemblablement nécessaire pour finaliser la maturation des MK et induire l'émission de proplaquettes.

II. Partie 2 : Rôle des cellules endothéliales médullaires dans la mégacaryopoïèse

1. Introduction

Dans cette deuxième partie de ma thèse je me suis intéressée aux phases finales de la mégacaryopoïèse, des étapes qui sont clés dans la formation des plaquettes et dont les mécanismes sont peu connus. La TPO est la cytokine la plus décrite et la plus importante de la mégacaryopoïèse, néanmoins elle ne semble pas jouer de rôle dans ces phases finales (Kaushansky and Drachman, 2002; Nagahisa et al., 1996). *In situ*, les MK immatures et matures sont à proximité des vaisseaux sinusoides de la moelle osseuse (Stegner et al., 2017). L'hypothèse évaluée ici est que cette localisation préférentielle procure un microenvironnement particulier aux MKp favorisant les dernières étapes de la mégacaryopoïèse.

Les interactions entre cellules endothéliales médullaires et MK ont principalement été étudiées par imagerie sur coupe ou intravitale. Très peu d'études fonctionnelles ont été rapportées dans la littérature sur l'influence de ces interactions sur la différenciation des MK et sur les mécanismes mis en jeu, que ce soit chez l'Homme ou la souris. Les principales données proviennent de l'équipe de S. Rafii qui a rapporté l'isolement de cellules endothéliales de moelle osseuse humaine (HBMEC) à partir d'aspirats de moelle. Une comparaison avec les cellules endothéliales classiquement utilisées, provenant de veine ombilicale HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et avec des MSC de moelle osseuse a révélé une meilleure adhésion des MK sur HBMEC (Rafii et al., 1994). De plus, la co-culture de progéniteurs CD34⁺ de patients mobilisés a permis de générer une fraction plus importante de MK sur HBMEC que sur HUVEC (Rafii et al., 1995). Ces résultats allaient dans le sens d'une spécialisation fonctionnelle des HBMEC. Ces travaux cependant souffraient d'une caractérisation très incomplète du phénotype des HBMEC et des composants du milieu de culture notamment en cytokines, et n'exploraient pas l'ensemble des étapes menant à la production de MK matures aptes à produire des proplaquettes.

Dans cette étude, nous avons mis au point une méthode d'isolement et de culture d'HBMEC primaires et les avons caractérisées sur le plan phénotypique, fonctionnel et transcriptionnel. Nous avons pu montrer dans des expériences de co-culture que ces HBMEC favorisaient la production de MK matures émettant des proplaquettes. Cette capacité est supérieure à celle de MSC de moelle osseuse purifiées à partir d'un même donneur ou à celle de cellules endothéliales primaires provenant d'autres organes ou tissus. Cette propriété des HBMEC est intrinsèque, car indépendante de l'ajout de cytokines hématopoïétiques exogènes, et nécessite un contact cellule-cellule. Enfin, le collagène XV (col XV) a été identifié comme une protéine potentiellement impliquée dans ce mécanisme par analyse transcriptomique différentielle. Ce travail fait l'objet d'un article en préparation.

Article 2 en préparation : Unique properties of bone marrow primary endothelial cells in supporting final megakaryocyte maturation

Unique properties of bone marrow primary endothelial cells in supporting final megakaryocyte maturation

Camille Jost¹, Anita Eckly¹, Catherine Strassel¹, François Gastaud², Henri De la Salle¹, Christian Gachet¹, Nathalie Brouard^{1*}, François Lanza^{1*}

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France

² Institut de Chirurgie Orthopédique et Sportive, Strasbourg, France

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: François Lanza ; UMR_S1255, INSERM, Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace), 10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France; e-mail: francois.lanza@efs.sante.fr; Phone +33 3 88 21 25 25, Fax: +33 3 88 21 25 21

Abstract words count: 170 (Limits 250)

Text words count: 3875 (limits 4000)

Figure count: 7 (limits 7)

Reference count: 21 (limits 100)

Scientific Section: PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Key words: megakaryopoiesis, microenvironment, endothelial cell, mesenchymal cell, primary cell culture

1-Human primary bone marrow endothelial cells (HBMEC) support proplatelet formation from immature MK without adding exogenous hematopoietic cytokines

2-HBMEC exhibits a unique capacity compared to other types of endothelial cells or to MSC suggesting a specific mechanism within the bone marrow

Abstract

The bone marrow is the major site of megakaryopoiesis in adult where in the latest stages, megakaryocytes (MK) come in close proximity with sinusoid vessels. To evaluate the role of this environment for full MK maturation we isolated and cultured a pure population of phenotypically and functionally characterized human bone marrow endothelial cells (HBMEC). Immature MK cocultured in a low cytokine cocktail with primary HBMEC gave rise to fully mature proplatelet producing MK with greater efficiency than with mesenchymal stem cells MSC from the same BM samples or with primary endothelial cells from iliac arteries or the bladder microvasculature. This effect was dependent on cell-cell contact and also observed in the complete absence of exogenously added cytokines, including thrombopoietin (TPO), supporting an intrinsic role of HBMEC. RT-qPCR array analysis identified collagen XV overexpression in HBMEC compared to these other cells suggesting an implication of this basal lamina component in MK maturation. Altogether, these results provide strong evidence that HBMEC contribute a unique specialized microenvironment supporting the latest stages of megakaryopoiesis.

INTRODUCTION

Stromal cells within the bone marrow (BM) provide a suitable environment, called niche, for self-renewal, proliferation, and differentiation of hematopoietic stem cells ¹. Following the introduction of the niche concept, the role of the BM microenvironment has been mainly evaluated in the context of hematopoietic stem cell (HSC) maintenance and by comparison very little is known about the megakaryocyte (MK) niche. This lack of knowledge hampers in turn efforts to efficiently reproduce megakaryopoiesis and thrombopoiesis *in vitro*.

In adults, platelets originate from fully mature MK in the BM. During this thrombopoiesis process MK come in close proximity to sinusoid endothelial cells and in the end extend fragments, called proplatelets, in the blood circulation ^{2,3}. Recent intravital microscopy studies have shown that MK are not randomly distributed within the bone marrow but are vessel-biased and do not appear to be migrating from the endosteal niche ⁴. This close proximity of MK and vessels even at an immature stage indicates that BM endothelial cells could play a role in the last stages of MK differentiation and maturation.

In 1995, Rafii and colleagues reported in *in vitro* studies that human bone marrow endothelial cells (HBMEC) promote MK commitment and differentiation from CD34⁺ human hematopoietic progenitors ⁵. This study, where long-term cultured HBMEC were compared to Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC), suggested a specialized role for HBMEC. This work however mainly focused on the early stages of MK differentiation and the question remains open on the influence of HBMEC on full MK maturation and proplatelet formation.

In this study, we have isolated a pure population of well-characterized primary human medullar endothelial cells and evaluated them in coculture with immature MK. We found that HBMEC efficiently supported MK maturation and proplatelet formation without addition of hematopoietic cytokines. HBMEC were more efficient than mesenchymal stem cells (MSC) or endothelial cells from other organs pointing to a specialized role of these cells. Finally, we highlighted a cell-cell contact mechanism with a possible implication of a basal lamina constituent, collagen XV.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of human primary HBMEC and MSC

Cells were harvested by curettage from human tibial tray obtained after knee prosthesis surgery (Approved by CEEI/IRB of INSERM, ethical number: IRB00003888). Cell suspensions were obtained after gentle digestion with collagenase I (1mg/mL) (Worthington Biochemical Co, Freehold, NJ) and Type II dispase (2 mg/mL) (Sigma, St Louis, MO) for 30 min at 37°C and filtration through a 100 µm cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA) with PBS-2% Newborn Calf Serum (NCS)(Dutscher SA, Brumath, FR). Red blood cells were removed with lysis buffer (BD Biosciences) and cell suspension was washed with PBS-2% NCS and then filtered through a 70 µm cell strainer (BD Biosciences). A fraction of cells was used for flow cytometry analysis with a Fortessa-X20 flow cytometer (BD Biosciences). Cells were labeled with PE conjugated CD90, PE-Cy7 conjugated CD45, PE-Cy7 conjugated CD68, PE-CF594 conjugated CD31, FITC conjugated CD73 and A647 conjugated CD105 antibodies. Cells were put in culture in EGM2 medium (Lonza, Walkersville, MD) for 4 days in 5% CO₂, 5% O₂ humidified air at 37°C. A detailed list of antibodies used is provided in Table S1. During the 4 days of culture, medium was changed once to remove non-adherent cells. At day 4 of culture, the adherent fraction was detached by using 0.5% Trypsin-EDTA (Life Technologies AS, Norway). Cells were labeled with FITC conjugated CD31, PE conjugated CD90, PE-Cy7 conjugated CD45, PE-Cy7 conjugated CD68. Cell sorting of HBMEC and MSC was performed on a BD Aria II flow cytometer (BD Biosciences). Flow cytometry data analyses were conducted using BD FACSDiva software (BD Biosciences).

Establishment of cocultures of stromal cells and human immature MK

Human CD34⁺ cells were isolated as previously described (Strassel et al., 2016). CD34⁺ cells were seeded in 24-well plates in Stemspan Serum-Free Expansion Medium (SFEM) supplemented with CC220 1X (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada), 1 µM Stem Regenin 1 (SR1) (Cellagen Technology, San Diego, CA), 20 ng/mL human low-density lipoprotein (Stemcell Technologies) and penicillin streptomycin glutamine (PSG)(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) for 7 days. In parallel, sorted HBMEC were cultured in 24-well plates in EGM2-MV medium (Lonza) on 200 µg/cm² gelatin (Sigma) coating for 8 days.

Sorted MSC were also cultured in 24-well plates in α -MEM supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) (Hyclone, South Logan, UT), supplemented with 1% GlutMAX, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% Sodium Pyruvate (all from Life Technologies) for 8 days.

Confluent layers of HBMEC and MSC were washed and immature MK from the 7 days culture were seeded onto the stromal layers in EGM2-MV (Lonza) supplemented or not with 10 ng/ml hSCF, 10 ng/ml hFlt3L (R&D systems) and 10 ng/ml hTPO (STEMCELL Technologies). The cultures were maintained six days at 37°C in a 5% CO₂, fully humidified atmosphere. Images were taken after six days of coculture with the microscope Olympus CKX53, camera SC50 (Olympus, Tokyo, Japan) and the CellSens Entry Software (Olympus).

Measurement of MK and proplatelet size

Diameter of MK size was measured using Image J software on images taken at day 6 of coculture. For proplatelet measurement, using Photoshop a mask of the proplatelets was drawn manually and extracted as binary color image. The surface covered by platelets (pixels) was quantified using, using Image J and normalized to the number of MK with proplatelets counted for the corresponding image.

Culture of Human Iliac Artery and Human MicroVascular Endothelial Cells (HIAEC and HMVEC)

HIAEC and HMVEC were purchased from Lonza. Cells were cultured in EGM2-MV medium (Lonza), subcultured twice a week and used between passage 4 and 6. For coculture, cells from passage less than 7 were plated in 24-well plate for 4 days in EGM2-MV. The cultures were maintained at 37°C in a 5% CO₂, in fully humidified atmosphere.

Functional assays for endothelial cells: tube formation assay and acetylated LDL uptake

Tube formation assay

Matrigel matrix (Corning, New York, USA) was coated in 24 or 48-well plates at 100 μ L/cm² and incubated at 37°C for 30 min. HBMEC or MSC were detached with trypsin-EDTA and 70 000 cell/cm² were seeded on matrigel. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂, fully humidified atmosphere. Images were taken every hour until 8 hours by optical microscopy,

Olympus CKX53, camera SC50 (Olympus, Tokyo, Japan) and the CellSens Entry Software (Olympus).

Acetylated LDL (acLDL) uptake

This assay was performed at HBMEC or MSC confluence. A488 conjugated acLDL (Life Technologies) was added to the cell medium and cells were incubated for 4 hours at 37°C. Cells were then washed with PBS and fixed by 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Pennsylvania, USA). Prolonggold with DAPI was used as mounting reagent (Invitrogen, California, USA). Slides were conserved at 4°C. Images were visualized and acquired using a Leica TCS SP8 confocal microscope and processed with the Leica LAS AF software or EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific).

RT-qPCR array

HBMEC, HIAEC, HMVEC and MSC were cultured as previously described for coculture studies. RNA extraction was performed with RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, DE) as described by the supplier. RNA was quantified with the Nanodrop (Nanovue, GE Healthcare Bioscience, Pittsburgh, USA). Reverse transcription was done using RT² First Strand Kit (Qiagen). qPCR were realized with qPCR array plates (RT² Profiler PCR Array for Human Endothelial Cell Biology, for Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules, and for Human Cell Surface Markers)(Qiagen) and run on the CFX96 thermocycler (Biorad, California, USA). Data were analyzed using the Qiagen online software.

Flow cytometry analysis of the stromal layer after coculture

After six days of coculture, wells were washed with PBS (Dutscher) and cells detached with trypsin-EDTA solution (Life Technologies). After centrifugation, cells were suspended in PBS-2% NCS (Dutscher) and labeled with PE conjugated CD90, PE-Cy7 conjugated CD45, PE-Cy7 conjugated CD68, PE-CF594 conjugated CD31, and A647 conjugated CD105 antibodies. Flow cytometry analysis was done with a Fortessa-X20 flow cytometer (BD Biosciences) and data analyses were analysed using BD FACSDiva software (BD Biosciences).

Immunofluorescence staining of human stromal cells

Stromal cells were grown to confluence in Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System (Thermo Fisher Scientific). Wells were washed with PBS (Dutscher) and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes. After PBS washing, cells were incubated in blocking buffer 1% BSA (Sigma) in PBS supplemented with 2% normal donkey serum for 30-45 minutes. Wells were then incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with purified primary antibodies (listed in Table S1) diluted in blocking buffer, then washed in PBS. Sections were then incubated with secondary antibodies for one hour at 20°C in a humidified chamber, and washed again in PBS. Prolonggold with DAPI was used as mounting reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Slides were kept at 4°C. Images were visualized and acquired using a Leica TCS SP8 confocal microscope and processed with the Leica LAS AF software. Z-stacked images were collected.

Transmission electronic microscopy

HBMEC were cultured in 6-wells plates as described above in EGM2-MV (Lonza) medium. When reaching confluency, they were washed 3 times with Caco buffer containing Dimethyl Arsinic Acid Sodium Salt Trihydrate, 0.1M, pH 7.4, osmolarity 305 (Merck, Darmstadt, Germany). They were then incubated for 1 hour at room temperature in osmium tetroxide (Merck). After a wash in Caco buffer and distilled water they were incubated in 4% uranyl acetate during one hour at 4°C (Ladd Research Industries Inc, Williston, USA). Cells were washed two times in distilled water and then in increasing concentrations of ethanol until pure ethanol. Cells were then embed in Epon LX112 (Ladd Research Industries Inc) at room temperature overnight. Sections of 100 nm were prepared using using Leica Ultracut UCT and visualized using the transmission electronic microscope CM120 Biotween (Philips, Amsterdam, Netherland).

RESULTS

Isolation and characterization of human primary bone marrow endothelial and mesenchymal cells

To explore whether bone marrow EC provide a favorable microenvironment for MK maturation we first developed a procedure to isolate them as a pure population and culture them as primary cells. For physiological relevance, we focused on cells of human origin and harvested them from the tibial plateau, which gave us a better yield than femur (data not shown). As summarized in Figure S1 we obtained a cell suspension after gentle enzymatic digestion of the bone marrow where the non-hematopoietic (Hem-) CD45⁻ population contained 8.6±1.5 % of CD31⁺ EC. Failure to efficiently culture these rare cells after sorting lent us to perform a 4 days pre-culture which allowed to enrich HBMEC by more than 5 times compared to day 0. During this pre-culture HBMEC and MSC could be easily distinguished on their morphology (Figure 1A.i). HBMEC were then sorted from the pre culture by gating on non-hematopoietic (Hem-) CD45 and CD68 negative cells, and selection of CD31⁺ cells. MSC were purified in the same experiment by sorting the CD31⁻CD90⁺ population. HBMEC represented 49.4±3.2 % and MSC 32.1±2.9% of the Hem- fraction (Figure 1A.ii). The sorted HBMEC cultured for up to 8 days in an optimized EC culture medium (EGM2-MV, Lonza) displayed an expected phenotype with 88.2±4.7 % of the cells (in the gate HBMEC OR MSC) being positive for CD31 (Figure 1C.i) and 99.7% of the CD31⁺ cells being positive for CD105 (data not shown). On the other hand cultured MSC cells were 100% CD90⁺ (in the gate HBMEC OR MSC) and 99.9% of the CD90⁺ cells co-expressed the CD105 and CD73 MSC markers. (Figure 1C.ii). Further characterization of HBMEC by RT-qPCR revealed the expression of endothelial lineage specific genes including CD31, von Willebrand factor (vWf), Tie 2, eNOS, VEGFR1 and 2, VE-cadherin and endoglin. They did not express PDGFRa a mesenchymal marker (Figure 2A). CD31 expression was also confirmed by immunofluorescence microscopy, displaying a typical cell junction pattern (Figure 2B). Transmission electron microscopy allowed observation of Weibel-Palade bodies (Figure 2C.i), a signature of EC⁶, and cell-cell junctions between EC with contacts extending for more than 3 μm (Figure 2C.ii). Finally, the EC identity was confirmed in functional assays. HBMEC exhibited the capacity to uptake acetylated LDL and form tubes in matrigel (Figure 2D) while MSC did not (data not shown).

HBMEC efficiently support MK maturation and proplatelet formation

Primary HBMEC were then evaluated for their capacity to sustain the late stages of MK maturation. This was explored by co-culturing human MK committed progenitors (MKcp) on the HBMEC layer. These progenitors correspond to a CD34⁺CD41^{low} enriched population obtained by pre-differentiating CD34⁺ cells in a medium containing SR1 as previously described ⁷. The Stemspan medium usually used for hematopoietic cells culture did not allow the maintenance of HBMEC layers, therefore cocultures were performed in EGM2-MV medium. A distinctive feature of the assay was the use of limiting concentrations of cytokines in order to uncover intrinsic properties of the stromal cells. Under these conditions, MKcp cultured on HBMEC for 6 days efficiently produced MK extending proplatelets (Figure 3A) (25.0±1.0 % of the non-adherent cells) whereas they were not observed when stromal cells were omitted (Figure 3B). MSC were also able to sustain maturation of MK extending proplatelets but with a lower efficiency (18.6±1.3 % at day 6). Furthermore, proplatelets on HBMEC were more developed and complex occupying an area double that on MSC (Figure 3C). When examining the round MK that had not reached the proplatelet stage their size was increased by 30% on HBMEC compared to MSC (Figure 3D). Taken together these results point to particular properties of HBMEC in facilitating the maturation of pre-differentiated immature MK.

HBMEC support megakaryopoiesis independently of exogenous hematopoietic cytokines

To evaluate an intrinsic role of HBMEC, co-cultures were performed as above but in a medium completely devoid of exogenous cytokines. MK extending proplatelets were again observed and in a proportion that was even higher than in the presence of low cytokine concentrations (39.0±1.4 %) (Figure 4A). However, this occurred at the expense of cell proliferation since the total number of MK was decreased by more than 2-fold when cytokines were omitted (Figure 4B), indicating a role of these cytokines in MK proliferation, as schematized in Figure 4E. Coculture in the absence of cytokines did not decrease the size of the round MK or the proplatelet complexity compared to cultures with cytokines (Figure 3C-D) further supporting an HBMEC-mediated effect (Figure 4C-D). In comparison MSC were less supportive of proplatelet formation in the absence of cytokines (Figure 4B). We verified that HBMEC did not

undergo a substantial drift during the coculture as they were more than 80 % CD45⁻CD31⁺ at the end of the co-culture (Figure S3). Altogether, the above studies performed in comparison with MSC from the same BM favor a specific and intrinsic role of HBMEC in the efficient maturation of MK.

HBMEC exhibit enhanced properties compared to other primary endothelial cells

We then evaluated whether these properties of bone marrow derived EC are restricted to this particular tissue or if EC from other origin could have the same impact on MK maturation. Human adult primary endothelial cells from iliac artery (HIAEC), a large vessel, and from bladder microvasculature (HMVEC) were selected for comparison (Figure S2A). Their EC identity was confirmed on their expression of CD31, CD105 and CD144 (Figure S2B and S2C). Coculture of immature MK with or without low concentrations of cytokines resulted in the production of MK bearing proplatelets on HIAEC and HMVEC, but much less efficiently than on HBMEC with less than 10% of MK extending proplatelets (Figure 5). These results strongly indicate a specific role of HBMEC in supporting the late phase of megakaryopoiesis and the existence of distinct mechanisms and effectors.

Cell-cell contact is required for proplatelet formation on HBMEC

To explore the possible mechanisms we first evaluated whether they were cell-cell contact dependent or through production of a soluble factor. This was evaluated using a Transwell assay where HBMEC were cultured in the lower chamber and immature MK added to the upper chamber. After 6 days of culture MK differentiated in the upper chamber were almost unable to extend proplatelets (Figure 6A) with less than 0.6 % of MK bearing proplatelets versus 25 or 39% when in direct contact with HBMEC (Figure 6B). Inefficient proplatelet formation was also observed in Transwell assays with HIAEC and HMVEC (data not shown). This indicates that endothelial cells support megakaryopoiesis by a cell-cell contact dependent mechanism.

