



**HAL**  
open science

# L'Aryl hydrocarbure récepteur, un acteur important de la biogenèse des plaquettes permettant la production de plaquettes de culture à visée transfusionnelle

Valentin Do Sacramento

## ► To cite this version:

Valentin Do Sacramento. L'Aryl hydrocarbure récepteur, un acteur important de la biogenèse des plaquettes permettant la production de plaquettes de culture à visée transfusionnelle. Hématologie. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ041 . tel-03504663

**HAL Id: tel-03504663**

**<https://theses.hal.science/tel-03504663v1>**

Submitted on 29 Dec 2021

**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

## THÈSE DE SCIENCES

Présentée par

**Valentin DO SACRAMENTO**

pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Strasbourg

**L'aryl hydrocarbon récepteur, un acteur important de la biogénèse des plaquettes permettant la production de plaquettes de culture à visée transfusionnelle**

Soutenue publiquement le Mercredi 16 Septembre 2020

### THÈSE DIRIGÉE PAR :

Mme Catherine STRASSEL

Chargée de recherche EFS, Université de Strasbourg

### RAPPORTEURS :

Mme France PIRENNE

PU-PH, Université Paris-Est Créteil

M Xavier COUMOUL

PU, Université Paris Descartes

### EXAMINATEUR :

M Philippe KASTNER

MCU-PH, IGBMC, Université de Strasbourg

### MEMBRES INVITÉS :

Dr Christian GACHET

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

M Francois LANZA

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

**UMR\_S1255, EFS Grand Est, Université de Strasbourg :**

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

Directeur Dr Christian GACHET

Établissement 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

**Directrice de thèse :**

Mme Catherine STRASSEL

E-mail : [catherine.strassel@efs.sante.fr](mailto:catherine.strassel@efs.sante.fr)

## **Remerciements**

Une thèse est le fruit d'un travail collaboratif, c'est pour cela que je souhaite présenter mes remerciements :

**À Monsieur le Docteur Christian GACHET, Directeur de l'EFS Grand EST et de l'unité INSERM UMR\_S1255,**

*Je tiens particulièrement à vous remercier pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, cette belle maison qui m'a permis de réaliser mon Master II et ma Thèse en sciences. J'ai eu la chance, compte tenu de votre agenda, de travailler à de nombreuses reprises en étroite collaboration avec vous, de pouvoir discuter bien évidemment de sciences, mais aussi d'aspects stratégiques et de communication. Sachez que j'ai beaucoup apprécié ces moments d'échange, car nous avons pu, lors de cette thèse, mêler des aspects scientifiques et humains, et pour cela je vous en remercie.*

**À Madame France PIRENNE et Messieurs Xavier COUMOUL et Philippe KASTNER,**

*Pour l'intérêt que vous portez à ce sujet en acceptant de juger ce travail.*

**À Madame Catherine STRASSEL,**

*Je tiens à te remercier pour ton encadrement au cours de ces quatre dernières années. Depuis mon arrivé en Master 2, en 2017, et durant ces trois ans de thèse tu as toujours su te rendre disponible pour échanger sur nos différents projets. Tes conseils, ton expérience m'ont permis d'apprendre beaucoup de choses concernant la plaquette sanguine bien évidemment, mais également de nombreuses autres compétences nécessaires au chercheur, que ce soit la présentation des résultats ou la réalisation de rapport. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi et j'ai énormément apprécié la grande autonomie que tu as su très rapidement me confier. Merci.*



**À Monsieur François LANZA,**

*Pour tous vos conseils toujours bienveillants qui ont tant apporté à cette thèse. Je tiens également à vous remercier pour votre relecture et vos commentaires sur ce manuscrit. Merci beaucoup François.*

**À Madame Léa MALLO,**

*Pour avoir eu la gentillesse de me former d'un point de vue technique sur la culture de cellules CD34+, mais également sur d'autres techniques. Pour toutes les discussions que nous avons pu avoir notamment au tout début de cette thèse lors de nos longs tris cellulaires au NHC.*

*J'espère que tu as pris autant de plaisir que moi durant ces trois années et que ma compagnie comme collègue de travail n'a pas été trop désagréable. Il fallait bien y faire allusion sinon cette thèse aurait eu un gout d'inachevé, mais tu sais ce que je pense, tu as bien raison. Je te souhaite le meilleur pour la suite.*

**À Madame Sylvie MOOG,**

*Pour avoir su transmettre nombres de techniques et bien d'autres choses. Je tiens à te remercier tout spécialement pour avoir pris de ton temps pour relire ce manuscrit.*

**À Madame Catherine HUMBRECHT,**

*Pour ta gentillesse et ta disponibilité au cours de ces trois années, tu as toujours su trouver le temps de m'aider entre deux urgences. Merci Catherine.*

**Au groupe de travail de l'ANR « MégaPlatProd » : Henri DE LA SALLE, François LANZA, Anita MICHEL, Nathalie BROUARD et plus généralement à l'ensemble de l'équipe 2 : Fabienne PROAMER, Jean Yves RINCKEL, Josiane WEBER, Catherine LEON, Alexandra MAZHARIAN et Yotis SENIS.**

*Je vous remercie pour l'ensemble des conseils et critiques bienveillantes que vous avez pu faire lors de nos réunions du lundi et du vendredi.*

**À l'ensemble de l'équipe 1 : Pierre MANGIN, Nicolas RECEVEUR, Béatrice HECHLER, Blandine MAITRE, Catherine RAVANAT, Catherine ANGENIEUX, Catherine BOURDON, Stéphanie BENOIT ainsi qu'à l'ensemble des personnes de l'animalerie, Monique FREUND, Catherine ZIESSEL, Ketty KNEZ-HIPPERT**

*Pour l'ensemble des échanges que nous avons pu avoir au cours de ces quatre dernières années, au détour d'un couloir ou lors du Bischenberg.*

**À Stéphan ROUX et à l'ensemble de l'équipe de la plateforme MTI**

*Pour votre accueil, votre gentillesse et l'ensemble des échanges que nous avons pu avoir autour de ce beau projet.*

**Au laboratoire d'hémostase spécialisée : Arnaud DUPUIS, Véronique HEIM, Julien MAILLARD SALLARD, Patricia LEUFFLER,**

*Pour m'avoir appris cette technique si chère à notre laboratoire, le lavage de plaquettes, et l'analyse des fonctions plaquettaires. Je tiens à remercier plus particulièrement Véronique Heim pour avoir pris de son temps pour relire ce manuscrit.*

**À Monsieur Hervé ISOLA et à son équipe de préparation des PSL,**

*Pour votre gentillesse et votre disponibilité, vous avez toujours été présent lorsque je souhaitais discuter des méthodes de production.*

**À l'ensemble de personnels du siège de l'EFS avec qui j'ai eu la chance d'échanger au cours de cette thèse et plus particulièrement Kenza BEJHAL et Gregory MARCH de la Direction de la Recherche et de la Valorisation,**

**À Madame Anne LEGENDRE FIALAIRE,**

*Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour l'ensemble des discussions autour de ce nouveau produit que sont les plaquettes de culture et des mesures à prendre pour pouvoir les produire en condition de Bonnes Pratiques de Fabrication.*

**À Monsieur Pascal FRITZ,**

*Je tiens à te remercier pour ta disponibilité, ta grande gentillesse et ton esprit taquin. Ta participation à cette thèse est bien plus importante que ce que tu peux penser. Je te souhaite le meilleur pour la suite, profite en bien, c'est mérité et bonne pêche Pascal !!.*

**À Valérie PETRI,**

*Merci pour ta gentillesse, pour ta disponibilité et pour ton aide tout au long de cette thèse.*

**À mes collègues de bureau, Alexandra, Quentin, Usman,**

Pour l'ensemble des échanges scientifiques et humains que nous avons eus. Pour m'avoir permis de pratiquer mon anglais au quotidien.

**À mes collègues doctorants, post doc et étudiants, Gabrielle, Sébastien, Emily, Julie, Alicia, Thao, Margot, Marion, Alicia, Marie-Belle, Camille, Charles, Yannick, Cyril, Inès, Anaïs, Desline, Clarisse, David, Marianne, Sacha, Christelle**

*Merci à vous tous pour ces moments conviviaux pendant ces trois années*

Plus personnellement je tiens à remercier :

**Mes parents,**

*Pour m'avoir soutenu au cours de ces 9 dernières années, vous avez su être là dans les moments difficiles et avez partagé mes joies. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu dans ces longues études.*

**Mes grands-mères,**

*Pour avoir toujours été à mes côtés*

**Pauline,**

*Pour tous ces moments passés à tes côtés, tout ce que l'on a pu partager au cours de ces années et pour celles à venir et bien évidemment pour ta relecture, ne change rien.*

**Antoine,**

*Pour ton esprit taquin et tout ce que tu as fait pour moi. Pour tous ces moments partagés depuis toutes ces années, ici et un peu partout.*

**Charlène,**

*Pour toutes ces années, tu devais être présente dans ces remerciements. Merci pour tout Charlène.*

**Nathalie et Thierry,**

*Pour tous les bons moments partagés avec vous au cours de ces dernières années.*

**Mes camarades de la promotion 2017, Sarah Sa., Claire M., Christine D., Claire C., Sarah So., Matthieu L., Thomas E., Laurent H., Nicolas K, Nicolas A., Pierre Z.**

*Pour toutes ces heures passées à l'amphi en votre compagnie, pour votre joie et votre bonne humeur. Il y a eu tellement de choses qui se sont passées durant ces années. Je vous souhaite plein de bonnes choses à toutes et à tous.*

**Mes amis de longue date, Sarah Sa., Claire M., Élise H., Florian B. et Marc-Antoine S.**

*Pour avoir été toujours là, et ce, depuis très très longtemps. Florian comment décrire tout ce que l'on a pu vivre ensemble. Le collège qui nous a fait grandir plus vite que la normale, on ne va pas se mentir. Les TP de chimie avec Marc au lycée que de bons souvenirs. Même les moments plus difficiles, notamment ce fameux tour en vélo, resteront de bons souvenirs. Je te souhaite le meilleur pour la suite en Angleterre.*

*Pour Sarah Sa., Claire M., Élise H. et Marc-Antoine S. notre rencontre est un peu plus jeune, mais juste un peu. L'adversité à laquelle nous avons été exposée au cours de ces études nous a permis de créer plus qu'une amitié. Je vous remercie de l'avoir rendue précieuse.*

**À toutes les personnes que j'ai pu oublier et avec qui j'ai partagé des moments au cours de ces années. À vous tous : merci !!**

## Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduction bibliographique</b> .....	<b>4</b>
<b>I. Le rôle de l’AHR au cours de la mégacaryopoïèse</b> .....	<b>5</b>
A. Généralités sur l’AHR .....	6
1. Historique .....	6
2. Structure.....	8
a. Les séquences d’import et d’export nucléaire .....	9
b. Le domaine bHLH/PAS .....	9
c. Le domaine de transactivation .....	11
3. Les gènes cibles.....	12
4. Régulation de l’AHR.....	13
B. Voies de signalisation .....	14
1. Les ligands .....	14
2. Signalisation sans ligands .....	15
3. Signalisation en présence d’un ligand .....	16
a. Au niveau nucléaire .....	16
b. Au niveau cytoplasmique .....	18
C. Les grands rôles de l’AHR .....	20
D. L’AHR dans la mégacaryopoïèse.....	21
1. Etude du rôle de l’AHR chez la souris .....	21
2. Etude du rôle de l’AHR chez l’Homme .....	22

<b>II. Physiologie de la Mégacaryopoïèse .....</b>	<b>24</b>
A. Des cellules souches hématopoïétiques aux plaquettes sanguines .....	26
1. La cellule souche hématopoïétique .....	26
a. Caractérisation phénotypique des CSH .....	27
b. La quiescence des CSH .....	28
c. L'auto-renouvellement des CSH .....	29
2. Les progéniteurs mégacaryocytaires.....	30
3. Les précurseurs mégacaryocytaires.....	31
a. Caractéristiques morphologiques des précurseurs mégacaryocytaires	32
b. L'endomitose.....	33
c. Le système de membranes de démarcation ou DMS .....	35
4. Les voies alternatives de la mégacaryopoïèse .....	37
5. De la proplaquette à la plaquette sanguine .....	38
6. La plaquette sanguine .....	40
a. Le système canaliculaire ouvert.....	41
b. Les organites plaquettaires .....	41
B. Les processus de contrôle de la mégacaryopoïèse .....	44
1. Les cytokines.....	45
a. Les cytokines régulant positivement la MKP.....	45
i. La cytokine clé de la mégacaryopoïèse : la thrombopoïétine.....	47
ii. Le récepteur de la TPO ou c-mpl.....	47
iii. Les autres cytokines impliquées dans la mégacaryopoïèse .....	49
• Facteurs de croissances .....	49
• Interleukines .....	51
b. Les cytokines régulant négativement la mégacaryopoïèse.....	52
2. Les facteurs de transcription .....	54
a. GATA-1 .....	55

b.	FOG-1 .....	56
c.	RUNX-1.....	56
d.	NF-E2 .....	57
e.	Autres facteurs.....	58
<b>III.</b>	<b>La production de plaquettes <i>in vitro</i> .....</b>	<b>59</b>
A.	Généralités sur l'hémostase .....	60
B.	Les plaquettes de culture.....	63
1.	Les sources de cellules et les méthodes d'obtention des progéniteurs mégacaryocytaires .....	64
a.	Des iPSC aux progéniteurs mégacaryocytaires.....	65
b.	Méthodes de culture pour obtenir des progéniteurs mégacaryocytaires	66
i.	La production de plaquettes <i>in vitro</i> à partir des imMKCL.....	67
ii.	La production de plaquettes <i>in vitro</i> à partir des MK-FOP .....	68
c.	Des progéniteurs hématopoïétiques CD34 <sup>+</sup> aux progéniteurs mégacaryocytaires.....	70
i.	Obtention des CD34 .....	70
ii.	Méthodes de culture pour l'obtention des progéniteurs MK.....	70
•	Co culture .....	71
•	Cytokines.....	71
2.	Les dispositifs de libération de plaquettes.....	73
a.	Systèmes microfluidiques biomimétiques .....	74
i.	Les systèmes microfluidiques en 2D.....	74
ii.	Les systèmes microfluidiques en 3D utilisant des biomatériaux .....	76
b.	Le bioréacteur : une approche à grande échelle.....	78
3.	Validation des plaquettes <i>in vitro</i> .....	79



<b>Objectifs du travail de thèse</b> .....	<b>81</b>
<b>Résultats expérimentaux</b> .....	<b>85</b>
A. L'interaction entre AHR et IKAROS, une nouvelle voie pharmacologique non canonique de AHR, essentielle à la production de plaquette <i>in vitro</i> .....	87
B. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des plaquettes produites <i>in vitro</i>	114
<b>Discussion générale</b> .....	<b>132</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>138</b>

## Abréviations

ADP	Adénosine 5'- diphosphate
AHR	Aryl hydrocarbon Receptor
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adénosine 5'- triphosphate
BCL-XL	B-Cell Lymphoma-Extra Large
BFU-MK	Burst-Forming Unit-Megakaryocyte
bHLH/PAS	basic Helix-Loop-Helix /Per ARNT Sim
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
BSS	Bernard-Soulier Syndrome
CBF	Core Binding Factor
CD133+	Cluster of Differentiation 133, Prominin-1
CD62L	Cluster of Differentiation 62L, L-Sélectine
CDKN	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CFU-MK	Colony-Forming Unit-Megakaryocyte
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
c-MPL	c-Myeloproliferative leukemia protein (Récepteur de la thrombopoéïtine)
COX1	Cyclooxygenase 1
CP	Concentré plaquettaire
CPA	Concentré de plaquettes d'aphérèse
CRH	Cytokine Receptor Homology
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSH_CT	CSH à Court Terme
CSH_LT	CSH à Long Terme
CSM	Cellule Stromale Mésoenchymateuse
C-X-C	Cystéine-X-Cystéine
DMS	Demarcation Membrane System
EPO	Erythropoïétine
FDA	Food and Drug Administration
FSHR	Follicle-stimulating hormone receptor
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMP	Progéniteur granulo-monocytaire
GP	Glycoprotéine
GPVI	Glycoprotéine VI, récepteur plaquettaire du collagène
HDAC 1	Histone deacetylase 1
HIF	Hypoxia inducible factors
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR isotype Locus majeur d'histocompatibilité de classe II
HPCA-1	Antigène-1 des cellules progénitrices humaines
HTLV	Virus T-lymphotropique humain
IKAROS	Kruppel-type zinc finger
IL	Interleukine
imMKCL	Immortalized megakaryocyte cell line
iPSC	Cellule souche pluripotente induite
JAK2	Janus Kinase 2
KITL	Kit ligand
Klf4	Kruppel-like factor 4
LIF	Leukemia inhibitory factor
Lin-	Lineage negative
LPS	Lypopolysaccharide
MCP	Concentré plaquettaire issu du mélange de plusieurs couches leuco plaquettaires (CLP)
MEP	Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor
MGG	May-Grünwald Giemsa
MK	Mégacaryocyte
MK-FOP	Forward programmed MK
MKP	Mégacaryopoïèse
PMP	Progéniteur multipotent
MVB	Multivesicular bodie
MYH10	Myosin Heavy Chain 10 (Chaîne lourde de la myosine non musculaire IIB)
MYH9	Myosin Heavy Chain 9 (Chaîne lourde de myosine non musculaire IIA)
NES	Nuclear export signal
NF	Nuclear factor

NFIB	Nuclear factor I/B
NLS	Nuclear import signal
NO	Monoxyde d'azote
PAI-2	Plasminogen activator inhibitor-2
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PF4	Platelet factor 4
PGI2	Prostaglandine I2
PM	Progéniteur mégacaryocytaire
POP	Polluants organiques persistants
PrM	Précurseur mégacaryopoïétique
PZ	Peripheral Zone
RCPG	Récepteur couplés aux protéines G
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SCF	Stem cell factor
Shh	Sonic hedgehog
SIM	Single minded proteins
SLAMf1	Signaling lymphocyte activation molecule family member
SR1	StemRegenin-1
SRC-1	Steroid receptor coactivator 1
TBP	TATA Binding protein
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TGF $\beta$ 1	Transforming growth factor $\beta$ -1
TIF2	Transcriptional intermediary factor 2
TLR-4	Toll-like récepteur 4
TPO	Thrombopoéïtine
TRALI	Transfusion-related acute lung injury
TRAP	Thrombin Receptor Agonist Peptide
TXA2	Thromboxane A2
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
vWF	von Willebrand Facteur
XRE	Xenobiotic reponse element

## Figures

Figure 1 : Structure de l'AHR.....	8
Figure 2 : Structure du domaine bHLH d'AHR et ARNT lié à la séquence XRE.....	10
Figure 3 : Signalisation de l'AHR au niveau nucléaire en présence d'un ligand.....	17
Figure 4 : Signalisation de l'AHR au niveau cytoplasmique en présence d'un ligand.....	19
Figure 5 : Implication de l'AHR dans la MKP.....	23
Figure 6 : La mégacaryopoïèse.....	25
Figure 7 : L'endomitose.....	34
Figure 8 : La formation du DMS.....	36
Figure 9 : Mégacaryocyte proplaquettaire (A) et remodelage des pré plaquette en plaquette dans la microcirculation pulmonaire (B) .....	39
Figure 10 : La structure de la plaquette sanguine.....	40
Figure 11 : Biogenèse des granules $\alpha$ , $\delta$ et des lysosomes.....	43
Figure 12 : Les cytokines régulant positivement la mégacaryopoïèse .....	46
Figure 13 : Les voie de signalisation du récepteur de la TPO.....	49
Figure 14 : Les régulateurs négatifs de la mégacaryopoïèse.....	52
Figure 15 : Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la MKP.....	54
Figure 16 : Rôle de la plaquette sanguine.....	62
Figure 17 : Les équipes productrices de plaquettes <i>in vitro</i> dans le monde.....	64
Figure 18 : Principaux dispositifs biomimétiques permettant la libération de plaquettes <i>in vitro</i> .....	73
Figure 19 : Le dispositif VerMES.....	79

## Tableaux

Tableau 1 : Les principales différences entre les imMCKLS et les FOP-MK.....	69
Tableau 2 : Les principales différences entre les cellules CD34 <sup>+</sup> et les iPSC.....	72

# Introduction générale

---

Le sang est composé de globules rouges, de globules blancs et de plaquettes circulants dans un liquide, le plasma. Chacun de ces éléments joue un rôle dans de nombreuses fonctions vitales : les globules rouges transportent l'oxygène, les globules blancs sont des cellules de l'immunité indispensables à la protection de l'organisme et les plaquettes quant à elles assurent l'arrêt des saignements lors d'une brèche vasculaire. Ces cellules ont une durée de vie limitée, allant de quelques jours pour les plaquettes (10 jours) à plusieurs centaines de jours pour les globules rouges (120 jours). Il est donc nécessaire de renouveler ces stocks de manière continue et régulée et cela est assuré par un processus physiologique important, l'hématopoïèse. Elle prend place dans la moelle osseuse et a comme origine la cellule souche hématopoïétique (CSH), qui, au contact du microenvironnement et sous l'influence de cytokines et de facteurs de transcription, va se différencier pour donner naissance aux différentes cellules du sang. Concernant nos cellules d'intérêt, les plaquettes, elles sont produites lors d'un processus particulier de l'hématopoïèse, la mégacaryopoïèse (MKP).

Les CSH, d'abord localisées au niveau péri-artériolaire, prolifèrent puis se différencient, sous l'influence de divers signaux intrinsèques et extrinsèques, pour produire les précurseurs des plaquettes que sont les mégacaryocytes (MK). Ceux-ci acquièrent une maturation optimale suite à une succession d'étapes importantes d'endomitoses et d'accroissement du cytoplasme. Les MK devenus matures se trouvent alors localisés au contact de la paroi vasculaire où ils vont pouvoir émettre dans les vaisseaux sinusoides de longues et fines extensions cytoplasmiques, les proplaquettes. Sous l'effet du flux sanguin, celles-ci libèrent des fragments cytoplasmiques, les préplaquettes, qui se remodelent dans la circulation pour former les futures plaquettes. Une production quotidienne de  $1,5 \cdot 10^{11}$  plaquettes est nécessaire pour maintenir une masse plaquettaire constante.

Le rôle principal des plaquettes est d'assurer l'hémostase primaire en formant le clou plaquettaire qui permet l'arrêt des saignements. La transfusion de plaquettes sanguines à partir de concentrés plaquettaires est indiquée de manière curative dans des cas d'hémorragies déclarées lorsque la numération plaquettaire est basse ou que les plaquettes n'assurent plus leurs fonctions (pathologies associées). De manière préventive, elles sont transfusées lorsque la numération plaquettaire est inférieure à 10 000 plaquettes/ $\mu$ L ou qu'un saignement pourrait mettre en jeu la vie du patient. En

France, ces transfusions ne sont possibles que grâce aux dons de sang de volontaires bénévoles et anonymes. Afin d'assurer la sécurité transfusionnelle, l'Établissement français du sang (EFS) se doit de fournir des produits sanguins contrôlés, indemnes de risques infectieux, immunitaires et inflammatoires. L'approvisionnement en plaquettes est particulièrement complexe puisque leur durée de stockage est limitée à 7 jours entre 20°C et 24°C alors que les globules rouges peuvent être stockés à 4°C pendant 42 jours.

Malgré des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes qui régulent la MKP et des progrès technologiques comme l'avènement des biotechnologies, la production de plaquettes de culture reste encore limitée. Si des progrès considérables ont été réalisés, les rendements actuels et les coûts de production ne permettent pas d'envisager aujourd'hui une production industrielle de plaquettes de culture. Les obstacles à franchir sont encore nombreux et c'est dans ce contexte que se situe mon sujet de thèse.

Ma thèse s'est articulée autour de deux parties :

- i) Mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui gouvernent la biogenèse des plaquettes comme l'un des préalables indispensables à l'amélioration de la production des plaquettes de culture. À mon arrivée au laboratoire venait d'être identifié un progéniteur mégacaryocytaire (CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>), présentant une forte capacité à produire des plaquettes, suite à l'inhibition de l'AHR par l'antagoniste SR1 (Stem Regenin-1) (Strassel, Brouard et al. 2016). Une partie de mon travail de thèse a été d'identifier les voies de signalisation dépendantes de l'AHR, impliquées dans l'apparition de cette population particulière. J'ai pu ainsi identifier que IKAROS formait un tandem avec l'AHR impliqué dans l'apparition de la population à fort pouvoir plaquettaire (manuscrit n°1 (en cours de finalisation))
- ii) Analyser la qualité et la fonction des plaquettes de culture et développer la méthode de production des plaquettes de culture pour qu'elle réponde aux normes de Bonnes Pratiques de Fabrication. En effet, l'identification de cette population progénitrice a permis de développer un système de production de plaquettes de culture performant, permettant d'atteindre un rendement de 150



plaquettes/cellule CD34<sup>+</sup> environ, l'un des meilleurs rapporté dans la littérature. Cette approche a alors motivé un projet clinique visant à évaluer, chez un volontaire sain après transfusion de 1% de la masse plaquettaire, les capacités de recirculation et la demi-vie des plaquettes de culture. Il était donc nécessaire dans ce contexte, de s'assurer de la fonctionnalité des plaquettes produites, un travail que j'ai mené et qui a abouti à une publication (manuscrit n°2). Un autre aspect de mon travail a été de développer la méthode de culture pour qu'elle soit compatible avec l'essai clinique que l'on souhaite mener. D'une part, en terme de mise à l'échelle, pour en faire un procédé capable de produire dans un volume de culture raisonnable  $1.10^{10}$  plaquettes soit l'équivalent de 1% de la masse plaquettaire d'un homme de corpulence normale et d'autre part, de mettre ce procédé de culture en adéquation avec les normes de Bonne Pratique de Fabrication imposées par les autorités de santé. Pour permettre d'appréhender au mieux l'ensemble de ma thématique, j'aborderai successivement dans cette partie introductive i) le rôle de l'AHR au cours de la MKP, ii) la physiologie de la MKP et enfin iii) la production de plaquettes *in vitro*.

# **Introduction bibliographique**

---

# **I. Le rôle de l'AHR au cours de la mégacaryopoïèse**

---

## A. Généralités sur l'AHR

L'aryl hydrocarbon récepteur ou AHR est un facteur de transcription favorisant l'élimination d'éléments chimiques extérieurs à l'organisme encore appelés xénobiotiques. On peut citer les composés appartenant à la famille des dioxines comme les composés aromatiques polycycliques qui induisent l'expression d'enzymes, comme les cytochromes P450, dont le rôle principal est de favoriser l'élimination de ces composés (Barouki, Aggerbeck et al. 2012). Des études phylogéniques ont mis en évidence la présence de ce récepteur dans de nombreuses espèces allant des nématodes à l'Homme (Hahn 2002). Cette conservation suggère donc que l'AHR, en plus de détoxifier l'organisme, régulerait d'autres voies de signalisation impliquées dans divers processus physiologiques.

Cette première partie sera consacrée à la description moléculaire de l'AHR, ses fonctions principales et plus particulièrement son implication dans la MKP.

### 1. Historique

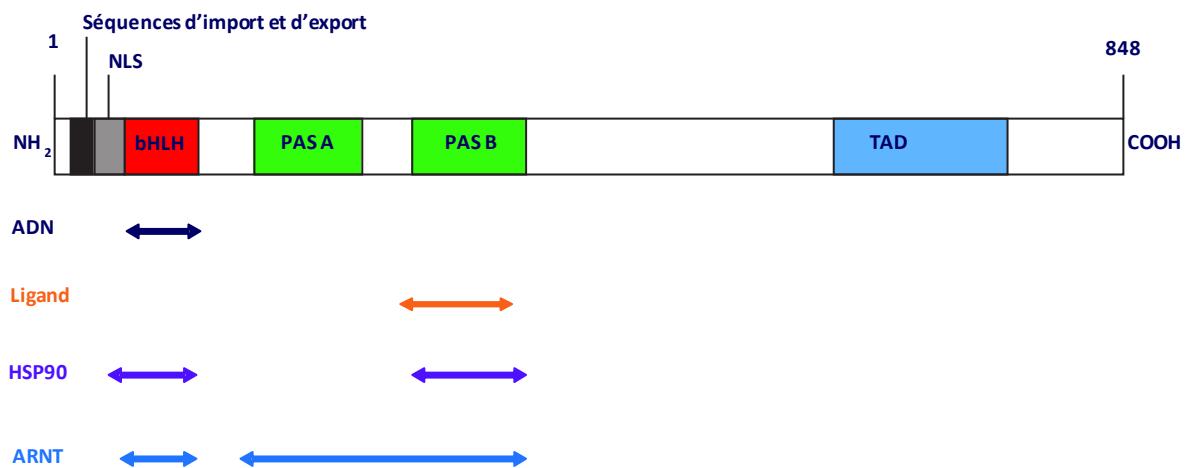
L'AHR est un facteur de transcription identifié pour la première fois par l'équipe de Poland en 1976 (Poland, Glover et al. 1976). Suite à la seconde guerre mondiale, il y a eu une expansion de l'industrie chimique conduisant à la génération d'intermédiaires de synthèse non désirés, plus communément appelés polluants qui ont la particularité d'être très persistants et toxiques. On trouve, notamment dans cette catégorie, les dérivés aromatiques polycycliques comme la dioxine ou les dérivés aromatiques halogénés dont la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD). Lors d'accidents impliquant des industries pétrochimiques où des quantités importantes de polluants ont été libérées, comme en 1949 en Virginie ou en 1976 à Seveso, ou lors de la guerre du Vietnam de 1962 à 1967 avec l'épandage de l'agent orange qui contient de grandes quantités de dioxine (Beischlag, Luis Morales et al. 2008), plusieurs études ont montré qu'un grand nombre de ces composés étaient des ligands de l'AHR. Les effets à long terme de ces composés décrits en 1957 par Sandermann ont été étayés par la suite. Leur accumulation dans l'organisme comprend les effets suivants :

- Ils sont tumorigènes (Fernandez-Salguero, Hilbert et al. 1996).
- Ils sont présents à des concentrations importantes au niveau hépatique (Fanelli, Bertoni et al. 1980).
- Ils sont à l'origine de lésions hépatiques (Fanelli, Bertoni et al. 1980).
- Ils se présentent comme des perturbateurs de l'homéostasie cellulaire (Kolluri, Jin et al. 2017)
- Ils sont à l'origine d'une augmentation du risque de développer un cancer (Kolluri, Jin et al. 2017) de la vessie (Mossanen, Kibel et al. 2017) et de la prostate (Chang, Boffetta et al. 2014))
- Ils se retrouvent stockés dans l'alimentation notamment dans la viande (bœuf, porc, poulet et dinde) (Barone, Storelli et al. 2019)
- et ils sont capables d'interagir avec le récepteur aux œstrogènes empêchant ainsi le développement de la dentelle utérine nécessaire à la reproduction (Buchanan, Sato et al. 2000).

Enfin, l'AHR a également été décrit pour lier d'autres composés, comme des dérivés du tryptophane ou des polyphénols que l'on retrouve dans l'alimentation. Des ligands endogènes ont également été décrits montrant des effets bien souvent tissu-dépendants, entraînant par exemple une modulation du système immunitaire (Thatcher, Williams et al. 2016) ou nerveux (Juricek and Coumoul 2018). Ainsi, ces données suggèrent un rôle de l'AHR non exclusivement lié aux polluants, mais qui participerait également à la régulation d'autres voies de signalisation impliquées dans divers processus physiologiques.

## 2. Structure

L'AHR humain est une protéine de 96 kDa (848 AA) (Figure 1) codée par le gène *AHR* de 47,5 kb constitué de 11 exons et localisé sur le chromosome 7p21.1. C'est un récepteur de type basic Helix-Loop-Helix /Per ARNT Sim (bHLH/PAS). Il est constitué de 3 domaines principaux de Nter vers Cter : (i) des séquences d'import et d'export, (ii) un domaine bHLH-PAS (basic Helix Loop Helix- Period (Per) ARNT Sim) permettant la dimérisation avec d'autres protéines de cette famille, la fixation des ligands (domaine PAS), ainsi que la liaison à l'ADN (domaine bHLH) et enfin (iii) un domaine de transactivation (TAD, transactivation domain) impliqué dans le recrutement de coactivateurs permettant la régulation de la transcription des gènes cibles, notamment les cytochromes P450 impliqués dans l'élimination des xénobiotiques (Mimura and Fujii-Kuriyama 2003, Marinkovic, Pasalic et al. 2010).



**Figure 1 : Structure de l'AHR**

*Les domaines d'import et d'export nucléaire permettent de réguler la quantité d'AHR présente dans le noyau. Le domaine bHLH permet la reconnaissance de séquences d'ADN. Les domaines PAS permettent l'interaction avec les protéines chaperonnes et notamment avec HSP90 mais aussi avec les polluants de l'environnement. Enfin le domaine de transactivation (TAD) permet le recrutement de coactivateurs et régule ainsi l'expression des Cytochromes P450.*

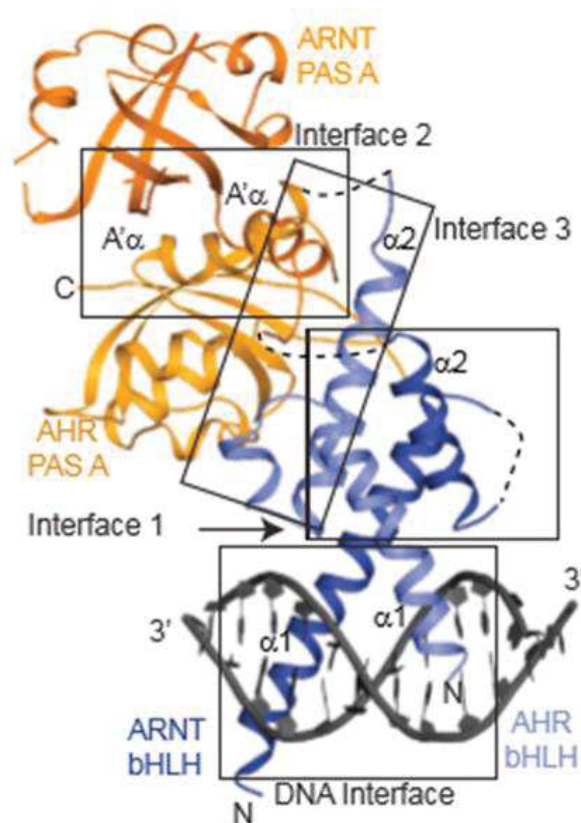
#### a. Les séquences d'import et d'export nucléaire

Les séquences d'import et d'export nucléaire sont de petites séquences d'environ une vingtaine d'acides aminés qui permettent à la protéine d'être transportée vers le noyau (NLS) ou vers le cytoplasme (NES). La séquence d'importation (NLS) s'étend du 13<sup>ème</sup> au 39<sup>ème</sup> acide aminé de l'AHR alors que la séquence d'exportation (NES) s'étend du 55<sup>ème</sup> au 75<sup>ème</sup> acide aminé. L'équilibre entre import et export permet de réguler la quantité d'AHR disponible au niveau nucléaire (Davarinos and Pollenz 1999) (Ikuta, Eguchi et al. 1998).

#### b. Le domaine bHLH/PAS

Le domaine bHLH/PAS est une structure présente dans l'AHR et dans d'autres facteurs de transcription et définit une famille protéique. Afin d'avoir une activité biologique, les protéines bHLH/PAS-A/B doivent se dimériser, formant soit un homodimère soit un hétérodimère (Kewley, Whitelaw et al. 2004). Dans cette famille, il existe deux classes de protéines bHLH/PAS : les protéines de classe I comme l'AHR, l'hypoxia inducible factors (HIF) et les single minded proteins (SIM), et les protéines de classe II comme l'aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) ainsi que les protéines du rythme circadien BMAL. Les facteurs de classe I sont, contrairement aux facteurs de classe II, incapables de s'auto-dimériser ou de s'hétérodimériser avec un autre facteur de classe I et leur partenaire est obligatoirement un facteur de classe II, l'AHR se dimérisant préférentiellement avec l'ARNT en présence de TCDD (Nebert 2017).

En plus de participer à la dimérisation de l'AHR, le domaine bHLH/PAS permet également la liaison à l'ADN et plus particulièrement aux Xenobiotic Reponse Elements (XRE) présents dans le promoteur des cytochromes P450, les principaux gènes cibles de l'AHR. Bien que la structure entière de l'AHR n'ait pas encore été déterminée par cristallographie, une étude récente est parvenue à déterminer la structure du domaine bHLH /PAS-A de l'AHR dimérisé avec l'ARNT et lié à une séquence d'ADN (Figure 2) (Schulte, Green et al. 2017). Cette structure montre que l'ARNT interagit avec ce domaine bHLH/PAS en 3 endroits : une interaction au niveau du domaine bHLH, une seconde avec le domaine PAS-A et enfin la dernière au niveau de la région reliant le domaine bHLH et le domaine PAS-A de l'AHR. Les interactions de l'hétérodimère AHR/ARNT avec l'ADN ont également été déterminées (Schulte, Green et al. 2017).



**Figure 2 : Structure du domaine bHLH d'AHR et ARNT lié à la séquence XRE d'après (Schulte, Green et al. 2017)**

*Mise en évidence par cristallographie des différents sites d'interaction entre les domaines bHLH et PAS-A de l'AHR et de l'ARNT lors de la liaison à la séquence XRE de l'ADN.*



Enfin, le domaine PAS-B est le site de liaison des agonistes de l'AHR. La liaison de composés chimiques aromatiques, tels que la TCDD, induit un changement conformationnel de l'AHR. Ce changement induit l'exposition des séquences d'adressage de l'AHR ainsi qu'une diminution d'affinité pour HSP90 et une augmentation pour l'ARNT (Soshilov and Denison 2008) (Soshilov, Motta et al. 2020).

### c. Le domaine de transactivation

Le domaine de transactivation ou TAD est composé de 304 acides aminés dans la partie C-terminale et est subdivisé en 3 sous-régions : une première composée de 56 acides aminés (545-600) puis une région riche en glutamines aussi appelée Q-rich région de 114 acides aminés (600-713), enfin les 135 derniers acides aminés (713-848) correspondent à une région riche en sous-domaines proline, sérine et thréonine. Le domaine de transactivation est impliqué dans le recrutement de coactivateurs et corépresseurs permettant la régulation de la transcription des gènes cibles. En effet, l'ensemble du TAD est très flexible et permet de s'adapter à différentes protéines partenaires, mais c'est le domaine riche en glutamines qui est le principal site de liaison d'interaction protéine/protéine du TAD, il permet notamment l'interaction avec la TATA Binding protein (TBP), steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) ou transcriptional intermediary factor 2 (TIF2) (Watt, Jess et al. 2005). La structure 3-D de cette région de l'AHR n'a pas encore été élucidée, mais des études utilisant un composé chimique capable de stabiliser l'état replié des protéines comme l'osmolyte triméthylamine-N-oxide (Macdonald and Khajehpour 2013) ont permis de mettre en évidence que la conformation de l'AHR est un élément essentiel pour la liaison de certaines protéines comme la TBP (Watt, Jess et al. 2005).

Bien que nous ne disposions pas à ce jour des données structurales complètes de l'AHR, les données obtenues grâce à des analyses physicochimiques suggèrent que la conformation tridimensionnelle de l'AHR dans son environnement permette la liaison protéique et l'activation de certaines voies de signalisation au niveau du domaine bHLH/PAS ou du TAD.

### 3. Les gènes cibles

Les gènes cibles de l'AHR les plus étudiés sont les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des dioxines et plus généralement des xénobiotiques. En présence de ces molécules, le dimère AHR/ARNT est capable *via* son domaine b-HLH, de se lier à l'élément XRE. Cet élément est une séquence d'ADN spécifique 5'-TNGCGTG-3', que l'on retrouve dans de nombreuses espèces et qui est présente au niveau des promoteurs des gènes codants pour divers cytochromes CYP450 comme le CYP1A1, CYP1A2, et CYP1B1, mais aussi pour l'AHR répresseur (AHRR), la glutathion S-transférase ou l'aldehyde-3-Dehydrogenase. En plus d'être impliquée dans le métabolisme de composés exogènes, la voie de l'AHR joue également un rôle, en présence de TCDD, dans la croissance cellulaire comme l'interleukine- 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) ou encore le transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) (Rowlands and Gustafsson 1997) (Bock 2019).

L'AHR *via* la séquence XRE est également capable d'induire l'expression de protéines du cycle cellulaire comme l'inhibiteur de kinase dépendant de la cycline 1B (CDKN1B), celui dépendant de la cycline 1A (CDKN1A) ou l'ADN polymérase, grâce à des interactions avec d'autres facteurs de transcription comme la protéine associée au rétinoblastome (Bock 2019).

En plus des séquences XRE, l'AHR est également capable de lier une séquence 5'-CANNTG-3' appelée E-box. Cette séquence est présente dans le promoteur du récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSHR) impliquée dans les cycles reproducteurs de la femme, notamment au niveau des ovaires, et chez l'homme au niveau des testicules. Il a été mis en évidence que l'AHR, en présence de TCDD, permettait d'augmenter l'expression de ce récepteur l'impliquant ainsi directement dans la mise en place des processus de reproduction (Teino, Kuuse et al. 2012).

#### 4. Régulation de l'AHR

La régulation des facteurs de transcription est essentielle pour prévenir toute stimulation excessive. Deux grandes voies physiologiques permettent la régulation de l'AHR, la dégradation de la protéine par le protéasome et la formation d'un dimère avec une protéine de la famille bHLH-PAS inhibant l'effet de l'AHR.

Comme pour de nombreuses protéines, la quantité d'AHR peut être modulée en fonction de l'environnement, et ce afin de protéger l'organisme. Ainsi il a été décrit que, suite à une exposition à la TCDD, l'AHR était fortement dégradé jusqu'à ne plus être détectable par Western Blot deux heures après exposition (Reick, Robertson et al. 1994). La dégradation de l'AHR est réalisée par le protéasome qui dégrade spécifiquement les protéines ubiquitinées. En effet, suite à l'exposition à la TCDD, l'AHR est rapidement exporté du noyau sous forme ubiquitinée et éliminé par le protéasome 26S (Pollenz 2002).

Il a été mis en évidence que la SUMOylation, qui est une modification post-traductionnelle permettant la fixation d'une protéine de la famille des Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) au niveau de certaines lysines du domaine TAD de l'AHR, permet d'augmenter sa durée de vie. La SUMOylation inhibe l'ubiquitination de l'AHR et ainsi sa dégradation naturelle par le protéasome (Xing, Bi et al. 2012). Il est à remarquer que bien que la SUMOylation augmente la durée de vie de l'AHR, elle diminue la capacité de l'AHR à lier l'ADN ou à activer d'autres protéines *via* le TAD, puisqu'en présence de protéine SUMO il y a un encombrement stérique de ces régions (Larigot, Juricek et al. 2018).

Par ailleurs, en présence de TCDD, l'AHR induit la transcription des cytochromes P450 ainsi que de l'AHRH qui est à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle négatif. L'AHRH est une protéine b-HLH-PAS structurellement très proche de l'AHR dont le domaine PAS-B est absent et le domaine TAD est remplacé par un domaine de transrépression supprimant ainsi l'activité de l'AHR (Larigot, Juricek et al. 2018). L'AHRH peut alors se lier préférentiellement à l'ARNT et permettre sa chélation la rendant indisponible pour se dimériser avec l'AHR et transcrire les gènes cibles (Hahn, Allan et al. 2009). Une compétition entre ces différentes molécules a également lieu dans des situations hypoxiques lorsque HIF1 $\alpha$  est surexprimé, et qu'il se dimérise avec l'ARNT qui n'est alors plus disponible pour l'AHR (Gabriely, Wheeler et al. 2017).

## B. Voies de signalisation

L'AHR est capable de réguler l'expression de gènes très différents comme des gènes du cycle cellulaire ou des enzymes comme les cytochromes P450, et ce par divers mécanismes comme la liaison à l'ADN *via* le domaine b-HLH ou par l'interaction avec d'autres facteurs de transcription.

### 1. Les ligands

De nombreuses molécules exogènes et endogènes sont capables de lier l'AHR. Plus généralement, l'AHR est capable de lier tout composé plan dont les dimensions sont compatibles avec son site de liaison, c'est-à-dire inférieures ou égales à 14 Å \* 12 Å \* 5 Å (Denison and Nagy 2003).

Parmi les molécules exogènes, on retrouve notamment les polluants comme le TCDD qui est le plus connu, et le 3-Methylcholanthrene, ainsi que des médicaments comme l'oméprazole un antisécrétoire gastrique (Shinde and McGaha 2018). Les molécules exogènes sont également présentes dans l'alimentation, on retrouve ainsi l'Indole-3-carbinol (I3C) dans le chou, des flavonoïdes comme la quercétine présente notamment dans les myrtilles ou encore des polyphénols comme le resveratrol présent entre autres dans le raisin.

De plus, certains ligands exogènes comme la curcumine ou SR1 s'opposent à la voie d'élimination des polluants aussi appelée voie canonique de l'AHR, mais sont capables d'activer d'autres voies pharmacologiques, celles non canoniques de l'AHR. À ce jour, il semblerait que ces voies non canoniques soient à l'origine de l'effet princeps de l'AHR, à savoir la modulation fine de voies pharmacologiques, ce qui explique qu'aujourd'hui ce récepteur est impliqué dans de nombreuses fonctions comme la vision, la neurologie ou la MKP.

En ce qui concerne les molécules endogènes, on y trouve des dérivés du tryptophane comme la kynurenine, mais également des composés comme la bilirubine et la biliverdine obtenues suite à la dégradation de l'hème (Shinde and McGaha 2018).

## 2. Signalisation sans ligands

L'AHR est un récepteur cytoplasmique complexé à un ensemble de protéines chaperonnes telles que Hsp90, XAP2 et p23. La protéine HSP90 (heat shock protein de 90 kDa) permet de réguler la dégradation d'un grand nombre de protéines et est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la réparation de l'ADN, le développement ou la réponse immunitaire (Schopf, Biebl et al. 2017). HSP90 permet la séquestration dans le cytoplasme de l'AHR tout en empêchant sa dégradation par le protéasome. Deux protéines HSP90 se lie au domaine b-HLH/PAS-B de l'AHR. D'autre part, HSP90 se lie via sa partie C-terminale avec la protéine XAP2 (hepatitis B virus X-associated protein 2) qui permet d'inhiber la dégradation du complexe par le protéasome en absence de ligand, mais qui joue également un rôle dans la localisation de l'AHR. En effet en présence de XAP2 il a été mis en évidence que la translocation de l'AHR est retardée (Kudo, Hosaka et al. 2018) (Kazlauskas, Poellinger et al. 2000). La protéine p23, quant à elle, se lie également au niveau de la protéine HSP90 et permet de consolider le complexe de protéines chaperonnes (Kudo, Hosaka et al. 2018) (Schopf, Biebl et al. 2017) (Figure 3).

### 3. Signalisation en présence d'un ligand

L'utilisation de souris déficientes pour l'AHR ainsi que des analyses transcriptomiques et protéomiques, ont permis de montrer qu'en fonction du ligand fixé sur l'AHR, celui-ci était capable de déclencher différentes réponses cellulaires, en utilisant une voie canonique nucléaire ou des voies alternatives qui peuvent être nucléaires ou cytoplasmiques impliquant ainsi l'AHR dans de nouvelles fonctions au niveau immunitaire, cardiovasculaire, développemental, tumoral et hématopoïétique.

#### a. Au niveau nucléaire

L'interaction de certains ligands avec l'AHR induit un changement de conformation du récepteur et dissociation des protéines chaperonnes, favorisant ainsi sa translocation dans le noyau où il s'associe avec son partenaire ARNT, induisant la voie de signalisation dite canonique. Cette hétérodimérisation permet l'association de deux domaines en doigt de zinc, l'un présent sur l'AHR et l'autre sur l'ARNT et la reconnaissance des séquences XRE, menant à la transcription entre autre des cytochromes P450, notamment CYP1A1 et CYP1B1 (Mimura and Fujii-Kuriyama 2003, Marinkovic, Pasalic et al. 2010).

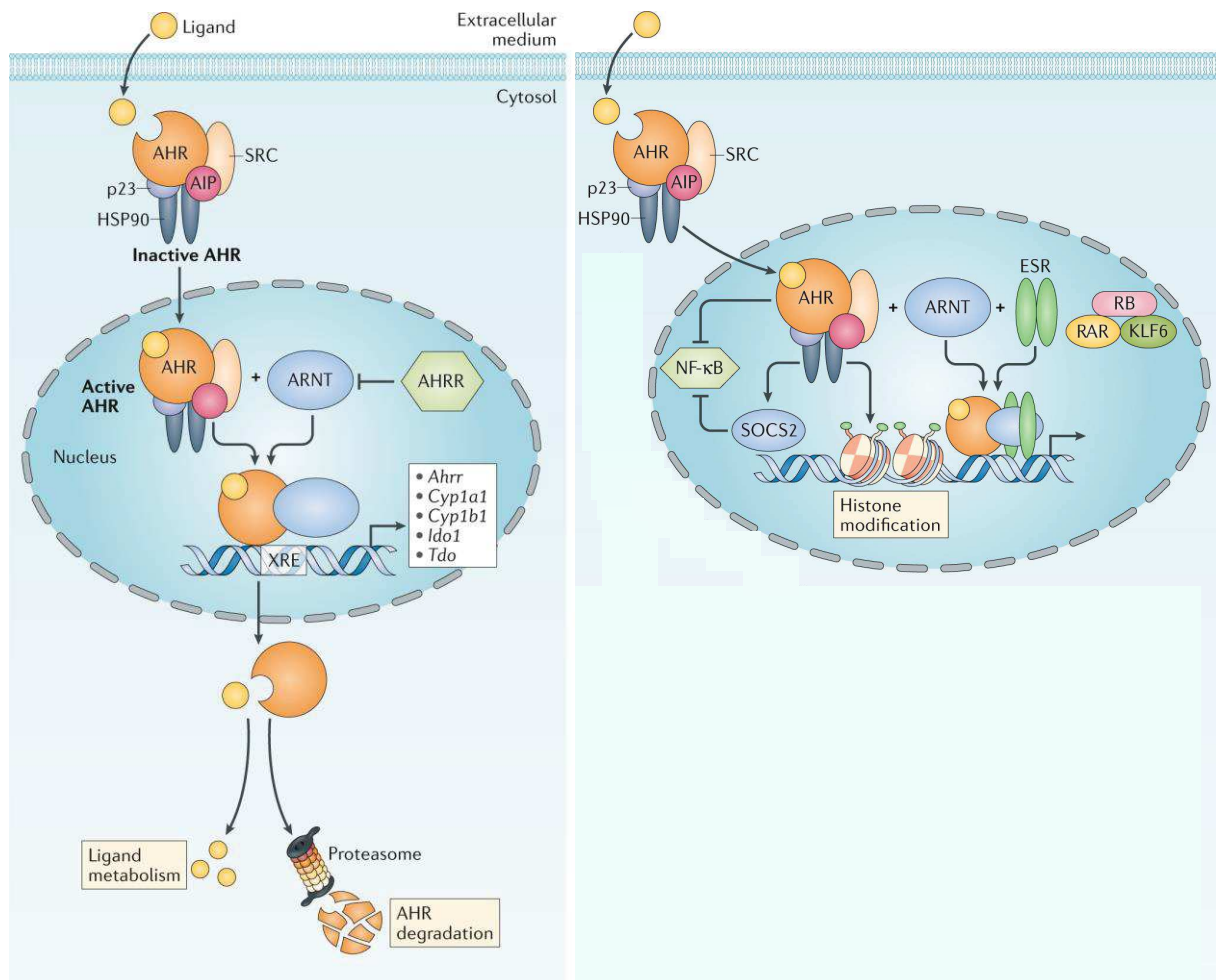
L'AHR peut également être engagé dans des voies de signalisation alternatives, dites non canoniques.