Collagen XV, a candidate effector for HBMEC specialized properties

To identify candidate effectors involved in HBMEC specialized functions, RT-qPCR array analysis was performed on a panel of 252 genes related to endothelial cells, matrix proteins or cell surface proteins. Assays were run in parallel on RNAs from HBMEC, HIAEC, HMVEC and MSC. Selection of genes with a Ct <30 and a significant fold change against HBMEC in the same direction (up- or downregulation) (Figure 7A) resulted in a list of 26 candidate genes compared to HIAEC, HMVEC and MSC. Among these, collagen XV presented an interesting expression pattern. Col XV was hardly or not expressed in HIAEC, HMVEC and MSC compared to HBMEC as measured by qPCR (Figure 7B). It is a non-fibrillar collagen found in endothelium basal lamina, a localization which could provide close points of contact with MK. We investigated col XV expression in HBMEC monolayers by immunostaining (Figure 7C.i-iii) and observed col XV labeling as long filaments between the cells (Figure 7C.iv). We did not detect Col XV in HIAEC, HMVEC and MSC layers. This distribution is compatible with the implication of collagen XV in MK-HBMEC contacts and a possible role in MK maturation.

DISCUSSION

The present study provides novel information on the cellular microenvironment of megakaryopoiesis in the bone marrow. We showed that HBMEC efficiently and specifically support the latest phases of MK maturation via a contact-dependent mechanism. This conclusion is strengthened by the fact that the experiments were conducted using freshly isolated primary human cells with no addition of exogenous cytokines. Differential RT-qPCR analysis (versus MSC and two other primary EC) identified candidate effectors in HBMEC, among which collagen XV appeared as a good candidate from its expression in sinusoids basal lamina⁸.

The niche concept has been thoroughly put to the test for HSC but a lot less is known about the microenvironment supporting megakaryopoiesis. *In vitro* studies have helped identify soluble factors involved in megakaryopoiesis like IL-3^{9,10}, IL-6^{11,12} and the essential TPO¹³. Questions remain on their production by stromal cells in the vicinity of MK progenitors. A number of matrix proteins have also been proposed as regulators of megakaryopoiesis. These include fibronectin produced by stromal cells¹⁴, which induces MK differentiation, and fibrinogen found at the sinusoid vessel wall which promotes proplatelet and platelet formation^{15,16}. Mechanical constraints (from stromal cells and matrix proteins) inside the bone marrow can also be assimilated as contributing to the MK niche from the observation that 3D environments of different stiffness influence megakaryopoiesis¹⁷.

A limited number of studies have directly explored and characterized the cellular components of the megakaryocytic microenvironment. MSC have been proposed by some studies to promote MK differentiation^{7,18,19} but also to inhibit it²⁰. The diversity of MSC used and culture conditions make it difficult to draw firm conclusions. For example the diverse composition and concentration of added cytokines could mask the effects directly attributed to the MSC. Despite these limitations, a recurrent theme is that MSC or certain populations of MSC, play a role at the stages of MK commitment and progenitor proliferation but might be less involved in the latest stages of MK maturation. Our results showing that MSC are less efficient than EC from the same BM samples in producing MK able to extend proplatelets add ground to this proposal.

Bone marrow-derived EC have already been identified as a component of the HSC niche. Suggestion that they could also provide a suitable environment for megakaryopoiesis came from the seminal work of Rafii and colleagues who showed that HBMEC co-cultured with CD34⁺ cells supported MK differentiation. It was not clear however if these cells also played a role in the latest stages of MK maturation. Indirect support for such a role comes from the observation that MK progenitors are not randomly distributed within the bone marrow but reside in close vicinity to sinusoids ^{2,4}. The present work provides the first direct evidence of a specific role of these cells in favoring full MK maturation sufficient to allow for efficient proplatelet formation.

To support this, care was taken to control several key conditions including: i) the high purity of the HBMEC in the coculture assay (at least 88% pure); ii) the use of only primary unpassaged cells to limit any possible drift from their native phenotype; and iii) the addition of limiting concentrations of hematopoietic cytokines to the culture medium to uncover the intrinsic properties of the HBMEC. Furthermore, analysis of the adherent layers at the end of the co-culture confirmed the maintenance of their endothelial identity. For physiological relevance we also limited our study to cells of human origin despite the constraints attached to this type of approach.

Having observed a positive and direct role of HBMEC on MK maturation we addressed the important question of its specificity. A specific role of HBMEC had already been proposed on MK differentiation in comparison with HUVEC ⁵. Here we found this was also true for MK maturation. This was established in a stringent comparison with primary human EC from different vascular beds providing a strong argument for the specific properties of HBMEC. This in turn allowed us to explore with some level of confidence for possible effectors using a differential transcriptomic analysis of HBMEC versus these other EC.

The contact-dependency being already established in a Transwell assay we focused our attention on transcripts coding for proteins potentially acting locally at the cell surface including surface receptors, matrix proteins and proteases. Collagen XV stood out as a good candidate in view of its restricted expression in HBMEC. These observations applied equally to the col XV transcript and protein, which were nearly undetectable by qPCR and not observed by immunofluorescence in HIAEC, HMVEC, respectively. These results were unexpected since type XV collagen has been described with a widespread distribution in

human tissues by northern blot analysis with an association with vascular, neuronal, and mesenchymal cells detected by immunocytochemistry²¹. A very interesting feature of collagen XV however is its distinct localization in basement membrane zones. In agreement with this immunofluorescence analysis of HBMEC monolayers showed collagen XV-reactive deposits between the cells. From this observation, it could be postulated that MK progenitors added to the HBMEC layer come in contact with locally secreted collagen XV which in turn directly influences their maturation. Collagen XV is a non fibrillar collagen comprising a number of domains which could act as linkage with other collagens and neighboring cells. To date the role of this matrix protein has been mostly studied within the tumor microenvironment where it has been proposed to maintain basement membrane integrity and prevent the migration of tumor cells. In comparison almost nothing is known in normal tissues including the bone marrow. Additional work is warranted to explore its role in MK maturation.

In conclusion, this study provides strong evidence that one distinct cellular component of the bone marrow, HBMEC, supports maturation of human immature MK *in vitro* without addition of exogenous hematopoietic cytokines. Some candidates involved in this mechanism have still to be tested. These findings could bear applications in the culture of MK *in vitro* to improve platelet production.

Addendum

N. Brouard and F. Lanza conceived and designed the research, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. C. Jost conducted experiments, acquired, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. A. Eckly conducted electronic microscopy experiments, acquired, analyzed and interpreted the data. C. Strassel, H. De la Salle and C. Gachet helped to conceive and design the research.

Acknowledgements

The authors would like to thank S. Maire and F. Proamer for technical assistance. This work was supported by EFS, ARMESA, INSERM, Alsace region and SFH.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
2. Lichtman MA, Chamberlain JK, Simon W, Santillo PA. Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release. *Am J Hematol*. 1978;4(4):303-312.
3. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow. *Science*. 2007;317(5845):1767.
4. Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, et al. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun*. 2017;8(1):127.
5. Rafii S, Shapiro F, Pettengell R, et al. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood*. 1995;86(9):3353-3363.
6. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1982;95(1):355-360.
7. Strassel C, Brouard N, Mallo L, et al. Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood*. 2016;127(18):2231-2240.
8. Arvanitidis A, Karsdal MA. Chapter 15 - Type XV Collagen. In: Karsdal MA, ed. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*: Academic Press; 2016:97-99.
9. Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Lopez AF, Williamson DJ. Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice. *Blood*. 1986;68(1):46-57.
10. Carrington PA, Hill RJ, Stenberg PE, et al. Multiple in vivo effects of interleukin-3 and interleukin-6 on murine megakaryocytopoiesis. *Blood*. 1991;77(1):34-41.
11. Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA. Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(15):5953-5957.
12. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, et al. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*. 1989;74(4):1241-1244.
13. 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):568-571.
14. Malara A, Currao M, Gruppi C, et al. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. *Stem Cells*. 2014;32(4):926-937.
15. Larson MK, Watson SP. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. *Blood*. 2006;108(5):1509-1514.
16. Balduini A, Pallotta I, Malara A, et al. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6(11):1900-1907.
17. Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, et al. Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood*. 2016;128(16):2022-2032.
18. Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2000;184(1):58-69.
19. Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE, et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2003;31(5):413-420.
20. Pallotta I, Lovett M, Rice W, Kaplan DL, Balduini A. Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis. *PLoS One*. 2009;4(12):e8359.
21. Myers JC, Dion AS, Abraham V, Amenta PS. Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell Tissue Res*. 1996;286(3):493-505.

Description	Clone	Supplier
PECy7 anti-human CD45	HI30	Biolegend
PECy7 anti-human CD68	eBioY1/82A	eBioscience
FITC anti-human CD31	WM59	eBioscience
PE anti-human CD90	5E10	Biolegend
A647 anti-human CD105	43A3	Biolegend
A647 anti-human CD144	BV9	Biolegend
FITC anti-human CD73	AD2	Biolegend
PE-CF594 anti-human CD31	WM59	BD Horizon

Table 1 : List of antibodies used for flow cytometry analysis or cell sorting

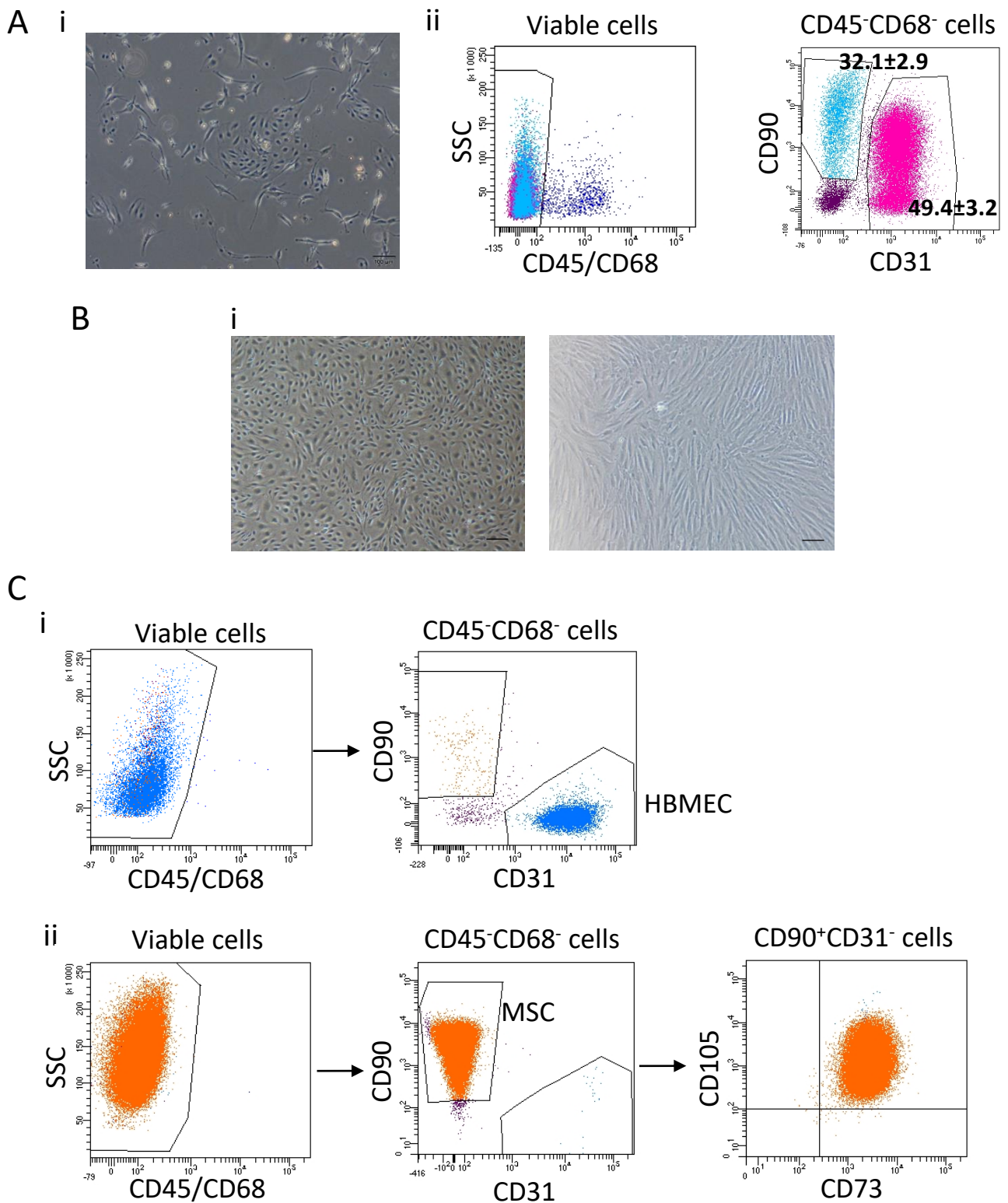


Figure 1 : Phenotype of HBMEC and MSC populations isolated from human bone marrow. **A.** (i) Representative phase contrast image of stromal cells obtained by FACS sorting of a human bone marrow cell suspension and pre-cultured for 4 days (scale bar : 100 μ m). (ii) Phenotypic analysis by flow cytometry of the stromal cells pre-cultured for 4 days before secondary sorting. Dot plots are representative figures of 29 independent experiments. Mean percentage \pm SEM of CD31⁺CD90⁺ (HBMEC) and CD31⁻CD90⁺ (MSC) populations are indicated. **B.** Representative images of sorted HBMEC (i) and MSC (ii) (scale bar : 100 μ m) after 8 days of culture. **C.** Flow cytometry analysis of freshly isolated HBMEC (i) and MSC (ii) after 8 days of culture in their appropriate medium. Representative dot plots from 3 independent experiments.

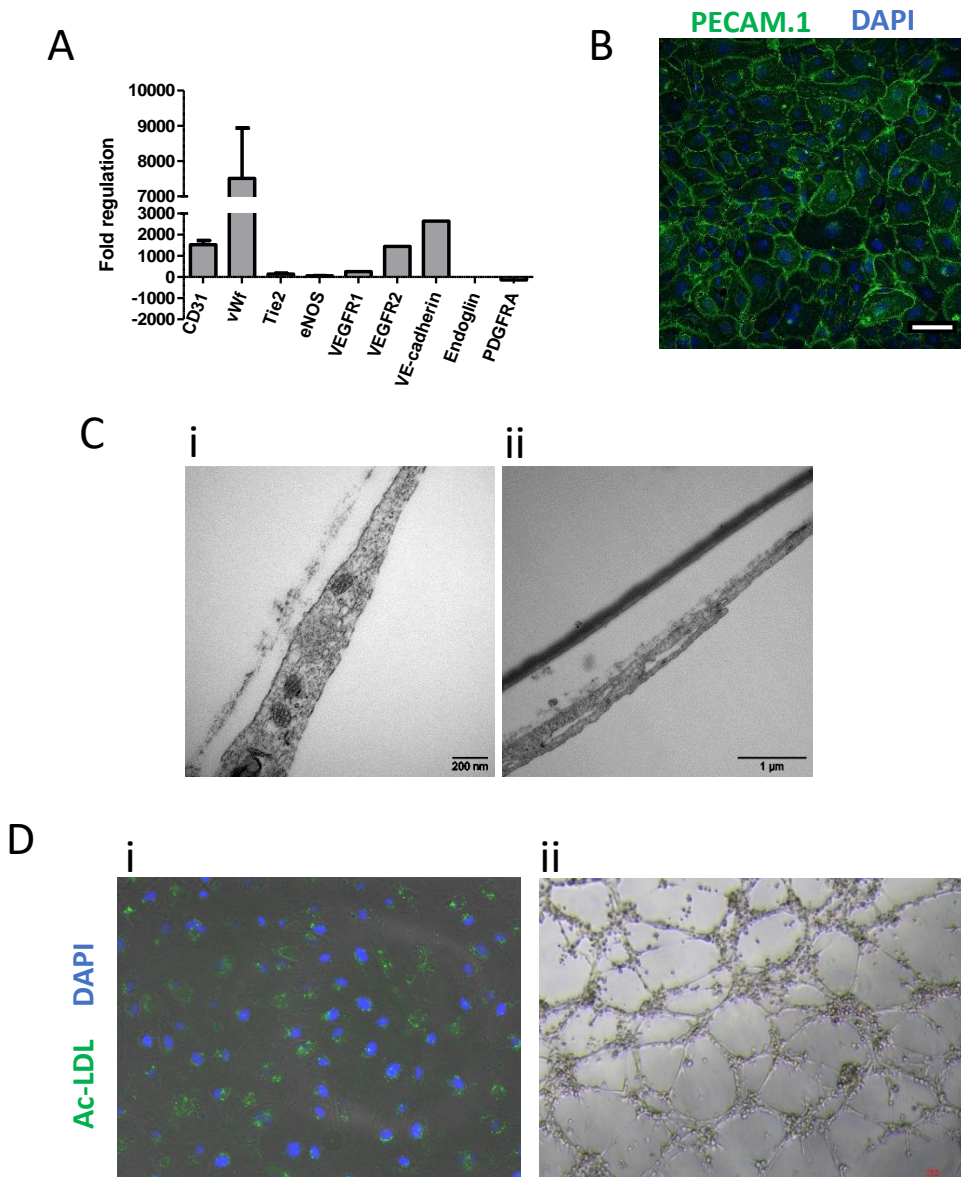


Figure 2 : Characterization of the bone marrow-derived endothelial cells. A. Level of expression of selected genes in HBMEC represented as fold regulation compared to MSC. **B.** Immunofluorescence staining of a HBMEC monolayer for CD31 (PECAM-1) in green. DAPI staining of the nucleus is in blue (scale bar : 100 μm). **C.** Transmission electron microscopy of HBMEC showing (i) intracellular Weibel-Palade bodies (scale bar : 200 nm) and (ii) a characteristic junction between two cells (scale bar : 1 μm). **D.** (i) Uptake of Alexa-488 labelled acetylated low density lipoprotein by HBMEC. (ii) Tube formation of HBMEC layered over matrigel after 5 hours (scale bar : 200 μm).

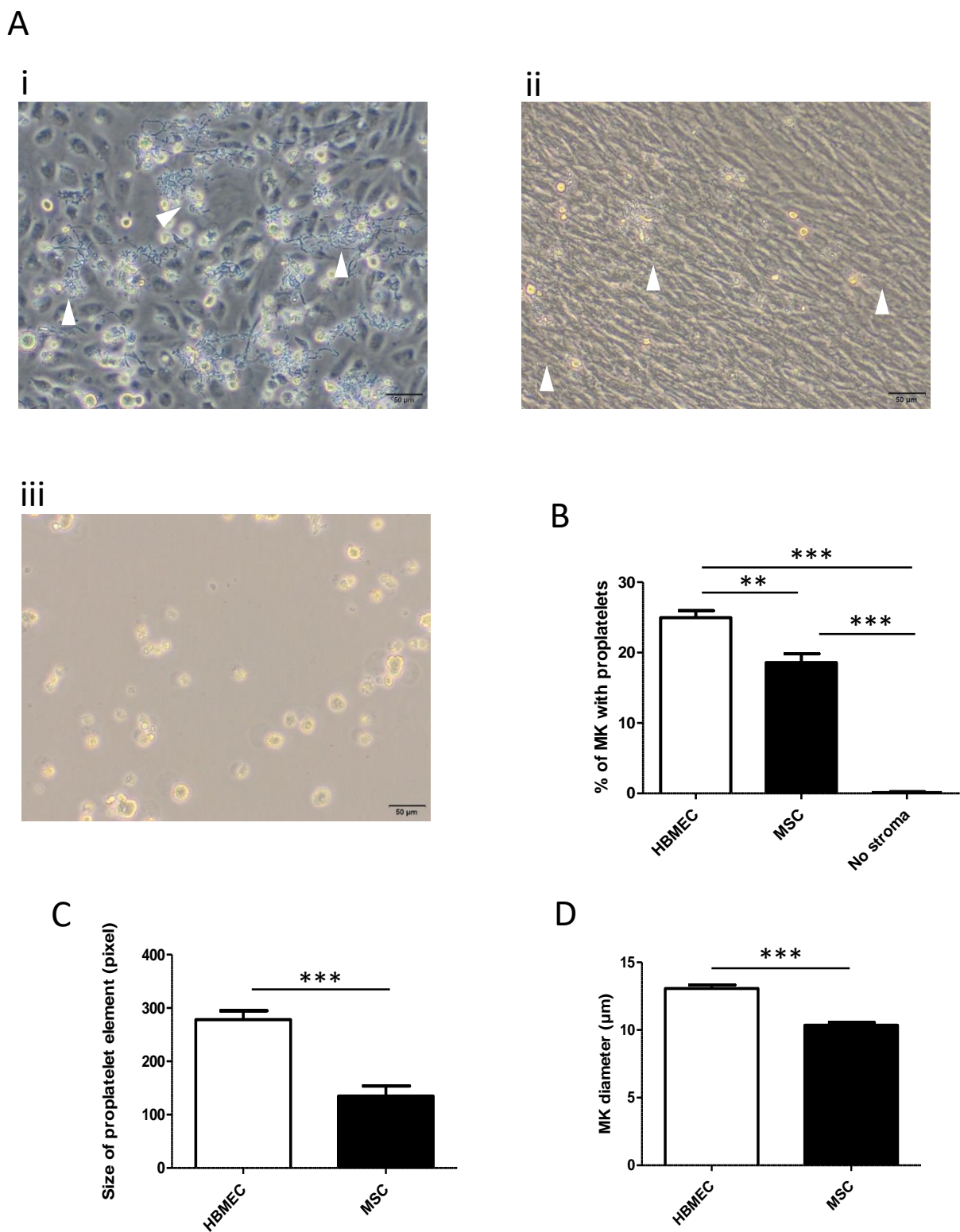


Figure 3 : Efficient proplatelet production after co-culture of immature MK with HBMEC.

A. Representative images of MK obtained after a 6-day coculture in low cytokines conditions with (i) HBMEC, (ii) MSC, or (iii) cultured without stromal cells. Arrowheads indicate proplatelet elements (scale bar : 50 μm). **B.** Percentage of MK extending proplatelets at day 6 of culture on HBMEC or MSC layers, or without stromal cells. **C.** Surface of proplatelets at day 6 of culture on HBMEC or MSC stromal layers. Area for each proplatelet element was calculated by Photoshop and Image J analyses and represented in pixels. **D.** Diameter of the MK population not extending proplatelets at day 6 of culture on HBMEC or MSC stromal layers. Values in B-D are the mean \pm SEM of n=8 (HBMEC), n=6 (MSC) and n=3 (No Stroma) independent experiments. **p<0.001;***p<0.0001 with one-way Anova or Student-t test.

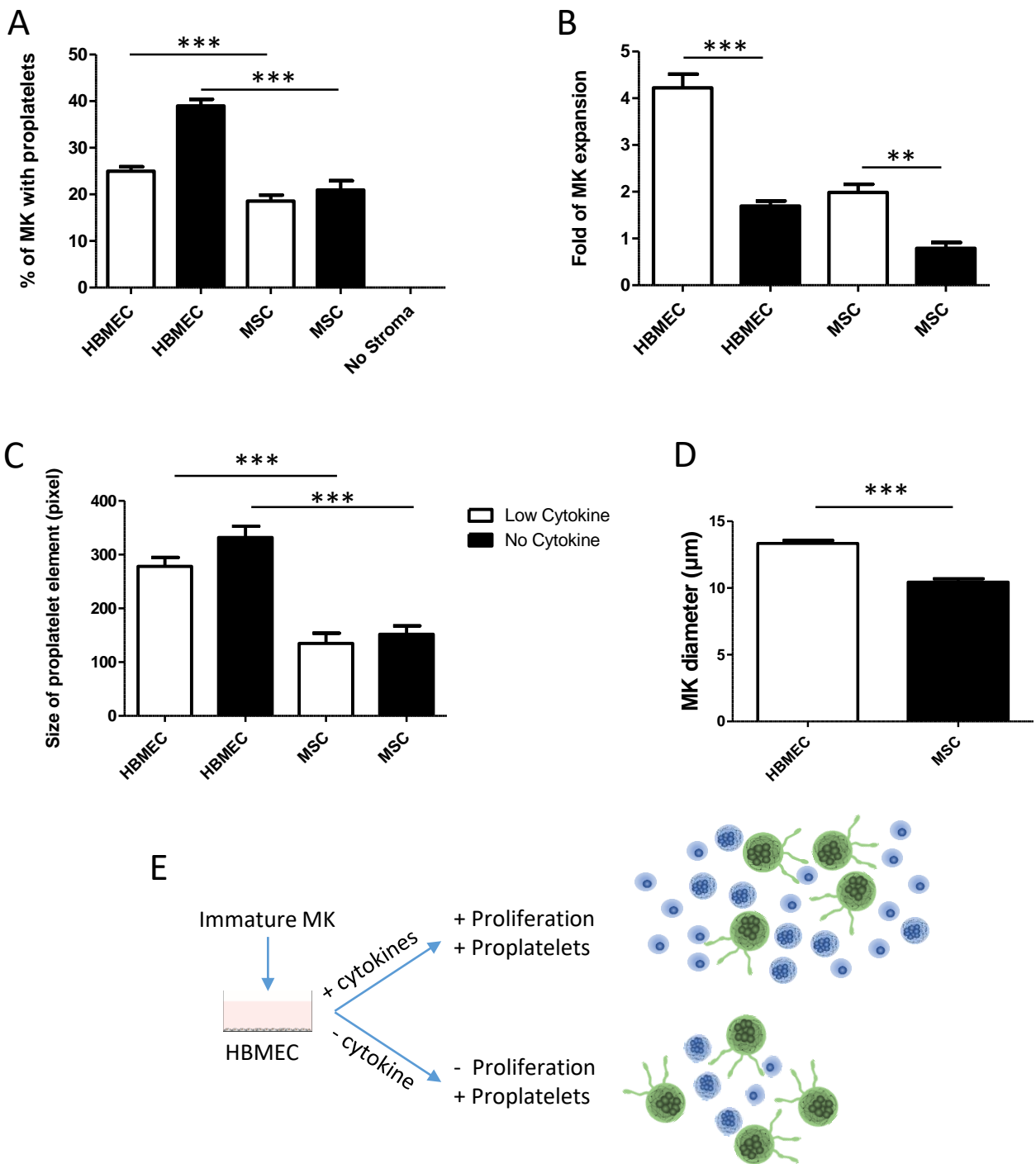


Figure 4 : Exogenous cytokine addition is not necessary to sustain proplatelet formation.

A. Percentage of MK extending proplatelets on HBMEC or MSC layers, at day 6 of culture with low cytokine concentrations (white bars) or without addition of cytokines (black bars), or without stromal cells. **B.** Fold increase in MK number after coculture on HBMEC or MSC layers with low cytokine concentrations (white bars) or without addition of cytokines (black bars). **C.** Size of proplatelets after culture on HBMEC or MSC layers for 6 days with low cytokine concentrations (white bars) or without addition of cytokines (black bars) as quantified in Fig.3C. **D.** Diameter of MK not extending proplatelets at day 6 of culture on HBMEC or MSC stromal layers in the absence of added cytokines. **E.** Schematic explanation for the increased proportion of mature MK without addition of cytokines (Figure 4A). Values in A-D are the mean values±SEM of n=8 (HBMEC), n=6 (MSC) and n=3 (No Stroma) independent experiments. **p<0.001;***p<0.0001 with one-way Anova or Student-t test.

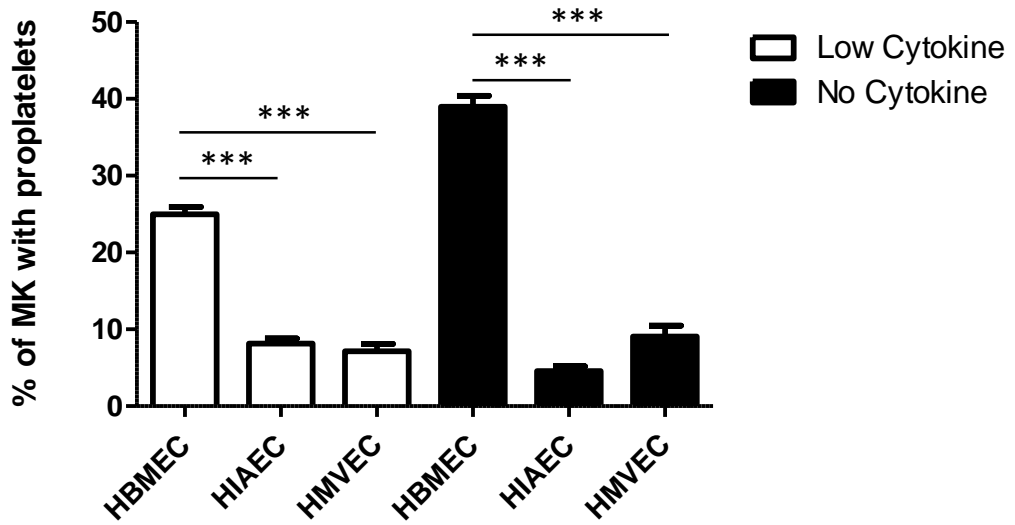
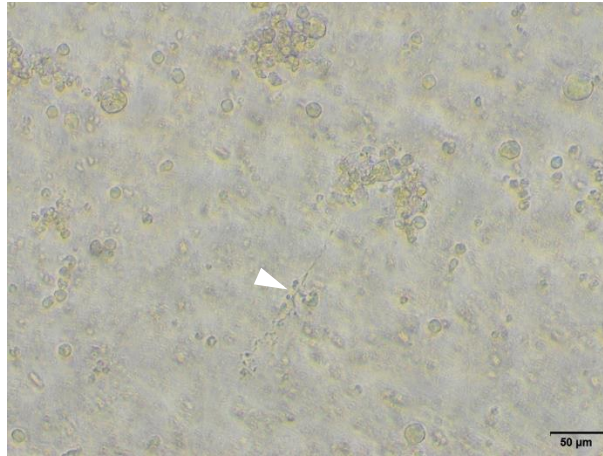


Figure 5 : HBMEC induce proplatelet formation more efficiently than primary endothelial cells from other sources. Percentage of MK extending proplatelets on Human Iliac Artery Endothelial Cells (HIAEC), Human MicroVascular Endothelial Cells (HMVEC) or HBMEC with or without addition of hematopoietic cytokines. Values are the mean values \pm SEM of n=8 (HBMEC) and n=3 (HIAEC, HMVEC) independent experiments. ***p<0.0001 with one-way Anova test.

A



B

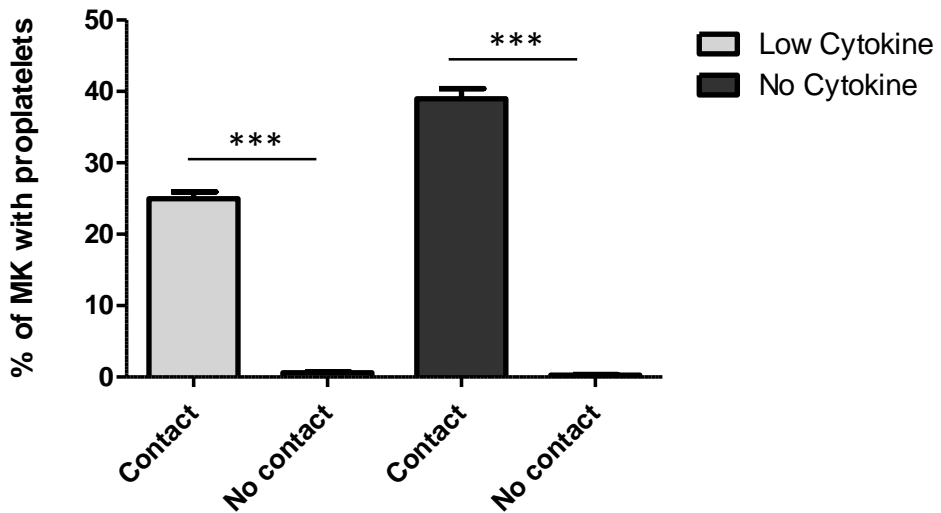


Figure 6 : Cell-cell contact is required for proplatelet formation on HBMEC. A. Representative image of a 6-day culture of MK in the upper chamber of a Transwell in a low cytokine cocktail with HBMEC in the lower chamber (scale bar : 50 μm). Arrowhead is showing a proplatelet. **B.** Percentage of MK with proplatelets with cells in contact with HBMEC or in the upper chamber of a Transwell (No contact), with or without addition of cytokines. n=4 for Transwell conditions and n= 8 for the contact condition. ***p<0.0001 with One way Anova test.

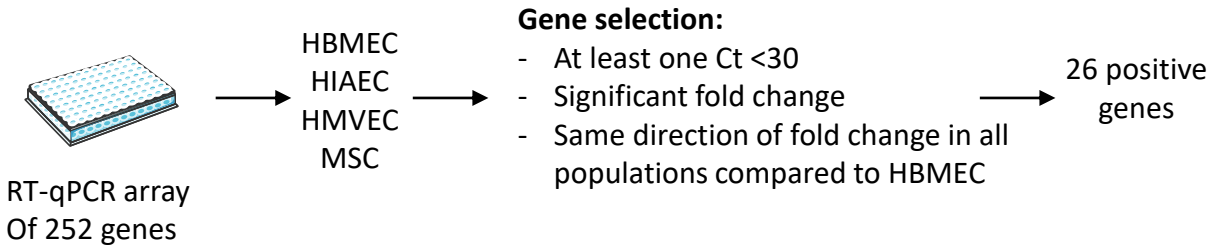
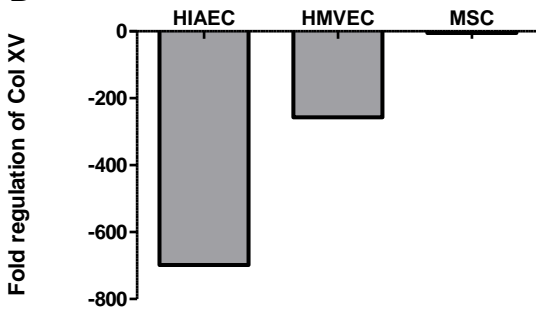
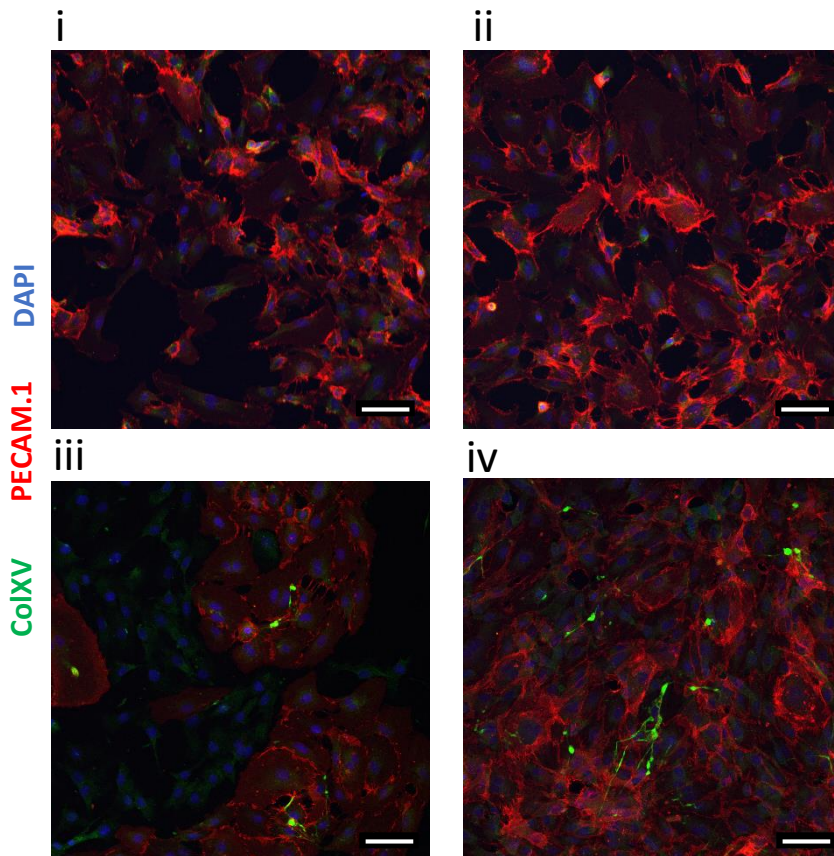
A**B****C**

Figure 7 : RT-qPCR array analysis identifies collagen XV as a candidate effector in HBMEC.

A. Schematic representation of the qPCR-array strategy to identify candidate genes involved in HBMEC specific support of MK maturation. **B.** Relative expression of collagen XV transcripts in HIAEC, HMVEC and MSC compared to HBMEC. **C.** Representative immunofluorescence images illustrating collagen XV expression in green in monolayers of HIAEC (i), HMVEC (ii), a mix of MSC and HBMEC (iii), or pure HBMEC (iv). PECAM-1 is represented in red and DAPI in blue (scale bar : 75 μ m).

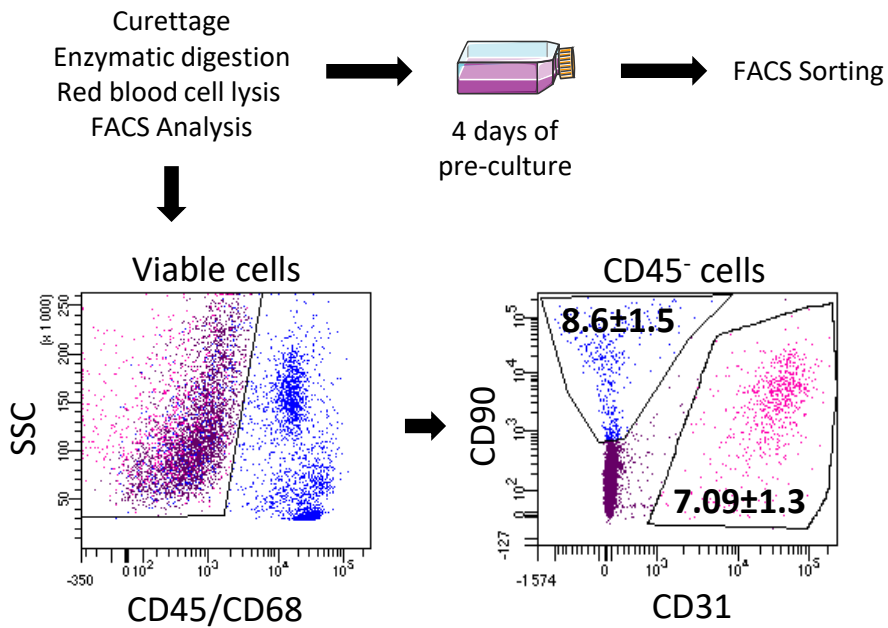


Figure S1 : Method for isolating stromal cells from human bone marrow

(Upper panel) Protocol used for human medullar stromal cells isolation. (Lower panel) Representative dot plots of the stromal cells and percentage of HBMEC and MSC after isolation in the CD45⁻ population. Dot plots are representative of 40 independent experiments. Mean percentage \pm SEM of CD31⁺CD90^{+/-} (HBMEC) and CD31⁻CD90⁺ (MSC) populations are indicated.

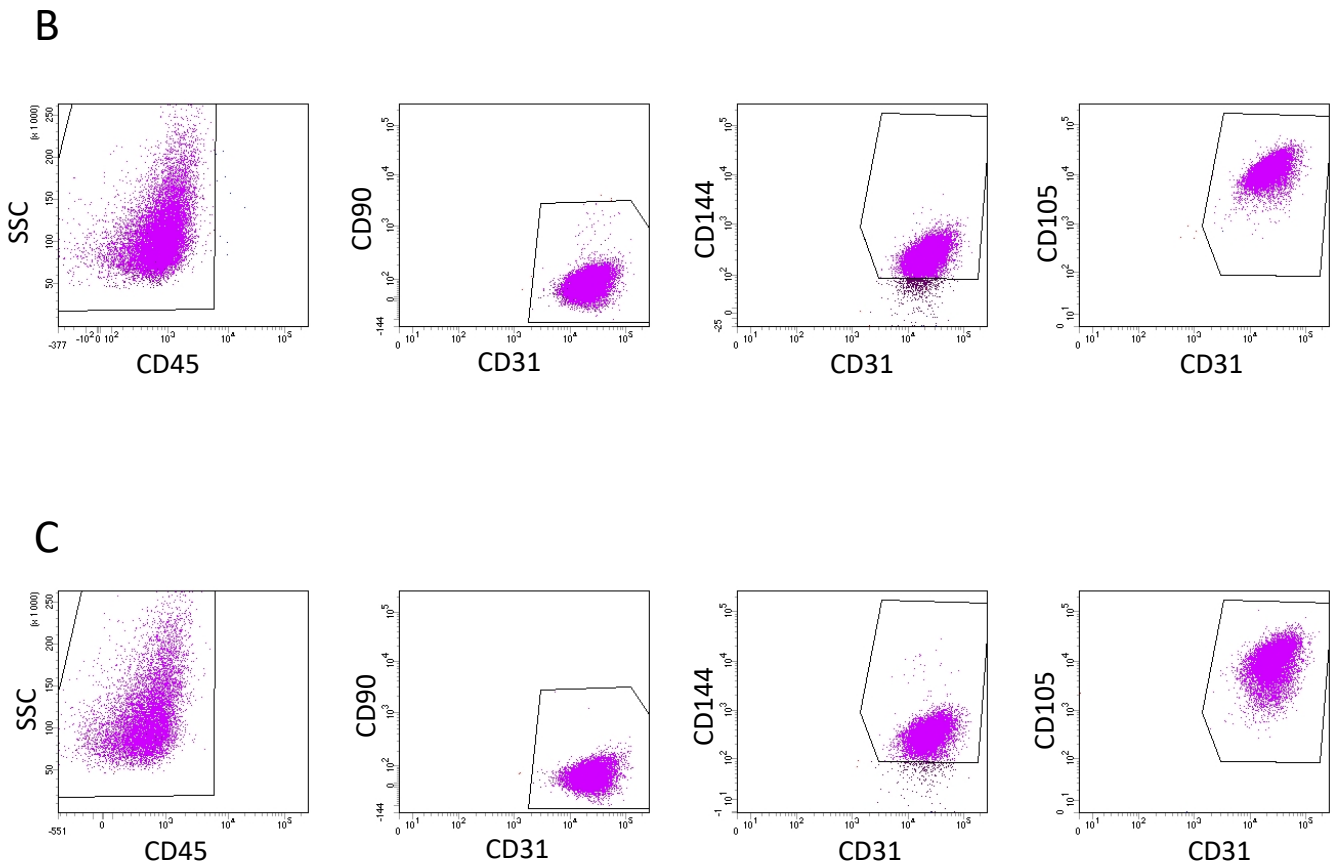
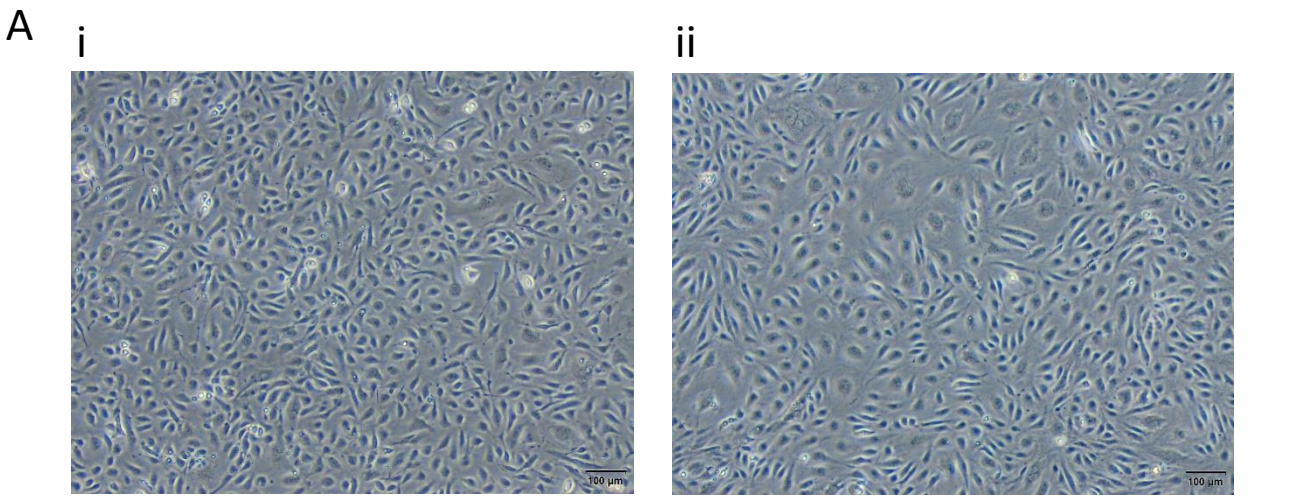
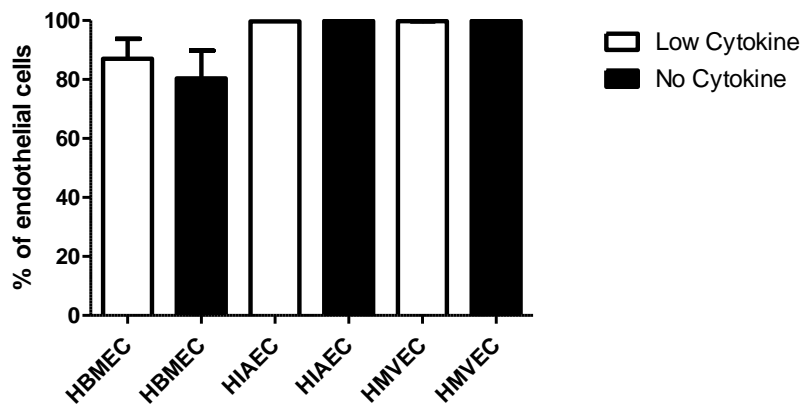


Figure S2 : Phenotype of HIAEC and HMVEC

A. Representative images of (i) HIAEC and (ii) HMVEC monolayers (Scale bar : 100 μm). **B.** FACS analysis of cultured HIAEC. Representative dot plots for CD45, CD31, CD90, CD105 and CD144 expression. **C.** FACS analysis of cultured HMVEC. Representative dot plots for CD45, CD31, CD90, CD105 and CD144 expression.