Elles peuvent être nucléaires en régulant des gènes sous la dépendance d'autres facteurs de transcription par la formation d'un dimère comme avec la protéine du rétinoblastome (Bock 2019). L'interaction de l'AHR avec d'autres facteurs de transcription a également été rapportée parmi lesquels on peut citer IKAROS, que l'on a étudié dans la publication n°1, un régulateur de la production de cellules lymphoïdes. L'interaction d'AHR avec IKAROS permet la régulation de l'immunité de l'intestin (Malinge, Thiollier et al. 2013) (Tijssen, Moreau et al. 2016) (Li, Heller et al. 2016).

L'AHR est également impliqué dans l'acétylation et la désacétylation des histones de l'ADN permettant ainsi de réguler la transcription des gènes en favorisant ou non la condensation de l'ADN. Il a été mis en évidence qu'une exposition au 3-

Methylcholanthrene, un ligand de l'AHR, induit une surexpression de l'histone désacétylase 1 (HDAC 1), une enzyme capable de désacétyler les histones favorisant l'accès à l'ADN (Chang, Sue et al. 2014).

En présence d'un agoniste l'AHR peut activer la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B et ainsi de réduire l'expression de cytokines inflammatoires telles que l'IL-8 ou CCL5 (RANTES) *via* d'autres voies de signalisation nucléaires (Ovrevik, Lag et al. 2014) (Figure 3).



**Figure 3 : Signalisation de l'AHR au niveau nucléaire en présence d'un ligand d'après (Rothhammer and Quintana 2019)**

*Dans le noyau, l'AHR peut activer deux grandes voies de signalisation, une canonique et une alternative. La voie canonique de l'AHR passe par la formation d'un complexe avec l'ARNT, la liaison à l'ADN au niveau des séquences XRE et la transduction de gènes cibles et notamment les cytochromes P450 CYP1A1 et CYP1B1. D'autre part au niveau nucléaire l'AHR peut réguler d'autres acteurs tels que NF- $\kappa$ B ou l'HDAC1.*



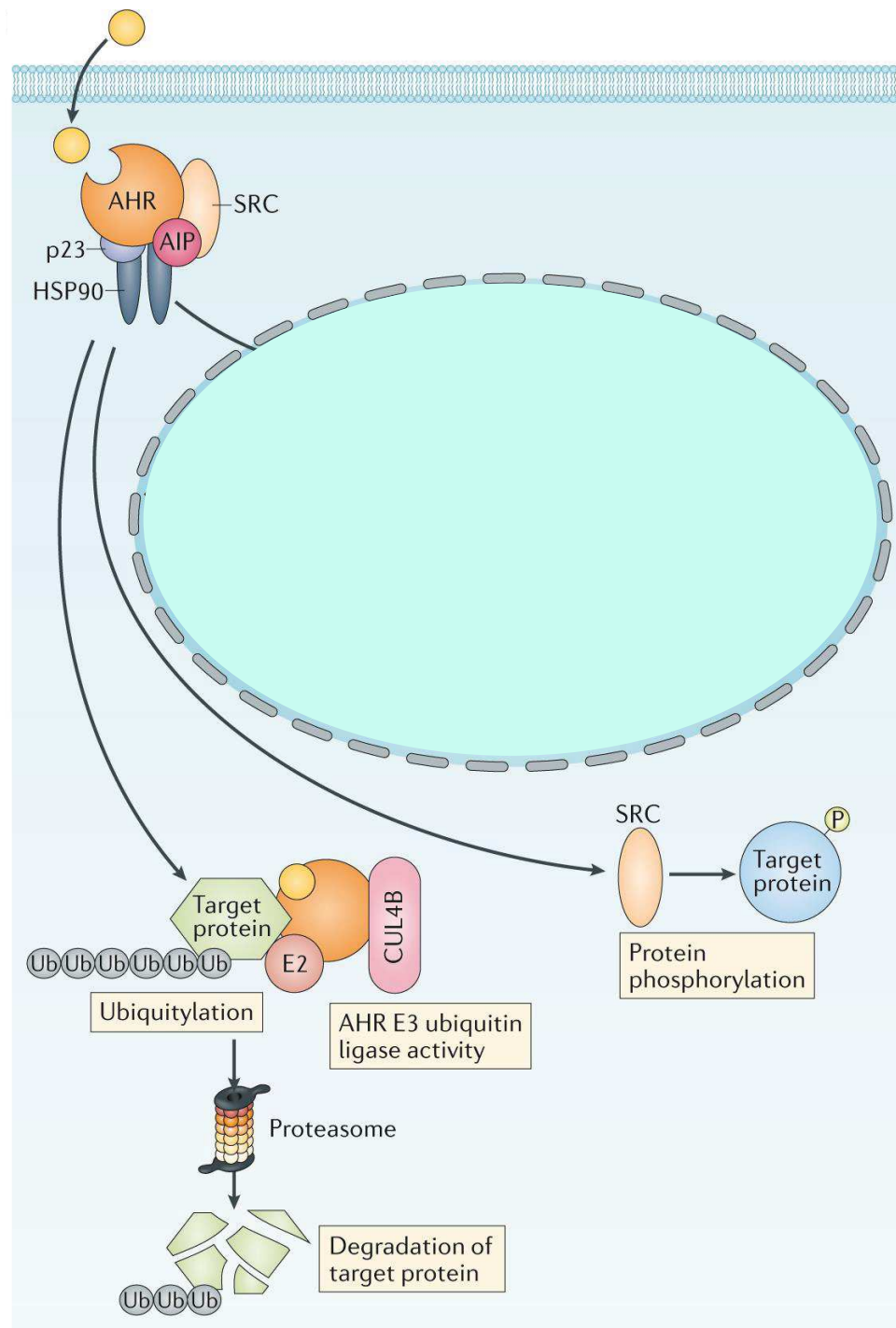
## b. Au niveau cytoplasmique

Le premier type de voie implique la séquestration de l'AHR dans le cytoplasme par les protéines chaperonnes qui masquent alors le site d'adressage au noyau. Dans les voies non canoniques cytoplasmiques, on retrouve la formation d'un complexe ubiquitine-ligase dans lequel on retrouve les protéines E3, CUL4B et l'AHR. Ce complexe a la capacité d'ubiquitiner certaines protéines et ainsi d'induire leur dégradation par le protéasome. Le complexe est notamment capable d'induire la dégradation des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes (Ohtake, Fujii-Kuriyama et al. 2009, Ohtake, Fujii-Kuriyama et al. 2011), de la  $\beta$ -caténine (Shiizaki, Kido et al. 2019) ou encore de PPAR $\gamma$  (Dou, Duan et al. 2019) (Figure 4).

En plus de cette capacité de dégradation, l'AHR favorise la phosphorylation de la protéine tyrosine kinase SRC qui elle est capable d'activer la voie STAT et notamment STAT3 (Zhu, Luo et al. 2018). De même, des études portant sur le resveratrol ont permis de mettre en évidence le rôle de SRC dans la perméabilité endothéliale puisqu'en absence de resveratrol le couple AHR/SRC induit une hyperphosphorylation de la VE-cadhérine, ce qui induit une hyperperméabilité endothéliale (Assefa, Yan et al. 2019). L'activation de la voie AHR/SRC a également été décrite dans le cancer du poumon non à petites cellules comme une source de résistance au traitement par des inhibiteurs de tyrosine kinase dirigés contre l'EGFR. En effet, le couple AHR/SRC induit la phosphorylation des voies en aval de l'EGFR en phosphorylant directement la PI3K ou les protéines de la voie des MAPKinases notamment MEK/ERK, rendant le traitement inefficace (Ye, Zhang et al. 2018).

Cette accumulation de l'AHR dans le cytoplasme lui permet d'être impliqué dans plusieurs voies de signalisation telles que les voies MAPK, STAT, PI3K. Parmi ces voies, certaines sont connues pour être en aval du récepteur de la thrombopoïétine (TPO), la cytokine clé de la biogenèse des plaquettes et la voie Wnt *via* la  $\beta$ -caténine impliquée dans les étapes finales de la production des plaquettes.





**Figure 4 : Signalisation de l'AHR au niveau cytoplasmique en présence d'un ligand d'après (Rothhammer and Quintana 2019)**

*Au niveau cytoplasmique l'AHR peut activer de nombreuses voies de signalisation par l'activation de la protéine SRC. De même, l'AHR sous certaines conditions peut former un complexe avec CUL4B et une ubiquitine ligase. Ce complexe permet l'ubiquitination de protéines cytoplasmiques et ainsi leur dégradation par le protéasome.*

## C. Les grands rôles de l'AHR

La mise en évidence de nombreuses voies alternatives empruntées par l'AHR permet de se réinterroger sur son rôle dans divers processus physiologiques. Initialement décrit comme le récepteur des dioxines, l'AHR est maintenant impliqué dans le développement des cancers, et des rôles lui ont été attribués dans l'immunité, le développement embryonnaire ou encore la MKP.

La présence de TCDD, un agoniste de la voie canonique, favorise la prolifération cellulaire en permettant à la cellule d'échapper aux systèmes de régulation du cycle cellulaire (Bock and Kohle 2005). Ainsi, l'ingestion de dioxines via la nourriture ou leur inhalation favorise le risque de développer un cancer du sein alors qu'une consommation riche en flavonoïdes en serait protectrice (Donovan, Selmin et al. 2018). L'ingestion de TCDD augmente également le risque de développer des fibroses hépatiques (Pierre, Chevallier et al. 2014).

L'AHR favorise également l'expression d'interleukines, facteurs clés dans les réactions immunitaires, notamment celles de l'IL-22 dans les cellules lymphoïdes T17, de l'IL10 et de l'IL21 dans les cellules lymphoïdes Tr1 (Gutierrez-Vazquez and Quintana 2018). Il joue également un rôle au niveau des cellules lymphoïdes présentes dans le microbiote, plus particulièrement intestinal, en régulant leur différenciation et prolifération (Li, Innocentin et al. 2011, Angelos, Ruh et al. 2017).

L'AHR participe également au développement embryonnaire. En effet, la perturbation de ce dernier par des polluants fait intervenir l'AHR qui, une fois dimérisé avec une histone désacétylase (NuRD), permet de modifier l'expression des gènes qui contrôlent la différenciation cellulaire dans les premiers instants post-fécondation agissant ainsi sur le développement (Gialitakis, Tolaini et al. 2017). L'AHR est également impliqué dans la mise en place du système neuronal chez *Caenorhabditis elegans* grâce à des interactions avec d'autres facteurs de transcription (Qin and Powell-Coffman 2004). Au niveau neuronal, une déficience en AHR induit également une démyélinisation des axones (Juricek, Carcaud et al. 2017).

Ainsi, l'AHR joue des rôles clés dans des fonctions physiologiques essentielles.

## D. L'AHR dans la mégacaryopoïèse

Le rôle de ce récepteur dans la MKP a été mis pour la première fois en évidence en 2011 par l'étude du phénotype de souris déficientes pour l'AHR. Plus récemment encore a été mis en avant le rôle de ce récepteur dans l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques vers la lignée érythro-mégacaryocytaire et il a été également décrit comme un outil clé dans la production de plaquettes *in vitro* avec l'utilisation, plus particulièrement, de SR1.

### 1. Etude du rôle de l'AHR chez la souris

L'AHR est décrit, dans un modèle murin, comme un acteur de l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire, mais également dans la différenciation des MK au cours de la MKP.

Lindsey et al. ont mis en évidence, sur une lignée mégacaryocytaire humaine CHRF, une augmentation du nombre de transcrits de l'AHR (Lindsey and T. Papoutsakis 2011). Cette même équipe a montré dans des souris déficientes pour l'AHR, une augmentation du nombre de MK et une immaturité des MK visualisée par la diminution de la lobulation des noyaux, un critère de maturation des MK (section II. A. 3. B). D'autre part, ces souris déficientes pour l'AHR présentent un défaut d'hémostase qui se traduit par une forte augmentation du temps de saignement, mesuré après section de la queue des souris et ce malgré une faible diminution de leur numération plaquettaire (9%) (Lindsey and T. Papoutsakis 2011). L'une des explications à cette modification du temps de saignement qui semble indépendante de la numération plaquettaire serait liée à une diminution de 14% de la glycoprotéine (GP) VI, le récepteur du collagène, qui empêcherait une agrégation maximale des plaquettes et donc la formation du clou plaquettaire (Lindsey, Jiang et al. 2014).

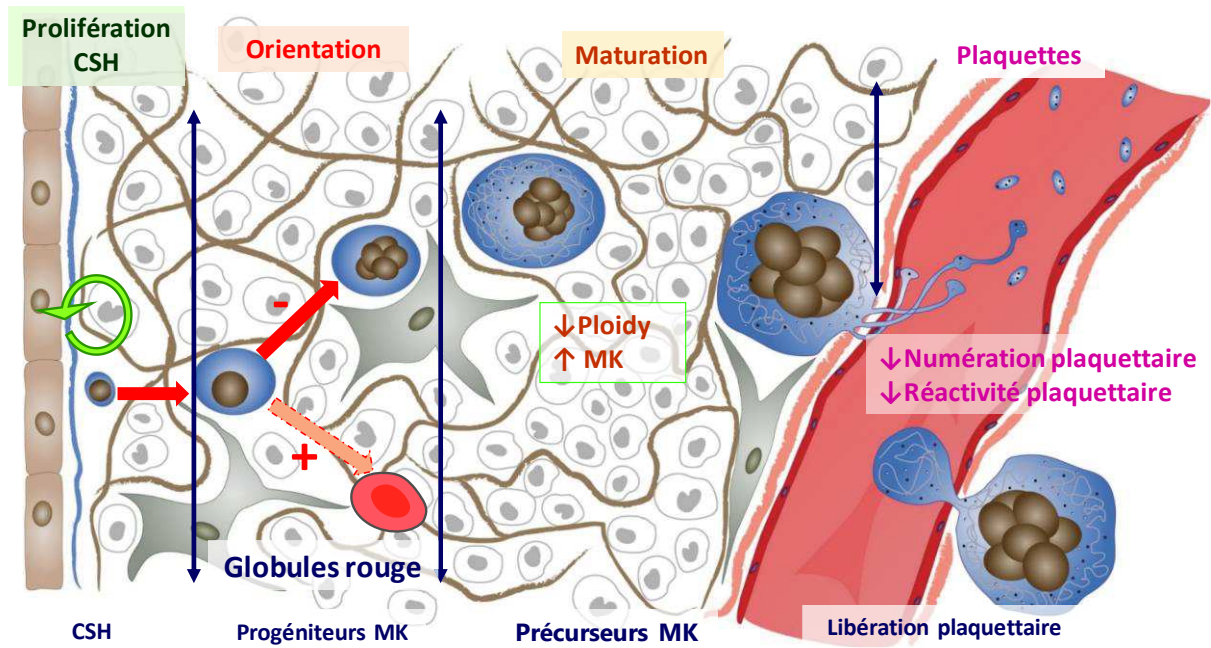
## 2. Etude du rôle de l'AHR chez l'Homme

L'AHR est impliqué dans l'hématopoïèse et plus particulièrement dans l'orientation du progéniteur bipotent MEP (paragraphe II.A.2) soit vers la lignée érythrocytaire en présence d'un agoniste de l'AHR soit vers la lignée mégacaryocytaire lorsqu'exposé à un antagoniste comme le CH223191 (Figure 5) (Smith, Rozelle et al. 2013).

Suite à un criblage pharmacologique, le composé chimique Stemregenin-1 (SR1), décrit comme un antagoniste de l'AHR, a été identifié comme un agent favorisant la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques (PH) de type CD34<sup>+</sup> et leur prise de greffe. En effet, SR1 multiplie par 50 le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> et par 17 l'efficacité de prise de greffe d'une souris immunodéficiente (Boitano, Wang et al. 2010). L'intérêt de l'utilisation de ce ligand de l'AHR a depuis été validé dans des études cliniques (Wagner, Brunstein et al. 2016)

Notre laboratoire a également montré que SR1 mimait des effets liés au contact des progéniteurs hématopoïétiques avec le microenvironnement médullaire et plus particulièrement avec les cellules souches mésenchymateuses ou MSC. En effet, la culture de progéniteurs hématopoïétiques humains, CD34<sup>+</sup>, en présence de SR1, permet l'apparition d'une population CD34<sup>+</sup>CD41<sup>dim</sup> présentant un fort pouvoir à produire des plaquettes tout comme lors de la co-culture des cellules CD34<sup>+</sup> en présence de MSC, mais pour l'instant le mécanisme par lequel les MSC régulent la différenciation et la maturation des MK est inconnu (Strassel, Brouard et al. 2016).

Il est surprenant de noter qu'une souris déficiente pour AHR présente une légère diminution de la numération plaquettaire (Lindsey, Jiang et al. 2014) alors qu'une molécule décrite comme un antagoniste de la voie canonique de l'AHR, SR1, permet l'augmentation de la production de plaquettes *in vitro* (Strassel, Brouard et al. 2016). Si l'effet de SR1 sur la production de plaquettes est dépendant de l'AHR, ce qui peut être confirmé par l'utilisation de shRNA ciblant l'AHR, ceci suggère que SR1 n'est pas uniquement un antagoniste de l'AHR mais qu'il permet la révélation d'autres voies de signalisation et c'est ce sur quoi porte la publication n°1 (page 90).



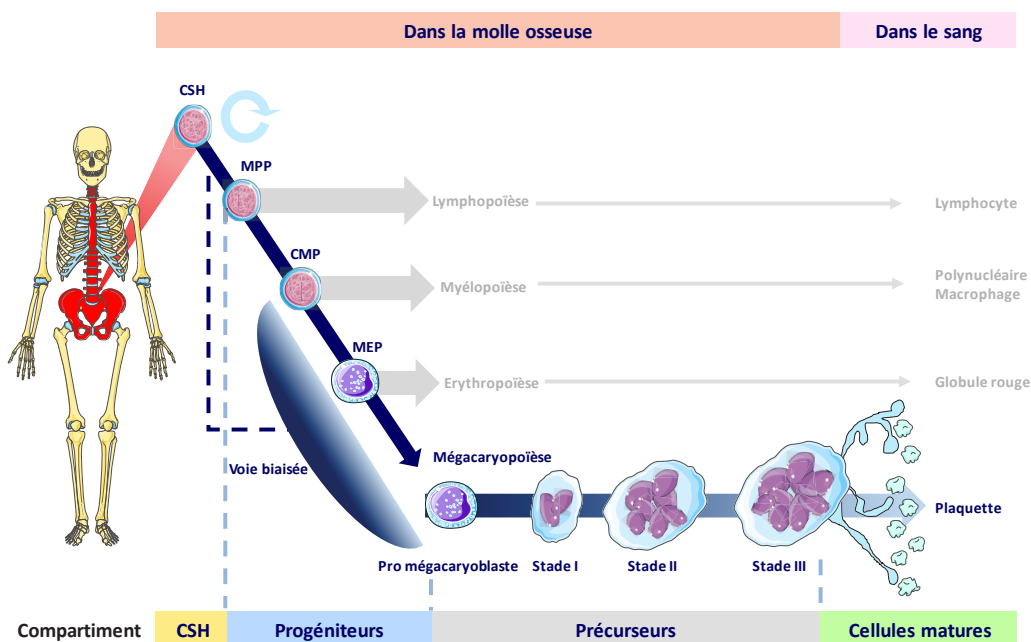
**Figure 5 : Implication de l'AHR dans la MKP**

*L'AHR est impliqué à tous les stades de la MKP. Il favorise la prolifération de la CSH, son engagement vers le progéniteur bipotent ainsi que la maturation des MK. Son absence chez la souris induit une augmentation du nombre de MK et une diminution de leur ploïdie. Au niveau des plaquettes, il a été mis en évidence chez les souris déficientes pour ce récepteur une diminution de la numération plaquettaire ainsi qu'une baisse de la réactivité plaquettaire au collagène.*

## **II. Physiologie de la Mégacaryopoïèse**

---

La MKP est le processus physiologique qui permet la formation de plaquettes sanguines à partir d'une CSH. Elle prend place dans la moelle osseuse, au sein de la niche ostéoblastique puis de la niche vasculaire où elle est influencée par de nombreux facteurs comprenant des cytokines, des facteurs de transcription et un microenvironnement particulier. La CSH peut ainsi proliférer, se différencier et s'engager irrévocablement dans la voie mégacaryocytaire pour donner successivement naissance aux progéniteurs mégacaryocytaires (PM), aux précurseurs mégacaryopoïétiques (PrM) et enfin aux MK matures qui eux, donneront naissance aux futures plaquettes. Chez l'Homme, on estime qu'un MK est capable de produire de 1000 à 3000 plaquettes (Figure 6).



**Figure 6 : La mégacaryopoïèse**

*La MKP prend place chez l'adulte au niveau de la moelle osseuse des os courts et plats de l'organisme dans le cadre d'un mécanisme plus général, l'hématopoïèse. À l'origine de ce processus se trouve la CSH qui voit son potentiel de différenciation se restreindre progressivement et donner naissance au progéniteur multipotent (PMP) qui permettra l'émergence du progéniteur commun myéloïde (CMP), puis au progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire à la confluence des voies érythro-mégacaryocytaires, le MEP. Ce dernier permet de générer les précurseurs mégacaryocytaires qui, une fois matures, libéreront les plaquettes dans la circulation. Il existe une seconde voie dite voie mégacaryocytaire biaisée qui, en cas de stress, permet de produire directement un MEP à partir de la CSH.*



## A. Des cellules souches hématopoïétiques aux plaquettes sanguines

Toutes les cellules du sang sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée, la CSH multipotente. Pour lui permettre de maintenir un stock constant, la CSH est douée de capacités d'auto-renouvellement et de quiescence. Elle perd ensuite progressivement ses capacités de différenciation pour s'engager à terme dans des lignages hématopoïétiques spécifiques.

### 1. La cellule souche hématopoïétique

Les CSH sont dites multipotentes, car capables de générer toutes les cellules du sang. Elles ne représentent qu'un nombre très faible de cellules mononucléées de la moelle osseuse, chez l'Homme entre 1 à  $4 \cdot 10^5$  cellules. On estime qu'il y a environ 150 CSH mobilisées quotidiennement pour assurer de manière régulière et continue le stock de cellules sanguines.

Les CSH ont été mises en évidence en 1961 par l'équipe canadienne de Till et McCulloch suite à l'injection de cellules de moelle osseuse syngénique à des souris préalablement irradiées de manière létale. La survie des souris greffées et donc leur radioprotection a permis de mettre en évidence la présence d'une cellule capable de reconstituer la moelle osseuse, la cellule souche (Till and McCulloch 1961).

La CSH est à l'heure actuelle définie par sa capacité à reconstituer la moelle osseuse d'une souris rendue aplasique par irradiation et de générer des CSH capables de reconstituer la moelle osseuse d'une autre souris après une greffe secondaire. Si les cellules greffées ne sont capables de reconstituer que la moelle osseuse de la première souris irradiée, on parle de CSH dite à court terme (CSH\_CT). Si les cellules régénèrent également la moelle osseuse de la seconde souris irradiée, on parle alors de CSH dite à long terme (CSH\_LT) (Purton and Scadden 2007).



### a. Caractérisation phénotypique des CSH

La réalisation d'une étude approfondie des propriétés et caractéristiques des CSH, nécessite de pouvoir les identifier phénotypiquement en utilisant des marqueurs cellulaires, notamment ceux présents au niveau de la membrane plasmique.

L'accès à de nombreux anticorps a facilité l'étude des CSH murines qui sont aujourd'hui très bien caractérisées. Pour sélectionner les CSH, toutes les cellules engagées dans les lignées hématopoïétiques sont exclues par un ensemble d'anticorps dits : Lin<sup>-</sup> (lineage negative). Leur caractérisation s'est ensuite affinée grâce à l'utilisation d'autres marqueurs identifiés lors d'expériences de reconstitution de l'hématopoïèse dans des souris irradiées, comme l'antigène thymocytaire CD90, un marqueur majeur des cellules souches pluripotentes, l'antigène-1 des cellules souches murine Sca1 et c-kit/CD117, un marqueur de la cellule souche impliqué dans la prolifération cellulaire. Il est à préciser que les CSH alors définies comme Lin<sup>-</sup> /Sca1<sup>+</sup> /CD90<sup>+/-</sup>/c-kit<sup>+</sup>, représentent malgré tout une population hétérogène. Au sein de cette population, on sait aujourd'hui différencier les CSH<sub>LT</sub> et CT des progéniteurs multipotents (PMP) grâce à l'expression du marqueur CD150 aussi appelé SLAMf1 (Signaling lymphocyte activation molecule family member 1). Il a permis de s'affranchir d'un marqueur nucléaire, le Hoechst, qui en cytométrie de flux, définit une population peu fluorescente et hétérogène, appelée side population, contenant les CSH<sub>LT</sub> et CT (Weksberg, Chambers et al. 2008) (Lee, Yoon et al. 2019). La cellule souche murine est donc définie comme Lin<sup>-</sup>Thy1.1<sup>low</sup>cKit<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>flk2-CD34-SLAMf1<sup>+</sup> (Bryder, Rossi et al. 2006).

Chez l'Homme, l'identification des CSH est beaucoup moins aboutie, notamment du fait de l'absence de marqueurs phénotypiques suffisamment spécifiques. On qualifie habituellement de CSH les cellules qui expriment le cluster de différenciation (CD)34, un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des phosphoglycoprotéines, une sialomucine dont la fonction au niveau cellulaire reste mal connue. Ce récepteur n'est cependant pas spécifique des CSH, car également retrouvé sur les progéniteurs hématopoïétiques (Furness and McNagny 2006).

La CSH se caractérise phénotypiquement, chez l'Homme comme étant Lin<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD90<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>. Le CD90 est un marqueur des cellules immunitaires et le CD45RA un marqueur lymphoïde et myéloïde (Seita and Weissman 2010), connu pour se lier à la L-Sélectine (CD62L) et à la protéine d'adaptation CrkL, permettant respectivement l'adhésion cellulaire et sa régulation (Sidney, Branch et al. 2014). Une identification plus fine des CSH est obtenue en associant au marqueur CD34 d'autres CD, comme les CD38, CD133<sup>+</sup> (la prominin-1), un marqueur des cellules souches, l'expression faible du CD45RA (CD45RA<sup>low</sup>), l'expression faible du CD90 (CD90<sup>low</sup>) et l'expression faible du CD117 (CD117<sup>low</sup>) (Lee, Yoon et al. 2019).