A



B

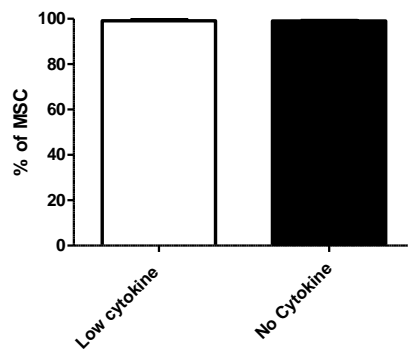


Figure S3 : Phenotype of stromal cells after coculture

Bar graph representing the percentage of the different endothelial cells (A) or MSC (B) in the CD45⁻CD68⁻ fraction of the remaining monolayer after a 6-day coculture (evaluated with flow cytometry). Values are the mean \pm SEM of n=6 (HBMEC), n=2 (HIAEC, HMVEC) and n=3 (MSC) independent experiments.

2. Discussion

Dans cette seconde partie de ma thèse nous nous sommes demandés si les HBMEC procuraient un environnement favorable à la maturation finale des MK.

J'ai pu montrer que ces cellules endothéliales favorisent la production de MK à un stade avancé de maturation par rapport à des MSC provenant du même prélèvement de moelle osseuse. Ceci est illustré par le pourcentage important de cellules capables d'émettre des proplaquettes. Les cultures réalisées en absence de cytokines suggèrent, que les HBMEC exercent par elles-mêmes et de manière directe, un effet sur les MK immatures pour les amener à un stade de maturation avancé. La comparaison avec des cellules endothéliales provenant d'autres organes indique des propriétés et mécanismes restreints aux HBMEC. Ces résultats vont dans le sens de ce qui avait été suggéré par S. Rafii et prolongent ces travaux (Hamada et al., 1998; Rafii et al., 1995; Rafii et al., 1994). Dans notre étude, un soin particulier a été porté à la vérification du phénotype du stroma utilisé. Ainsi la pureté des cellules stromales a été contrôlée avant et après la co-culture et les cellules ont été utilisées uniquement à passage 0. Je me suis intéressée aux étapes finales de maturation et d'émission de proplaquettes, un aspect qui n'avait pas été développé jusqu'ici. Enfin, la spécialisation des HBMEC, qui n'avait auparavant été mise en avant qu'en comparaison avec des cellules HUVEC a été démontrée ici en utilisant des cellules endothéliales primaires et adultes dont seule l'origine diffère avec les HBMEC, rendant ainsi possible l'identification de gènes candidats par analyse transcriptomique différentielle.

Mise au point et caractérisation des cultures d'HBMEC

Les HBMEC contrairement aux MSC, sont des cellules particulièrement difficiles à cultiver et dont le phénotype peut ne pas se maintenir en culture. Au cours de cette étude, le phénotype des HBMEC a été validé phénotypiquement mais également fonctionnellement. En plus de l'utilisation des cellules à P0 uniquement, la pureté des HBMEC a été vérifiée avant et après la co-culture par cytométrie. Les conditions de culture ont été adaptées pour permettre une expansion optimale des HBMEC et restreindre une dérive au cours des passages et de la co-culture avec l'apparition d'une population au phénotype mésenchymateux au détriment des HBMEC. Pour cela nous avons évalué l'effet de la présence ou non d'un coating de gélatine et

comparé différents milieux plus ou moins riches en sérum (EGM2 versus EGM2-MV) (Lonza). Les conditions sélectionnées ont été la présence de gélatine et le milieu EGM2-MV. En cas de dérive observée l'hypothèse de transition endothélio-mésenchymateuse (Endo-MT) est privilégiée par rapport à une contamination avec des MSC qui semble peu probable au vu de la pureté des EC vérifiée après le tri et qui ne contenaient aucune cellule dans la fenêtre des MSC (données non montrées). Une tentative de tri de cette population mixte lors d'une dérive n'a pas permis de conserver leur phénotype de cellule endothéliale plus longtemps en culture. Suite à ces observations, nous n'avons entrepris de co-culture qu'avec des puits d'HBMEC ne présentant aucune dérive par observation préalable au microscope optique. Ces puits ont par ailleurs été analysés en cytométrie permettant de définir une moyenne de 88% d'HBMEC, un niveau de pureté qui s'est avéré suffisant pour déduire les propriétés propres aux HBMEC. A la fin des co-cultures cette pureté a été vérifiée et s'est maintenue à un niveau minimum de 80%. Pour les expériences futures, il serait évidemment préférable de pouvoir maintenir une population pure ce qui nécessiterait l'évaluation d'autres types de milieux. Une piste possible serait de bloquer les effets du TGF β connu pour induire l'Endo-MT (Cooley et al., 2014; Pardali et al., 2017), en incluant un antagoniste des récepteurs au TGF β tel que le GW 788388 (Tocris). Une autre intervention possible serait d'optimiser les concentrations de FGF (Fibroblast Growth Factor), un facteur présent dans la moelle osseuse qui inhibe l'Endo-MT (Chen et al., 2012) et participe au maintien des cellules endothéliales.

Choix du milieu de culture : un compromis imposé par la co-culture de cellules aux besoins différents

Les co-cultures n'ont pas été réalisées dans un milieu de culture classiquement utilisé pour la différenciation des MK mais dans le milieu EGM2-MV, un milieu destiné à la culture de cellules endothéliales. Ceci apporte un argument supplémentaire en faveur d'un effet propre des HBMEC indépendant de l'ajout de cytokines hématopoïétiques utilisées dans les milieux favorisant la mégacaryopoïèse. Il faut cependant tenir compte du fait que le milieu EGM2-MV contient 5% de sérum dont il est difficile de connaître la composition en cytokines et notamment en TPO, la cytokine principale de la mégacaryopoïèse. Néanmoins plusieurs données permettent de supposer que le sérum n'a que peu d'influence sur les effets observés. Des co-cultures réalisées en milieu EGM-2 qui ne contient que 2% de sérum montrent une

capacité équivalente des HBMEC à soutenir la production de MK avec proplaquettes (Figure 18). De plus, les concentrations estimées de TPO provenant du sérum (Kosugi et al., 1996) sont de l'ordre de 3 fg/mL dans le milieu EGM2-MV alors que les concentrations habituellement utilisées pour différencier des MK *in vitro* sont comprises entre 50 et 100 ng/mL (Hamada et al., 1998; Strassel et al., 2016) permettant d'éliminer l'influence de cette cytokine dans les effets observés en co-culture. Enfin, la culture de MK immatures dans le milieu EGM2-MV sans cellules stromales ne permet pas d'obtenir de proplaquettes renforçant l'hypothèse que les cytokines présentes dans le milieu ne sont pas des acteurs majeurs.

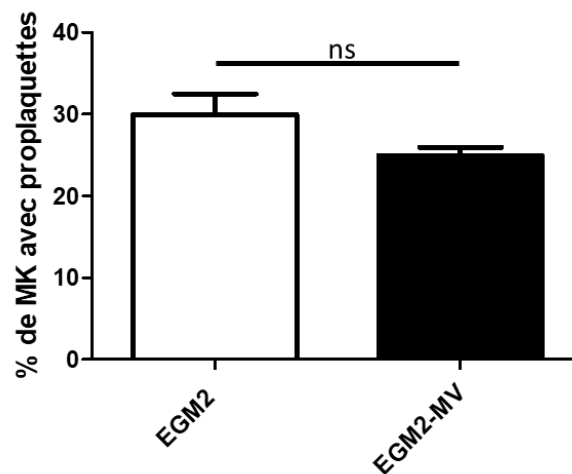


Figure 18 : La production de proplaquettes ne dépend pas de la concentration en sérum du milieu utilisé. Histogramme représentatif du pourcentage de MK émettant des proplaquettes sur le stroma HBMEC en condition faible de cytokines “Low cytokine” en EGM2 (2% de sérum) ou EGM2-MV (5% de sérum). Les valeurs sont des moyennes±SEM de n=2 (EGM2) et n=8 (EGM2-MV) expériences indépendantes. ns = non significatif, test de Student.

Différentes compositions de stroma selon le territoire osseux

Les HBMEC et les MSC utilisées dans cette étude proviennent d'une pièce anatomique, le plateau tibial, qui n'est pas habituellement utilisée pour l'étude de l'hématopoïèse. Celles-ci proviennent plus souvent de tête de fémur ou de crête iliaque. Au début de l'étude, les HBMEC et les MSC ont été isolées à partir de tête de fémur par une procédure nécessitant une étape de déplétion des cellules CD45⁺ par sélection négative par billes magnétiques. La moelle de plateau tibial (PT) contenant beaucoup moins de leucocytes (données non montrées) a permis

de s'affranchir de cette étape et a permis de plus d'obtenir un nombre bien plus important d'HBMEC malgré la plus faible quantité de tissu récupérée par échantillon (Figure 19). Ceci suggère une vascularisation plus riche de la moelle au niveau du PT, un point qui n'a pas encore été examiné à ce jour. Par ailleurs les HBMEC provenant de PT ont montré une tendance EndoMT beaucoup moins importante. Ces résultats indiquent que des différences notables existent selon le territoire osseux en termes de vascularisation et plus largement de microenvironnement cellulaire. Ceci pourrait être évalué en comparant différentes sources de moelle provenant d'os du crâne (souvent observé en imagerie intravitale chez la souris) ou encore de crête iliaque siège d'une forte hématopoïèse chez l'adulte.

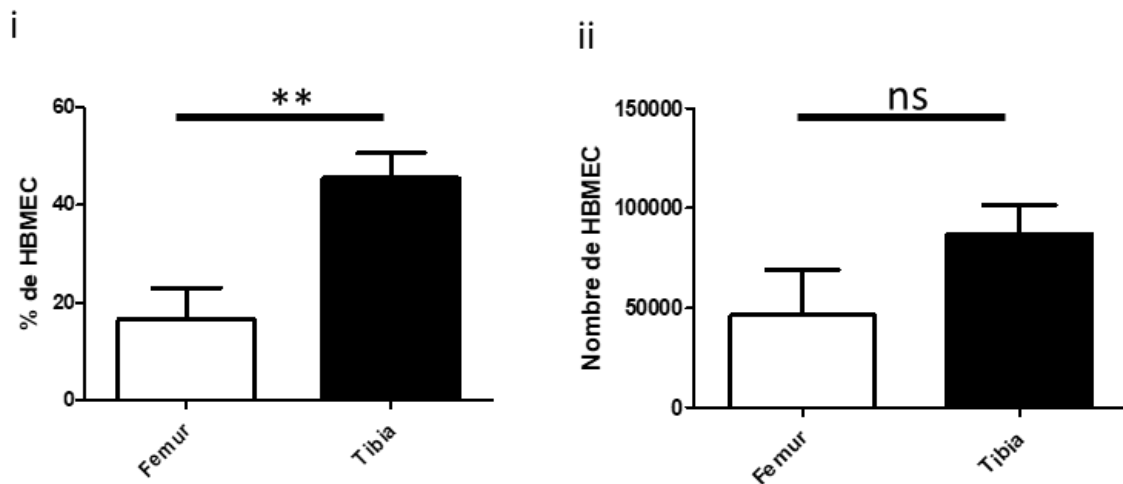


Figure 19 : La proportion et le nombre de HBMEC obtenus sont plus importants à partir de plateau tibial. Graphe représentant le pourcentage (i) ou le nombre (ii) de HBMEC au moment du tri (préculture de 4 jours) en fonction de l'origine de la moelle: plateau tibial ou fémur. (i) Les valeurs sont des moyennes±SEM de n=8 (fémur) et n=19 (plateau tibial) expériences indépendantes. (ii) Les valeurs sont des moyennes±SEM de n=6 (fémur) et n=31 (plateau tibial) expériences indépendantes. **p<0.005 ; ns = non significatif, test de Student.

Les résultats observés s'appliquent-ils quelle que soit l'origine des progéniteurs CD34⁺ ?

Les MK immatures utilisés dans les expériences de co-culture ont été prédifférenciés selon un protocole établi au laboratoire à partir de cellules CD34⁺ issues de sang circulant de donateurs sains, plus précisément à partir de filtres de déleucocytation utilisés dans la préparation des produits transfusionnels (globules rouges, plaquettes et plasma) (Strassel et al., 2016). Il reste

à évaluer si des cellules issues de patients mobilisés, de moelle ou de sang de cordon ombilical qui sont plus fréquemment utilisées pour la différenciation de MK en culture présentent les mêmes capacités de maturation en présence d'HBMEC (Van Epps et al., 1994). Nous sommes déjà en mesure d'évaluer les CD34⁺ isolées à partir de PT ou de tête de fémur dont la présence a été déjà vérifiée par cytométrie en flux (données non montrées).

L'origine artérielle ou veineuse des HBMEC a-t'elle une influence ?

Il serait intéressant de pouvoir séparer les cellules endothéliales artérielles et sinusoides. En effet, nous avons vu dans la partie A.IV.2.a de l'introduction générale que les MK étaient préférentiellement situés à proximité des sinusoides au sein de la moelle osseuse. Cette séparation semble possible chez la souris (N. Brouard, résultats non montrés) mais n'est pas encore envisageable chez l'Homme où la caractérisation des vaisseaux s'est limitée à l'analyse histologique. De plus, les marqueurs utilisés jusqu'ici l'ont été principalement en imagerie et restent à valider en cytométrie en flux. La validation chez l'Homme des marqueurs sinusoides décrits chez la souris permettrait d'étudier un rôle différentiel des cellules endothéliales artérielles et sinusoides dans la mégacaryopoïèse.

Pertinence de l'analyse différentielle pour identifier des effecteurs et évaluation des candidats retenus dans la 1^{ère} analyse

La différence observée entre les HBMEC, les MSC et les autres cellules endothéliales pour soutenir la maturation des MK a laissé supposer un programme d'expression particulier dans les HBMEC. Pour l'évaluer, une analyse différentielle par RT-qPCR array a été engagée. Une limite de cette approche est que les différences fonctionnelles observées entre les types cellulaires pourraient intervenir au niveau post-transcriptionnel. De plus, nous avons choisi de cibler un nombre restreint de gènes. Malgré ces limites nous avons pu identifier une protéine, le col XV, présentant des caractéristiques compatibles avec un rôle particulier des HBMEC par un mécanisme contact dépendant. Son expression protéique est spécifique des HBMEC dans notre étude. Pour évaluer l'implication du col XV, des cultures de MK immatures sur du col XV recombinant humain sont envisagées. Une deuxième approche sera d'induire l'expression de col XV dans les HIAEC et HMVEC et d'évaluer leur capacité à reproduire les propriétés des

HBMEC. A terme, une étude plus systématique du transcriptome complet des HMVEC, HIAEC, HBMEC et MSC est envisageable pour compléter l'identification de candidats potentiels.

Au-delà du col XV l'approche par RT-qPCR array a permis d'identifier d'autres candidats intéressants (voir tableau 3). Les CD83 et CD79b sont intéressants de par leur forte différence d'expression entre les HBMEC et les autres cellules stromales testées. Enfin, deux métalloprotéases, les MMP-2 et MMP-14 pourraient être impliquées dans les phases finales de transmigration des proplaquettes au travers de l'endothélium en permettant la digestion des composants de la lame basale.

En conclusion, nous avons établi un nouveau modèle de co-culture basé uniquement sur des cellules primaires et humaines. Notre système permet de ne pas ou peu rajouter de cytokines hématopoïétiques dans le but de ne pas interférer dans les interactions entre les cellules stromales et hématopoïétiques. Ce modèle pourra être utilisé afin d'étudier les phénomènes de transmigration des proplaquettes et MK ou encore d'évaluer l'interaction des HBMEC ou MSC avec des CSH provenant de ces mêmes prélèvements. Nous avons également mis en évidence un mécanisme spécifique aux cellules médullaires restant encore à définir

TRAVAIL DE THÈSE - PARTIE 2

Description	Nombre de cycles (Ct)				Fold change		
	HIAEC	HMVEC	MSC	Groupe contrôle HBMEC	HIAEC	HMVEC	MSC
CD44 molecule (Indian blood group)	23.23	24.09	24.3	27.05	7.3208	7.0911	7.6105
Collagen, type XV, alpha 1	35	34.37	29.07	26.5	0.0014	0.0039	0.1905
Collagen, type V, alpha 1	25.15	27.41	23.89	29.2	8.5861	3.1514	44.88
Collagen, type VIII, alpha 1	25.99	27.98	26.76	30.67	13.2875	5.8807	17.0063
Intercellular adhesion molecule 1	25.97	26.78	30.31	25.38	0.3444	0.3453	0.0371
Matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)	26.13	26.74	27.11	28.37	2.4487	2.8206	2.7094
Platelet/endothelial cell adhesion molecule	25.66	25.35	34.01	23.31	0.1017	0.2216	0.0007
Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	23.76	24.41	18.34	25.76	2.0734	2.323	193.7429
Thrombospondin 1	18.22	19.66	20.04	20.99	3.5357	2.291	2.1856
Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	30.56	30.62	29.94	27.13	0.0624	0.1129	0.238
Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	20.71	21.5	22.31	20.05	0.427	0.4659	0.3499
Chemokine (C-C motif) ligand 2	25.31	25.79	28.69	23.68	0.2179	0.2948	0.0519
Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	23.23	24.43	24.97	25.31	2.851	2.3415	2.1179
Matrix metallopeptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	22.31	24.58	22.21	26.34	10.9768	4.2942	29.1859
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	26.97	28.79	27.34	33.11	47.3856	25.323	91.1866
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	27.24	28.37	33.44	26.7	0.4621	0.3984	0.0156
Von Willebrand factor	23.22	25.74	35	22	0.2895	0.0952	0.0002
CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	28.57	29.72	28.43	27.55	0.1056	0.071	0.1516
CD63 molecule	20.75	21.75	20.44	20.45	0.1739	0.1298	0.2809
CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta	30.65	30.87	35	28.82	0.0602	0.0772	0.0038
CD83 molecule	31.34	33.08	31.14	28.96	0.0411	0.0184	0.0616
Carbohydrate sulfotransferase 10	28.42	29.2	28.97	28.22	0.1863	0.162	0.1659
Myosin, heavy chain 10, non-muscle	26.17	27.45	26.59	26.89	0.3526	0.2167	0.3434
5'-nucleotidase, ecto (CD73)	25.29	26.15	25.17	25.17	0.197	0.162	0.2789
TEK tyrosine kinase, endothelial	25.36	26.01	32.2	26.33	0.4193	0.3989	0.0048

Tableau 3 : Liste des gènes sélectionnés par RT-qPCR array.

Ces gènes ont été sélectionnés suite à une expérience de RT-qPCR sur 252 gènes. La méthode de sélection est décrite dans l'article 2.

C. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Durant la mégacaryopoïèse, une CSH va progressivement s'engager, proliférer puis se différencier en progéniteur MK qui après maturation va émettre des proplaquettes au travers des sinusoides et libérer les plaquettes dans la circulation sanguine. Ce processus a lieu dans le foie fœtal durant l'embryogenèse et dans la moelle osseuse chez l'adulte. Bien que la structure et la composition de ces tissus diffèrent, leur capacité commune à soutenir efficacement l'ensemble des étapes de la mégacaryopoïèse indique l'existence dans ces organes d'un microenvironnement présentant des propriétés communes. Le microenvironnement regroupe les éléments cellulaires mais également les facteurs solubles et les protéines de matrice extracellulaire. La connaissance des acteurs du microenvironnement influençant spécifiquement la mégacaryopoïèse est à ce jour encore très incomplète et représente un frein pour reproduire efficacement ce processus *in vitro*.

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a été d'étudier le microenvironnement cellulaire du FF murin et d'évaluer sa capacité à soutenir la mégacaryopoïèse à partir de CSH humaines. Le deuxième objectif a été d'étudier les cellules stromales de la moelle osseuse impliquées plus particulièrement dans les phases finales de la mégacaryopoïèse dans un système *in vitro* entièrement humain. Ces deux parties complémentaires m'ont permis d'aborder l'ensemble des étapes allant de la CSH au MK mature capable d'émettre des proplaquettes. Ces travaux se sont inscrits dans une thématique commune du laboratoire visant une meilleure compréhension des mécanismes intervenant dans la mégacaryopoïèse avec comme application la production de plaquettes *in vitro*.

Le microenvironnement cellulaire du foie fœtal : particularités de la population V⁺P⁻

Le foie fœtal est un site majeur de l'hématopoïèse durant l'embryogenèse. Il est colonisé par les CSH à partir de E11 chez la souris (Morrison et al., 1995) et est le lieu de leur expansion jusqu'à E15.5-E16.5. A partir de E17.5, les CSH migrent dans la moelle osseuse qui restera le siège de l'hématopoïèse chez l'adulte (Christensen et al., 2004). Des MK matures de grande taille sont observés dans le FF murin dès E13 (Gandhi et al., Gordon Research Conference 2013, Galveston) et ils sont capables, *in vitro*, de produire des plaquettes (Schulze, 2012). Le

DISCUSSION GÉNÉRALE

FF possède donc à un stade donné, un microenvironnement favorable à la production de MK matures capables de donner ensuite des plaquettes. Dans la première partie de cette thèse je me suis intéressée aux cellules non hématopoïétiques présentes dans le FF et à leur capacité à soutenir la mégacaryopoïèse. A partir de FF à E13.5, période d'expansion des progéniteurs hématopoïétiques, nous avons pu isoler trois populations stromales sur l'expression différentielle de VCAM-1 et PDGFR α (Platelet Derived Growth Factor receptor α), dont deux sont de type mésenchymateux et une population de progéniteurs hépatiques. Cette dernière, de phénotype V⁺P⁻ a montré dans des cocultures en présence de CSH murines qu'elle favorisait la production de MK, ceci dans un milieu restreint en cytokines hématopoïétiques. J'ai pu montrer que ces propriétés s'appliquaient également aux CSH d'origine humaine indiquant l'existence d'un mécanisme commun. Ainsi, le stroma V⁺P⁻ permet, en comparaison aux deux autres populations stromales une meilleure production de MK matures et polyploïdes à partir de CSH humaines provenant de sang circulant. De plus, ce stroma favorise la production de progéniteurs MK présentant un phénotype CD34⁺CD41^{dim} et ayant un fort pouvoir proplaquetogène (Strassel et al., 2016). La population V⁺P⁻ permet donc de soutenir plusieurs étapes de la mégacaryopoïèse, jusqu'à la production de MK humains polyploïdes, à l'exception de la production de proplaquettes et de plaquettes. Plusieurs études avaient déjà démontré que le microenvironnement médullaire murin était compatible *in vitro* pour le soutien de l'hématopoïèse humaine en particulier les lignées comme MS5 (Radtke et al., 2016) ou OP9 (Ji et al., 2008; Van Coppennolle et al., 2009). Nous montrons ici que des cellules stromales hépatiques murines sont également capables de soutenir la mégacaryopoïèse humaine.

Les cellules V⁺P⁻ possèdent les caractéristiques d'un progéniteur hépatique non encore différencié en hépatocyte, ce qui explique leur présence transitoire en si grand nombre lors du développement embryonnaire. Ces cellules n'ont pas *stricto sensu* d'équivalent dans la moelle ou dans d'autres organes chez l'embryon et sont présentes en quantité très faible chez l'adulte. Elles sont très rares chez l'adulte et correspondraient à des cellules souches hépatiques. Les cellules V⁺P⁻ représentent une population de progéniteurs hépatiques qui à E13.5 commencent à se différencier en hépatocytes ou cellules épithéliales biliaires (Ruebner et al., 1990). Les progéniteurs hépatiques présentent des marqueurs de type épithéliaux tels que les cytokératines 18 et 19, EpCam ou la E-cadhérine mais aussi hépatiques avec Dlk1

DISCUSSION GÉNÉRALE

(Tanimizu et al., 2003). La population V⁺P⁻ présente ce phénotype à la fois hépatique et épithélial.

Le mécanisme précis impliqué dans l'action du stroma V⁺P⁻ reste à élucider. Nous avons pu mettre en évidence son caractère contact dépendant, ce qui pourrait orienter vers des récepteurs exprimés à la surface des cellules. La voie de signalisation du récepteur transmembranaire Notch a été impliquée dans la régulation de la mégacaryopoïèse (Mercher et al., 2008). Nous avons pu mettre en évidence une expression exclusive de Jag2, ligand de Notch, par les cellules V⁺P⁻ en comparaison aux autres cellules stromales du FF. Ce couple ligand/récepteur pourrait être à l'origine des résultats obtenus et des études sont en cours pour tester cette hypothèse.

Microenvironnement équivalent dans la moelle osseuse ?

Des cellules stromales de fonctions similaires aux cellules V⁺P⁻ sont vraisemblablement présentes chez l'adulte mais avec a priori un phénotype différent. Une population cellulaire candidate en terme d'action, classiquement décrite comme favorisant la mégacaryopoïèse, est représentée par les MSC (Angelopoulou et al., 2003; Cheng et al., 2000; Hatami et al., 2015; Strassel et al., 2016). En accord avec ces observations j'ai pu montrer que remplacer le stroma V⁺P⁻ par des MSC de moelle osseuse de souris (phénotype CD45⁻CD140a⁺CD105^{-/dim}) permettait une production de MK à partir de CSH humaines équivalente à celle observée sur le stroma V⁺P⁻ (données non montrées), et ceci jusqu'à la production de proplaquettes. Ces cellules présentent donc des propriétés similaires de soutien des stades précoces de la mégacaryopoïèse, mais également de l'étape de maturation, ce qui diffère du stroma V⁺P⁻.

Nous pourrions exploiter ces similitudes d'action entre la population V⁺P⁻ et les MSC adultes, pour réaliser une analyse transcriptomique différentielle en vue d'identifier des effecteurs communs. Une approche s'appuyant sur le développement de lignées immortalisées est également envisageable, soit à partir des V⁺P⁻ ou de MSC. Pour cela est actuellement mise en place une stratégie s'appuyant sur l'utilisation de souris Immorto (Jat et al., 1991) où l'immortalisation des cellules *in vitro* peut être activée de manière thermosensible. Le criblage des clones obtenus sur leur capacité à soutenir ou non la mégacaryopoïèse pourrait permettre de comparer le transcriptome des clones positifs et

DISCUSSION GÉNÉRALE

négatifs. Un criblage avec une banque de siRNA est également envisageable sur la population V⁺P⁻ (soit primaire soit provenant des lignées « immorto » qui seront établies) afin de mettre en évidence un gène responsable de la perte de soutien de la mégacaryopoïèse. Lors des cocultures nous avons observé une forte adhérence des MK au stroma. Cette particularité pourra être utilisée pour sélectionner facilement par microscopie les siRNA d'intérêt. Pour le moment cette phase d'adhésion n'a pas été décrite dans la littérature et il serait intéressant de déterminer si elle est nécessaire pour initier le développement des proplaquettes.

Microenvironnement des étapes finales de la mégacaryopoïèse : propriétés particulières des cellules endothéliales de la moelle

Dans une deuxième partie de mon travail l'accent a été porté sur une population particulière de cellules stromales, les cellules endothéliales vasculaires, idéalement situées d'un point de vue anatomique pour intervenir dans les étapes finales de maturation des MK. Suite aux difficultés rencontrées pour cultiver les cellules endothéliales médullaires murines nous nous sommes par la suite limités aux cellules humaines. Dans ce but j'ai développé une méthode de purification et de culture de cellules endothéliales de moelle osseuse humaine adulte (HBMEC). Il y a une vingtaine d'année, l'équipe de S. Rafii a montré l'implication de l'endothélium dans la différenciation des MK à partir de cellules CD34⁺ et dans leur passage dans la circulation. Ces travaux suggéraient déjà des propriétés particulières des cellules endothéliales de la moelle par comparaison avec les HUVEC et les MSC (Hamada et al., 1998; Rafii et al., 1995; Rafii et al., 1994). Par rapport à cette étude nous avons adapté notre modèle pour nous focaliser sur les étapes finales de maturation des MK et dégager les effets strictement attribuables aux cellules endothéliales. Pour les cellules hématopoïétiques le choix s'est porté non pas sur des HSC mais sur des progéniteurs MK immatures humains et le point de lecture de l'état de maturation a été la formation des proplaquettes. Pour révéler les propriétés intrinsèques des cellules endothéliales, les cultures ont été réalisées en présence de concentrations limitantes de cytokines et *in fine* sans addition de cytokines. Dans ces conditions j'ai pu montrer que les HBMEC permettaient une production efficace de MK matures émettant des proplaquettes. Cet effet a également été observé pour les MSC de moelle mais moins efficacement. De même une moindre efficacité a été observée lorsque les HBMEC ont été comparées à des cellules endothéliales primaires humaines provenant d'autre

DISCUSSION GÉNÉRALE

organes renforçant l'hypothèse d'une spécialisation fonctionnelle des HBMEC. A l'image de ce qui a été observé pour les cellules V⁺P⁻ du foie foetal, l'effet facilitateur des HBMEC dépend du contact entre les cellules. Ceci pourrait impliquer des interactions directes de type récepteur et contre-récepteur entre les deux types cellulaires ou indirectes entre le progéniteur MK et une protéine de matrice ou cytokine sécrétée localement par les HBMEC. Une approche par RT-qPCR a permis d'établir une liste de gènes différentiellement exprimés par les HBMEC par rapport aux MSC et aux autres cellules endothéliales. Les profils d'expression et l'analyse de la littérature nous ont conduit à nous intéresser au col XV.

Rôle possible du collagène XV dans la maturation des MK

Le collagène XV est une protéine de matrice de 1388 acides aminés de la famille des collagènes non fibrillaires. Il est principalement présent au niveau des épithéliums, des nerfs, des muscles mais également de la lame basale des microvaisseaux où il serait idéalement localisé pour interagir avec les progéniteurs MK proches de l'endothélium (Amenta et al., 2005; Myers et al., 1996). Il est associé *in vivo* avec des GAG tels que le dermatan sulfate, la chondroïtine sulfate ou l'héparan sulfate et ces interactions pourraient être à l'origine de fonctions diverses (Amenta et al., 2005). Les souris déficientes pour le col XV présentent un défaut de maturation du système nerveux, des cardiomyopathies et des malformations des capillaires (Clementz and Harris, 2013; Eklund et al., 2001). Le col XV a surtout été étudié dans le contexte du cancer où il inhibe la transition épithélio-mésenchymateuse en interagissant avec la E-cadhérine (Clementz et al., 2013). Son expression corrèle avec le tissu tumoral puisqu'il est retrouvé dans la lame basale des sinusoides dans les carcinomes hépatiques alors qu'il y est absent en condition non pathologique (Kimura et al., 2016). Son interaction avec d'autres cadhérines comme la VE-cadhérine présente dans les jonctions intercellulaires entre cellules endothéliales n'est pas connue. Nos données montrent que l'endothélium des sinusoides n'est pas fenêtré dans la moelle (Anita Eckly, communication personnelle), le col XV pourrait être impliqué dans ce maintien d'un endothélium continu via l'interaction avec la VE-cadhérine. Son expression dans la moelle osseuse humaine n'a pas encore été étudiée. Les premières images obtenues sur les HBMEC en culture indiquent une production de col XV du côté considéré comme apical de ces cellules alors qu'*in situ* la production a lieu du côté basal. Ceci pourrait s'expliquer par une polarisation anormale des HBMEC en conditions de culture. L'implication du col XV dans la maturation des MK pourra être évaluée en cultivant des MK

DISCUSSION GÉNÉRALE

immature directement sur une surface recouverte de cette matrice. Du fait de ses nombreux interactants *in vivo*, il est cependant envisageable que cet effet nécessite la présence d'autres composants de la matrice. Une autre approche pour établir son implication serait alors d'introduire le col XV par transduction dans des cellules endothéliales ne l'exprimant pas et d'observer l'effet sur la maturation des MK.

Rôle des HBMEC d'origine artérielle ou veineuse

Un des points qui n'a pas été abordé dans ce travail concerne l'origine artérielle ou veineuse des HBMEC utilisées en coculture, sachant que les marqueurs utilisés pour trier ces cellules (CD31 ou même CD105) ne permettent pas de les distinguer. Plusieurs marqueurs ont été proposés pour les distinguer essentiellement dans la souris, comme VEGFR3, Sca1, CD73 ou encore SCF, mais qui n'ont été souvent validés qu'*in situ* et n'ont jamais été utilisés pour isoler les deux types de cellules endothéliales (Breitbach et al., 2018; Hooper et al., 2009; Nombela-Arrieta et al., 2013; Xu et al., 2018). Au vu des données montrant une grande proximité entre les MK et les sinusoides (Lichtman et al., 1978; Stegner et al., 2017) l'hypothèse la plus probable est que la maturation finale des MK ait lieu au niveau des sinusoides qui sont de type veineux. La séparation de ces deux types de cellules endothéliales sera requise pour le démontrer. Une deuxième condition sera de pouvoir maintenir la spécificité des deux types de cellules endothéliales en culture après leur isolement.

Applications à des modèles d'étude

Le protocole mis en place pour purifier et cultiver des HBMEC primaires va permettre d'aborder de nouvelles questions pour lesquelles les outils n'étaient pas encore disponibles. Par exemple, la question du mode d'interaction des MK avec les cellules endothéliales et les mécanismes du passage des proplaquettes au travers de la barrière endothéliale. Des études microscopiques de la moelle de souris ont montré que les MK interagissaient avec les cellules endothéliales en émettant des structures ressemblant à des podosomes (Eckly et al., 2019, en révision). L'étude de ces interactions sur des HBMEC en culture pourra permettre d'explorer plus finement les mécanismes et acteurs mis en jeu. De même des observations du passage des proplaquettes ont été réalisées *in situ* et *in vivo* suggérant des mécanismes distincts de

DISCUSSION GÉNÉRALE

ceux observés dans des cultures de MK, par exemple sur l'implication des microtubules (Brown et al., 2018). Ici également des cocultures de MK et d'HBMEC permettront de mieux caractériser ces différences et de modéliser le passage au travers de l'endothélium dans des systèmes de type Transwell. Dans notre système de coculture, il existe une incertitude sur l'orientation apico-basale des cellules endothéliales. Par la suite, l'orientation de ces cellules devra être évaluée et prise en compte puisque l'endothélium est polarisé *in vivo* et cette particularité est sans doute importante pour les mécanismes de passages.

Une autre application envisageable des HBMEC ou lignées dérivées de BMEC de souris, serait de les inclure dans des modèles de culture se rapprochant plus de la moelle. L'approche serait de réunir en 3-D un stroma contenant à la fois des MSC et des cellules endothéliales pour reproduire un système vasculaire. Des systèmes de ce type ont déjà été décrits mais utilisant des cellules endothéliales de type HUVEC dont les propriétés semblent peu adaptées pour soutenir une mégacaryopoïèse efficace. Des matrices à base de biomatériaux de type fibre de soie ou gel de hyaluronan ont été mis au point dans cet objectif (Abbonante et al., 2017; Di Buduo et al., 2018; Tozzi et al., 2018). Des microchambres de culture peuvent être envisagées avec possibilité d'y utiliser différentes matrices et d'y appliquer un flux mimant le flux sanguin (Sieber et al., 2018; Wang et al., 2015). Des puces de type « bone marrow on a chip » sont déjà utilisées dans l'étude de la niche des CSH (Sieber et al., 2018; Torisawa et al., 2014). Ensuite, une reconstruction en utilisant différentes couches cellulaires est également possible (Guduric et al., 2017). Les péricytes, une population de MSC localisées au contact de l'endothélium, pourront également être évalués dans ces modèles. Les sinusoides médullaires en sont partiellement recouverts et plusieurs phénotypes leur sont attribués notamment l'expression du CXCL12 (Acar et al., 2015) et du récepteur à la leptine (Ding et al., 2012). Les péricytes qui recouvrent les vaisseaux sinusoides n'ont pas été pris en compte dans notre modèle de coculture (Bianco, 2011). Leur contribution dans la mégacaryopoïèse est pour le moment inconnue et une modélisation 3D les impliquant permettra de se rapprocher au plus près du microenvironnement *in situ*. Des approches similaires sont utilisées pour recréer des vaisseaux lymphatiques (Gibot et al., 2017) ou des sinusoides hépatiques par exemple (Griffin and Gao, 2017) laissant augurer des progrès dans un proche avenir en vue de modéliser au plus près l'environnement 3D de la moelle osseuse.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Enfin, les protocoles mis en place pourraient également permettre l'étude de l'endothélium dans des conditions pathologiques. On peut imaginer qu'en situation inflammatoire ou de lésion de l'endothélium (sepsis, irradiation ou chimiothérapie), les propriétés de soutien de la mégacaryopoïèse soient altérées. Certaines de ces conditions pourront être modélisées *in vitro* en traitant par exemple les HBMEC par des cytokines proinflammatoires ou du LPS et en évaluant la répercussion en cocultures.

En conclusion les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mieux définir le microenvironnement cellulaire impliqué dans la mégacaryopoïèse. Les résultats obtenus nous permettent de conclure qu'il n'existe pas un seul microenvironnement pour la mégacaryopoïèse, mais une succession de microenvironnements permettant chacun de favoriser des étapes précises de ce processus. Ces microenvironnements agissent via des interactions dynamiques entre cellules, comme nous l'avons vu dans ce travail, en produisant des composés solubles ou des matrices. En termes de perspectives, ce travail de thèse permet d'ouvrir des pistes de recherche afin de mieux comprendre les acteurs et mécanismes mis en jeu dans la mégacaryopoïèse avec comme application possible d'améliorer la production de plaquettes *in vitro*.

D. RÉFÉRENCES

- Abbonante, V., Di Buduo, C.A., Gruppi, C., De Maria, C., Spedden, E., De Acutis, A., Staii, C., Raspanti, M., Vozzi, G., Kaplan, D., *et al.* (2017). A new path to platelet production through matrix sensing. *Haematologica*.
- Abdel-Misih, S.R.Z., and Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *The Surgical clinics of North America* 90, 643-653.
- Acar, M., Kocherlakota, K.S., Murphy, M.M., Peyer, J.G., Oguro, H., Inra, C.N., Jaiyeola, C., Zhao, Z., Luby-Phelps, K., and Morrison, S.J. (2015). Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* 526, 126-130.
- Adams, G.B., and Scadden, D.T. (2006). The hematopoietic stem cell in its place. *Nature immunology* 7, 333-337.
- Adams, G.N., Rosenfeldt, L., Frederick, M., Miller, W., Waltz, D., Kombrinck, K., McElhinney, K.E., Flick, M.J., Monia, B.P., Revenko, A.S., *et al.* (2015). Colon cancer growth and dissemination relies upon thrombin, stromal PAR-1, and fibrinogen. *Cancer Research* 75, 4235-4243.
- Aguilar, A., Pertuy, F., Eckly, A., Strassel, C., Collin, D., Gachet, C., Lanza, F., and Leon, C. (2016). Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood* 128, 2022-2032.
- Aird, W.C. (2007). Vascular bed-specific thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, 283-291.
- Aitsebaomo, J., Portbury, A.L., Schisler, J.C., and Patterson, C. (2008). Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity. *Circulation Research* 103, 929-939.
- Alard, J.-E., Ortega-Gomez, A., Wichapong, K., Bongiovanni, D., Horckmans, M., Megens, R.T.A., Leoni, G., Ferraro, B., Rossaint, J., Paulin, N., *et al.* (2015). Recruitment of classical monocytes can be inhibited by disturbing heteromers of neutrophil HNP1 and platelet CCL5. *Science Translational Medicine* 7, 317ra196.
- Albanese, P., Caruelle, D., Frescaline, G., Delbe, J., Petit-Cocault, L., Huet, E., Charnaux, N., Uzan, G., Papy-Garcia, D., and Courty, J. (2009). Glycosaminoglycan mimetics-induced mobilization of hematopoietic progenitors and stem cells into mouse peripheral blood: structure/function insights. *Experimental hematology* 37, 1072-1083.
- Albelda, S.M., Oliver, P.D., Romer, L.H., and Buck, C.A. (1990). EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *Journal of Cell Biology* 110, 1227-1237.
- Allen, T.D., and Dexter, T.M. (1976). Cellular Interrelationships during in vitro Granulopoiesis. *Differentiation* 6, 191-194.
- Amenta, P.S., Scivoletti, N.A., Newman, M.D., Sciancalepore, J.P., Li, D., and Myers, J.C. (2005). Proteoglycan-collagen XV in human tissues is seen linking banded collagen fibers subjacent to the basement membrane. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53, 165-176.

RÉFÉRENCES

- Angelopoulou, M., Novelli, E., Grove, J.E., Rinder, H.M., Civin, C., Cheng, L., and Krause, D.S. (2003). Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Experimental hematology* *31*, 413-420.
- Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K., and Nagasawa, T. (2003). Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* *19*, 257-267.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* *118*, 149-161.
- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental cell* *21*, 193-215.
- Asano, S., Okano, A., Ozawa, K., Nakahata, T., Ishibashi, T., Koike, K., Kimura, H., Tanioka, Y., Shibuya, A., Hirano, T., *et al.* (1990). In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood* *75*, 1602-1605.
- Aschoff (1893). Ueber capillare Embolie von riesenkernhaltigen Zellen. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology* *134*, 11-14.
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C.N., O'Farrell, F.M., and Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* *36*, 451-455.
- Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., *et al.* (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine* *10*, 64-71.
- Avraham, H., Scadden, D.T., Chi, S., Broudy, V.C., Zsebo, K.M., and Gropman, J.E. (1992). Interaction of human bone marrow fibroblasts with megakaryocytes: role of the c-kit ligand. *Blood* *80*, 1679-1684.
- Balduini, A., Pallotta, I., Malara, A., Lova, P., Pecci, A., Viarengo, G., Balduini, C.L., and Torti, M. (2008). Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* *6*, 1900-1907.
- Balduini, C.L., and Noris, P. (2014). Platelet count and aging. *Haematologica* *99*, 953-955.
- Banu, N., Wang, J.F., Deng, B., Gropman, J.E., and Avraham, H. (1995). Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin: the c-Mpl ligand. *Blood* *86*, 1331-1338.
- Barthes, J., Ozcelik, H., Hindie, M., Ndreu-Halili, A., Hasan, A., and Vrana, N.E. (2014). Cell microenvironment engineering and monitoring for tissue engineering and regenerative medicine: the recent advances. *BioMed Research International* *2014*, 921905.