#### b. La quiescence des CSH

Les CSH sont quiescentes c'est-à-dire qu'elles ne se divisent pas. Leur cycle cellulaire est arrêté. Cette propriété les rend plus résistantes au stress cellulaire généré par l'environnement, comme l'irradiation ou l'exposition à des composés chimiques. La quiescence est nécessaire pour préserver le nombre de cellules souches (Li 2011, Li and Bhatia 2011). Cependant, en fonction des signaux reçus du microenvironnement notamment, elles peuvent se mettre en cycle et ainsi assurer leur prolifération (Mohammad, Dakik et al. 2019) en particulier grâce aux cyclines. En effet, la cycline C qui permet le passage de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire est un acteur important dans la régulation de la quiescence des CSH. Son extinction, dans des cellules CD34<sup>+</sup>, entraîne une augmentation des CSH quiescentes et favorise leur prolifération (Miyata, Liu et al. 2010). La cycline E1, quant à elle, permet la transition G1/S facilitant la sortie de la quiescence et favorise une entrée rapide des cellules dans le cycle cellulaire lors de conditions de stress, par exemple lors d'une exposition à des rayonnements ionisants. D'autre part, il a été montré que les CSH déficientes pour la cycline E1 étaient capables de rester plus longtemps dans un état de quiescence ce qui leur confère une longévité accrue (Jayapal and Kaldis 2013).

D'autres acteurs de la quiescence ont été proposés comme les récepteurs d'adhésion cellulaire, tels que la N-Cadhérine, des intégrines, les récepteurs de la voie TGF- $\beta$  ou celui de la TPO. Ces récepteurs permettent le maintien en phase G0 grâce à leur capacité d'activation de voies permettant l'arrêt du cycle cellulaire comme le

gène suppresseur de tumeur p53, la voie Akt mTOR (Li 2011, Li and Bhatia 2011) et la voie du TGF $\beta$  (Cheng, Shen et al. 2001) (Batard, Monier et al. 2000). Les facteurs de transcription y jouent également un rôle comme le facteur HIF-1 $\alpha$  qui agit comme un capteur d'hypoxie, ou encore FoxO, qui est sensible au stress oxydatif. Ces facteurs permettent la mise au repos des cellules. GATA en est également un acteur, en effet, une surexpression de GATA-2 induit une quiescence longue des CSH réduisant alors fortement la prise de greffe chez la souris, mais les mécanismes impliqués sont encore mal identifiés (Li 2011, Li and Bhatia 2011). Il a également été mis en évidence que GATA-3 était nécessaire au maintien des CSH\_LT et à leur entrée dans le cycle cellulaire (Ku, Hosoya et al. 2012).

### c. L'auto-renouvellement des CSH

L'auto-renouvellement, tout comme la quiescence, est une propriété des CSH qui permet de maintenir constant leur nombre, que ce soit en conditions physiologiques ou pathologiques comme lors de traumatismes ou de saignements par exemple. Ce processus fait intervenir des voies qui affectent le cycle cellulaire. La surexpression de l'oncogène bcl-2 entraîne une augmentation du nombre de CSH *in vivo* chez la souris, mais d'autres voies de signalisation, telles que les voies Notch, Sonic hedgehog (Shh) et Wnt, sont aussi impliquées (Reya, Morrison et al. 2001, Reya, Duncan et al. 2003). L'auto-renouvellement implique également des protéines du cycle cellulaire pour assurer le maintien de l'homéostasie comme les kinases CDK4 et CDK6 dépendantes des cyclines (Hao, Chen et al. 2016).

En plus des voies de signalisation, l'auto-renouvellement est dépendant de nombreux facteurs de transcription comme Pbx-1, PU.1 ou p53 (Wang and Ema 2016).

## 2. Les progéniteurs mégacaryocytaires

Les progéniteurs hématopoïétiques représentent le 1er stade de différenciation cellulaire dans l'hématopoïèse. Ils se caractérisent fonctionnellement par une forte capacité de prolifération et par une perte totale des capacités d'auto-renouvellement. Non identifiables morphologiquement, ils peuvent être identifiés *in vitro* à partir de tests clonogéniques qui permettent, après culture en milieu semi solide, d'évaluer leur capacité à générer les différents lignages hématopoïétiques.

Les CSH perdent progressivement leur potentiel, elles sont à l'origine des progéniteurs communs, soit lymphoïdes (CLP) à l'origine des LT et des LB, soit myéloïdes (CMP) qui, eux, sont à l'origine des cellules polynucléaires et des macrophages (Figure 6). Les CMP vont ainsi s'orienter vers les progéniteurs granulomonocytaires (GMP) qui donneront à terme naissance au progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire (MEP dont la signature phénotypique récemment proposée chez l'Homme est Lin(-)CD34(+)CD38(mid)CD45RA(-)FLT3(-)MPL(+)-CD36(-)CD41(-)) (Sanada, Xavier-Ferrucio et al. 2016). Lorsque celui-ci s'oriente dans la voie MK, il donne naissance à deux familles de progéniteurs spécialisés : les BFU-MK et les CFU-MK. La première est le BFU-MK pour Burst-Forming Unit-Megakaryocyte. Ce sont des cellules diploïdes qui, *in vitro*, donnent des colonies d'aspect irrégulier et qui, lors de tests clonogéniques, apparaissent après 21 jours de culture. La seconde est le CFU-MK pour Colony-Forming Unit-Megakaryocyte qui apparait après 12 jours de culture et forme des colonies de petite taille. Outre leur reconnaissance morphologique lors des tests clonogéniques, on peut également les distinguer phénotypiquement. Ces deux types de progéniteurs sont positifs pour le marqueur CD3, le CFU-MK exprimant en plus l'antigène-1 des cellules progénitrices humaines, HPCA-1 et le locus majeur d'histocompatibilité de classe II, HLA-DR (Briddell, Brandt et al. 1989).

### 3. Les précurseurs mégacaryocytaires

Se différenciant, le potentiel des précurseurs MK va encore se restreindre. Ils perdent ainsi progressivement leur potentiel de prolifération au profit de leur capacité de maturation. Apparaissent les précurseurs mégacaryocytaires qui sont les premières cellules identifiables sur un frottis de moelle osseuse après coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa). Ils ont été décrits pour la première fois en 1890 par Howell. Trois stades de précurseurs mégacaryocytaires ont été décrits, basés essentiellement sur des critères de taille, de quantité de cytoplasme, d'aspect de la chromatine et de lobulation du noyau. Ces cellules sont rares et représentent moins de 0,05% des cellules de la moelle osseuse mais sont facilement reconnaissables par leur grande taille comprise entre 50 et 100  $\mu\text{m}$  de diamètre (Howell 1890, Levine 1980, Levine, Bunn et al. 1980).

Trois grands stades de précurseurs mégacaryocytaires sont décrits. Ils vont subir des phases de maturation importantes impliquant un remaniement profond de leur cytosquelette et l'apparition d'organites indispensables aux fonctions plaquettaires. La maturation des MK fait intervenir deux mécanismes biologiques quasiment uniques chez les mammifères, i) l'endomitose, caractérisée par une duplication du matériel génétique sans division cellulaire aboutissant à l'apparition de cellules de grande taille, et ii) la formation d'un réseau intracellulaire de membranes appelé DMS qui est l'acronyme de « demarcation membrane system ».

### a. Caractéristiques morphologiques des précurseurs mégacaryocytaires

Les MK dits de stade I ont un diamètre compris entre 10 et 15  $\mu\text{m}$ . Leur noyau est petit et composé d'un ou deux lobes. Le cytoplasme est faiblement granuleux et de plus petite taille que le noyau, d'où un rapport nucléocytoplasmique élevé (Yamada 1957, Levine, Hazzard et al. 1982).

Les MK de stade II ont un diamètre compris entre 15 et 30  $\mu\text{m}$ . Leur rapport nucléocytoplasmique diminue. Bien que le noyau se développe et devienne polylobé, le cytoplasme prend plus d'ampleur, il devient fortement granuleux ; les granules alpha ( $\alpha$ ) et denses ( $\delta$ ) sont en cours de formation par l'intermédiaire de corps dits multivésiculaires (Yamada 1957, Levine 1980, Levine, Bunn et al. 1980, Levine, Hazzard et al. 1982). Le DMS est, à ce stade, en pleine expansion grâce à l'apport en lipides du réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Les MK de stade III sont les MK dits matures. Ils mesurent entre 20 et 50  $\mu\text{m}$  de diamètre et présentent quatre caractéristiques morphologiques et ultrastructurales majeures : i) un noyau multilobé de grande taille, ii) un DMS développé, iii) la présence de granules  $\alpha$  et  $\delta$  essentiels aux fonctions plaquettaires et des lysosomes, et iv) une région sous-membranaire encerclant le MK, dépourvue de granules, et riche en actomyosine, appelée zone périphérique (ou PZ pour « Peripheral Zone »), (Levine 1980, Levine, Bunn et al. 1980, Levine, Hazzard et al. 1982, Eckly, Heijnen et al. 2014).

La différenciation mégacaryocytaire se caractérise par l'apparition et la disparition de différents marqueurs à la surface des cellules ce qui permet leur identification au cours du processus de différenciation et de maturation. Le marqueur CD34, bien que considéré comme un des marqueurs de la CSH, ne disparaît que très progressivement au cours de la différenciation. En effet, il se retrouve encore fortement exprimé au stade des progéniteurs bipotents érythro-mégacaryocytaires (MEP) (Seita and Weissman 2010) et des MK les plus immatures. Les récepteurs présents à la surface des plaquettes qui assurent des fonctions clés de l'hémostase apparaissent successivement : la glycoprotéine (GP) IIb (appelée aussi CD41 ou intégrine  $\alpha\text{IIb}$ ) s'associe à la GPIIIa (appelée aussi CD61 ou intégrine  $\beta\text{3}$ ) formant l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  est un marqueur apparaissant déjà au stade MEP. Bien qu'absent des CSH de la moelle osseuse adulte, il a été retrouvé sur des CSH de l'embryon lors du passage de l'hématopoïèse primitive à définitive (Ferkowicz, Starr et al. 2003, Lacaud and

Kouskoff 2017). Lors de la mise en place des premières étapes de l'endomitose, apparaît le complexe GPIb-V-IX (CD42a,b,c,d), récepteur du FW (Debili, Issaad et al. 1992). La tétraspanine CD9 apparaît, quant à elle, de manière plus ou moins concomitante et est considérée comme un marqueur tardif de la maturation des MK.

## b. L'endomitose

L'endomitose est un processus de mitose avortée qui permet une augmentation du matériel génétique sans division cellulaire conduisant à une polyploïdisation des MK. La ploïdie modale des MK dans la moelle osseuse est de 16N, la ploïdie pouvant aller de 2 à 64N voir 128N. Ce processus très particulier n'est pourtant pas spécifique des MK. On le retrouve également dans d'autres types cellulaires, notamment dans les cellules musculaires lisses ou dans les embryons de drosophile (Zimmet, Ladd et al. 1997). L'endomitose est caractérisée par l'absence d'anaphase B, de télophase et de cytokinèse (Figure 7) (Vitrat, Cohen-Solal et al. 1998, Nagata, Jones et al. 2005, Raslova, Kauffmann et al. 2007, Mazzi, Lordier et al. 2018). Elle est constituée de deux grandes étapes : la première permet l'augmentation du matériel génétique et la seconde inhibe la contraction de l'anneau contractile d'actomyosine à l'origine de la séparation des cellules filles.

La régulation du cycle cellulaire des MK n'est pas encore totalement comprise, cependant plusieurs pistes ont été étudiées. Parmi les éléments contrôlant le cycle cellulaire, les cyclines et plus particulièrement la cycline E et les cyclines D sont impliquées. Ainsi les travaux de Geng et al. ont montré que les souris KO pour la cycline E présentaient une faible ploïdie (Geng, Yu et al. 2003). La cycline D3, et de manière moins importante la cycline D1, sont présentes dans les MK. Elles sont surexprimées lorsque le récepteur de la thrombopoïétine (TPO), le c-mpl, est activé. La surexpression des cyclines D1 et D3 dans des modèles murins a permis de générer des MK avec des niveaux de ploïdie plus élevés que ceux des souris exprimant un niveau basal de cycline D1 et D3. (Sun, Zimmet et al. 2001).

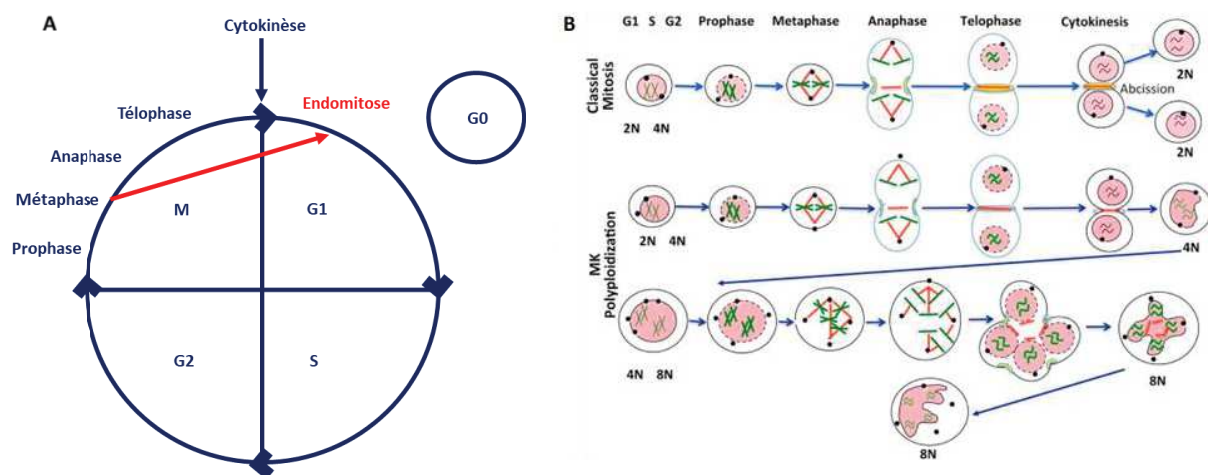
Baccini et al. ont démontré que les protéines inhibitrices des kinases dépendant des cyclines p21 et p27 régulant le cycle cellulaire, sont vraisemblablement exprimées dans les MK hyperploïdes matures supérieurs à 32N. La surexpression de p21 sur des



MK en culture stoppe le cycle endomitotique et permet une maturation cytoplasmique avec la formation du DMS (Baccini, Roy et al. 2001).

L'échec de la cytokinèse est essentiellement dû à un défaut de l'anneau contractile qui ne permet ni une invagination ni une force de contraction suffisante pour permettre la séparation des deux cellules filles.

Le facteur de transcription RUNX1 induit la sous-expression de la chaîne lourde IIB de la myosine non musculaire (MYH10), une protéine essentielle pour la scission des cellules filles lors de la mitose, ce qui favorise l'augmentation de la ploïdie en empêchant les cellules 4N de redevenir 2N (Lordier, Bluteau et al. 2012). Il inhibe également la voie RhoA/myosine qui est essentielle pour la formation de l'anneau contractile d'actomyosine. Lors de l'endomitose, il y a alors un défaut d'accumulation de la myosine et de l'actine F, l'anneau contractile ne peut se former efficacement ce qui aboutit à un échec de scission entre les cellules filles (Mazzi, Lordier et al. 2018) (Trakala, Rodriguez-Acebes et al. 2015).



**Figure 7 : L'endomitose d'après (Edgar and Orr-Weaver 2001) (A) et (Mazzi, Lordier et al. 2018) (B)**

*L'endomitose correspond à la multiplication du matériel génétique sans division cellulaire. Cela implique une modification du cycle cellulaire permettant le passage de la phase Métaphase directement à la phase G1 sans passage par la cytokinèse (A) D'un point de vue plus dynamique, les chromatides sœurs se séparent lors de la métaphase, mais la cytokinèse ne peut pas être réalisée du fait d'un défaut de contraction de l'anneau d'actomyosine. Ceci génère la polylobulation du noyau.*



### c. Le système de membranes de démarcation ou DMS

Lors de la maturation du MK, on observe un développement très important d'un réseau de membrane, le DMS. Il constitue une réserve de membrane située à l'intérieur du MK qui correspond à la membrane des futures plaquettes comme en atteste sa composition lipidique et protéique (Green, Padula et al. 2020). Des études en microscopie ont montré, grâce à un marquage par du rouge de ruthénium, que ces membranes étaient en continuité avec l'extérieur (Behnke 1968). Elles s'organisent sous forme d'invaginations constituant un réseau fortement interconnecté dessinant des îlots cytoplasmiques appelés à l'origine « territoires plaquettaires ». Cette dénomination de DMS provient d'observations effectuées en microscopie électronique à transmission, qui montraient que le MK présentait de petits territoires cytoplasmiques de la taille des plaquettes faisant penser à des plaquettes préformées. L'utilisation de nouvelles technologies de microscopie électronique permettant une reconstitution 3D, la microscopie à double faisceau (FIB-SEM), a permis de mettre en évidence que le DMS est en réalité le résultat d'un empilement membranaire continu (Figure 8) (Eckly, Heijnen et al. 2014). Ce réseau structuré par le cytosquelette fait intervenir l'actine F mais est indépendant du réseau de microtubules (Kieffer, Guichard et al. 1987, Boneu and Cazenave 1997). Des études *in vitro*, associées à de la microscopie confocale, ont précisé les mécanismes à l'origine de la formation du DMS. L'inhibition de la guanosine triphosphate hydrolase Cdc42, par exemple, entraîne une déstructuration du DMS démontrant un lien fonctionnel entre la dynamique de l'actine et la maturation du DMS (Antkowiak, Viaud et al. 2016). Des techniques combinées de microscopie électronique et photonique, ont, quant à elles montré que le développement du DMS semblait se faire grâce à l'apport intracellulaire de membrane *via* des exocytoses de vésicules venant de l'appareil de Golgi ainsi qu'au niveau membranaire grâce à l'invagination de la membrane cytoplasmique (Eckly, Heijnen et al. 2014).

L'importance du DMS est soulignée dans certaines pathologies. Par exemple, la dilatation du DMS observée dans des maladies liées à la myosine, et notamment la chaîne lourde IIA de myosine non musculaire MYH9, se traduit par une thrombopénie et des plaquettes avec une distribution anormale du nombre d'organites (Eckly, Strassel et al. 2009). Le DMS est également anormalement structuré dans le syndrome de Bernard-Soulier dû à un déficit d'expression du complexe GPIb-V-IX. Dans ce cas,

les territoires cytoplasmiques sont plus larges, le DMS apparaît dilaté. Ce défaut entraîne alors une thrombopénie et la production de plaquettes de grande taille (Strassel, Eckly et al. 2009).

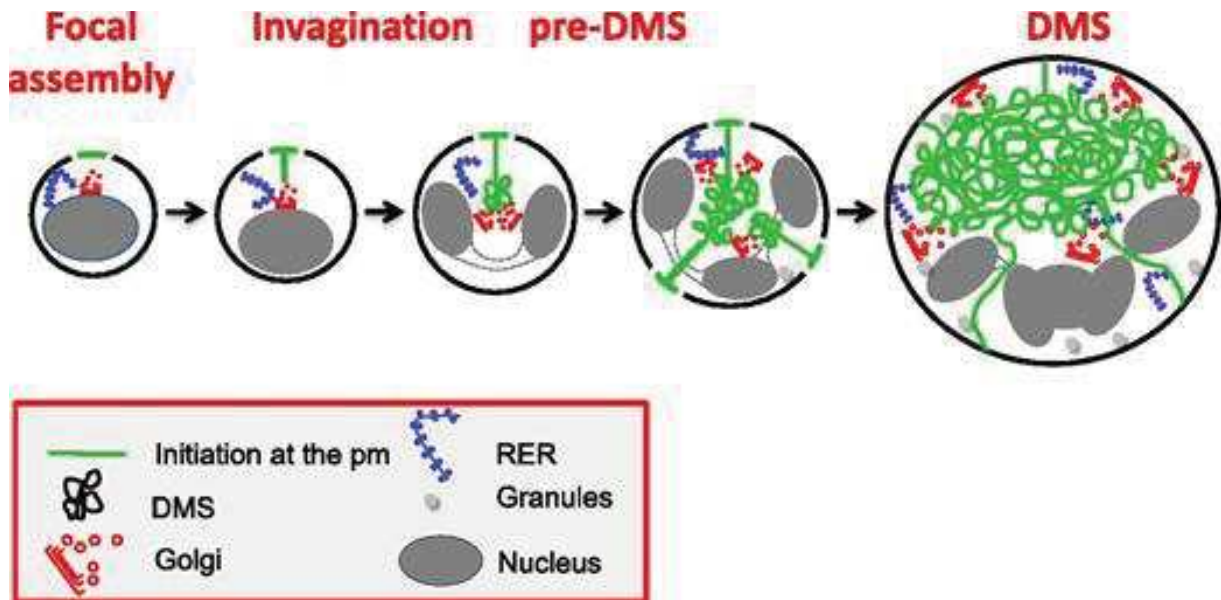


Figure 8 : La formation du DMS d'après (Eckly, Heijnen et al. 2014)

*Le DMS se forme au cours de la MKP de manière quasi concomitante avec l'augmentation de la ploïdie. Celui-ci débute par l'apparition d'un point focal sur la membrane plasmique qui va progressivement former un réseau observable entre les deux lobes nucléaires que l'on appelle le pré-DMS. Celui-ci se développe alors de plus en plus et augmente avec la ploïdie, puisqu'entre chaque lobe nucléaire apparaît un nouveau pré-DMS qui va se développer alimenté par des vésicules provenant du Golgi.*

#### 4. Les voies alternatives de la mégacaryopoïèse

Des modèles alternatifs de la MKP ont été récemment proposés dans la souris puis chez l'Homme grâce à des approches permettant l'étude des transcrits sur cellule unique (single cell), associées à des analyses phénotypiques, des tests clonogéniques et des greffes dans des modèles murins (Zhang, Gao et al. 2018).

Des études de greffe de cellules humaines dans des souris immunodéficientes ont montré que la CSH est capable de donner naissance, par division symétrique sans modification du potentiel de différenciation, à des CSH ou de se différencier directement en précurseurs érythro-mégacaryocytaires par division asymétrique. On parle ici de voie biaisée de la MKP (Yamamoto, Morita et al. 2013).

En plus de cette voie biaisée, deux modèles alternatifs de la MKP ont été décrits (Haas, Trumpp et al. 2018).

Le premier modèle est basé sur une séparation de l'ensemble des lignées au stade des PMP (Figure 6) (Haas, Trumpp et al. 2018). Ce PMP présentant un tropisme pour la voie mégacaryocytaire est capable de donner directement, dans un modèle de greffe, des précurseurs mégacaryocytaires en évitant le passage par les stades CMP et MEP. (Notta, Zandi et al. 2016, Nishikii, Kurita et al. 2017, Velten, Haas et al. 2017, Noetzli, French et al. 2019).

Le second modèle, dit de Waddington, a mis en évidence une très grande hétérogénéité d'expression des transcrits au niveau de la CSH\_LT indiquant alors la présence d'une CSH à fort pouvoir mégacaryocytaire qui lui permet de se différencier unilatéralement directement vers les précurseurs mégacaryocytaires en court-circuitant les étapes classiques précédemment décrites (Haas, Trumpp et al. 2018, Noetzli, French et al. 2019).

Ces voies alternatives pourraient être mises en jeu en cas de stress comme lors d'hémorragie, d'infection ou d'inflammation. Elles permettraient alors de produire des plaquettes très rapidement le temps que la voie classique prenne le relais.

## 5. De la proplaquette à la plaquette sanguine

Les MK devenus matures émettent *in vitro*, des proplaquettes (Figure 9A), de longues extensions cytoplasmiques qui grâce à une réorganisation complète du réseau membranaire permettent la production des plaquettes. Ces éléments ont été décrits pour la première fois suite à des études de moelle de souris par microscopie électronique en 1976 (Becker and De Bruyn 1976, Muto 1976).

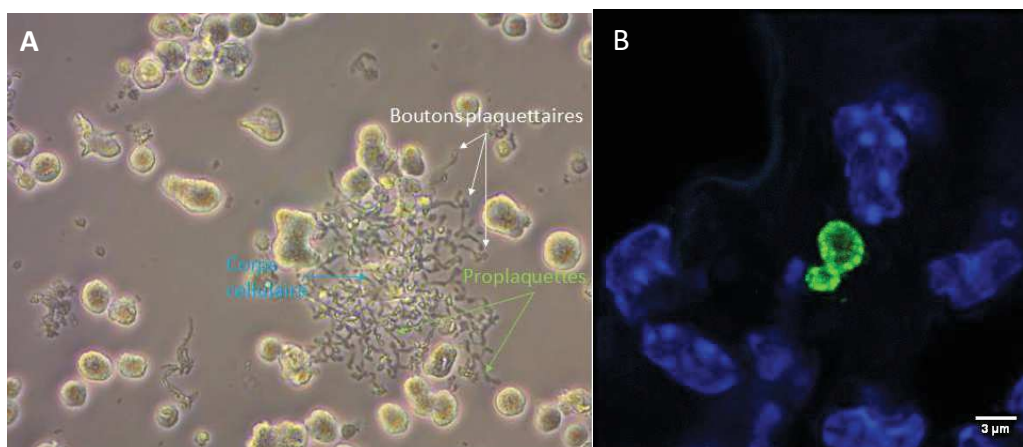
Les mécanismes d'émission et de structuration des proplaquettes ont principalement été décrits *in vitro* sur des MK différenciés en culture. Le rôle des microtubules dans l'initiation de l'émission des proplaquettes et leur élongation a pu être mis en évidence à l'aide d'un agent chimique comme la vincristine, qui inhibe la polymérisation des microtubules. L'amplification des proplaquettes est, elle, sous le contrôle de l'actine comme le montre l'utilisation de la cytochalasine (inhibiteur de la polymérisation d'actine) qui empêche la ramification des proplaquettes. (Italiano, Lecine et al. 1999, Thon, Montalvo et al. 2010).