RÉFÉRENCES

- Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.S., Lu, H.S., Martin, F., Chang, M.S., Samal, B., Nichol, J.L., Swift, S., *et al.* (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* **77**, 1117-1124.
- Bartsch, G., Yoo, J.J., De Coppi, P., Siddiqui, M.M., Schuch, G., Pohl, H.G., Fuhr, J., Perin, L., Soker, S., and Atala, A. (2005). Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem cells and development* **14**, 337-348.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiological Reviews* **84**, 869-901.
- Becker, R.P., and De Bruyn, P.P. (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *The American journal of anatomy* **145**, 183-205.
- Begonja, A.J., Pluthero, F.G., Suphamungmee, W., Giannini, S., Christensen, H., Leung, R., Lo, R.W., Nakamura, F., Lehman, W., Plomann, M., *et al.* (2015). FlnA binding to PACSIN2 F-BAR domain regulates membrane tubulation in megakaryocytes and platelets. *Blood* **126**, 80-88.
- Behnke, O. (1967). Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. *Anatomical Record* **158**, 121-137.
- Behnke, O. (1968). An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow: I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *Journal of Ultrastructure Research* **24**, 412-433.
- Belloc, F., Hourdille, P., Fialon, P., Boisseau, M.R., and Soria, J. (1985). Fibrinogen synthesis by megakaryocyte rich human marrow cell concentrates. *Thrombosis Research* **38**, 341-351.
- Bender, M., Thon, J.N., Ehrlicher, A.J., Wu, S., Mazutis, L., Deschmann, E., Sola-Visner, M., Italiano, J.E., and Hartwig, J.H. (2015). Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood* **125**, 860-868.
- Bentfeld-Barker, M.E., and Bainton, D.F. (1982). Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood* **59**, 472-481.
- Bentley, S.A. (1982). Bone marrow connective tissue and the haemopoietic microenvironment. *British Journal of Haematology* **50**, 1-6.
- Benz, C., Copley, M.R., Kent, D.G., Wohrer, S., Cortes, A., Aghaeepour, N., Ma, E., Mader, H., Rowe, K., Day, C., *et al.* (2012). Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell stem cell* **10**, 273-283.
- Berthier, R., Prandini, M.H., Schweitzer, A., Thevenon, D., Martin-Sisteron, H., and Uzan, G. (1997). The MS-5 murine stromal cell line and hematopoietic growth factors synergize to support the megakaryocytic differentiation of embryonic stem cells. *Experimental hematology* **25**, 481-490.

RÉFÉRENCES

- Bertoncello, I., Hodgson, G.S., and Bradley, T.R. (1985). Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine-123 fluorescence. *Experimental hematology* *13*, 999-1006.
- Bertozzi, C.C., Schmaier, A.A., Mericko, P., Hess, P.R., Zou, Z., Chen, M., Chen, C.Y., Xu, B., Lu, M.M., Zhou, D., *et al.* (2010). Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood* *116*, 661-670.
- Besancenot, R., Roos-Weil, D., Tonetti, C., Abdelouahab, H., Lacout, C., Pasquier, F., Willekens, C., Rameau, P., Lecluse, Y., Micol, J.B., *et al.* (2014). JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood* *124*, 2104-2115.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A., Jr. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *84*, 9238-9242.
- Bianco, P. (2011). Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* *117*, 5281-5288.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., and Wang, C.Y. (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine* *19*, 35-42.
- Bieback, K., Kern, S., Kocaomer, A., Ferlik, K., and Bugert, P. (2008). Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Bio-medical materials and engineering* *18*, S71-76.
- Biomox (2018). Simulation of the Perfusion Characteristic of the Liver Tissue.
- Bizzozero, J. (1882). Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* *90*, 261-332.
- Blaauwgeers, H.G., Holtkamp, G.M., Rutten, H., Witmer, A.N., Koolwijk, P., Partanen, T.A., Alitalo, K., Kroon, M.E., Kijlstra, A., van Hinsbergh, V.W., *et al.* (1999). Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *The American Journal of Pathology* *155*, 421-428.
- Blakytyn, R., Ludlow, A., Martin, G.E., Ireland, G., Lund, L.R., Ferguson, M.W., and Brunner, G. (2004). Latent TGF-beta1 activation by platelets. *Journal of cellular physiology* *199*, 67-76.
- Blebea, J.S., Houseni, M., Torigian, D.A., Fan, C., Mavi, A., Zhuge, Y., Iwanaga, T., Mishra, S., Udupa, J., Zhuang, J., *et al.* (2007). Structural and functional imaging of normal bone marrow and evaluation of its age-related changes. *Seminars in nuclear medicine* *37*, 185-194.
- Boneu, B.a.J.P.C. (1997). Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose, 2ème édition edn (Reims).
- Borst, S., Sim, X., Poncz, M., French, D.L., and Gadue, P. (2017). Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Megakaryocytes and Platelets for Disease Modeling and Future Clinical Applications. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *37*, 2007-2013.

RÉFÉRENCES

- Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Barbera, J.P.M., and Zaret, K.S. (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Developmental Biology* 290, 44-56.
- Braet, F., and Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative hepatology* 1, 1-1.
- Breitbach, M., Kimura, K., Luis, T.C., Fuegemann, C.J., Woll, P.S., Hesse, M., Facchini, R., Rieck, S., Jobin, K., Reinhardt, J., *et al.* (2018). In Vivo Labeling by CD73 Marks Multipotent Stromal Cells and Highlights Endothelial Heterogeneity in the Bone Marrow Niche. *Cell stem cell* 22, 262-276 e267.
- Bridgell, R.A., and Hoffman, R. (1990). Cytokine regulation of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* 76, 516-522.
- Brown, E., Carlin, L.M., Nerlov, C., Lo Celso, C., and Poole, A.W. (2018). Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels. *Life science alliance* 1.
- Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., *et al.* (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Journal of Experimental Medicine* 201, 1307-1318.
- Bruno, S., Gunetti, M., Gammaitoni, L., Dane, A., Cavalloni, G., Sanavio, F., Fagioli, F., Aglietta, M., and Piacibello, W. (2003). In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica* 88, 379-387.
- Butler, J.M., Nolan, D.J., Vertes, E.L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A.T., Seandel, M., Shido, K., White, I.A., Kobayashi, M., *et al.* (2010). Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* 6, 251-264.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9, 641-650.
- Caplan, A.I. (2008). All MSCs Are Pericytes? *Cell stem cell* 3, 229-230.
- Carreira, C.M., Nasser, S.M., di Tomaso, E., Padera, T.P., Boucher, Y., Tomarev, S.I., and Jain, R.K. (2001). LYVE-1 Is Not Restricted to the Lymph Vessels. *Cancer Research* 61, 8079.
- Carrington, P.A., Hill, R.J., Stenberg, P.E., Levin, J., Corash, L., Schreurs, J., Baker, G., and Levin, F.C. (1991). Multiple in vivo effects of interleukin-3 and interleukin-6 on murine megakaryocytopoiesis. *Blood* 77, 34-41.
- Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H.E., and Moore, M.A. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56, 289-301.
- Cattoretti, G., Schiro, R., Orazi, A., Soligo, D., and Colombo, M.P. (1993). Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells in vivo and in vitro. *Blood* 81, 1726-1738.

RÉFÉRENCES

- Challen, G.A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J.S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., *et al.* (2011). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature genetics* *44*, 23-31.
- Chamberlain, James, F., Brian, A., and Jim, M. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *25*, 2739-2749.
- Charbord, P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human gene therapy* *21*, 1045-1056.
- Charbord, P., Tavian, M., Humeau, L., and Peault, B. (1996). Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* *87*, 4109-4119.
- Charras, G., and Sahai, E. (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *15*, 813.
- Chen, D., Abrahams, J.M., Smith, L.M., McVey, J.H., Lechler, R.I., and Dorling, A. (2008). Regenerative repair after endoluminal injury in mice with specific antagonism of protease activated receptors on CD34+ vascular progenitors. *Blood* *111*, 4155-4164.
- Chen, J.-Y., Mou, X.-Z., Du, X.-C., and Xiang, C. (2015). Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* *8*, 739-746.
- Chen, J.Y., Miyanishi, M., Wang, S.K., Yamazaki, S., Sinha, R., Kao, K.S., Seita, J., Sahoo, D., Nakauchi, H., and Weissman, I.L. (2016). Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature* *530*, 223-227.
- Chen, P.-Y., Qin, L., Barnes, C., Charisse, K., Yi, T., Zhang, X., Ali, R., Medina, Pedro P., Yu, J., Slack, Frank J., *et al.* (2012). FGF Regulates TGF- β Signaling and Endothelial-to-Mesenchymal Transition via Control of let-7 miRNA Expression. *Cell reports* *2*, 1684-1696.
- Cheng, L., Qasba, P., Vanguri, P., and Thiede, M.A. (2000). Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Journal of cellular physiology* *184*, 58-69.
- Chitu, V., and Stanley, E.R. (2015). PACSIN2: a BAR-riever forming the megakaryocyte DMS. *Blood* *126*, 5-6.
- Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C., and Hunt, P. (1995). Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* *85*, 402.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development (Cambridge, England)* *125*, 725-732.
- Christensen, J.L., Wright, D.E., Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2004). Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS biology* *2*, E75.

RÉFÉRENCES

- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., *et al.* (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* *91*, 3527-3561.
- Ciriza, J., Thompson, H., Petrosian, R., Manilay, J.O., and Garcia-Ojeda, M.E. (2013). The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: lessons learned and possible clinical applications. *Experimental hematology* *41*, 411-423.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* *3 Suppl 3*, S131-139.
- Claushuis, T.A.M., Van Der Veen, A.I.P., Horn, J., Schultz, M.J., Houtkooper, R.H., Van 't Veer, C., and Van Der Poll, T. (2018). Platelet Toll-like receptor expression and activation induced by lipopolysaccharide and sepsis. *Platelets*, 1-9.
- Clementz, A.G., and Harris, A. (2013). Collagen XV: exploring its structure and role within the tumor microenvironment. *Molecular cancer research : MCR* *11*, 1481-1486.
- Clementz, A.G., Mutolo, M.J., Leir, S.H., Morris, K.J., Kucybala, K., Harris, H., and Harris, A. (2013). Collagen XV inhibits epithelial to mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma cells. *PLoS one* *8*, e72250.
- Cline, J.M., and Maronpot, R.R. (1985). Variations in the histologic distribution of rat bone marrow cells with respect to age and anatomic site. *Toxicologic pathology* *13*, 349-355.
- Cooley, B.C., Nevado, J., Mellad, J., Yang, D., St Hilaire, C., Negro, A., Fang, F., Chen, G., San, H., Walts, A.D., *et al.* (2014). TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Science translational medicine* *6*, 227ra234-227ra234.
- Coşkun, S., Chao, H., Vasavada, H., Heydari, K., Gonzales, N., Zhou, X., de Crombrughe, B., and Hirschi, K.K. (2014). Development of the fetal bone marrow niche and regulation of HSC quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells. *Cell reports* *9*, 581-590.
- Coutu, D.L., Kokkaliaris, K.D., Kunz, L., and Schroeder, T. (2017a). Multicolor quantitative confocal imaging cytometry. *Nature Methods* *15*, 39-46.
- Coutu, D.L., Kokkaliaris, K.D., Kunz, L., and Schroeder, T. (2017b). Three-dimensional map of nonhematopoietic bone and bone-marrow cells and molecules. *Nature biotechnology* *35*, 1202-1210.
- Couvelard, A., Scoazec, J.Y., Dauge, M.C., Bringuier, A.F., Potet, F., and Feldmann, G. (1996). Structural and functional differentiation of sinusoidal endothelial cells during liver organogenesis in humans. *Blood* *87*, 4568-4580.
- Crisan, M., Corselli, M., Chen, W.C.W., and Péault, B. (2012). Perivascular cells for regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* *16*, 2851-2860.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., *et al.* (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* *3*, 301-313.

RÉFÉRENCES

- Cumano, A., Ferraz, J.C., Klaine, M., Di Santo, J.P., and Godin, I. (2001). Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* *15*, 477-485.
- Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual review of immunology* *25*, 745-785.
- Dalm, V.A.S.H., Driessen, G.J.A., Barendregt, B.H., van Hagen, P.M., and van der Burg, M. (2015). The 11q Terminal Deletion Disorder Jacobsen Syndrome is a Syndromic Primary Immunodeficiency. *Journal of clinical immunology* *35*, 761-768.
- de Graaf, J.C., Banga, J.D., Moncada, S., Palmer, R.M., de Groot, P.G., and Sixma, J.J. (1992). Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* *85*, 2284-2290.
- de Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., Kuang, W.J., *et al.* (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* *369*, 533-538.
- Debili, N., Masse, J.M., Katz, A., Guichard, J., Breton-Gorius, J., and Vainchenker, W. (1993). Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood* *82*, 84.
- Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebe, L., Layrolle, P., Haupl, T., *et al.* (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* *111*, 2631-2635.
- Deutsch, V.R., and Tomer, A. (2006). Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology* *134*, 453-466.
- Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Journal of cellular physiology* *91*, 335-344.
- Di Buduo, C.A., Abbonante, V., Tozzi, L., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2018). Three-Dimensional Tissue Models for Studying Ex Vivo Megakaryocytopoiesis and Platelet Production. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* *1812*, 177-193.
- Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* *481*, 457-462.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315-317.
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., and Dick, J.E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature immunology* *11*, 585-593.

RÉFÉRENCES

- Eckly, A., Heijnen, H., Pertuy, F., Geerts, W., Proamer, F., Rinckel, J.-Y., Léon, C., Lanza, F., and Gachet, C. (2014). Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* *123*, 921-930.
- Eckly, A., Strassel, C., Freund, M., Cazenave, J.P., Lanza, F., Gachet, C., and Leon, C. (2009). Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood* *113*, 3182-3189.
- Eklund, L., Piuholta, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fässler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T., *et al.* (2001). Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice, Vol 98.
- Emerson, S.G., Yang, Y.C., Clark, S.C., and Long, M.W. (1988). Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 have overlapping but distinct hematopoietic activities. *Journal of Clinical Investigation* *82*, 1282-1287.
- Enzan, H., Hara, H., Yamashita, Y., Ohkita, T., and Yamane, T. (1983). Fine structure of hepatic sinusoids and their development in human embryos and fetuses. *Acta pathologica japonica* *33*, 447-466.
- Erber, W.N., Breton-Gorius, J., Villeval, J.L., Oscier, D.G., Bai, Y., and Mason, D.Y. (1987). Detection of cells of megakaryocyte lineage in haematological malignancies by immuno-alkaline phosphatase labelling cell smears with a panel of monoclonal antibodies. *British Journal of Haematology* *65*, 87-94.
- Erickson-Miller, C.L., Ji, H., and Murphy, M.J., Jr. (1993). Megakaryocytopoiesis and platelet production: does stem cell factor play a role? *Stem cells (Dayton, Ohio)* *11 Suppl 2*, 163-169.
- Escolar, G., Lopez-Vilchez, I., Diaz-Ricart, M., White, J.G., and Galan, A.M. (2008). Internalization of tissue factor by platelets. *Thrombosis Research* *122*, S37-S41.
- Escolar, G., and White, J.G. (1991). The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood cells* *17*, 467-485; discussion 486-495.
- Favier, R., Jondeau, K., Boutard, P., Grossfeld, P., Reinert, P., Jones, C., Bertoni, F., and Cramer, E.M. (2003). Paris-Trousseau syndrome : clinical, hematological, molecular data of ten new cases. *Thrombosis and haemostasis* *90*, 893-897.
- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., and Greaves, M.F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* *75*, 2417-2426.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* *376*, 66-70.
- Franco, R.S. (2009). The measurement and importance of red cell survival. *American journal of hematology* *84*, 109-114.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* *4*, 267-274.

RÉFÉRENCES

- Fujiki, H., Kimura, T., Minamiguchi, H., Harada, S., Wang, J., Nakao, M., Yokota, S., Urata, Y., Ueda, Y., Yamagishi, H., *et al.* (2002). Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture. *Experimental hematology* 30, 1373-1380.
- Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 12355.
- Galley, H.F., and Webster, N.R. (2004). Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia* 93, 105-113.
- Gibot, L., Galbraith, T., Bourland, J., Rogic, A., Skobe, M., and Auger, F.A. (2017). Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for in vitro studies of lymphangiogenesis. *Nature protocols* 12, 1077-1088.
- Gissen, P., and Arias, I.M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of hepatology* 63, 1023-1037.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 183, 1797-1806.
- Goodman, J.W., and Hodgson, G.S. (1962). Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 19, 702-714.
- Gordillo, M., Evans, T., and Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. *Development (Cambridge, England)* 142, 2094-2108.
- Goswami, R., and Kaplan, M.H. (2011). A brief history of IL-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186, 3283-3288.
- Griffin, C.T., and Gao, S. (2017). Building discontinuous liver sinusoidal vessels. *Journal of Clinical Investigation* 127, 790-792.
- Grozovsky, R., Begonja, A.J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J.H., Falet, H., and Hoffmeister, K.M. (2015). The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nature medicine* 21, 47-54.
- Grüneboom, A., Hawwari, I., Weidner, D., Culemann, S., Müller, S., Henneberg, S., Brenzel, A., Merz, S., Bornemann, L., Zec, K., *et al.* (2019). A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nature Metabolism* 1, 236-250.
- Guduric, V., Metz, C., Siadous, R., Bareille, R., Levato, R., Engel, E., Fricain, J.-C., Devillard, R., Luzanin, O., and Catros, S. (2017). Layer-by-layer bioassembly of cellularized polylactic acid porous membranes for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 28, 78.
- Guo, Y., Zhang, X., Huang, J., Zeng, Y., Liu, W., Geng, C., Li, K.W., Yang, D., Wu, S., Wei, H., *et al.* (2009). Relationships between hematopoiesis and hepatogenesis in the midtrimester fetal liver characterized by dynamic transcriptomic and proteomic profiles. *PloS one* 4, e7641.

RÉFÉRENCES

- Gurevitch, O., Slavin, S., and Feldman, A.G. (2007). Conversion of red bone marrow into yellow - Cause and mechanisms. *Medical hypotheses* 69, 531-536.
- Haas, S., Hansson, J., Klimmeck, D., Loeffler, D., Velten, L., Uckelmann, H., Wurzer, S., Prendergast, A.M., Schnell, A., Hexel, K., *et al.* (2015). Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell stem cell* 17, 422-434.
- Hamada, T., Mohle, R., Hesselgesser, J., Hoxie, J., Nachman, R.L., Moore, M.A., and Rafii, S. (1998). Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *Journal of Experimental Medicine* 188, 539-548.
- Handagama, P., Scarborough, R.M., Shuman, M.A., and Bainton, D.F. (1993). Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa). *Blood* 82, 135-138.
- Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., and Proudfoot, A.E. (2005). Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annual review of biochemistry* 74, 385-410.
- Hartsock, R.J., Smith, E.B., and Petty, C.S. (1965). Normal Variations with Aging of the Amount of Hematopoietic Tissue in Bone Marrow from the Anterior Iliac Crest. A Study Made from 177 Cases of Sudden Death Examined by Necropsy. *American journal of clinical pathology* 43, 326-331.
- Hassan, H.T., and Zander, A.R. (1996). Thrombocytopenia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: an unresolved problem and possible approaches to resolve it. *Journal of hematotherapy* 5, 407-414.
- Hatami, J., Andrade, P.Z., Alves de Matos, A.P., Djokovic, D., Lilaia, C., Ferreira, F.C., Cabral, J.M.S., and da Silva, C.L. (2015). Developing a co-culture system for effective megakaryo/thrombopoiesis from umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Cytotherapy* 17, 428-442.
- Heazlewood, S.Y., Nilsson, S.K., Cartledge, K., Be, C.L., Vinson, A., Gel, M., and Haylock, D.N. (2017). Progress in bio-manufacture of platelets for transfusion. *Platelets* 28, 649-656.
- Hechler, B., Lenain, N., Marchese, P., Vial, C., Heim, V., Freund, M., Cazenave, J.-P., Cattaneo, M., Ruggeri, Z.M., Evans, R., *et al.* (2003). A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *The Journal of experimental medicine* 198, 661-667.
- Hechler, B., Nonne, C., Eckly, A., Magnenat, S., Rinckel, J.Y., Denis, C.V., Freund, M., Cazenave, J.P., Lanza, F., and Gachet, C. (2010). Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8, 173-184.
- Heijnen, H.F.G., Debili, N., Vainchencker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1998). Multivesicular Bodies Are an Intermediate Stage in the Formation of Platelet α -Granules. *Blood* 91, 2313-2325.
- Ho, A.D., Wagner, W., and Franke, W. (2008). Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 10, 320-330.

RÉFÉRENCES

- Holinstat, M. (2017). Normal platelet function. *Cancer metastasis reviews* 36, 195-198.
- Holmsen, H., and Weiss, H.J. (1979). Secretable storage pools in platelets. *Annual review of medicine* 30, 119-134.
- Honn, K.V., Tang, D.G., and Crissman, J.D. (1992). Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? *Cancer Metastasis Rev* 11, 325-351.
- Hooper, A.T., Butler, J.M., Nolan, D.J., Kranz, A., Iida, K., Kobayashi, M., Kopp, H.-G., Shido, K., Petit, I., Yanger, K., *et al.* (2009). Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell stem cell* 4, 263-274.
- Horwitz, M.E. (2007). Sources of human and murine hematopoietic stem cells. *Current protocols in immunology* 79, 22A.22.21-22A.22.26.
- Hou, Y., Carrim, N., Wang, Y., Gallant, R.C., Marshall, A., and Ni, H. (2015). Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *Journal of biomedical research* 29, 437-444.
- Howell, W.H. (1890). Observations upon the occurrence, structure, and function of the giant cells of the marrow. *Journal of Morphology* 4, 117-130.
- Howell, W.H., and Donahue, D.D. (1937). The Production of Blood Platelets in the Lungs. *J Exp Med* 65, 177-203.
- Huang, G.T., Gronthos, S., and Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research* 88, 792-806.
- Huang, H., and Cantor, A.B. (2009). Common features of megakaryocytes and hematopoietic stem cells: what's the connection? *Journal of cellular biochemistry* 107, 857-864.
- Imai, K., Kobayashi, M., Wang, J., Ohiro, Y., Hamada, J., Cho, Y., Imamura, M., Musashi, M., Kondo, T., Hosokawa, M., *et al.* (1999). Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells: a role in homing of progenitor cells. *Blood* 93, 149-156.
- Imai, T., and Nakahata, T. (1994). Stem cell factor promotes proliferation of human primitive megakaryocytic progenitors, but not megakaryocytic maturation. *International journal of hematology* 59, 91-98.
- Inoue, S., and Osmond, D.G. (2001). Basement membrane of mouse bone marrow sinusoids shows distinctive structure and proteoglycan composition: a high resolution ultrastructural study. *Anatomical Record* 264, 294-304.
- Ishibashi, T., Kimura, H., Shikama, Y., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takatsuki, F., and Akiyama, Y. (1989a). Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 74, 1241-1244.
- Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P., and Burstein, S.A. (1989b). Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5953-5957.

RÉFÉRENCES

- Italiano, J.E., Jr., Bergmeier, W., Tiwari, S., Falet, H., Hartwig, J.H., Hoffmeister, K.M., Andre, P., Wagner, D.D., and Shivdasani, R.A. (2003). Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood* *101*, 4789-4796.
- Italiano, J.E., Jr., Lecine, P., Shivdasani, R.A., and Hartwig, J.H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *Journal of Cell Biology* *147*, 1299-1312.
- Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J.A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Ledergor, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M.G., *et al.* (2016). Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* *532*, 323-328.
- Ito, Y., Nakamura, S., Sugimoto, N., Shigemori, T., Kato, Y., Ohno, M., Sakuma, S., Ito, K., Kumon, H., Hirose, H., *et al.* (2018). Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. *Cell* *174*, 636-648 e618.
- Jat, P.S., Noble, M.D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L., and Kioussis, D. (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 5096-5100.
- Jelkmann, W. (2001). The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *European journal of gastroenterology & hepatology* *13*, 791-801.
- Ji, J., Vijayaragavan, K., Bosse, M., Weisel, K., and Bhatia, M. (2008). OP9 Stroma Augments Survival of Hematopoietic Precursors and Progenitors During Hematopoietic Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *26*, 2485-2495.
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Shivdasani, R.A., *et al.* (2007). Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow. *Science* *317*, 1767.
- Kallinikos-Maniatis, A. (1969). Megakaryocytes and platelets in central venous and arterial blood. *Acta haematologica* *42*, 330-335.
- Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., *et al.* (1999). Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *The EMBO journal* *18*, 2127.
- Kaufman, R.M., Airo, R., Pollack, S., and Crosby, W.H. (1965). Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. *Blood* *26*, 720-731.
- Kaushansky, K. (1998). Thrombopoietin. *The New England journal of medicine* *339*, 746-754.
- Kaushansky, K. (2005). Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1044*, 139-141.
- Kaushansky, K., and Drachman, J.G. (2002). The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene* *21*, 3359-3367.

RÉFÉRENCES

- Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R.D., Broudy, V.C., Lin, N., Bailey, M.C., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Oort, P.J., Hagen, F.S., *et al.* (1994). Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* *369*, 568-571.
- Kazama, I., Endo, Y., Toyama, H., Ejima, Y., Kurosawa, S., Murata, Y., Matsubara, M., and Maruyama, Y. (2011). Compensatory thrombopoietin production from the liver and bone marrow stimulates thrombopoiesis of living rat megakaryocytes in chronic renal failure. *Nephron extra* *1*, 147-156.
- Keller, G., and Snodgrass, R. (1990). Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* *171*, 1407-1418.
- Kessler, A., Shinitzky, M., and Kessler, B. (1995). Number of platelet dense granules varies with age, schizophrenia and dementia. *Dementia (Basel, Switzerland)* *6*, 330-333.
- Khan, J.A., Mendelson, A., Kunisaki, Y., Birbrair, A., Kou, Y., Arnal-Estape, A., Pinho, S., Ciero, P., Nakahara, F., Ma'ayan, A., *et al.* (2016). Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science* *351*, 176-180.
- Kieffer, N., Guichard, J., Farcet, J.-P., Vainchenker, W., and Breton-Gorius, J. (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *European Journal of Biochemistry* *164*, 189-195.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* *121*, 1109-1121.
- Kimura, H., Ishibashi, T., Uchida, T., Maruyama, Y., Friese, P., and Burstein, S.A. (1990). Interleukin 6 is a differentiation factor for human megakaryocytes in vitro. *European journal of immunology* *20*, 1927-1931.
- Kimura, K., Nakayama, M., Naito, I., Komiyama, T., Ichimura, K., Asano, H., Tsukuda, K., Ohtsuka, A., Oohashi, T., Miyoshi, S., *et al.* (2016). Human collagen XV is a prominent histopathological component of sinusoidal capillarization in hepatocellular carcinogenesis. *International journal of clinical oncology* *21*, 302-309.
- King, S.M., and Reed, G.L. (2002). Development of platelet secretory granules. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *13*, 293-302.
- Kinoshita, T., Sekiguchi, T., Xu, M.J., Ito, Y., Kamiya, A., Tsuji, K., Nakahata, T., and Miyajima, A. (1999). Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 7265-7270.
- Klein, G. (1995). The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* *51*, 914-926.
- Klein, G., Conzelmann, S., Beck, S., Timpl, R., and Müller, C.A. (1995). Perlecan in human bone marrow: A growth-factor-presenting, but anti-adhesive, extracellular matrix component for hematopoietic cells. *Matrix Biology* *14*, 457-465.
- Kline, D.L., and Clifton, E.E. (1952). Lifespan of leucocytes in man. *Journal of applied physiology* *5*, 79-84.

RÉFÉRENCES

- Kobayashi, H., Butler, J.M., O'Donnell, R., Kobayashi, M., Ding, B.S., Bonner, B., Chiu, V.K., Nolan, D.J., Shido, K., Benjamin, L., *et al.* (2010). Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nature cell biology* *12*, 1046-1056.
- Kokkaliaris, K.D., Drew, E., Endeley, M., Loeffler, D., Hoppe, P.S., Hilsenbeck, O., Schaubberger, B., Hinzen, C., Skylaki, S., Theodorou, M., *et al.* (2016). Identification of factors promoting ex vivo maintenance of mouse hematopoietic stem cells by long-term single-cell quantification. *Blood* *128*, 1181-1192.
- Kosugi, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y., Tahara, T., Kato, T., Tadokoro, S., Shiraga, M., Honda, S., Kanakura, Y., and Matsuzawa, Y. (1996). Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *British Journal of Haematology* *93*, 704-706.
- Koupenova, M., Kehrel, B.E., Corkrey, H.A., and Freedman, J.E. (2017). Thrombosis and platelets: an update. *European heart journal* *38*, 785-791.
- Kubota, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., and Lawley, T.J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *Journal of Cell Biology* *107*, 1589-1598.
- Kume, T. (2010). Specification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells during embryonic development. *Histology and histopathology* *25*, 637-646.
- Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., *et al.* (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* *502*, 637-643.
- Kusadasi, N., Oostendorp, R.A., Koevoet, W.J., Dzierzak, E.A., and Ploemacher, R.E. (2002). Stromal cells from murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region, liver and gut mesentery expand human umbilical cord blood-derived CAFC(week6) in extended long-term cultures. *Leukemia* *16*, 1782-1790.
- Kuter, D.J. (1996). The physiology of platelet production. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *14 Suppl 1*, 88-101.
- Lai, A.Y., and Kondo, M. (2008). T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in Immunology* *20*, 207-212.
- Lambert, M.P., Meng, R., Harper, D., Xiao, L., Marks, M.S., and Poncz, M. (2014). Megakaryocytes Exchange Significant Levels of Their Alpha-Granular PF4 with Their Environment. *Blood* *124*, 1432.
- Lambertsen, R.H., and Weiss, L. (1984). A model of intramedullary hematopoietic microenvironments based on stereologic study of the distribution of endocloned marrow colonies. *Blood* *63*, 287.
- Lampugnani, M.G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L.P., and Dejana, E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *Journal of Cell Biology* *118*, 1511-1522.
- Lanza, F, Gachet,C.,David,T,,Mangin, P (2008). Signalisation via le complexe GPIb-V-IX plaquettaire. *Hématologie* *14*, 273-284.

RÉFÉRENCES

- Larson, M.K., and Watson, S.P. (2006). Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. *Blood* 108, 1509-1514.
- Lecine, P., Villeval, J.L., Vyas, P., Swencki, B., Xu, Y., and Shivdasani, R.A. (1998). Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood* 92, 1608-1616.
- Lefrançois, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D.M., Thornton, E.E., Headley, M.B., David, T., Coughlin, S.R., *et al.* (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 544, 105-109.
- Lemischka, I.R. (1997). Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 15, 63-68.
- Léon, C., Eckly, A., Hechler, B., Aleil, B., Freund, M., Ravanat, C., Jourdain, M., Nonne, C., Weber, J., Tiedt, R., *et al.* (2007). Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* 110, 3183.
- Lepage, A., Leboeuf, M., Cazenave, J.P., de la Salle, C., Lanza, F., and Uzan, G. (2000). The alpha(IIb)beta(3) integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34(+) cord blood cells to megakaryocytes. *Blood* 96, 4169-4177.
- Levin, J. (1997). The Evolution of Mammalian Platelets. In *Thrombopoiesis and Thrombopoietins: Molecular, Cellular, Preclinical, and Clinical Biology*, D.J. Kuter, P. Hunt, W. Sheridan, and D. Zucker-Franklin, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 63-78.
- Levine, R.F., Eldor, A., Shoff, P.K., Kirwin, S., Tenza, D., and Cramer, E.M. (1993). Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *European journal of haematology* 51, 233-246.
- Levine, R.F., Hazzard, K.C., and Lamberg, J.D. (1982). The significance of megakaryocyte size. *Blood* 60, 1122-1131.
- Lichtman, M.A., Chamberlain, J.K., Simon, W., and Santillo, P.A. (1978). Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release. *American journal of hematology* 4, 303-312.
- Liu, Y., Wang, Y., Gao, Y., Forbes, J.A., Qayyum, R., Becker, L., Cheng, L., and Wang, Z.Z. (2015). Efficient generation of megakaryocytes from human induced pluripotent stem cells using food and drug administration-approved pharmacological reagents. *Stem cells translational medicine* 4, 309-319.
- Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., Kramer, J.M., *et al.* (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 369, 565-568.
- Long, M.W., and Dixit, V.M. (1990). Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 75, 2311-2318.

RÉFÉRENCES

- Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., and Chang, Y. (2008). Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* *112*, 3164-3174.
- Luskey, B.D., Rosenblatt, M., Zsebo, K., and Williams, D.A. (1992). Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells. *Blood* *80*, 396-402.
- Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.S., and Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology* *40*, 46-62.
- Maecker, H.T., McCoy, J.P., and Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature reviews Immunology* *12*, 191-200.
- Mahaut-Smith, M.P., Thomas, D., Higham, A.B., Usher-Smith, J.A., Hussain, J.F., Martinez-Pinna, J., Skepper, J.N., and Mason, M.J. (2003). Properties of the Demarcation Membrane System in Living Rat Megakaryocytes. *Biophysical Journal* *84*, 2646-2654.
- Malara, A., Currao, M., Gruppi, C., Celesti, G., Viarengo, G., Buracchi, C., Laghi, L., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2014). Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *32*, 926-937.
- Malara, A., Gruppi, C., Rebuzzini, P., Visai, L., Perotti, C., Moratti, R., Balduini, C., Tira, M.E., and Balduini, A. (2011). Megakaryocyte-matrix interaction within bone marrow: new roles for fibronectin and factor XIII-A. *Blood* *117*, 2476.
- Mammadova-Bach, E., Mangin, P., Lanza, F., and Gachet, C. (2015). Platelets in cancer. From basic research to therapeutic implications. *Hamostaseologie* *35*, 325-336.
- Manz, M.G., Miyamoto, T., Akashi, K., and Weissman, I.L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 11872-11877.
- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Pinsky, D.J., Islam, N., and Maliszewsk, C.R. (2001). Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: significance for occlusive vascular diseases. *Italian heart journal : official journal of the Italian Federation of Cardiology* *2*, 824-830.
- Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., and Zaret, K.S. (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* *294*, 559-563.
- Mauchamp, J., Chambard, M., Verrier, B., Gabrion, J., Chabaud, O., Gerard, C., Penel, C., Pialat, B., and Anfosso, F. (1987). Epithelial cell polarization in culture: orientation of cell polarity and expression of specific functions, studied with cultured thyroid cells. *Journal of cell science Supplement* *8*, 345-358.
- Mazur, E.M., Lindquist, D.L., de Alarcon, P.A., and Cohen, J.L. (1988). Evaluation of bone marrow megakaryocyte ploidy distributions in persons with normal and abnormal platelet counts. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* *111*, 194-202.

RÉFÉRENCES

- Mazzi, S., Lordier, L., Debili, N., Raslova, H., and Vainchenker, W. (2018). Megakaryocyte and polyploidization. *Experimental hematology* 57, 1-13.
- McLaren, K.M. (1983). Immunohistochemical localisation of thrombospondin in human megakaryocytes and platelets. *Journal of clinical pathology* 36, 197-199.
- McNicol, A., and Israels, S.J. (1999). Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thrombosis Research* 95, 1-18.
- Medvinsky, A.L., Samoylina, N.L., Muller, A.M., and Dzierzak, E.A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-67.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
- Mercher, T., Cornejo, M.G., Sears, C., Kindler, T., Moore, S.A., Maillard, I., Pear, W.S., Aster, J.C., and Gilliland, D.G. (2008). Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* 3, 314-326.
- Metcalf, D., Begley, C.G., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Lopez, A.F., and Williamson, D.J. (1986). Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice. *Blood* 68, 46-57.
- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology* 196, 430-443.
- Mikkola, H.K., and Orkin, S.H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development (Cambridge, England)* 133, 3733-3744.
- Miyawaki, K., Iwasaki, H., Jiromaru, T., Kusumoto, H., Yurino, A., Sugio, T., Uehara, Y., Odawara, J., Daitoku, S., Kunisaki, Y., *et al.* (2017). Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood* 129, 3332-3343.
- Moore, M.A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *British Journal of Haematology* 18, 279-296.
- Moreau, T., Evans, A.L., Vasquez, L., Tijssen, M.R., Yan, Y., Trotter, M.W., Howard, D., Colzani, M., Arumugam, M., Wu, W.H., *et al.* (2016). Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nature Communications* 7, 11208.
- Morrison, S.J., Hemmati, H.D., Wandycz, A.M., and Weissman, I.L. (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10302-10306.
- Müller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzakt, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.

RÉFÉRENCES

- Myers, J.C., Dion, A.S., Abraham, V., and Amenta, P.S. (1996). Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell and Tissue Research* 286, 493-505.
- Nagahisa, H., Nagata, Y., Ohnuki, T., Osada, M., Nagasawa, T., Abe, T., and Todokoro, K. (1996). Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. *Blood* 87, 1309-1316.
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Fujioka, M., and Suda, T. (2014). Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 454, 353-357.
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Kobayashi, H., Suzuki-Inoue, K., and Suda, T. (2015). CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med* 212, 2133-2146.
- Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K., Koike, T., Harimoto, K., Dohda, T., *et al.* (2014). Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 14, 535-548.
- Nakeff, A., and Floeh, D.P. (1976). Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by density gradient centrifugation. *Blood* 48, 133-138.
- Nakeff, A., and Maat, B. (1974). Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by velocity sedimentation. *Blood* 43, 591-595.
- Nakeff, A., Valeriote, F., Gray, J.W., and Grabske, R.J. (1979). Application of flow cytometry and cell sorting to megakaryocytopoiesis. *Blood* 53, 732-745.
- Nakorn, T.N., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2003). Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 205-210.
- Ng, A.P., Kauppi, M., Metcalf, D., Di Rago, L., Hyland, C.D., and Alexander, W.S. (2012). Characterization of thrombopoietin (TPO)-responsive progenitor cells in adult mouse bone marrow with in vivo megakaryocyte and erythroid potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2364-2369.
- Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A., Sheridan, W.P., Ohashi, H., Kato, T., Li, Y.S., Bartley, T.D., Choi, E., and Bogenberger, J. (1995). Megakaryocyte growth and development factor. Analyses of in vitro effects on human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *The Journal of clinical investigation* 95, 2973-2978.
- Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B., and Mannel, D.N. (1999). Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Research* 59, 1295-1300.
- Nilsson, S.K., Debatis, M.E., Dooner, M.S., Madri, J.A., Quesenberry, P.J., and Becker, P.S. (1998). Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem* 46, 371-377.

RÉFÉRENCES

- Nishikii, H., Kurita, N., and Chiba, S. (2017). The Road Map for Megakaryopoietic Lineage from Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem cells translational medicine* 6, 1661-1665.
- Niswander, L.M., Fegan, K.H., Kingsley, P.D., McGrath, K.E., and Palis, J. (2014). SDF-1 dynamically mediates megakaryocyte niche occupancy and thrombopoiesis at steady state and following radiation injury. *Blood* 124, 277-286.
- Nolta, J.A., Thiemann, F.T., Arakawa-Hoyt, J., Dao, M.A., Barsky, L.W., Moore, K.A., Lemischka, I.R., and Crooks, G.M. (2002). The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors. *Leukemia* 16, 352-361.
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature cell biology* 15, 533-543.
- Nonne, C., Lenain, N., Hechler, B., Mangin, P., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2005). Importance of Platelet Phospholipase C γ 2 Signaling in Arterial Thrombosis as a Function of Lesion Severity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1293-1298.
- Norol, F., Vitrat, N., Cramer, E., Guichard, J., Burstein, S.A., Vainchenker, W., and Debili, N. (1998). Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells. *Blood* 91, 830-843.
- Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., *et al.* (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* 351, aab2116.
- Oertel, M., Menthena, A., Chen, Y.Q., Teisner, B., Jensen, C.H., and Shafritz, D.A. (2008). Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver. *Gastroenterology* 134, 823-832.
- Osawa, M., Hanada, K.-i., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science* 273, 242.
- Packham, M.A. (1994). Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 72, 278-284.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development (Cambridge, England)* 126, 5073-5084.
- Pallotta, I., Lovett, M., Rice, W., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2009). Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis. *PLoS one* 4, e8359.
- Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M.C., and Ten Dijke, P. (2017). TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *International journal of molecular sciences* 18, 2157.
- Pascale Grenard, A.M., Sophie Lotersztajn (2005). Rôle des myofibroblastes dans la fibrogenèse hépatique. *Hépatogastro & Oncologie Digestive* 12, 143-152.

RÉFÉRENCES

- Patel, S.R., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005a). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal of Clinical Investigation* *115*, 3348-3354.
- Patel, S.R., Richardson, J.L., Schulze, H., Kahle, E., Galjart, N., Drabek, K., Shivdasani, R.A., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E., Jr. (2005b). Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* *106*, 4076-4085.
- Pedersen, N.T. (1978). Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. *Scandinavian journal of haematology* *21*, 369-375.
- Phinney, D.G. (2012). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *Journal of cellular biochemistry* *113*, 2806-2812.
- Picker, L.J., and Siegelman, M. H. (1999). Lymphoid tissues and organs In *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed. (Philadelphia: Lippincott-Raven), pp. 479–531.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* *284*, 143-147.
- Potts, K.S., Sargeant, T.J., Markham, J.F., Shi, W., Biben, C., Josefsson, E.C., Whitehead, L.W., Rogers, K.L., Liakhovitskaia, A., Smyth, G.K., *et al.* (2014). A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood* *124*, 2725-2729.
- Punzel, M., Gupta, P., and Verfaillie, C.M. (2002). The microenvironment of AFT024 cells maintains primitive human hematopoiesis by counteracting contact mediated inhibition of proliferation. *Cell communication & adhesion* *9*, 149-159.
- Punzel, M., Moore, K.A., Lemischka, I.R., and Verfaillie, C.M. (1999a). The type of stromal feeder used in limiting dilution assays influences frequency and maintenance assessment of human long-term culture initiating cells. *Leukemia* *13*, 92-97.
- Punzel, M., Wissink, S.D., Miller, J.S., Moore, K.A., Lemischka, I.R., and Verfaillie, C.M. (1999b). The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. *Blood* *93*, 3750-3756.
- Pusztaszeri, M.P., Seelentag, W., and Bosman, F.T. (2006). Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *54*, 385-395.
- Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., Jensen, C.T., Antonchuk, J., Mansson, R., Thoren, L.A., Ekblom, M., Alexander, W.S., and Jacobsen, S.E. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* *1*, 671-684.
- Quesenberry, P.J., Ihle, J.N., and McGrath, E. (1985). The effect of interleukin 3 and GM-CSF-2 on megakaryocyte and myeloid clonal colony formation. *Blood* *65*, 214-217.