Si l'existence des proplaquettes a été validée *in situ* par l'utilisation de microscopes biphotoniques (Junt, Schulze et al. 2007)(Bornert, Boscher et al. 2020), les mécanismes responsables de leur émission, élongation et fragmentation ne sont encore que parcellaires. Une étude récente du laboratoire a mis en évidence le rôle des microtubules, suite à l'utilisation chez la souris de vincristine, dans l'initiation de l'extension des proplaquettes. Dans cette même étude, l'équipe a montré que l'émission des proplaquettes n'était pas un phénomène linéaire, comme décrit *in vitro*, mais la résultante d'un équilibre entre extension et rétractation permanente (Bornert, Boscher et al. 2020).

Une fois libérés, ces éléments vont se remodeler sous l'effet du flux sanguin, notamment au niveau de la microcirculation pulmonaire. En effet, on a pu observer dans des modèles murins pour lesquelles la MKP a été stimulée par injection de TPO, un grand nombre de MK intacts, de fragments de MK et de noyaux de MK dénudés, sur des coupes histologiques dans les capillaires pulmonaires (Zucker-Franklin and Philipp 2000). Plus récemment, l'utilisation d'un microscope bi-photonique a permis de visualiser *in situ* par fluorescence directement dans la lumière des vaisseaux pulmonaires murins, la génération des plaquettes et leur remodelage (Lefrançois,

Ortiz-Muñoz et al. 2017) qui semble guidé par les forces rencontrées dans le flux sanguin. Cette hypothèse est appuyée par des observations réalisées *in vitro* et *in situ*, qui ont montré que les proplaquettes libérées formaient des éléments appelés des préplaquettes d'une taille comprise entre 2 et 10  $\mu\text{m}$ . Celles-ci, subissent des phénomènes de torsion de leurs microtubules lors de leur passage dans la microcirculation pulmonaire ce qui favorise leur fragmentation et la libération de plaquettes discoïdes d'une taille homogène de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 9B) (Handagama, Feldman et al. 1987, Junt, Schulze et al. 2007, Thon, Montalvo et al. 2010).

Une publication toute récente pourrait remettre en question le mécanisme de production des plaquettes sanguines basé sur la formation des proplaquettes et propose un mécanisme faisant intervenir la formation de vésicules ou « blebs » directement à partir du mégacaryocyte mature. Cette proposition bouleverse notre vision de la thrombopoïèse et va être très certainement examinée avec grande attention et mise à l'épreuve par la communauté scientifique (Potts, Farley et al. 2020).

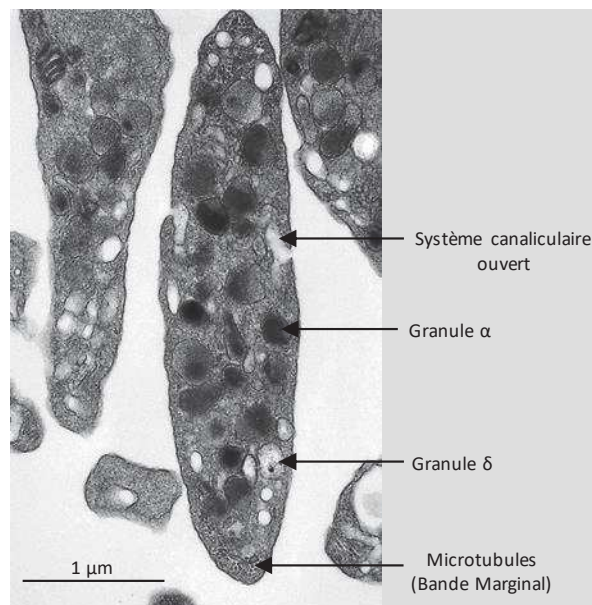


**Figure 9 : Mégacaryocyte proplaquettaire (A) et remodelage des pré plaquette en plaquette dans la microcirculation pulmonaire (B) (Image UMR\_S1255)**

(A) Au terme de la culture *in vitro* de cellules  $CD34^+$ , des MK proplaquettaires sont produits. Ils se distinguent, en microscopie optique, par la génération à partir du corps cellulaire, de fines extensions cytoplasmiques appelées les proplaquettes au bout desquelles se trouvent de petits bourgeons, les boutons plaquettaire. (B) Visualisation par immunofluorescence sur des sections de poumon de souris du remodelage du cytosquelette plaquettaire (tubuline  $\beta 1$  en vert). La couleur bleue correspond au DAPI.

## 6. La plaquette sanguine

Libérées dans la circulation, les plaquettes produites circulent à une numération comprise entre 150 G/L et 450 G/L. Ce sont les plus petits éléments figurés du sang d'un diamètre compris entre 1 et 3  $\mu\text{m}$  (Machlus and Italiano 2013) (Frojmovic and Milton 1982, Trowbridge, Martin et al. 1982). Leur demi-vie est de 4 à 5 jours ce qui nécessite de produire chaque jour un dixième de la masse plaquettaire, soit environ 100 milliards de plaquettes pour un individu sain de corpulence normale et de sexe masculin (1,75m, 75kg) (Grossman, Macewan et al. 1960, Boneu, Robert et al. 1982, Thon, Macleod et al. 2012). Au repos, les plaquettes sanguines ont une forme discoïde soutenue par des anneaux de microtubules (7 à 12 enroulements) qui forment la bande marginale, essentielle au maintien de leur forme. D'un point de vue ultrastructural, on définit 3 zones : la bande marginale, le système canaliculaire ouvert et les organites (Behnke and Zelander 1966, Patel-Hett, Richardson et al. 2008) (White and Krivit 1967) (Figure 10).



**Figure 10 : La structure de la plaquette sanguine (Image UMR\_S1255)**

*Image représentative d'une coupe de plaquettes sanguines en microscopie électronique à transmission. La présence de microtubule aux pôles des plaquettes permet de maintenir leur forme discoïde. La plaquette contient dans son cytoplasme différents organites participant à l'activation plaquettaire comme les granules  $\alpha$  et  $\delta$ .*



#### a. Le système canaliculaire ouvert

Décrit pour la première fois chez le rat en 1967, le système canaliculaire ouvert se compose de cavités en continuité avec la membrane plasmique de la plaquette (Behnke 1967) (Figure 10). C'est une réserve de membrane pour la plaquette facilitant, lors de l'activation son changement de forme et le passage de la forme discoïde à sphérique, l'émission de filopodes, l'étalement et l'exocytose des granules plaquettaires (Selvadurai and Hamilton 2018). Il permet également aux plaquettes de capter des éléments dans la circulation comme par exemple le fibrinogène (White and Escolar 1991) (Handagama, Feldman et al. 1987).

#### b. Les organites plaquettaires

Il existe trois types de granules plaquettaires qui diffèrent par leur composition : les granules  $\alpha$ , les granules denses ou  $\delta$  et les lysosomes. Les granules sont produits par les MK de stade II et possèdent une origine commune : les « multivesicular bodies » (MVB), un sous-groupe d'endosomes tardifs reconnaissables par la présence dans l'endosome de replis membranaires (Figure 11). L'anomalie de formation des granules ainsi que l'absence de contenu granulaire sont à l'origine d'une pathologie rare appelée maladie du pool vide (Bain and Bhavnani 2011). Un défaut qualitatif et/ou quantitatif, constitutionnel ou acquis en granule  $\alpha$  et  $\delta$ , induit chez les patients des hémorragies modérées (Fiore, Garcia et al. 2017).

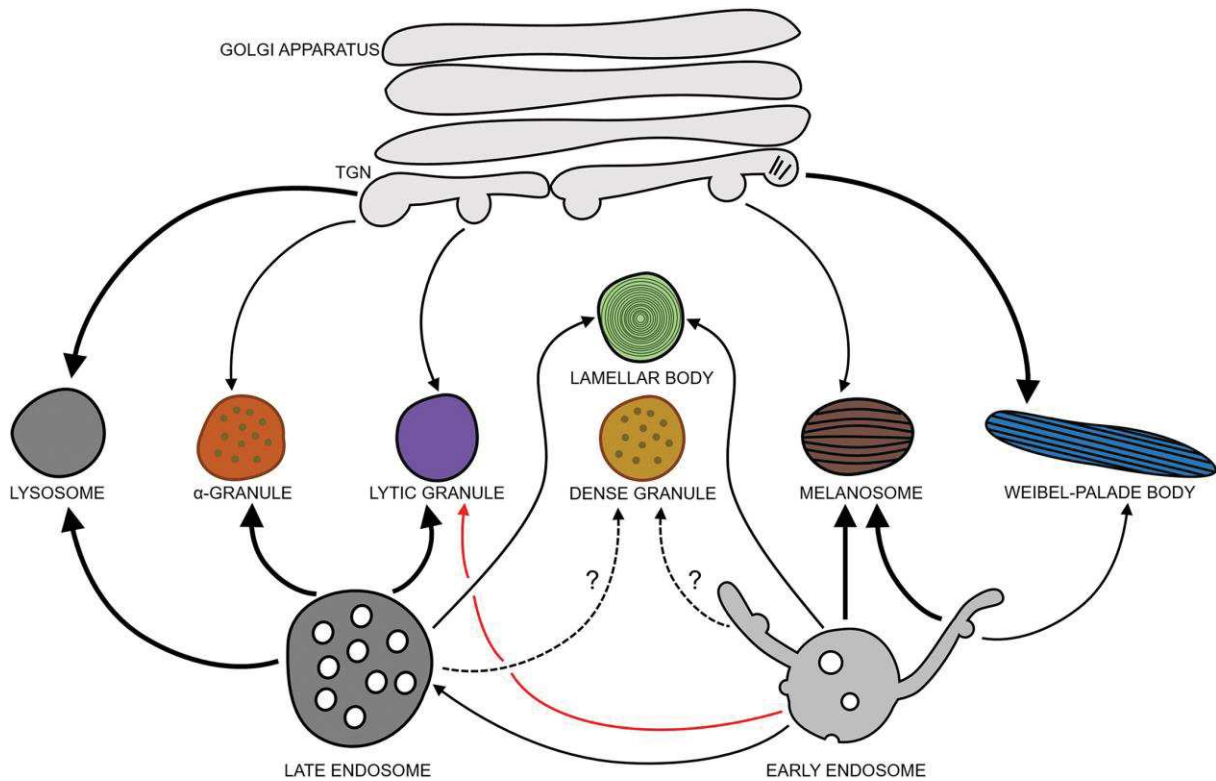
Les granules  $\alpha$  sont les éléments intra-plaquettaires les plus représentés, à raison de 50 à 80 granules  $\alpha$  par plaquette, et occupent environ 10% du volume plaquettaire (Blair and Flaumenhaft 2009). Composés d'éléments protéiques et non protéiques, ces granules jouent un rôle essentiel dans l'hémostase primaire en favorisant l'adhérence plaquettaire puisqu'ils constituent une réserve de récepteurs plaquettaires, tels que le complexe GPIb-V-IX, la GPIIb-IIIa ou la GPVI mobilisables lors de l'activation plaquettaire (Berger, Masse et al. 1996, Youssefian, Massé et al. 1997, Suzuki, Murasaki et al. 2003). Ces granules jouent aussi un rôle dans l'hémostase secondaire en apportant des facteurs et co-facteurs de la coagulation tels

que le fibrinogène, les facteurs V, VII, XI et XIII de la coagulation des facteurs de croissance et des cytokines (Rendu and Brohard-Bohn 2001).

Les granules denses ( $\delta$ ) sont facilement reconnaissables en microscopie électronique à transmission. En effet, la présence dans ces granules d'éléments non peptidiques, notamment le calcium opaque aux électrons entraîne un contraste important en leur centre (Rendu and Brohard-Bohn 2001). La concentration des divers constituants de ces granules a été déterminée par des techniques de chimie analytique. En 1979 déjà, Holmsen et al. ont déterminé les concentrations des principaux constituants : l'ATP (436 mM), l'ADP (653 mM) qui favorise l'activation et permet de stabiliser le clou plaquettaire (Gachet 2006, Gachet 2008), le pyrophosphate (326  $\mu$ M), le calcium (2181 mM) et la sérotonine (65 mM) (Holmsen and Weiss 1979).

Les lysosomes, tout comme les granules  $\alpha$  et  $\delta$  denses, proviennent du système endosomal. Il est aujourd'hui admis que les lysosomes, tout comme les granules  $\alpha$ , ont une double origine : l'endosome tardif et la face trans du Golgi (Bowman, Bi-Karchin et al. 2019). Ces lysosomes se différencient des granules  $\alpha$  en microscopie électronique par une taille inférieure, la présence de corps denses aux électrons, ainsi qu'un halo transparent sous-membranaire (Sixma, van den Berg et al. 1985). Ils sont composés essentiellement d'hydrolases permettant la dégradation de nombreuses protéines ou sucres. Le rôle de ces organites, dont le contenu n'est jamais totalement sécrété même après une stimulation par un agoniste fort (Södergren, Svensson Holm et al. 2016), reste pour le moment peu clair, mais ils participeraient à l'élimination des agrégats plaquettaires circulants grâce à la sécrétion d'élastase et de cathepsine G (Rendu and Brohard-Bohn 2001).





**Figure 11 : Biogenèse des granules  $\alpha$ ,  $\delta$  et des lysosomes d'après (Bowman, Bi-Karchin et al. 2019)**

*Les granules plaquettaires produits dans les MK de stade II ont une origine commune. Tout comme les corps de Weibel –Palade présents dans les cellules endothéliales ou les mélanosomes, les granules sont produits à partir de l'appareil de Golgi et des endosomes. Ainsi les lysosomes proviennent de manière égale de l'appareil de Golgi et de l'endosome tardif alors que les granules alpha proviennent essentiellement de l'endosome tardif. Pour ce qui est des granules denses ou delta, leur origine est mal décrite et proviendrait soit de l'endosome tardif, soit de l'endosome précoce.*

## B. Les processus de contrôle de la mégacaryopoïèse

La MKP régulée tout au long de ces différentes étapes, permet de contrôler la prolifération, l'engagement, la différenciation des CSH en MK matures et la libération des plaquettes. Physiologiquement de nombreux acteurs interviennent dans le contrôle de la MKP : des cytokines, des facteurs de croissance, des protéines de matrice, des éléments cellulaires et les contraintes mécaniques. L'ensemble de ces éléments forment ce que l'on nomme le microenvironnement.

Le microenvironnement est majoritairement composé de cellules hématopoïétiques et de différents types de cellules stromales (ostéoblastes, fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes, cellules stromales mésenchymateuses (CSM)). Il est également le lieu d'interaction entre les éléments cellulaires et ceux de la matrice extracellulaire qui libèrent et séquestrent des chimiokines et des facteurs de croissance. Cela favorise l'adhésion à la matrice et l'interaction entre cellules, générant ainsi des contraintes mécaniques.

La moelle osseuse est un tissu hétérogène : on y trouve des gradients de pression, d'oxygénation, de cytokines, ainsi que divers types cellulaires. Les cellules souches hématopoïétiques ont besoin d'un environnement propice à leur développement. Les niches ostéoblastiques ou vasculaires sont des microenvironnements tissulaires locaux qui maintiennent et régulent les cellules souches (Morrison and Spradling 2008) et régulent de part des interactions complexes la différenciation et la maturation de la CSH en MK matures. Il a été mis en évidence que la MKP est inhibée lorsque l'hypoxie présente au niveau de ces niches est trop importante et quelle favorise alors la libération de collagène de type I à partir des ostéoblastes. D'autre part en condition normoxique une interaction des CSH avec des MSC favorise la production de plaquettes via la voie de signalisation V CAM-1 (Pallotta, Lovett et al. 2009).

Si la production de plaquettes de culture est aujourd'hui réalisable c'est grâce aux connaissances acquises sur le rôle des cytokines et des facteurs de transcription sur la différenciation et la maturation des MK que nous allons maintenant aborder. Mais l'utilisation de ces différents outils ne permet pas pour le moment, même en combinaison de reproduire fidèlement les conditions du microenvironnement et ainsi

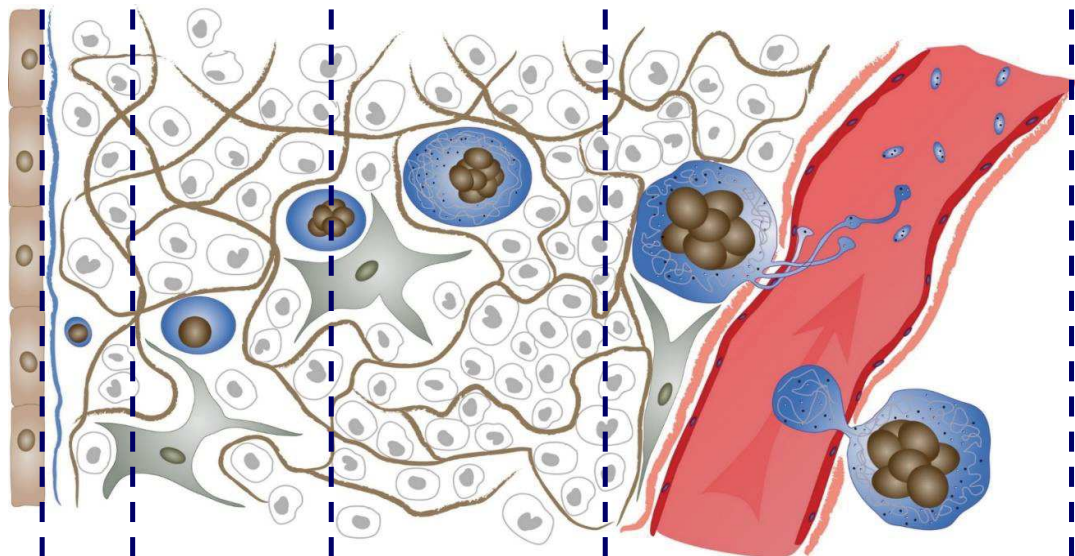
d'obtenir *in vitro* les rendements de production obtenu *in vivo*. Ce constat encourage les équipes de recherche à envisager l'utilisation d'étude sans a priori et notamment *via* l'utilisation des technologies omiques afin de trouver de nouveaux acteurs.

## 1. Les cytokines

Si la TPO joue un rôle primordial dans la MKP, elle n'est pour autant pas la seule cytokine participant au contrôle de ce processus. (Kaushansky 2006).

### a. Les cytokines régulant positivement la MKP

La première cytokine a été découverte en 1957 pour sa capacité à interférer avec la réplication virale (Isaacs and Lindenmann 1957). C'est en 1974, que Cohen et al. ont défini le terme de cytokine du grec cyto-, la cellule, et -kine, le mouvement, suite à la mise en évidence d'une substance produite lors de l'infection des fibroblastes par des particules virales entraînant l'arrêt de la migration des macrophages (Cohen, Bigazzi et al. 1974). Les cytokines agissent comme des médiateurs et elles ne sont pas que produites par les glandes, mais aussi par des cellules, tels que les leucocytes inflammatoires et les fibroblastes. Cela les différencie des hormones. Les interleukines sont un sous-groupe de cytokines sans caractéristique biologique ou structurale propre. Elles ont été numérotées au fur et à mesure de leur découverte (Figure 12).



Cytokines	CSH	Progéniteurs	Précurseurs	Cellules mature
TPO	+	+	+	+
EPO		+		
LIF		+	+	
SCF	+	+	+	
IL3	+/-	+	+	
IL6		+	+	
IL9	+	+		
IL11		+	+	
GM-CSF		+		

**Figure 12 : Les cytokines régulant positivement la mégacaryopoïèse**

*Un grand nombre de cytokines favorisent la MKP. Certaines, comme la TPO, agissent tout du long, mais aucune n'est indispensable. C'est l'association de l'ensemble de ces cytokines qui permet la MKP. Certaines sont plus impliquées dans la différenciation des MK, comme l'EPO, l'IL-9, le GM-CSF et le SCF, alors que d'autres participent à la maturation du MK, comme LIF et des interleukines IL-3, IL-6 et l'IL-11.*

i. La cytokine clé de la mégacaryopoïèse : la thrombopoïétine

La TPO, codée par le chromosome 3 (Chr 3: 184.37 – 184.38 Mb) est la cytokine majeure de la MKP puisqu'il a été montré, suite à la génération d'une souris déficiente pour la TPO, qu'elle contrôlait l'ensemble de la MKP de la CSH aux MK différenciés. Elle a une masse de 37,8 kDa et présente une forte homologie de séquence avec l'érythropoïétine (EPO). Elle est produite chez l'adulte majoritairement par le foie et dans une moindre mesure par les reins et cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse (Kaushansky 1998). Son identification suite à la découverte de son récepteur c-mpl, a permis sa production sous forme recombinante et ainsi l'étude approfondie de la MKP (Kaushansky 1998). Elle est aujourd'hui utilisée comme médicament sous le nom de romiplostim pour le traitement des thrombopénies (Doobaree, Newland et al. 2019, Yang, Lin et al. 2019).

Le rôle de la TPO sur la MKP a été établi dans les souris déficientes, soit pour la TPO, soit pour son récepteur c-mpl, qui présentent toutes deux une thrombopénie sévère. (>90%) par rapport à des souris contrôle. Elle est dûe à une diminution du nombre de progéniteur mégacaryocytaires ainsi qu'à un défaut de maturation des MK et notamment une diminution de leur ploïdie (Murone, Carpenter et al. 1998).

Ce reliquat de plaquettes indique malgré tout que la TPO n'est pas la cytokine exclusive de la MKP. D'autres cytokines, telles que l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-11 (IL-11) ou encore le Leukemia inhibitory factor (LIF), ont depuis été impliquées (Bunting, Widmer et al. 1997).

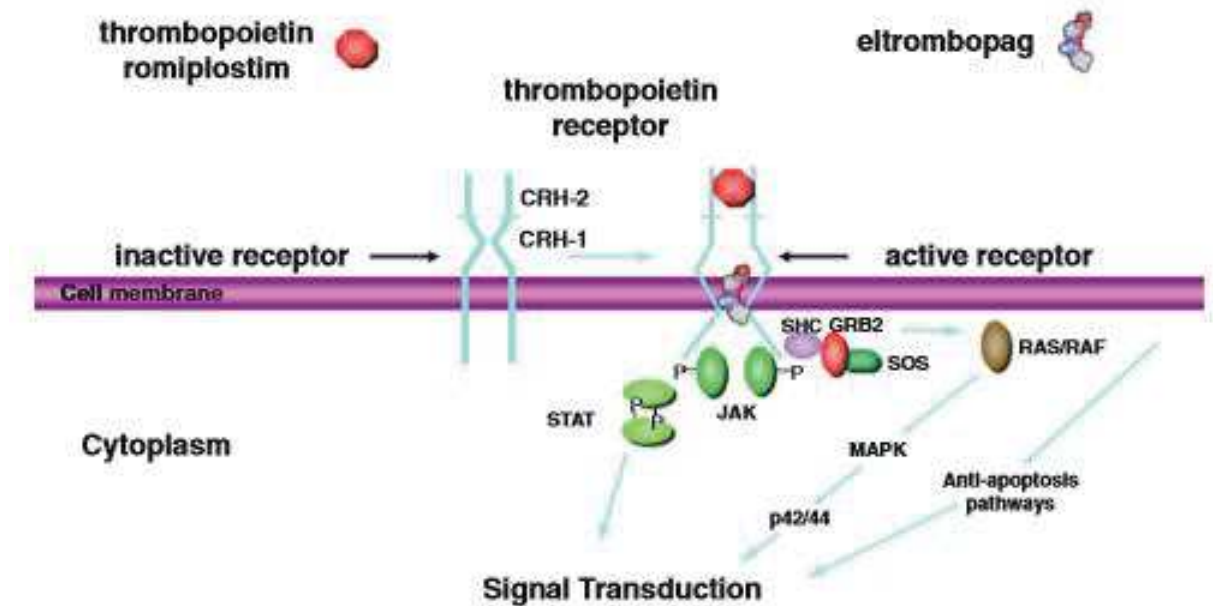
ii. Le récepteur de la TPO ou c-mpl

Le récepteur de la TPO ou c-mpl est un homodimère appartenant à la superfamille des récepteurs aux cytokines. Chaque dimère est composé de deux domaines CRH (cytokine receptor homology). Il est présent sur toutes les cellules mégacaryocytaires ainsi que sur les plaquettes (Kuter 2013). La TPO se lie au domaine CRH le plus distal du récepteur, ce qui entraîne un changement de conformation intra-cytoplasmique et permet le recrutement de protéines kinases, telles

que Shc et JAK2 au niveau des tyrosines phosphorylées (Drachman, Griffin et al. 1995). Cela permet d'activer de nombreuses voies de signalisation, notamment la voie JAK/STAT, Ras/MAPKinase, PI3K et PKC, stimulant, l'endomitose favorisant ainsi grâce à une augmentation de la ploïdie la maturation du mégacaryocyte et contribuant ainsi la production de plaquettes (Kuter 2013) (Figure 13).

En 1995 déjà, Kuter et al. ont suggéré suite à des expériences chez le lapin, que la masse plaquettaire influait directement sur la quantité de TPO disponible dans le sang et régulerait ainsi la MKP (Kuter and Rosenberg 1995). Peu de temps après, il avait été mis en évidence que le récepteur c-mpl présent au niveau plaquettaire permettait l'internalisation et la dégradation de la TPO (Fielder, Hass et al. 1997). Cela a lieu grâce à deux motifs présents dans la partie cytoplasmique du récepteur, box2 et les motifs dileucine (Dahlen, Broudy et al. 2003). Plus récemment un troisième domaine dans la région cytoplasmique, le domaine YRRL, a été mis en évidence dans l'internalisation et l'adressage lysosomal induisant la dégradation (Hitchcock, Chen et al. 2008). Il a également été montré que le c-mpl sialylé des plaquettes jeunes est progressivement désialylé lors de leur vieillissement. Cette désialylation induit une diminution de l'affinité de la TPO pour son récepteur, augmentant ainsi la quantité de TPO circulante et donc la stimulation de la MKP (Grozovsky, Giannini et al. 2015).