RÉFÉRENCES

- Radley, J.M., and Haller, C.J. (1982). The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* *60*, 213-219.
- Radtke, S., Gorgens, A., Liu, B., Horn, P.A., and Giebel, B. (2016). Human mesenchymal and murine stromal cells support human lympho-myeloid progenitor expansion but not maintenance of multipotent haematopoietic stem and progenitor cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* *15*, 540-545.
- Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell, R., Ferris, B., Nachman, R.L., Moore, M.A., and Asch, A.S. (1995). Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* *86*, 3353-3363.
- Rafii, S., Shapiro, F., Rimarachin, J., Nachman, R.L., Ferris, B., Weksler, B., Moore, M.A., and Asch, A.S. (1994). Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* *84*, 10-19.
- Randrianarison-Huetz, V., Laurent, B., Bardet, V., Blobe, G.C., Huetz, F., and Duménil, D. (2010). Gfi-1B controls human erythroid and megakaryocytic differentiation by regulating TGF- β signaling at the bipotent erythro-megakaryocytic progenitor stage. *Blood* *115*, 2784-2795.
- Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J.P., Brison, O., Metivier, D., Feunteun, J., Kroemer, G., Debili, N., and Vainchenker, W. (2003). Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood* *101*, 541-544.
- Robin (1864). Note sur les éléments anatomiques appelés myeloplaxes. . *Journal de l'anatomie et de la physiologie normales et pathologiques de l'homme et des animaux* *1*.
- Robin, C., Ottersbach, K., Boisset, J.-C., Oziemlak, A., and Dzierzak, E. (2011). CD41 is developmentally regulated and differentially expressed on mouse hematopoietic stem cells. *Blood* *117*, 5088.
- Rodrigues, S.F., and Granger, D.N. (2015). Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue barriers* *3*, e978720-e978720.
- Rogler, L.E. (1997). Selective bipotential differentiation of mouse embryonic hepatoblasts in vitro. *The American Journal of Pathology* *150*, 591-602.
- Rojewski, M.T., Weber, B.M., and Schrezenmeier, H. (2008). Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* *35*, 168-184.
- Ruebner, B.H., Blankenberg, T.A., Burrows, D.A., SooHoo, W., and Lund, J.K. (1990). Development and transformation of the ductal plate in the developing human liver. *Pediatric pathology* *10*, 55-68.
- Sabri, S., Jandrot-Perrus, M., Bertoglio, J., Farndale, R.W., Mas, V.M., Debili, N., and Vainchenker, W. (2004). Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by $\alpha 2\beta 1$ integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood* *104*, 3117-3125.

RÉFÉRENCES

- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., *et al.* (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* *131*, 324-336.
- Safadi, F., Barbe, M., Abdelmagid, S., Rico, M., A. Aswad, R., Litvin, J., and N. Popoff, S. (2009). *Bone Structure, Development and Bone Biology: Bone Pathology* (Philadelphia).
- Sahin, A.O., and Buitenhuis, M. (2012). Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. *Cell adhesion & migration* *6*, 39-48.
- Sakamoto, N., Ueki, Y., Oi, M., Kiuchi, T., and Sato, M. (2018). Fluid shear stress suppresses ICAM-1-mediated transendothelial migration of leukocytes in coculture model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *502*, 403-408.
- Sanada, C., Xavier-Ferrucio, J., Lu, Y.C., Min, E., Zhang, P.X., Zou, S., Kang, E., Zhang, M., Zerafati, G., Gallagher, P.G., *et al.* (2016). Adult human megakaryocyte-erythroid progenitors are in the CD34+CD38mid fraction. *Blood* *128*, 923-933.
- Scheinin, T.M., and Koivuniemi, A.P. (1963). Megakaryocytes in the pulmonary circulation. *Blood* *22*, 82-87.
- Schick Paul, K., Walker, J., Profeta, B., Denisova, L., and Bennett, V. (1997). Synthesis and Secretion of von Willebrand Factor and Fibronectin in Megakaryocytes at Different Phases of Maturation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *17*, 797-801.
- Schlesinger, M. (2018). Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *Journal of Hematology & Oncology* *11*, 125.
- Schmitt, A., Guichard, J., Massé, J.-M., Debili, N., and Cramer, E.M. (2001). Of mice and men: Comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Experimental hematology* *29*, 1295-1302.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells* *4*, 7-25.
- Schroeder, T. (2007). Asymmetric Cell Division in Normal and Malignant Hematopoietic Precursor Cells. *Cell stem cell* *1*, 479-481.
- Schulze, H. (2012). Culture of murine megakaryocytes and platelets from fetal liver and bone marrow. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) *788*, 193-203.
- Schulze, H., Korpál, M., Hurov, J., Kim, S.-W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T., and Shivdasani, R.A. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* *107*, 3868-3875.
- Schuring, A.N., Schulte, N., Kelsch, R., Ropke, A., Kiesel, L., and Gotte, M. (2011). Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertility and sterility* *95*, 423-426.

RÉFÉRENCES

- Sedlmayr, P., Blaschitz, A., Wilders-Truschnig, M., Tiran, A., and Dohr, G. (1995). Platelets contain interleukin-1 alpha and beta which are detectable on the cell surface after activation. *Scandinavian journal of immunology* *42*, 209-214.
- Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* *2*, 640-653.
- Semeniak, D., Kulawig, R., Stegner, D., Meyer, I., Schwiebert, S., Bosing, H., Eckes, B., Nieswandt, B., and Schulze, H. (2016). Proplatelet formation is selectively inhibited by collagen type I through Syk-independent GPVI signaling. *Journal of cell science* *129*, 3473-3484.
- Semple, J.W., Italiano, J.E., Jr., and Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* *11*, 264-274.
- Shen, Y., and Nilsson, S.K. (2012). Bone, microenvironment and hematopoiesis. *Current opinion in hematology* *19*, 250-255.
- Shin, J.Y., Hu, W., Naramura, M., and Park, C.Y. (2014). High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *Journal of Experimental Medicine* *211*, 217-231.
- Shiraki, R., Inoue, N., Kawasaki, S., Takei, A., Kadotani, M., Ohnishi, Y., Ejiri, J., Kobayashi, S., Hirata, K., Kawashima, S., *et al.* (2004). Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thrombosis Research* *113*, 379-385.
- Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A., and Orkin, S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *The EMBO journal* *16*, 3965-3973.
- Shivdasani, R.A., Rosenblatt, M.F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C.W., Hunt, P., Saris, C.J.M., and Orkin, S.H. (1995). Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* *81*, 695-704.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental cell* *18*, 175-189.
- Sieber, S., Wirth, L., Cavak, N., Koenigsmark, M., Marx, U., Lauster, R., and Rosowski, M. (2018). Bone marrow-on-a-chip: Long-term culture of human haematopoietic stem cells in a three-dimensional microfluidic environment. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* *12*, 479-489.
- Simmons, P.J., and Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* *78*, 55-62.
- Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J., and Jacobsen, S.E. (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* *17*, 463-472.
- Sixma, J.J., Slot, J.-W., and Geuze, H.J. (1989). [26] Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. In *Methods in Enzymology* (Academic Press), pp. 301-311.

RÉFÉRENCES

- Sohma, Y., Akahori, H., Seki, N., Hori, T., Ogami, K., Kato, T., Shimada, Y., Kawamura, K., and Miyazaki, H. (1994). Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS letters* *353*, 57-61.
- Soler, A., Cayrefourcq, L., Mazel, M., and Alix-Panabieres, C. (2017). EpCAM-Independent Enrichment and Detection of Viable Circulating Tumor Cells Using the EPISPOT Assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) *1634*, 263-276.
- Soves, C.P., Miller, J.D., Begun, D.L., Taichman, R.S., Hankenson, K.D., and Goldstein, S.A. (2014). Megakaryocytes are mechanically responsive and influence osteoblast proliferation and differentiation. *Bone* *66*, 111-120.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* *241*, 58-62.
- Spence, A.P. (1995). *Biology of Human Aging*, 2nd Edition (Benjamin Cummings).
- Spooncer, E., Gallagher, J.T., Krizsa, F., and Dexter, T.M. (1983). Regulation of haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. IV. Glycosaminoglycan synthesis and the stimulation of haemopoiesis by beta-D-xylosides. *The Journal of Cell Biology* *96*, 510.
- Stegner, D., vanEeuwijk, J.M.M., Angay, O., Gorelashvili, M.G., Semeniak, D., Pinnecker, J., Schmithausen, P., Meyer, I., Friedrich, M., Dutting, S., *et al.* (2017). Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nature Communications* *8*, 127.
- Stern, D., Nawroth, P., Handley, D., and Kisiel, W. (1985). An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *82*, 2523.
- Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grunewald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L.M., Rittling, S.R., *et al.* (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* *201*, 1781-1791.
- Strassel, C., Brouard, N., Mallo, L., Receveur, N., Mangin, P., Eckly, A., Bieche, I., Tarte, K., Gachet, C., and Lanza, F. (2016). Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood* *127*, 2231-2240.
- Strassel, C., Eckly, A., Léon, C., Petitjean, C., Freund, M., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2009). Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* *94*, 800-810.
- Strell, C., and Entschladen, F. (2008). Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal* *6*, 10.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* *25*, 977-988.
- Sungaran, R., Markovic, B., and Chong, B.H. (1997). Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* *89*, 101-107.

RÉFÉRENCES

- Tablin, F., Castro, M., and Leven, R.M. (1990). Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *Journal of cell science* *97*, 59.
- Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1994). Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine* *179*, 1677-1682.
- Taichman, R.S., Reilly, M.J., and Emerson, S.G. (1996). Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood* *87*, 518-524.
- Tajika, K., Ikebuchi, K., Inokuchi, K., Hasegawa, S., Dan, K., Sekiguchi, S., Nakahata, T., and Asano, S. (1998). IL-6 and SCF exert different effects on megakaryocyte maturation. *Br J Haematol* *100*, 105-111.
- Takayama, N., Nishimura, S., Nakamura, S., Shimizu, T., Ohnishi, R., Endo, H., Yamaguchi, T., Otsu, M., Nishimura, K., Nakanishi, M., *et al.* (2010). Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *The Journal of Experimental Medicine* *207*, 2817.
- Tamura, S., Suzuki-Inoue, K., Tsukiji, N., Shirai, T., Sasaki, T., Osada, M., Satoh, K., and Ozaki, Y. (2016). Podoplanin-positive periarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. *Blood* *127*, 1701-1710.
- Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *6*, a016295-a016295.
- Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H., Tsujimura, T., and Miyajima, A. (2003). Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *Journal of cell science* *116*, 1775-1786.
- Tavassoli, M. (1981). Structure and function of sinusoidal endothelium of bone marrow. *Progress in clinical and biological research* *59B*, 249-256.
- Tavassoli, M., and Aoki, M. (1989). Localization of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood cells* *15*, 3-14.
- Tavassoli, M., and Shaklai, M. (1979). Absence of tight junctions in endothelium of marrow sinuses: possible significance for marrow cell egress. *British Journal of Haematology* *41*, 303-307.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H.S., Dieterlen-Lievre, F., and Peault, B. (1996). Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* *87*, 67-72.
- Thiery, J.P., and Bessis, M. (1956a). [Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* *242*, 290-292.
- Thiery, J.P., and Bessis, M. (1956b). [Mechanism of platelet genesis; in vitro study by cinemicrophotography]. *Revue d'hematologie* *11*, 162-174.
- Thon, J.N., Dykstra, B.J., and Beaulieu, L.M. (2017). Platelet bioreactor: accelerated evolution of design and manufacture. *Platelets* *28*, 472-477.

RÉFÉRENCES

- Thon, J.N., Medvetz, D.A., Karlsson, S.M., and Italiano, J.E., Jr. (2015). Road blocks in making platelets for transfusion. *Journal of thrombosis and haemostasis : Journal of thrombosis and haemostasis*. *13 Suppl 1*, S55-62.
- Tiberghien, P., Folléa, G., and Muller, J.-Y. (2016). Platelet Transfusions in Acute Leukemia. *New England Journal of Medicine* *375*, 96-97.
- Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* *14*, 213-222.
- Tober, J., Koniski, A., McGrath, K.E., Vemishetti, R., Emerson, R., de Mesy-Bentley, K.K., Waugh, R., and Palis, J. (2007). The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* *109*, 1433-1441.
- Toksoz, D., Zsebo, K.M., Smith, K.A., Hu, S., Brankow, D., Suggs, S.V., Martin, F.H., and Williams, D.A. (1992). Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *89*, 7350-7354.
- Tomer, A. (2004). Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood* *104*, 2722-2727.
- Torisawa, Y.-s., Spina, C.S., Mammoto, T., Mammoto, A., Weaver, J.C., Tat, T., Collins, J.J., and Ingber, D.E. (2014). Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro. *Nat Meth* *11*, 663-669.
- Torok-Storb, B., Iwata, M., Graf, L., Gianotti, J., Horton, H., and Byrne, M.C. (1999). Dissecting the marrow microenvironment. *Annals of the New York Academy of Sciences* *872*, 164-170.
- Tozzi, L., Laurent, P.A., Di Buduo, C.A., Mu, X., Massaro, A., Bretherton, R., Stoppel, W., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2018). Multi-channel silk sponge mimicking bone marrow vascular niche for platelet production. *Biomaterials* *178*, 122-133.
- Travlos, G.S. (2006). Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicologic pathology* *34*, 548-565.
- Trivanovic, D., Jaukovic, A., Popovic, B., Krstic, J., Mojsilovic, S., Okic-Djordjevic, I., Kukulj, T., Obradovic, H., Santibanez, J.F., and Bugarski, D. (2015). Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sciences* *141*, 61-73.
- Troussard, X., Vol, S., Cornet, E., Bardet, V., Couaillac, J.P., Fossat, C., Luce, J.C., Maldonado, E., Siguret, V., Tichet, J., *et al.* (2014). [Determination of full blood count normal reference values for adults in France]. *Annales de biologie clinique* *72*, 561-581.
- Trueta, J. (1997). The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 6-14.

RÉFÉRENCES

- Trueta, J., and Harrison, M.H. (1953). The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. *J Bone Joint Surg Br* 35-B, 442-461.
- Vainchenker, W., Besancenot, R., and Favale, F. (2013). [Megakaryopoiesis: regulation of platelet production by thrombopoietin]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 197, 395-406.
- Vainchenker, W., Deschamps, J.F., Bastin, J.M., Guichard, J., Titeux, M., Breton-Gorius, J., and McMichael, A.J. (1982). Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in in vivo cells from normal and leukemic patients. *Blood* 59, 514-521.
- van Buul-Wortelboer, M.F., Brinkman, H.J., Reinders, J.H., van Aken, W.G., and van Mourik, J.A. (1989). Polar secretion of von Willebrand factor by endothelial cells. *Biochimica et biophysica acta* 1011, 129-133.
- Van Coppernolle, S., Verstichel, G., Timmermans, F., Velghe, I., Vermijlen, D., De Smedt, M., Leclercq, G., Plum, J., Taghon, T., Vandekerckhove, B., *et al.* (2009). Functionally mature CD4 and CD8 TCRalpha cells are generated in OP9-DL1 cultures from human CD34+ hematopoietic cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 183, 4859-4870.
- Van Epps, D.E., Bender, J., Lee, W., Schilling, M., Smith, A., Smith, S., Unverzagt, K., Law, P., and Burgess, J. (1994). Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood cells* 20, 411-423.
- van Hinsbergh, V.W., Collen, A., and Koolwijk, P. (2001). Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 936, 426-437.
- Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E., and Zetter, B.R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99, 2034-2040.
- Vyas, P., Ault, K., Jackson, C.W., Orkin, S.H., and Shivdasani, R.A. (1999). Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 93, 2867-2875.
- Wagner, O.F., Christ, G., Wojta, J., Vierhapper, H., Parzer, S., Nowotny, P.J., Schneider, B., Waldhausl, W., and Binder, B.R. (1992). Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 267, 16066-16068.
- Wagner, W., and Ho, A.D. (2007). Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem cell reviews* 3, 239-248.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., *et al.* (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology* 33, 1402-1416.
- Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A.I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & nerve* 18, 1417-1426.
- Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741-753.

RÉFÉRENCES

- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H., and Speck, N.A. (1996). Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 3444-3449.
- Wang, X.Y., Pei, Y., Xie, M., Jin, Z.H., Xiao, Y.S., Wang, Y., Zhang, L.N., Li, Y., and Huang, W.H. (2015). An artificial blood vessel implanted three-dimensional microsystem for modeling transvascular migration of tumor cells. *Lab on a chip* *15*, 1178-1187.
- Weksler, B.B., Ley, C.W., and Jaffe, E.A. (1978). Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A 23187. *The Journal of clinical investigation* *62*, 923-930.
- White, J.G. (1968). The substructure of human platelet microtubules. *Blood* *32*, 638-648.
- White, J.G., and Clawson, C.C. (1980). The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *The American journal of pathology* *101*, 353-364.
- Wickramasinghe, S.N. (1991). Observations on the ultrastructure of sinusoids and reticular cells in human bone marrow. *Clinical & Laboratory Haematology* *13*, 263-278.
- Wickramasinghe, S.N., and Bain, B.J. (1986). *Blood and bone marrow* (Churchill Livingstone).
- Williams, B., and Allan, D.J. (1996). Combination of SCF, IL-6, IL-3, and GM-CSF increases the mitotic index in short term bone marrow cultures from acute promyelocytic leukemia (APL) patients. *Cancer genetics and cytogenetics* *91*, 77-81.
- Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology* *6*, 93-106.
- Wisse, E. (1972). An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. *Journal of Ultrastructure Research* *38*, 528-562.
- Wood, J.P., Silveira, J.R., Maille, N.M., Haynes, L.M., and Tracy, P.B. (2011). Prothrombin activation on the activated platelet surface optimizes expression of procoagulant activity. *Blood* *117*, 1710-1718.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., and Black, I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research* *61*, 364-370.
- Woodfin, A., Voisin, M.B., Beyrau, M., Colom, B., Caille, D., Diapouli, F.M., Nash, G.B., Chavakis, T., Albelda, S.M., Rainger, G.E., *et al.* (2011). The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature immunology* *12*, 761-769.
- Wright, J.H. (1902). A Rapid Method for the Differential Staining of Blood Films and Malarial Parasites. *The Journal of medical research* *7*, 138-144.
- Wright, J.H. (1906). The Origin and Nature of the Blood Plates. *The Boston Medical and Surgical Journal* *154*, 643-645.

RÉFÉRENCES

- Xiao, M., Wang, Y., Tao, C., Wang, Z., Yang, J., Chen, Z., Zou, Z., Li, M., Liu, A., Jia, C., *et al.* (2017). Osteoblasts support megakaryopoiesis through production of interleukin 9. *Blood* *129*, 3196-3209.
- Xu, C., Gao, X., Wei, Q., Nakahara, F., Zimmerman, S.E., Mar, J., and Frenette, P.S. (2018). Stem cell factor is selectively secreted by arterial endothelial cells in bone marrow. *Nature Communications* *9*, 2449.
- Xu, M.J., Matsuoka, S., Yang, F.C., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., Eguchi, M., Asano, S., Nakahata, T., and Tsuji, K. (2001). Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* *97*, 2016-2022.
- Yagi, M., Ritchie, K.A., Sitnicka, E., Storey, C., Roth, G.J., and Bartelmez, S. (1999). Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 8126-8131.
- Yamada, E. (1957). The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta anatomica* *29*, 267-290.
- Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* *154*, 1112-1126.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., *et al.* (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell stem cell* *1*, 685-697.
- Zabel, B.A., Lewen, S., Berahovich, R.D., Jaen, J.C., and Schall, T.J. (2011). The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Molecular cancer* *10*, 73.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* *425*, 836-841.
- Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J., and Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* *20*, 1321.
- Zorn, A.M. (2008). Liver development. In *StemBook*, T.S.C.R. Community, ed. (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute)
- Zuchriegel, G., Uhl, B., Pühr-Westerheide, D., Pornbacher, M., Lauber, K., Krombach, F., and Reichel, C.A. (2016). Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS biology* *14*, e1002459.
- Zuckerman, K.S., and Wicha, M.S. (1983). Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *Blood* *61*, 540-547.

RÉFÉRENCES

Rôle du microenvironnement cellulaire de la mégacaryopoïèse

Résumé

Les plaquettes sanguines ont comme rôle principal d'arrêter les saignements. Elles sont produites dans la moelle osseuse par des mégacaryocytes (MK) qui proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'objectif de ma thèse a été d'identifier les éléments cellulaires du microenvironnement contrôlant la mégacaryopoïèse. Mon travail a permis d'identifier une population particulière de progéniteurs hépatiques du foie fœtal capable de promouvoir *in vitro* les étapes précoces de la mégacaryopoïèse à partir de CSH humaines et murines (Brouard et al., 2017). Le rôle des cellules endothéliales (EC) dans les étapes tardives de maturation a été étudié après purification à partir de moelle humaine dans des expériences de co-culture avec des MK prédifférenciés. Mes résultats montrent que ces EC ont la propriété unique, par comparaison avec des EC d'autres tissus, de promouvoir la maturation des MK. Une analyse transcriptionnelle différentielle a permis d'identifier des effecteurs possibles ouvrant des pistes pour mieux comprendre les mécanismes de la mégacaryopoïèse et pour améliorer la production des plaquettes en culture.

Mots-clés : mégacaryopoïèse, hématopoïèse, microenvironnement, cellule stromale, endothélium, cellule souche mésenchymateuse

Résumé en anglais

The main role of platelets is to stop bleeding. They are produced in the bone marrow by megakaryocytes (MK) that are produced by the differentiation of hematopoietic stem cells (HSC). The objective of my thesis was to identify the cellular elements of the microenvironment controlling megakaryopoiesis. My work has identified a particular population of hepatic progenitors from the fetal liver capable of promoting *in vitro* the early stages of megakaryopoiesis from human and murine HSC (Brouard et al., 2017). The role of endothelial cells (EC), purified from human bone marrow, in late maturation stages was studied in co-culture experiments with pre-differentiated MK. My results show that these EC have the unique property in comparison with EC from other tissues, of promoting the maturation of MK. A differential transcriptional analysis identified possible effectors that could lead to a better understanding of the mechanisms of megakaryopoiesis and improve platelet production in culture.

Key words : megakaryopoiesis, hematopoiesis, microenvironment, stromal cells, endothelium, mesenchymal stem cell