La protéine JAK2 (Janus Kinase 2) permet la transduction du signal de c-mpl. Cette protéine associée à ce récepteur est mutée par une mutation faux sens, dans certains cas, essentiellement au niveau de l'exon 10. Cette mutation est surtout retrouvée dans les thrombocytoses héréditaires et dans certains syndromes myéloprolifératifs. Dans ce dernier cas la mutation la plus fréquente de JAK2 correspond au changement d'une valine en position 617 en phénylalanine (JAK2V617F). Ces deux types de mutations ont un point en commun, une activation constitutive de JAK2 responsable du syndrome myéloprolifératif. Des inhibiteurs de JAK2 ont été développés comme le ruxolitinib indiqué dans la prise en charge des myélofibroses (Vainchenker, Leroy et al. 2018).



**Figure 13 : Les voie de signalisation du récepteur de la TPO d'après (Kuter 2013)**

*La TPO une fois liée au domaine CRH le plus distal du récepteur, entraîne un changement de conformation intra-cytoplasmique et permet d'activer de nombreuses voies de signalisation, notamment la voie JAK/STAT, Ras/MAPKinase, PI3K et PKC, stimulant, la maturation du mégacaryocyte.*

### iii. Les autres cytokines impliquées dans la mégacaryopoïèse

Si la TPO n'est pas la seule à réguler la MKP, c'est la seule à agir tout au long du processus. Les autres n'ont que des rôles ponctuels plus ou moins synergiques.

On retrouve des facteurs de croissance comme l'EPO, le GM-CSF, le SCF et le LIF et des interleukines : IL-3, IL-6, l'IL-9, et l'IL-11.

- Facteurs de croissances

L'érythropoïétine ou EPO si elle est, à l'image de la TPO, la cytokine majeure de l'érythropoïèse, intervient également en soutien de la TPO dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs et des précurseurs mégacaryocytaires (Beguin



1999). Son effet a été rapporté dans la souris après injection journalière d'EPO recombinante pendant 1 à 2 semaines entraînant une augmentation de 15% à 30% de la numération plaquettaire. Toutefois, il faut noter qu'une administration de fortes doses d'EPO (80 U/jour) induit une thrombopénie. L'EPO permet donc de stimuler la production de plaquettes mais à faible dose (Tsukada, Misago et al. 1990, McDonald, Clift et al. 1992).

Le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ou GM-CSF est essentiellement produit chez l'adulte par les lymphocytes T. Dans la MKP, il intervient au niveau des progéniteurs mégacaryocytaires en favorisant leur prolifération. Il a été montré, au cours des années 90, grâce au remplacement du domaine extracellulaire par celui du récepteur c-mpl que la partie intra-cytoplasmique permet de transmettre le signal du récepteur de la TPO (Schulz, Krumwieh et al. 1991, Stoffel, Ziegler et al. 1999).

Le stem cell factor ou SCF ou encore KITL pour kit ligand est produit par les cellules stromales et peut être produit sous forme soluble ou ancré à la membrane (Broudy 1997). Il permet l'auto-renouvellement des cellules souches chez l'adulte, lors de l'hématopoïèse et donc la MKP. Utilisé *in vitro* dans des systèmes de culture de MK, le SCF associé à l'IL-3 ou à la TPO, favorise l'engagement mégacaryocytaire en augmentant de 20 fois le nombre de précurseurs mégacaryocytaires (Broudy 1997).

Le leukemia inhibitory factor ou LIF est produit lors de l'embryogenèse par le trophoblaste. Une administration de LIF ou sa surexpression chez la souris induit une augmentation de 30% de la numération plaquettaire. Cette cytokine, comme l'IL-6 et l'IL-11, n'agit pas seule, mais en association avec d'autres, (Metcalf 1991, Waring, Wall et al. 1993, Gainsford, Nandurkar et al. 2000).



- Interleukines

Les interleukines sont des facteurs solubles de petite taille initialement décrits pour stimuler l'activité des leucocytes, ils participent également à la croissance des autres types de cellules et nomment des MK.

L'IL-9 est produite essentiellement par les ostéoblastes et les lymphocytes T. Elle intervient au niveau de la CSH et des progéniteurs hématopoïétiques en stimulant leur prolifération et engagement vers la lignée MK (Fujiki, Kimura et al. 2002, Beriou, Bradshaw et al. 2010, Xiao, Wang et al. 2017).

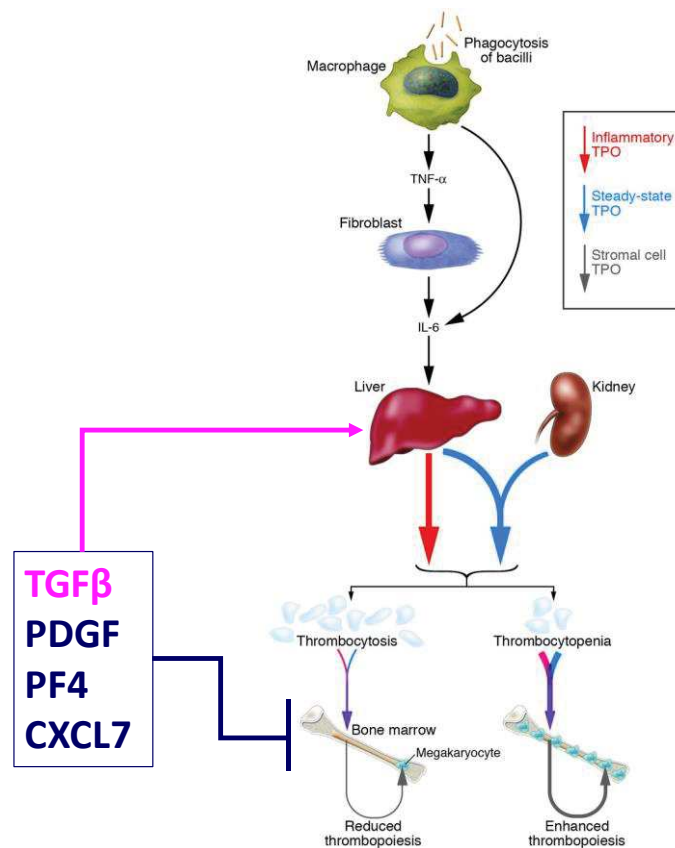
L'IL-3 et l'IL-6 agissent elles en association et sont essentiellement produites par les cellules immunitaires lors d'évènements inflammatoires, (arthrite juvénile, cancers, infections virales) (Nitz, Lokau et al. 2015). L'IL-3 favorise la prolifération de la CSH et induit une augmentation de 20% de la quantité de plaquettes produites 120 h après le début d'une administration journalière lorsqu'elle est administrée seule chez la souris, et une augmentation de 61% lorsqu'elle est co-administrée avec l'IL-6. L'effet de l'IL-3 comme celui de l'IL-6 est réversible puisqu'après l'arrêt de l'administration, la numération plaquettaire se normalise. Au niveau du mégacaryocyte, l'IL3 permet d'augmenter sa taille d'environ 18% contre 43% pour l'IL-6 (Carrington, Hill et al. 1991). L'IL-6, tout comme l'IL-3, sont donc importantes pour la MKP, mais ne sont pas essentielles. En effet, chez la souris déficiente pour cette protéine, la numération plaquettaire est normale. Cela sous-entend qu'il existe d'autres voies de signalisation de compensation permettant la régulation de la numération plaquettaire (Carrington, Hill et al. 1991).

L'IL-11 est produite par les cellules stromales de la moelle osseuse. Tout comme pour l'IL-6, une souris déficiente pour l'IL-11 ne présente pas de défaut au niveau de la numération plaquettaire (Negahdaripour, Nezafat et al. 2016). Toutefois, lorsqu'elle est administrée chez la souris et chez l'Homme, sous le nom de Neumega, elle permet d'augmenter la quantité de plaquettes produite. Agissant de manière synergique avec la TPO, elle permet d'améliorer la prise en charge de manière préventive des thrombopénies induites par un ou plusieurs cycles de chimiothérapie. De plus, l'IL-11 étant une interleukine anti-inflammatoire elle présente l'intérêt de

diminuer le risque de décès chez les patients atteints d'une thrombopénie associée à un sepsis (Du and Williams 1997).

b. Les cytokines régulant négativement la mégacaryopoïèse

D'autres cytokines ont été mises en évidence dans des modèles murins pour réguler négativement la MKP qui pourraient ainsi éviter l'emballement de ce processus. Il s'agit essentiellement de quatre cytokines : PDGF, PF4, CXCL7 et TGFβ1 (Figure 14).



**Figure 14 : Les régulateurs négatifs de la mégacaryopoïèse d'après (Kaushansky 2005)**

*La régulation de la MKP se fait tout d'abord via la TPO et la régulation de sa concentration par la masse plaquettaire. Mais d'autres protéines d'origine plaquettaire comme PDGF, PF4, CXCL7 permettent une régulation négative directe de la MKP. Alors que le TGFβ permet de réguler la MKP en agissant positivement ou négativement sur la production de TPO par le foie et le rein.*

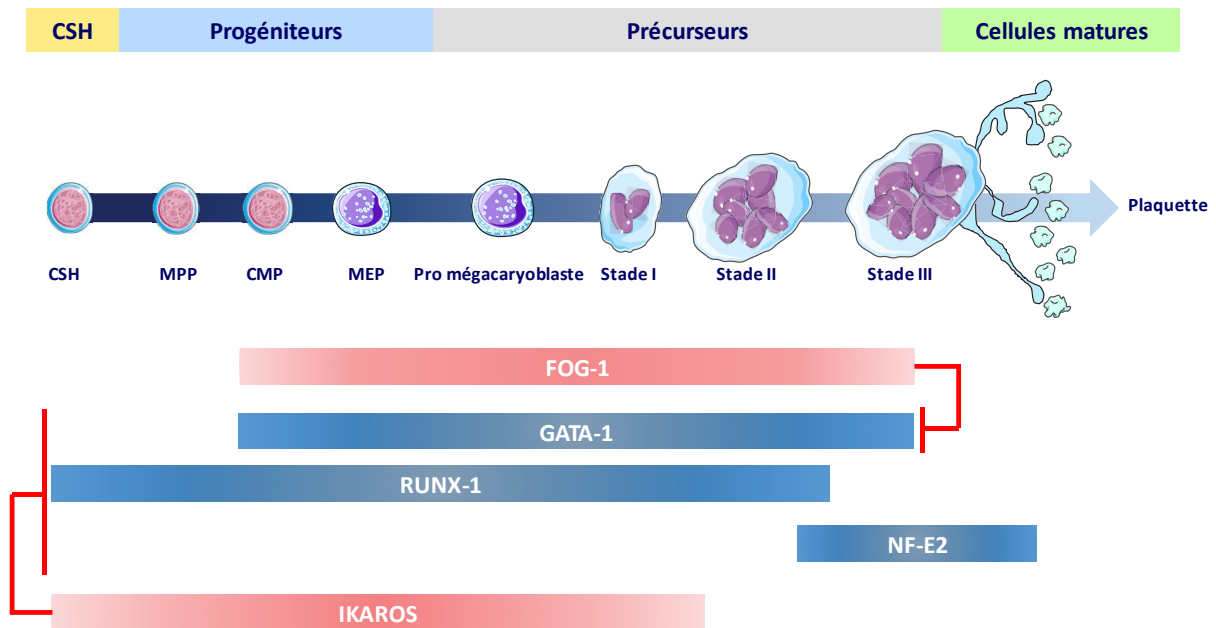
Le platelet-derived growth factor (PDGF) n'est pas une protéine unique, mais comprend quatre membres PDGFA, B, C et D. L'ensemble des PDGF est produit par les cellules mésenchymateuses de la moelle et est ensuite stocké dans les granules alpha des plaquettes. Une augmentation de la concentration en PDGF induit un ralentissement de la différenciation des progéniteurs et des précurseurs mégacaryocytaires (Gary, Sheldon et al. 2013).

Tout comme le PDGF, le transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF $\beta$ 1) est stocké dans les granules plaquettaires alpha, mais il est produit par les macrophages et les astrocytes. Cette protéine est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, comme les cancers, puisqu'elle contrôle la croissance et la prolifération, mais aussi la différenciation cellulaire et l'apoptose. En ce qui concerne la MKP, le facteur agit sur les organes à l'origine de la production de TPO, le foie et le rein (Assoian, Komoriya et al. 1983).

Le platelet factor 4 (PF4) également appelé CXCL4, est tout comme le CXCL7, stocké dans les granules alpha d'où il est sécrété et est classiquement utilisé comme un marqueur de l'activation plaquettaire. Une forte concentration plasmatique en PF4 ou en CXCL7 induit un ralentissement de la différenciation des MK surtout au niveau des progéniteurs et des précurseurs (Majumdar, Gonder et al. 1991, Warkentin 2007). Il semblerait que les concentrations importantes de PF4 s'opposent à l'effet de la TPO, puisqu'en bloquant cette chimiokine avec un anticorps spécifique, on retrouve les effets observés en présence de TPO sans pour autant avoir un effet additif (Lambert, Rauova et al. 2007, Lambert, Xiao et al. 2011).

## 2. Les facteurs de transcription

Des facteurs de transcription tels que GATA-1, FOG-1, RUNX1 et NFE2, permettent l'engagement et la maturation des MK, mais des études récentes ont mis en évidence que certains facteurs, comme IKAROS, peuvent être importants dans la régulation des premières phases de la MKP (Figure 15).



**Figure 15 : Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la MKP**

*Les facteurs de transcription impliqués dans la MKP permettent la régulation des CSH comme l'engagement dans la MKP (RUNX-1) ou la régulation de la prolifération des MK et leur organisation (GATA-1). D'autres facteurs sont impliqués dans le remodelage du cytosquelette (NF-E2). Enfin certains facteurs de transcription, comme FOG ou IKAROS, permettent un rétrocontrôle de l'ensemble de ces facteurs de transcription.*

### a. GATA-1

GATA-1 est un facteur essentiel. Il est constitué de deux domaines à doigt de zinc en N et C terminal et est capable de lier son partenaire FOG-1 *via* son domaine N terminal et l'ADN *via* son domaine C terminal (Shivdasani, Fujiwara et al. 1997, Balduini and Savoia 2012).

Il est connu pour son rôle dans la maturation des globules rouges, mais il est également exprimé dans d'autres cellules hématopoïétiques, comme les MK. C'est en 1997, avec l'arrivée des souris génétiquement modifiées, que le rôle de GATA-1 dans la MKP a été mis en évidence. En effet, les souris KO ainsi générées présentaient une macrothrombopénie avec une diminution de la numération plaquettaire de 85% par rapport à des souris témoins. L'origine de cette thrombopénie est centrale et résulte d'un défaut de maturation des MK au niveau de la moelle osseuse qui sont peu développés et de petite taille (Shivdasani, Fujiwara et al. 1997). Les MK présentent une hyper-prolifération associée à une faible ploïdie (2N) et une sous-expression de gènes spécifiques de la lignée MK tels que GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  ou impliqués au stade final de production des plaquettes tel que NF-E2 (Vyas, Ault et al. 1999).

L'interaction de GATA-1 avec son cofacteur FOG-1 favorise la transcription du gène codant pour CD41 (ITGA2B). Une immunoprécipitation de la chromatine a mis en évidence la présence d'une troisième protéine au niveau du promoteur, le facteur de transcription Fli-1 (Wang, Crispino et al. 2002).

Chez l'Homme, l'importance de GATA-1 dans la MKP a été corroborée par l'identification de mutations chez des patients présentant une thrombopénie congénitale dans deux pathologies connues sous le nom d'anémie dysérythropoïétique et de Bêta-thalassémie - thrombocytopenie liée à l'X (Ciovacco, Raskind et al. 2008).

## b. FOG-1

FOG-1 est un répresseur de GATA-1 auquel il se lie par son domaine en doigt de zinc N terminal (Balduini and Savoia 2012). Cette liaison induit une augmentation de l'affinité de GATA1 pour l'ADN (Yu, Niakan et al. 2002). L'association GATA-1/FOG-1 est essentielle pour la MKP. En effet, la mutation de l'un ou l'autre de ces facteurs de transcription donne chez la souris une anémie foétale qui dans la majeure partie des cas est létale ainsi qu' une diminution de la numération plaquettaire de 85% (Shivdasani, Fujiwara et al. 1997, Vyas, Ault et al. 1999). Mais dans certains cas l'absence d'association n'est pas en cause et le défaut est dû à des mutations au niveau des domaines à doigt de zinc de ces protéines, des éléments essentiels pour la liaison à l'ADN.

L'association de FOG-1 et de GATA-1 a peu d'impact au début de la MKP, mais est indispensable lors des dernières étapes. Ainsi, des souris déficientes pour GATA-1, spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire, possèdent des MK relativement immatures. Ils sont de petite taille et présentent un DMS peu développé et un noyau condensé (Shimizu, Ohneda et al. 2004).

## c. RUNX-1

Le runt-related transcription factor 1 ou RUNX1 est un facteur de transcription de type Core binding factor (CBF) intervenant lors de la bifurcation des MEP vers les lignées mégacaryocytaire et érythrocytaire et de la maturation des MK (Tracey and Speck 2000).

La répression de RUNX1 par l'utilisation de shRNA, inhibe la différenciation vers la lignée érythrocytaire en faveur de la lignée mégacaryocytaire. En effet, des études sur des souris mutées pour RUNX-1 montrent une diminution de la ploïdie et du développement cytoplasmique des MK ainsi que de la formation des proplaquettes comme cela avait été démontré pour GATA-1 (Bluteau, Glembotsky et al. 2012).

Une association entre RUNX1, CBF $\beta$  et GATA-1 a été mise en évidence lors de l'engagement mégacaryocytaire à partir de cellules CD34 (Elagib, Racke et al. 2003). Par ailleurs RUNX-1, comme décrit dans la section II. A. 3.b. contribue au processus d'endomitose en entraînant une diminution de MYH10 (Lordier, Bluteau et al. 2012).

Enfin, RUNX1 est connu pour favoriser la production de plaquettes en réprimant le Neurogenic locus notch homolog 4 (NOTCH4), impliqué dans le développement cellulaire. En effet, il a été mis en évidence dans des modèles de culture utilisant des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ou des iPSC, qu'une inhibition de NOTCH4 par un agent chimique ou *via* une extinction génique améliore la MKP. Cette augmentation est due à une amélioration de l'engagement mégacaryocytaire puisque 2,8 fois plus de CFU-MK sont retrouvés lorsque NOTCH4 est inhibé (Li, Jin et al. 2018).

#### d. NF-E2

NF (nuclear factor)-E2 est un facteur de transcription qui présente la particularité d'être impliqué tardivement dans la MKP. C'est un facteur de transcription très exprimé dans la lignée mégacaryocytaire et dans la lignée érythrocytaire. Si les souris déficientes pour NF-E2 présentent des globules rouges microcytaires et une diminution de l'hémoglobine (Shivdasani, Rosenblatt et al. 1995), son rôle dans la MKP a essentiellement été montré au niveau de la maturation finale des MK et de l'extension des proplaquettes. La thrombopénie observée (numération plaquettaire diminuée par 5) est due à une anomalie de prolifération des progéniteurs hématopoïétiques (Levin, Peng et al. 1999), qui se traduit ensuite par l'apparition de MK anormaux qui présentent un DMS désorganisé et un faible de nombre de granules (Shivdasani, Rosenblatt et al. 1995). Le rôle de NF-E2 dans les étapes finales de maturation des MK a été associé à l'expression de certains gènes cibles notamment celle de la tubuline  $\beta$ 1, un isotype de tubuline spécifiquement mégacaryocytaire impliqué dans la formation de la bande marginale des plaquettes (Shivdasani 2001).

#### e. Autres facteurs

Par ailleurs, une étude transcriptomique récente a mis en évidence l'implication du facteur de transcription NFIB (nuclear factor I/B) également dans les étapes tardives de différenciation mégacaryocytaire. En effet, la surexpression de NFIB dans des cellules CD34<sup>+</sup> a permis d'améliorer l'expression de marqueurs clés de la MKP tels que le CD41 et le CD42 après 10 jours de culture (Chen, Kostadima et al. 2014).

De même la recherche de nouveaux acteurs par des techniques sans a priori a permis d'impliquer dans les premières étapes de la MKP le kruppel-type zinc finger IKAROS. Ce facteur de transcription possède un domaine à doigt de zinc et est essentiellement décrit pour son rôle dans la l'orientation lymphocytaire. Mais en 2013 il a été décrit pour inhiber la différenciation ainsi que la maturation des MK. IKAROS est capable de lier les facteurs de transcription NOTCH et GATA en régulant négativement la MKP comme l'atteste la diminution de l'expression de transcrits spécifiques de la lignée mégacaryocytaire *NF-E2*, *PF4* ou *RUNX1* (Malinge, Thiollier et al. 2013) (Liu, Li et al. 2018).

On peut également citer TAL1, qui comme AHR appartient à la famille bHLH. Il se lie en fonction de son partenaire protéique soit à la séquence E box soit à celle du facteur de transcription GATA. TAL1 est impliqué dans le maintien de la cellules souche au long terme, il intervient également dans la maturation des MK puisqu'il est un inhibiteur de la cycline CDKN1A qui joue un rôle important dans la ploïdisation (Tijssen, Moreau et al. 2016).



### **III. La production de plaquettes *in vitro***

---

## A. Généralités sur l'hémostase

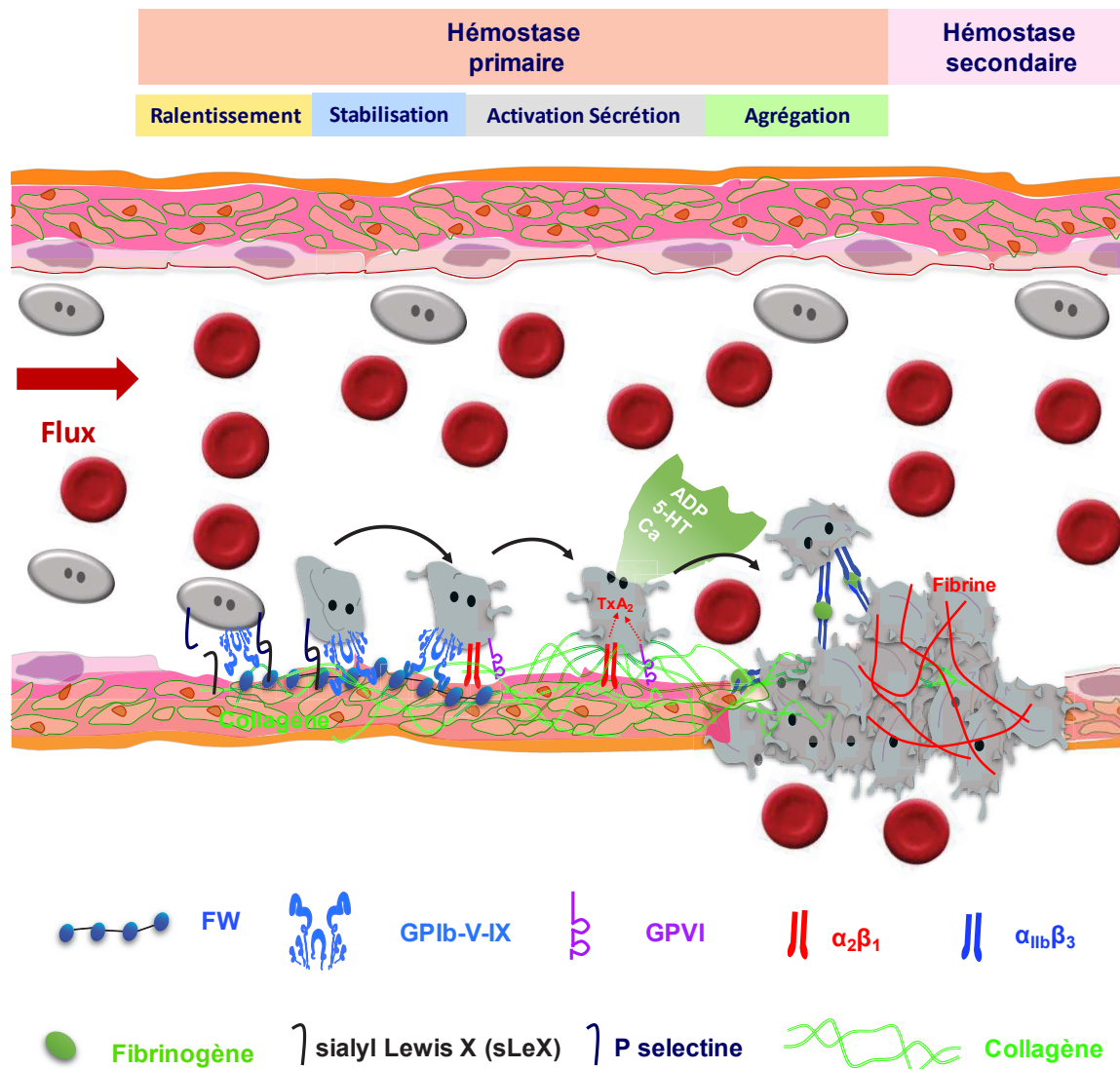
L'Hémostase est un ensemble de phénomènes physiologiques qui concourent à la prévention et à l'arrêt des saignements. Elle participe à la réparation de la brèche vasculaire et d'une façon générale, elle assure le maintien de l'intégrité des vaisseaux.

Elle se compose de trois étapes, : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse et fait intervenir trois composantes i) le vaisseau et en particulier les cellules endothéliales, ii) les plaquettes sanguines et les protéines plasmatiques impliquées dans les voies de la coagulation et enfin iii) les forces hémodynamiques. Des défauts quantitatifs ou qualitatifs de l'un de ces systèmes entraînent un défaut d'hémostase primaire, de la coagulation ou des deux. Ces anomalies peuvent conduire à des maladies hémorragiques plus ou moins sévères (Lanza 2006, Nurden, Pillois et al. 2013, Proulle, Strassel et al. 2019). Lors d'une lésion vasculaire, les premières étapes mises en jeu qui impliquent principalement les plaquettes sanguines définissent ce que l'on appelle l'hémostase primaire (Chapin and Hajjar 2015, Koupenova, Kehrel et al. 2017).

Lors d'une lésion vasculaire, l'endothélium lésé laisse apparaître une surface riche en protéines adhésives qui permettent les premières étapes de capture et d'adhérence des plaquettes. En présence de flux élevés rencontrés notamment dans les vaisseaux de petit calibre (artérioles, microcirculation), la première étape de capture et de ralentissement des plaquettes circulantes est assurée par l'interaction du complexe GPIb-V-IX et de son ligand le facteur Willebrand, une protéine de haut poids moléculaire qui se dépose sur la surface sous-endothéliale nouvellement exposée (Broos, Feys et al. 2011). L'adhérence stable des plaquettes est, quant à elle, favorisée par plusieurs protéines adhésives comme le collagène, la fibronectine, les laminines ou le fibrinogène qui sont les ligands de récepteurs glycoprotéiques membranaire de type intégrines ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ) (Kasirer-Friede, Kahn et al. 2007). Cette étape permet également l'interaction de la glycoprotéine (GP) VI avec son ligand le collagène. Elle enclenche alors une activation plaquettaire soutenue qui entraîne le changement de forme des plaquettes et le recrutement des plaquettes circulantes nécessaires à la formation du futur agrégat (Best, Senis et al. 2003, Kojima,

Moroi et al. 2006). D'une forme discoïde, les plaquettes vont devenir sphériques et émettre des extensions cytoplasmiques, les filopodes, pour favoriser les contacts plaquettes-plaquettes et enfin s'étaler. Les plaquettes vont sécréter le contenu de leurs granules tel que l'ADP (Gachet 2008)(Gachet 2006) ou synthétisent des composés comme le thromboxane A2 (Rendu and Brohard-Bohn 2001). Ces médiateurs solubles sont les ligands de récepteurs liés à des protéines G ( $G_q$ ,  $G_{12/13}$ ,  $G_i$ ) qui participent au recrutement des plaquettes circulantes, à l'amplification de l'activation plaquettaire, pour aboutir finalement à l'activation de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  ou GPIIb-IIIa (CD41/CD42) en augmentant son affinité pour le fibrinogène, et permettre le pontage des plaquettes pour former le clou plaquettaire (Huang, Ramamurthy et al. 2004, Korbecki, Baranowska-Bosiacka et al. 2014). Ces étapes entraînent des remaniements importants de la membrane des plaquettes qui expose des phospholipides chargés négativement, tels que les phosphatidylsérines, qui ont un rôle pro-coagulant. Ce processus accélère les réactions de coagulation pour aboutir à la génération de thrombine qui est le plus puissant activateur des plaquettes et également l'enzyme qui permet la formation de fibrine nécessaire à la consolidation du clou plaquettaire (Coughlin 2000, Ofori and Nyarko 2000) (Kahn, Nakanishi-Matsui et al. 1999). Dans les heures qui suivent et parallèlement au processus de cicatrisation de la paroi, la fibrine est dissoute sous l'action de la plasmine, rétablissant une circulation sanguine normale (Figure 16).

La formation d'un agrégat permet de limiter les pertes sanguines lors de l'hémostase, mais elle peut conduire dans une situation pathologique à l'occlusion d'un vaisseau, c'est la thrombose artérielle (Broos, Feys et al. 2011, Holinstat 2017). La thrombose artérielle est une complication majeure de la maladie athéromateuse entraînant ischémie et infarctus à la suite de l'occlusion des artères comme celles du cœur, du cerveau et des membres inférieurs. Plusieurs médicaments antiplaquettaires sont utilisés en traitement préventif des événements thromboemboliques et de l'athérothrombose comme l'aspirine, un inhibiteur de cyclooxygénase, prévenant la synthèse de thromboxane A2 (Fontana, Zufferey et al. 2014) ou le clopidogrel (PLAVIX®) une prodrogue qui une fois métabolisée inhibe de façon irréversible la fixation de l'ADP au récepteur P2Y12 ce qui inhibe l'amplification de l'agrégation plaquettaire (Hechler, Cattaneo et al. 2005, Angiolillo, Rollini et al. 2017).



**Figure 16 : Rôle de la plaquette sanguine**

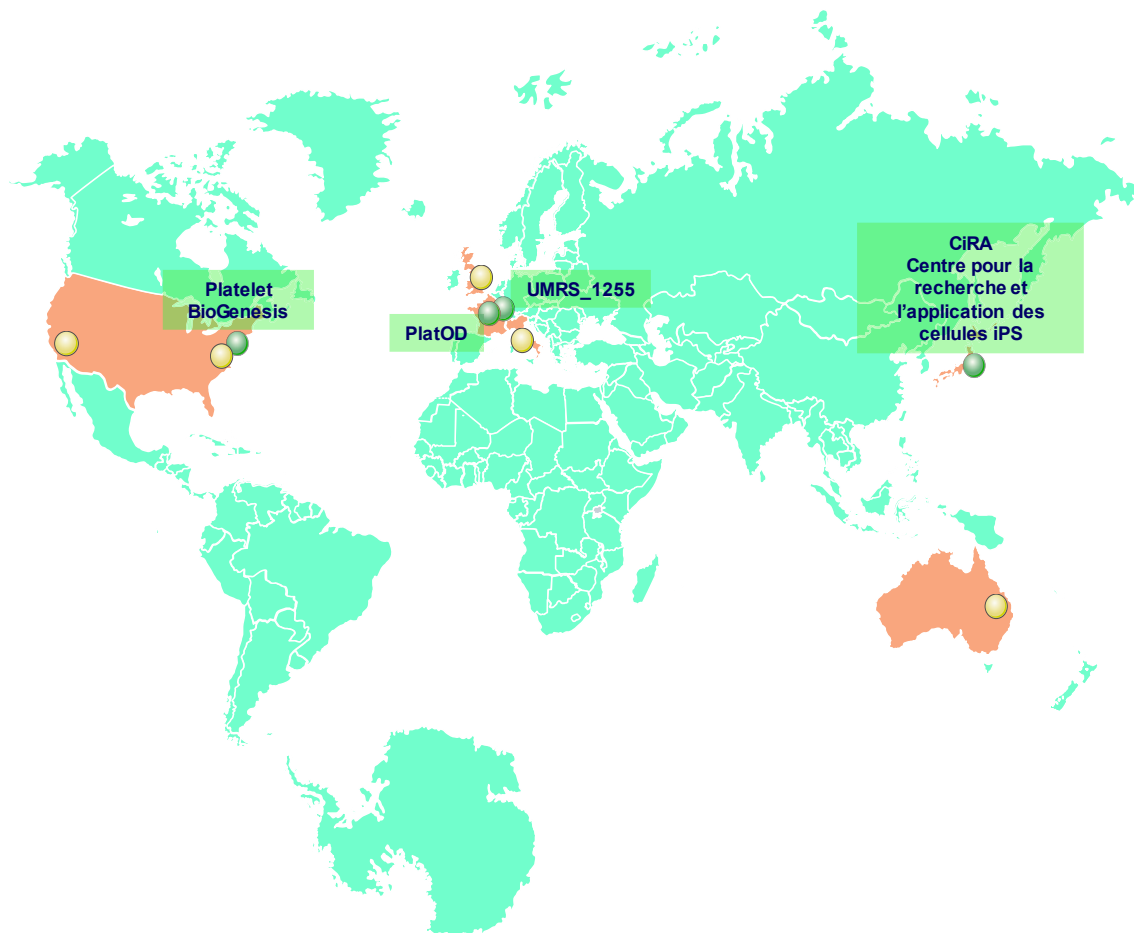
Lors d'une brèche vasculaire, l'exposition du sous-endothélium induit l'exposition de protéines de matrice telles que le collagène et le facteur Willebrand. L'exposition de ces éléments permet d'initier l'hémostase primaire en favorisant le ralentissement, l'adhérence puis la stabilisation des plaquettes. Les plaquettes vont alors s'activer, changer de forme et libérer le contenu de leurs granules, ce qui permet l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus stabilisé par un réseau de fibrine.

## B. Les plaquettes de culture

Les plaquettes sont des éléments essentiels pour l'hémostase. Leurs fonctions adhésives jouent un rôle clé dans l'arrêt des saignements. Une forte diminution du nombre de plaquettes (généralement  $<10-30 \cdot 10^6$  plaquettes/ $\mu$ l), fréquemment observée chez les patients soumis à un traitement médical (chimiothérapie, radiothérapie ou chirurgie de transplantation d'organes) est associée à un risque accru d'hémorragie sévère. Jusqu'à présent, le seul moyen de contourner ces risques est la transfusion de plaquettes. L'allongement de la durée de vie de la population couplée à la durée de stockage limitée des plaquettes (7 jours) représentent un défi majeur pour les centres de transfusion sanguine qui, malgré des tensions logistiques fréquentes, doivent assurer un approvisionnement adéquat en plaquettes, indemnes de risques immunitaires, infectieux et inflammatoires. Face à ce besoin croissant et grâce au développement des biotechnologies, des équipes ont développé des systèmes de culture pour la production de plaquettes fonctionnelles, à l'instar de ce qui a été développé pour les globules rouges (Neildez-Nguyen, Wajcman et al. 2002, Douay and Giarratana 2005, Giarratana, Kobari et al. 2005, Douay 2012).

Plusieurs laboratoires sont engagés dans ce programme d'envergure au niveau international (Figure 17). Cependant et malgré leurs efforts, les rendements obtenus en plaquettes par MK sont encore faibles. En effet, alors qu'un MK est théoriquement capable de libérer 1000 à 3000 plaquettes dans la circulation, les meilleurs rendements de culture font actuellement mention de 100 à 200 plaquettes/MK. Ces rendements sont malgré tout suffisants pour permettre d'engager des essais cliniques afin d'évaluer i) la capacité des plaquettes de culture à recirculer chez l'Homme et ii) leur durée de vie.

Dans les paragraphes suivants, nous verrons qu'une grande variété de stratégies ont été utilisées en termes de sources de cellules, méthodes de culture et dispositifs de libération des plaquettes. Malgré ces différences, un même plafond d'efficacité semble avoir été atteint. Pour le dépasser il est encore nécessaire d'améliorer les connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régulent la MKP et d'engager des partenariats avec des équipes multi-disciplinaires pour améliorer les dispositifs de libération des plaquettes.



**Figure 17 : Les équipes productrices de plaquettes *in vitro* dans le monde réalisé à partir de support disponible sur ServierArt**

1. Les sources de cellules et les méthodes d'obtention des progéniteurs mégacaryocytaires

La production de plaquettes *in vitro* nécessite comme source de cellules, des cellules dont les capacités sont proches des CSH produites dans la moelle osseuse c'est-à-dire des cellules multipotentes et possédant des capacités d'auto-renouvellement (Partie I). Les principales sont les iPSC (cellules souches pluripotentes induites) et les progéniteurs CD34<sup>+</sup>. La production d'iPSC nécessite une reprogrammation par l'introduction de vecteurs codant pour un facteur de transcription lié aux octamères Oct3/4 (Ben-Shushan, Thompson et al. 1998), pour le facteur de transcription Sox2 ainsi que pour le Krueppel-like factor 4 (Klf4) qui sont des gènes

impliqués dans le développement des CSH et enfin le proto-oncogène c-MYC qui lui, favorise la prolifération et la différenciation des progéniteurs mégacaryocytaires (Takahashi and Yamanaka 2006, Takahashi, Tanabe et al. 2007).

#### a. Des iPSC aux progéniteurs mégacaryocytaires

Les cellules iPSC, découvertes en 2006, ont comme caractéristique principale de pouvoir être multipliées à l'infini. Elles peuvent se différencier et donner naissance à tous les types cellulaires d'un organisme, à l'exception du placenta. Elles sont obtenues en reprogrammant une cellule somatique différenciée, généralement des fibroblastes, vers un état de pluripotence. Cette reprogrammation nécessite une combinaison optimale de facteurs de transcription, initialement Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc à l'origine d'une séquence d'événements épigénétiques qui modifient l'organisation de la chromatine et la méthylation de l'ADN, transformant la cellule différenciée en cellule pluripotente. D'abord réalisée chez la souris, cette technique a pu être appliquée chez l'homme avec une reprogrammation des fibroblastes visibles en 10 jours (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008, Ito, Nakamura et al. 2018, Nakagawa, Nakamura et al. 2013).

Bien que la culture et le maintien à l'état de cellules souches soit une étape délicate, les cellules iPSC présentent l'avantage d'avoir une forte capacité proliférative associée à une importante stabilité cellulaire au cours du temps. Ces cellules conservent ces propriétés même après décongélation ce qui est un atout pour les protocoles de thérapie cellulaire.

## b. Méthodes de culture pour obtenir des progéniteurs mégacaryocytaires

La majeure partie des équipes impliquées dans la production de plaquettes de culture utilisent comme source de cellules des cellules dérivées d'iPSC. L'obtention de progéniteurs MK à partir d'iPSC se fait *via* des méthodes dérivées de celles initialement utilisées pour la culture des cellules souches embryonnaires (CSE). Elles permettent dans un premier temps l'obtention de progéniteurs mégacaryocytaires, soit par une co-culture avec des cellules nourricières, soit en présence de cytokines.

Une des premières techniques ayant permis l'obtention de plaquettes fonctionnelles a été la co-culture de CSE avec des cellules de support nourricières de type fibroblastes murins C3H10T1/2 ou de cellules souches mésenchymateuses de type OP-9. Il a été montré qu'elles favorisaient la différenciation des CSE en MK en combinaison avec des cytokines (VEGF, TPO...) (Takayama, Nishikii et al. 2008). Une autre équipe, celle de GJ. Murphy, a quant à elle utilisé du Matrigel (support de culture composé d'un grand nombre de protéines) pour induire la différenciation des iPSC. En combinaison avec de nombreuses cytokines comprenant VEGF, BMP4, TPO, SCF, IL-6, EPO, BMGF, ce protocole permet d'induire une expansion importante des progéniteurs hématopoïétiques et à terme, une différenciation érythrocytaire et mégacaryocytaire (Smith, Rozelle et al. 2013).

À l'heure actuelle, bien que ces techniques puissent toujours être utilisées, ces équipes sont capables de s'affranchir de l'utilisation d'une lignée cellulaire nourricière grâce à l'utilisation de cytokines et de composés chimiques ce qui simplifie le processus et permet d'envisager la production à une échelle industrielle (Feng, Shabrani et al. 2014, Nakamura, Takayama et al. 2014).

La prochaine partie se focalise sur les différents types de cellules dérivées des iPSC obtenus par les différentes équipes en vue de produire des MK, i) les MK immortalisés (imMKCL) et ii) les MK obtenus suite à la surexpression de gènes cibles (MK-FOPs).



i. La production de plaquettes *in vitro* à partir des imMKCL

La faible différenciation des iPSC en progéniteur mégacaryocytaire a conduit l'équipe de Koji Eto à développer des lignées de MK immortalisées ou imMKCL (immortalized megakaryocyte cell lines) à partir des iPSC de différentes sources comme des fibroblastes ou des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon. Dans un premier temps, les iPSC sont différenciées en MK grâce à la surexpression du proto-oncogène c-MYC et de l'oncogène BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) puis immortalisées grâce à l'expression d'un gène anti-apoptotique BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large). Cet ensemble d'étapes a permis de générer la lignée imMKCL utilisée aujourd'hui par l'équipe pour la production de plaquettes de culture. La présence dans ces cellules de trois gènes (c-MYC, BMI1 et BCL-XL) sous la dépendance d'un promoteur inductible par la doxycycline permet la prolifération des imMKCL alors que l'absence de cet antibiotique favorise leur maturation (Nakamura, Takayama et al. 2014, Ito, Nakamura et al. 2018).

C'est en étudiant différentes combinaisons de facteurs de reprogrammation que l'équipe de Koji Eto a mis en évidence le rôle de c-MYC dans la différenciation mégacaryocytaire et la production plaquettaire à partir de cellules iPSC et que cette même équipe est parvenue à produire les imMKCL. C-MYC promeut l'engagement des iPSC dans le lignage mégacaryocytaire, en favorisant la prolifération, mais apparaît comme inhibiteur de la production plaquettaire. Toutefois la réactivation limitée de c-MYC suivie d'une diminution de son expression permet la transcription de gènes mégacaryocytaires et ainsi améliore la différenciation, le rendement en plaquettes ainsi que la qualité des plaquettes produites par les iPSC (Takayama, Nishimura et al. 2010).

Dans ce même article, les auteurs ont pu montrer que l'origine des cellules utilisées pour produire les iPSC, puis les imMKCL, influençait la production de plaquettes *in vitro* sans pouvoir encore donner d'explications sur les mécanismes mis en jeu. En effet, les imMKCL provenant de fibroblastes et de lymphocytes T présentent un rendement similaire de  $62,5 \cdot 10^4$  et  $75 \cdot 10^4$  plaquettes/imMKCL, alors qu'il n'est que de  $37,5 \cdot 10^4$  plaquettes/imMKCL pour ceux provenant de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon (Ito, Nakamura et al. 2018) soit environ deux fois moins. Comprendre ces différences permettrait sans doute de pouvoir mettre en lumière des acteurs importants

de l'engagement des cellules souches dans la voie de la MKP et de la capacité des MK à produire des plaquettes.

Les capacités de prolifération importante et de maturation des imMKCL ont permis de produire des plaquettes de culture en quantité suffisante pour les premières analyses fonctionnelles. Les plaquettes ainsi produites sont capables de recirculer chez le lapin et chez la souris. Concernant les capacités hémostatiques de ces plaquettes, il a été montré qu'elles permettaient de corriger le temps de saignement dans un modèle murin (Ito, Nakamura et al. 2018).

Les imMKCL servent également d'outils pour l'amélioration des procédés de production. En effet, elles ont été utilisées dans des expériences de criblage haut débit, afin d'identifier de nouvelles familles de molécules chimiques qui favoriseraient la production de plaquettes *in vitro*. De ces études, 2 composés chimiques ont été identifiés comme pouvant améliorer la production de plaquettes *in vitro*, le TCS-359, un inhibiteur de Flt-3 et Wnt C59, un inhibiteur de la voie Wnt (Seo, Chen et al. 2018).

Enfin les imMKCL et plus généralement les iPSC permettent également la génération de plaquettes de culture dites universelles, c'est à dire des plaquettes dépourvues de molécules HLA-I (human leukocyte antigen), responsables de réactions allo-immunes et d'inefficacité transfusionnelle. L'équipe a généré dans ce but, des plaquettes déficientes pour la  $\beta 2$  microglobuline, à partir de cellules iPSC, Une absence d'expression du gène de la  $\beta 2$  microglobuline, permet d'obtenir des plaquettes négatives pour les principaux antigènes d'histocompatibilité (Feng, Shabrani et al. 2014).

## ii. La production de plaquettes *in vitro* à partir des MK-FOP

Toujours à partir d'iPSC, l'équipe de Cédric Ghevaert a choisi une autre option pour obtenir des MK. Il a mis en évidence en 2016 que la surexpression de trois facteurs de transcription (GATA1, FLI1 et TAL1) permettait de générer des MK à partir d'iPSC. Cette équipe a également développé une technique de transduction qui permet d'éliminer un maximum de particules virales et de cellules non-transduites. Les

MK, baptisés MK-FOP (forward programmed MK), sont obtenus grâce aux facteurs de transcription spécifiques (GATA1, FLI1 et TAL1).

Type cellulaire	Temps total (jours)	Cytokines Composés chimiques Cellules	Délais d'obtention IPSC (jours)	Délais d'obtention MK (jours)	Temps de culture (jours)	Rendement	Références
imMCKLs	77	SCF TA-316 SR1 Inhibiteur de ROCK KP-457 doxycycline βestradiol C3H10T1/2	15	36	26 jours en deux phases. Prolifération : 20 Maturation: 6	75.10 <sup>4</sup> plaquettes/imMCKL	(Ito, Nakamura et al. 2018) (Nakamura, Takayama et al. 2014)
FOP-MK	110	TPO SCF IL1b FGF2 Activin-A Y-27632 BMP4 protamine sulfate	10	10	90	4 - 6 plaquettes/MK	(Moreau, Evans et al. 2016)

**Tableau 1 : Les principales différences entre les imMCKLS et les FOP-MK**

c. Des progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> aux progéniteurs mégacaryocytaires

Il existe trois sources principales de progéniteurs hématopoïétiques humains : la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical et le sang périphérique dont on obtient les cellules CD34<sup>+</sup> soit en stimulant la moelle osseuse avec du Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) pour favoriser la sortie des cellules CD34<sup>+</sup> dans le sang périphérique ou à partir de filtres de leuco-déplétion utilisés lors de la préparation des produits sanguins labiles.

i. Obtention des CD34

En 1984, le premier anticorps anti-CD34 a été généré par Civin et al., ouvrant la voie à la purification de progéniteurs hématopoïétiques (Civin, Strauss et al. 1984). La récolte des cellules CD34<sup>+</sup> repose sur une sélection en présence d'un anticorps dirigé contre ce marqueur. Les échantillons utilisés pour réaliser ce tri peuvent être obtenus par les techniques évoquées ci-dessus, après stimulation par le G-CSF (Au - Perdomo, Au - Yan et al. 2017) ou à partir des filtres de leuco-déplétion (Peytour, Villacreces et al. 2013).

ii. Méthodes de culture pour l'obtention des progéniteurs MK

Actuellement très peu d'équipes utilisent les progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> pour la production de plaquettes *in vitro*. Si l'obtention des cellules est aisée, le tri des cellules CD34<sup>+</sup> reste onéreux et leur capacité de multiplication est faible ce qui limite leur utilisation. Cependant ces cellules ont été à l'origine de la mise au point de nombreuses techniques de production de plaquettes *in vitro* soit en co-culture soit à partir de cocktails de cytokine qui ont été développés et optimisés par de nombreuses équipes (Feng, Shabrani et al. 2014, Di Buduo, Wray et al. 2015, Blin, Le Goff et al. 2016, Moreau, Evans et al. 2016, Strassel, Brouard et al. 2016, Ito and Ito 2018).

- Co culture

En 1995 Rafii et al. ont décrit l'importance des cellules endothéliales dans la prolifération des cellules souches et dans leur engagement dans la MKP. Pour cela, ils ont réalisé une co-culture de cellules endothéliales de moelle osseuse et de cellules CD34<sup>+</sup> en présence de concentrations faibles en cytokines et ce afin d'évaluer l'effet des cellules endothéliales sur les cellules CD34<sup>+</sup> (Rafii, Shapiro et al. 1995). Plus récemment la co-culture de cellules CD34<sup>+</sup> et de fibroblastes embryonnaires de souris a permis de générer en 20 jours 25 à 160 MK par CD34<sup>+</sup>ensemencée dans un milieu dépourvu de cytokines. Les éléments CD41<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup> (GPIIb<sup>+</sup>GPIb<sup>+</sup>) produits après 20 jours de culture sont fonctionnels *in vitro* puisque capables d'exposer la P-sélectine en présence d'agonistes ce qui montre que ces éléments plaquettaires sont capables de s'activer (Pick, Azzola et al. 2013). Enfin des cellules nourricières de type fibroblastes murins C3H10T1/2 ou de cellules souches mésenchymateuses de type OP-9 en combinaison avec des cytokines (VEGF, TPO) sont également utilisées dans la production de plaquettes de culture à partir d'iPSC et il a été montré que ces combinaisons favorisaient leur engagement vers la lignée mégacaryocytaire (Takayama, Nishikii et al. 2008).

- Cytokines

L'optimisation des cocktails de cytokines a permis de favoriser l'amplification des cellules CD34<sup>+</sup>, leur engagement dans la lignée mégacaryocytaire et la maturation des MK (Debili, Issaad et al. 1992, Choi, Nichol et al. 1995, Abbonante, Di Buduo et al. 2016). Il est possible d'obtenir aujourd'hui des plaquettes de culture en 15 jours avec un rendement de 150 à 200 plaquettes / MK (Di Buduo, Wray et al. 2015, Strassel, Brouard et al. 2016, Jarocha, Vo et al. 2018, Do Sacramento, Mallo et al. 2020). La différence de rendement avec les imMKCL précédemment décrites est essentiellement due à l'utilisation d'une lignée stable qui prolifère indéfiniment et parvient à se multiplier en 15 à 20 jours par 10 000, contre 2 à 5 fois en 7 jours pour des cellules primaires CD34<sup>+</sup>.

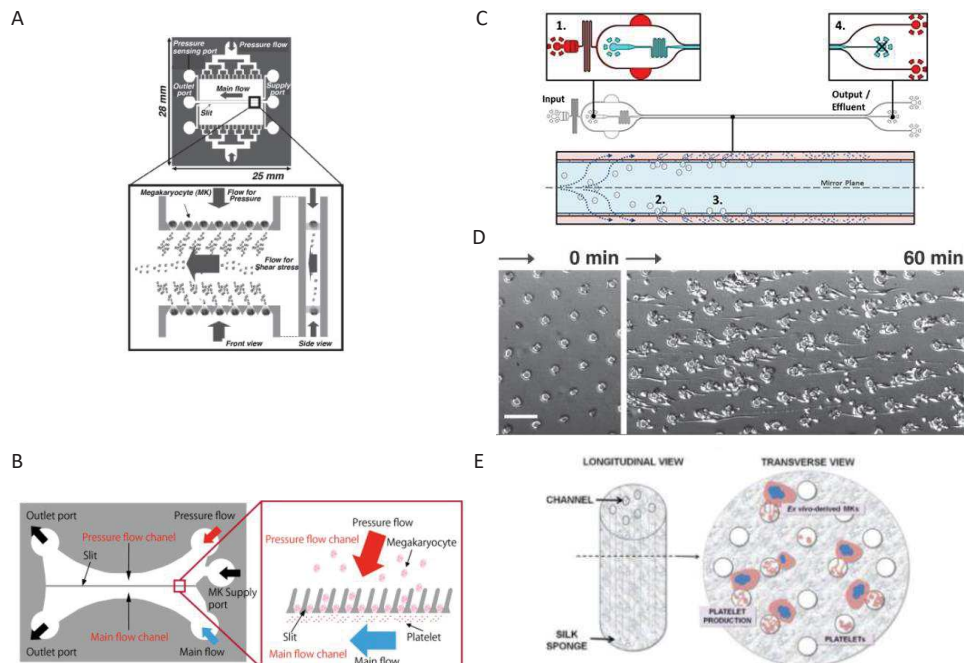
La source des cellules CD34<sup>+</sup> à prendre en considération est fonction des protocoles que l'on souhaite développer. En effet, les cellules CD34<sup>+</sup> provenant de sang de cordon présentent un pouvoir prolifératif supérieur aux cellules CD34<sup>+</sup> provenant de sang périphérique (mobilisé ou non) qui est respectivement de 44 fois et 6,9 fois (Fibbe, Noort et al. 2001). Les cellules issues de moelle osseuse se comportent quant à elles comme celles du sang périphérique. Par contre, la meilleure capacité proliférative des cellules issues de sang de cordon est contrebalancée par des capacités de maturation des MK limitée, alors que les MK dérivés du sang périphérique ou de la moelle osseuse se différencient très bien. Cela s'explique par l'immatunité relative des cellules de sang de cordon par rapport aux cellules CD34<sup>+</sup> issues de moelle osseuse ou du sang périphérique (Fibbe, Noort et al. 2001, Di Buduo, Kaplan et al. 2017, Strassel, Gachet et al. 2018).

	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Cellules CD34+</b>	Facilement accessible Temps de culture court	Faible prolifération Variabilité inhérente à la cellule primaire Rendement plaquettaire faible
<b>iPSC</b>	Forte capacité de prolifération Stabilité dans le temps Possibilité de congeler en cours de différenciation Rendement plaquettaire élevé	Durée de culture très longue Modification du génome Locaux spécifiques (laboratoire L3)

**Tableau 2 : Les principales différences entre les cellules CD34+ et les iPSC**

## 2. Les dispositifs de libération de plaquettes

Plusieurs techniques de libération de plaquettes ont été envisagées. Les données de la littérature ont mis en évidence une influence du flux et des forces de cisaillement retrouvées dans les vaisseaux sinusoïdes et notamment dans la microcirculation pulmonaire sur la libération des pro-plaquettes et leurs remodelage en plaquettes (Thon, Mazutis et al. 2014, Lefrançais, Ortiz-Muñoz et al. 2017, Ito, Nakamura et al. 2018). Sur la base de ces observations et s'appuyant sur des progrès de fabrication un certain nombre de laboratoires ont développé différents systèmes microfluidiques biomimétiques ainsi que des bioréacteurs.



**Figure 18 : Principaux dispositifs biomimétiques permettant la libération de plaquettes *in vitro***

Les dispositifs microfluidiques de libération des plaquettes sont majoritairement développés en PDMS et basés sur l'immobilisation des MK au niveau de pores et sur l'utilisation de flux différentiels (A, B, C) (Nakagawa, Nakamura et al. 2013, Thon, Mazutis et al. 2014). Les MK peuvent également être fixés sur des plots de PDMS recouverts de FW (D) (Blin, Le Goff et al. 2016). Les MK peuvent être immobilisés dans une structure en fibres de soie (E) (Tozzi, Laurent et al. 2018). Enfin les plaquettes sont libérées suite à la génération de force de cisaillement dans des canaux dédiés (A, B, C, E) ou directement dans la chambre (D).

### a. Systèmes microfluidiques biomimétiques

Les systèmes microfluidiques ont pour objectif de reproduire les phénomènes physiologiques. Deux types de systèmes microfluidiques ont été développés : les systèmes en 2D mimant la libération plaquettaire au niveau des sinusoides de la moelle osseuse et ceux en 3D dont le but est de reproduire l'ensemble du processus allant de la MKP à la libération des plaquettes.

#### i. Les systèmes microfluidiques en 2D

Les systèmes 2D utilisent principalement le polydiméthylsiloxane appelé PDMS, un polymère organo-minéral de la famille des siloxanes. Pour la fabrication du dispositif microfluidique, le PDMS est mélangé à un agent réticulant versé dans un moule microstructuré chauffé afin d'obtenir une réplique en élastomère (PDMS réticulé).

Le premier système développé en 2013 par l'équipe japonaise de Koji Eto sous l'égide de leur entreprise Megakaryon était un système composé de deux flux : le premier permettant de contraindre les MK pro-plaquettaires et le second permettant de générer des forces de cisaillement et ainsi entrainer la libération des plaquettes. De manière plus précise, le premier dispositif (Figure 18 A) maintient les MK dans des pores coniques de 8  $\mu\text{m}$  de part et d'autre du canal central, alors que le second flux généré dans le canal central à 90° des deux précédents, permet de générer la force de cisaillement à l'origine de la libération des plaquettes.

Par la suite l'équipe a proposé une amélioration qui consistait à générer un angle relatif de 60° entre les deux flux (Figure 18B) ce qui permet d'augmenter significativement le rendement de libération des plaquettes comparativement au dispositif (Figure 16A) où les flux sont à 90° les uns des autres. Le dispositif B permet de libérer 3,6 fois plus de plaquettes par rapport à une libération spontanée sans dispositif alors que le dispositif A ne permet de libérer que 1,1 fois plus de plaquettes que la condition contrôle. Les plaquettes ainsi produites sont capables *in vitro* d'activer



leur GPIIb-IIIa en présence d'une concentration élevée d'ADP (50  $\mu\text{M}$ ) ou de thrombine (0,5 U/ml) (Nakagawa, Nakamura et al. 2013).

Thon et al. ont conçu un dispositif microfluidique sur puce qui présente la possibilité d'inclure différents composants rencontrés dans la moelle osseuse. Une particularité de leur dispositif est de pouvoir incorporer de la microscopie en temps réel. Les MK proplaquettaires obtenus à partir d'iPSC sont introduits dans le dispositif par le canal central et soumis à une force de cisaillement de  $500 \text{ s}^{-1}$  pendant deux heures. Au fur et à mesure de la libération des plaquettes, celles-ci sont récupérées dans les deux canaux latéraux, les corps cellulaires des MK sont quant à eux éliminés par le canal central limitant ainsi le bouchage des pores et du dispositif. Ce dispositif permet de libérer environ 30 plaquettes/MK (Thon, Mazutis et al. 2014) (Figure 18C).

Une équipe française, PlatOD, a mis au point un système en PDMS constitué de micro-piliers placés en quinconce et imprégnés de facteur Willebrand (Blin, Le Goff et al. 2016) (Figure 18D). Ce facteur favorise le ralentissement et la fixation des MK matures préalablement obtenus par différenciation de cellules  $\text{CD34}^+$  de sang de cordon. La disposition en quinconce des micro-piliers permet d'augmenter la probabilité de contact et ainsi favoriser la fixation des MK dans une zone de stase à l'arrière du micro-pilier. Une force de cisaillement de  $1800 \text{ s}^{-1}$  permet alors la formation d'une élongation cytoplasmique de type proplaquette puis la plaquette. (Poirault-Chassac, Nguyen et al. 2013) permettant d'atteindre un rendement de 3 plaquettes/MK (Blin, Le Goff et al. 2016). Bien que les MK aient interagi avec le FW, ces plaquettes ne présentent pas de signe d'activation et sont capables de s'activer en présence de TRAP (Thrombin Receptor Agonist Peptide), un agoniste capable d'induire une activation de ces plaquettes, puisqu'un changement de conformation de la GPIIb-IIIa est observé.

Ces dispositifs microfluidiques présentent comme avantages une production aisée et grâce au PDMS d'autoriser tous types de géométrie. Les flux sont modulables et ils ont montré une bonne efficacité de libération des plaquettes. Par contre, ils ne permettent pas de traiter de gros volumes, et même si aucune contrainte de bonnes pratiques de fabrication (BPF) ne vient contrarier la production de ce type de système, le traitement exclusivement de petits volumes pourrait limiter leur exploitation pour la production de plaquettes à plus large échelle.

ii. Les systèmes microfluidiques en 3D utilisant des biomatériaux

En parallèle des systèmes évoqués plus haut, la plupart des équipes ont développé l'utilisation de biomimétiques. Mimant une structure 3D, les biomatériaux permettent de se rapprocher des paramètres biologiques de la moelle osseuse. On peut notamment dans un système en 3D mimer les interactions cellule/cellule ou cellule/environnement.

L'équipe de Lasky a montré que la culture de CSH au sein de biomatériaux synthétiques (polyester ou hydrogels recouverts de TPO ou fibronectine) permet d'augmenter les rendements de production plaquettaire (Sullenbarger, Bahng et al. 2009). Cette même équipe a comparé une culture 2D classique à un système 3D et montré une durée de culture des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon de 24 jours en 3D contre 10 pour un dispositif 2D. Toutefois le dispositif 3D permet d'améliorer le rendement à 10 plaquettes/MK contre 0,8 plaquette par MK pour la culture 2D. Ils ont également caractérisé les plaquettes ainsi générées et ont mis en évidence qu'elles sont capables, suite à une stimulation par la thrombine, de former des agrégats et d'exposer la P-sélectine à leur surface (Sullenbarger, Bahng et al. 2009). Ce dispositif de production ne permet pas de s'affranchir de tissus nourriciers ce qui est un désavantage pour une production à grande échelle.

D'autres équipes ont utilisé des biomatériaux biologiques composés de polysaccharides naturels comme les hydrogels de polysaccharides. La taille des pores ainsi que la porosité de ces hydrogels peuvent être façonnées de telle sorte que l'hydrogel soit favorable à la culture et la différenciation de cellules *in vitro* (Sullenbarger, Bahng et al. 2009).

L'équipe de Letourneur a également rapporté la possibilité de réaliser une différenciation des CSH dans des hydrogels ce qui permet d'améliorer la différenciation en MK (Pietrzyk-Nivau, Poirault-Chassac et al. 2015), l'amélioration de cette technique par l'équipe de C. Léon est plus propice à la maturation des MK (Aguilar, Pertuy et al. 2016, Aguilar, Boscher et al. 2018).

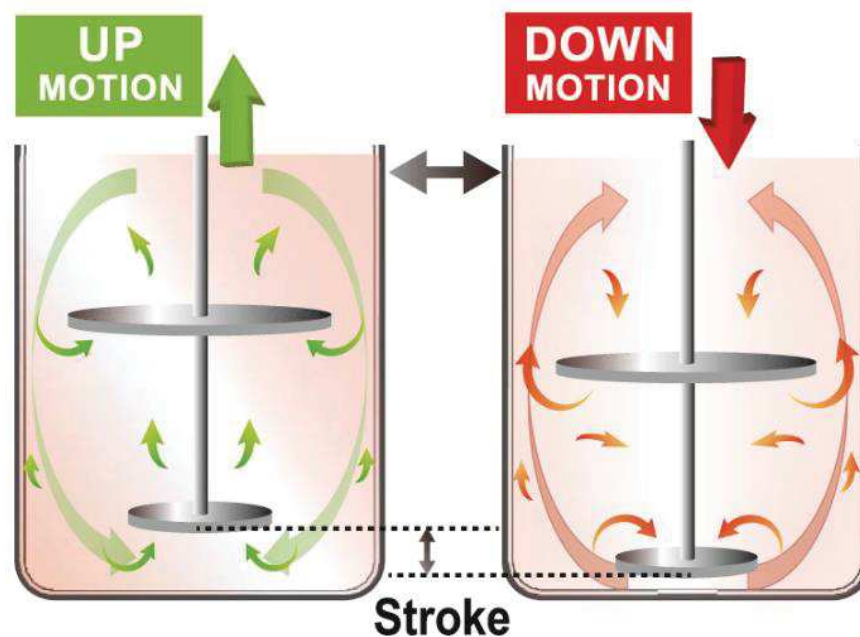
La plus avancée dans ce domaine des biomatériaux est sans contexte l'équipe d'A. Balduini. Elle a développé un dispositif en 3D en fibres de soie, un élément inerte pouvant facilement être utilisé pour une production de grade pharmaceutique puisqu'il est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) (Figure 18E). Ce système modélise l'environnement médullaire à proximité des sinusoides. Il s'agit d'un matériau dont la structure est similaire à celle d'une éponge dont la porosité et les canaux miment l'environnement médullaire. Le modèle présenté utilise des MK dérivés de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon qui sont intégrés au système lorsqu'ils sont à l'état de progéniteur mégacaryocytaires. La lumière de la fibre est perfusée avec un débit de 10 µL/min pendant 6 heures. Les MK émettent alors des proplaquettes à travers les pores et sous l'effet du flux appliqué les plaquettes sont libérées. Il est important de mentionner que ce système peut intégrer des cellules endothéliales pour se mettre au plus près des conditions physiologiques. La libération de plaquettes augmente avec le nombre de canaux ainsi 0,27 plaquette/MK sont libérées lorsque 3 canaux traversent l'éponge de soie alors que 1,27 plaquettes/MK sont libérées lorsqu'il y en a 7. La majorité des corps nucléaires des MK restent dans la matrice de soie ce qui permet de faciliter l'étape de purification des plaquettes de culture. Les plaquettes ainsi produites présentent la capacité de s'activer *via* un changement de conformation de la GPIIb-IIIa en présence de 3 U/mL de thrombine (Tozzi, Laurent et al. 2018). L'utilisation d'un matériau approuvé par la FDA, la possibilité de produire des éponges de taille plus importante ainsi que le fait que ce dispositif puisse être autoclavé, sont des avantages significatifs pour ce dispositif. Toutefois, le rendement de ce dispositif reste faible.

Enfin une technologie permettant de générer des forces de cisaillement basées sur des membranes en nanofibres a été développée par Avanzi et al. Ils ont assemblé un bioréacteur capable de produire étape par étape des plaquettes à partir de cellules CD34<sup>+</sup> provenant de sang de cordon ombilical avec un rendement de 100 plaquettes/MK (Avanzi, Oluwadara et al. 2016).

## b. Le bioréacteur : une approche à grande échelle

L'étude des capacités hémostatiques qui permettraient de valider définitivement les plaquettes *in vitro* en vue de leur transfusion chez l'homme nécessite de pouvoir les produire en grande quantité. Les grands volumes de culture, la nécessité d'un dispositif de production stérile de bout en bout, le coût d'une telle production font qu'aujourd'hui une seule équipe a été en mesure de présenter un bioréacteur de grade clinique.

C'est dans cette optique que l'équipe de K. Eto s'est basée sur un tout autre modèle, se basant sur la génération de flux turbulents, et a pour cela créé le bioréacteur VerMES (Figure 19). Ce bioréacteur permet de réaliser à la fois la culture des imMKCL et la libération des plaquettes. D'une capacité pouvant atteindre 8 litres, il permet d'éliminer une étape critique du processus, le transfert entre le dispositif de culture et le dispositif de libération. Ce dispositif permet de libérer 70-80 plaquettes/MK soit, une fois couplé à la capacité de prolifération des imMKCL, une production de près de  $75 \cdot 10^4$  plaquettes/imMKCL. Pour cela il est nécessaire que la course du piston soit de 40 mm avec une vitesse verticale de 150 mm/s, ce qui génère une énergie turbulente comprise entre  $0.002-0.014 \text{ m}^2/\text{s}^2$  favorisant la culture et des contraintes de cisaillement comprises entre 0.4–3.0 Pa permettant la libération plaquettaire. Après 6 jours de culture, une réduction de volume est réalisée par filtration en fibres creuses, puis les imMKCL résiduels sont éliminés par centrifugation et les plaquettes *in vitro* sont ainsi purifiées. La caractérisation de ces plaquettes a permis de mettre en évidence leur capacité à circuler chez l'animal ainsi que leur fonctionnalité *in vivo* et *in vitro* (Ito, Nakamura et al. 2018).



**Figure 19 : Le dispositif VerMES**

*Représentation schématique des forces fluidique présente au sein du bioréacteur VerMes développé par l'équipe de K. Eto pour la culture à grande échelle de plaquette in vitro à partir de imMCKLs.*

### 3. Validation des plaquettes *in vitro*

La production de plaquettes de culture à visée transfusionnelle implique de définir les essais préalables à réaliser afin de caractériser au mieux le produit *in vitro* et *in vivo*.

Concernant les tests *in vitro*, on peut réaliser une étude de la morphologie par microscopie électronique des éléments cellulaires produits ce qui permet de déterminer, en plus de la taille des éléments plaquettaires, la présence ainsi que le l'organisation des microtubules présents au niveau des pôles plaquettaires. De plus, cette technique permet la quantification des organites plaquettaires (granule  $\alpha$ , granule  $\delta$  et les corps multi vésiculaire) ainsi qu'une appréciation de leur contenu. La microscopie à fluorescence peut également être utilisée pour déterminer la taille des plaquettes, la présence de l'anneau de microtubules ainsi que déterminer le contenu granulaire (Aguilar, Weber et al. 2019, Proulle, Strassel et al. 2019).

La caractérisation des récepteurs plaquettaires essentiels à l'hémostase primaire peut être effectuée sur de faibles quantités de matériel par cytométrie en flux. On procèdera notamment à la quantification des différents constituants du complexe GPIb-V-IX, mais aussi de la GPIIb-IIIa, de la GPVI, ou encore du CD9 (Kraft, Drechsler et al. 2015). La cytométrie en flux permet également, suite à une activation par un agoniste plaquettaire comme la thrombine, la détection de la P-sélectine ou du changement de conformation de la GPIIb-IIIa, des témoins de l'activabilité des plaquettes (Do Sacramento, Mallo et al. 2020).

Une étude plus globale de la fonctionnalité plaquettaire peut être effectuée par l'étude de l'agrégation plaquettaire en réponse à différents agonistes tels que l'ADP, la thrombine, l'acide arachidonique ou le thromboxane A2 (De Cuyper, Meinders et al. 2013).

Pour caractériser leurs fonctions *in vivo*, deux tests sont utilisés, d'une part l'étude de leur capacité à recirculer suite à leur transfusion dans une souris immunodéficente et d'autre part l'analyse de leurs propriétés hémostatiques. On pourrait également mettre en place chez la souris le même test que celui qui sera effectué chez l'Homme c'est-à-dire un marquage des plaquettes à l' $^{111}\text{In}$ . Les plaquettes humaines ainsi marquées peuvent être quantifiées à tout moment tout en pouvant permettre la localisation des plaquettes dans l'organisme par Tomographie par Émission de Positrons (Takahashi, Ohyanagi et al. 2005).

Enfin la fonctionnalité *in vivo* de ces plaquettes de culture peut être évaluée par mesure du temps de saignement après transfusion à une souris immunodéficente rendue thrombopénique. Actuellement, seules les équipes de K. Eto et C. Strassel (article 1) ont pu réaliser une étude exhaustive de la qualité des plaquettes de culture produite en analysant leur morphologie, leurs fonctions *in vitro*, leur capacité à recirculer ainsi que leur propriété hémostatique (Ito, Nakamura et al. 2018, Do Sacramento, Mallo et al. 2020).

## **Objectifs du travail de thèse**

---

Le laboratoire a comme thématique principale l'étude de la biologie et de la pharmacologie des plaquettes sanguines, et ce, dans un contexte d'hémostase, de thrombose et de transfusion. Les études sont menées par deux équipes, l'une focalisée sur l'hémostase et la thrombose et l'autre, dans laquelle je me suis inscrit, est centrée sur l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires qui régulent les différentes étapes de la mégacaryopoïèse.

A mon arrivé au laboratoire, ayant pour perspective la production de plaquettes de culture, l'équipe cherchait à améliorer les phases de différenciation et de maturation des MK qu'ils obtenaient à partir de progéniteurs hématopoïétiques humains dérivés du sang périphérique, les cellules CD34<sup>+</sup>. En utilisant le composé chimique Stemregenin-1 (SR1), un antagoniste de l'AHR, initialement décrit pour améliorer la prolifération des cellules CD34<sup>+</sup> (Boitano, Wang et al. 2010), ils ont de manière inattendue obtenu dans leurs conditions de culture, non pas une prolifération accrue des cellules CD34<sup>+</sup>, mais une augmentation significative (X3) de la production de plaquettes. Analysant les cellules issues de la culture à différentes étapes pour comprendre l'action de SR1, ils ont identifié, après 10 jours de culture, une population de progéniteurs MK hautement compétents pour la production de plaquettes exprimant le marqueur CD34 tout en exprimant faiblement le marqueur CD41 (GPIIb) (CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>). Cette population qui représentait environ 40% des cellules présentes dans la culture permettait d'atteindre le rendement de 150 à 200 plaquettes/CD34. Ce rendement qui les plaçait dans les meilleurs rendements publiés a motivé la protection de la méthode de culture par un brevet (N°:FR1557020- Date de priorité 2015, Extension en Europe, US, Canada, Chine, Japon, Australie et Inde). Il leur a également permis d'envisager une preuve de concept chez l'Homme visant à démontrer la capacité des plaquettes produites à recirculer et à en mesurer leur durée de vie. Pour mener à bien cet essai, la transfusion de plaquettes de culture équivalente à 1% de la masse plaquettaire du receveur est nécessaire. C'est donc la volonté de réaliser cette preuve de concept qui a initié mon projet de thèse.

En effet, la mise en place de cet essai nécessitait i) une mise en adéquation des méthodes développées avec des procédés de production à grande échelle répondant aux normes des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) et ii) de démontrer que les plaquettes produites étaient comparables à des plaquettes natives en termes



de qualité et de fonction, un critère indispensable à leur utilisation à des fins transfusionnelles.

Pour atteindre cet objectif, la culture devra répondre aux prérequis de l'industrialisation que sont : la simplicité, la robustesse et l'automatisation du procédé associés à un coût de production raisonnable. Atteindre un tel niveau de production nécessite de lever encore certains obstacles technologiques et cognitifs. Notre groupe a décidé de porter son effort sur la prolifération des cellules CD34<sup>+</sup>, qui n'est actuellement que de 5 fois entre J0 et J7 et la maturation des MK qui n'est pas optimale, le DMS étant encore peu développé et la ploïdie faible. Améliorer ces étapes nécessite une compréhension fine des mécanismes qui gouvernent la différenciation et la maturation des MK à partir des progéniteurs hématopoïétiques.

Dans ce but, le premier objectif que j'ai poursuivi a été l'étude des mécanismes dépendants de l'AHR, qui permettent l'émergence de la population d'intérêt CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> en réponse à SR1. Devant l'immaturation de la population CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> et l'analyse de la littérature, nous nous sommes focalisés sur le rôle du facteur de transcription IKAROS (IKZF1). En effet, il a été décrit comme exerçant un contrôle négatif sur la MKP en dérégulant l'expression de certains facteurs de transcription comme GATA-1 (Malinge, Thiollier et al. 2013) et a été montré comme un partenaire de l'AHR. J'ai donc étudié son rôle en réponse à SR1 dans l'émergence de la population CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> à l'aide d'outils pharmacologiques, de techniques d'extinction de gènes, d'analyses de transcrits, de cytométrie en flux et de microscopie confocale.

Le second objectif qui m'a été confié a été l'étude morphologique et fonctionnelle des plaquettes de culture. L'analyse morphologique a été réalisée par microscopie optique et électronique à transmission. Enfin, l'analyse fonctionnelle a été réalisée *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, en analysant i) la capacité des plaquettes à agréger en réponse à différents agonistes, grâce aux tests de turbidimétrie (voir paragraphe IV. B. 3. Validation des plaquettes *in vitro*) et ii) la capacité de la GPIIb-IIIa à changer de conformation pour lier le fibrinogène par cytométrie en flux. Les études *in vivo* ont été réalisées dans des souris immunodéficientes de type NSG, prétraitées au clodronate. Nous avons i) analysé la capacité des plaquettes de culture à recirculer après transfusion et ii) évalué leurs capacités hémostatiques.

Le troisième objectif que je ne pourrai pas développer pleinement pour des raisons de confidentialité a été de participer à la montée en échelle de la production de plaquettes, la mise en adéquation avec les normes BPF et le transfert de notre technologie de production des plaquettes de culture sur la plateforme de Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) de Besançon, suite à l'obtention du statut de MTI qu'ont obtenu les plaquettes de culture pour réaliser cette preuve de concept.

*Montée en échelle.* Pour développer cet aspect, j'ai utilisé différents contenants allant de boîtes de culture de différentes surfaces à l'utilisation de poches de différents volumes. Il m'a fallu trouver les meilleures conditions de culture qui combinaient à la fois la conservation du rendement de 150 plaquettes/CD34 et la fonctionnalité des plaquettes.

*Mise aux normes BPF.* Pour que le système de production réponde aux normes BPF je me suis servi de mes connaissances acquises lors de mes études de pharmacie et j'ai interagi avec différents acteurs de la transfusion de notre établissement et notamment le service de préparation dirigé par H. Isola. Pour ne pas rompre la stérilité, j'ai rendu le système « clos », c'est-à-dire que de l'obtention des cellules CD34+ à la libération des plaquettes, il n'y a jamais de contact avec l'air ambiant. Pour cela j'ai dû adapter i) des systèmes de reconstitution et de transfert des milieux, ii) les étapes de centrifugation et de concentration des cellules et iii) les contenants réceptionnant les plaquettes de culture.

*Transfert sur la plateforme MTI.* Pour réaliser le transfert de notre technologie, je me suis rendu plusieurs fois sur la plateforme MTI de Besançon pour permettre aux équipes de la plateforme d'appréhender au mieux le procédé et la qualification des différentes étapes.

Enfin, lors de ma thèse, j'ai eu la chance de participer au développement d'un dispositif de libération des plaquettes en collaboration avec Yannick Knapp, un enseignant chercheur en mécanique des fluides, de l'université d'Aix Marseille Avignon, que nous avons breveté (brevet déposé en 2019 FR 1911303). J'ai ainsi pu participer activement aux différentes phases du développement de ce dispositif allant de sa conception en laboratoire à sa production industrielle par la société Saint-Gobain.

## Résultats expérimentaux

---

- A. L'interaction entre AHR et IKAROS, une nouvelle voie pharmacologique non canonique de AHR, essentielle à la production de plaquettes *in vitro*

**Publication n° 1 :**

**AHR:IKAROS interaction promotes platelet biogenesis by inhibiting AHR transcriptional activity in response to SR1**

Do Sacramento V\*<sup>1</sup>, Mallo L\*<sup>1</sup>, Gachet C<sup>1</sup>, Chan S<sup>2</sup>, Lanza F<sup>1</sup>, de La Salle H<sup>1</sup> and Strassel C<sup>1</sup>.

\*Both authors contributed equally to this study and were considered as co-first authors

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, INSERM, EFS-Grand Est, BPPS UMR\_S1225, FMTS, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR 7104, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France.

- B. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des plaquettes produites *in vitro*

**Publication 2 :**

**Functional properties of human platelets derived *in vitro* from CD34<sup>+</sup> cells**

Do Sacramento V, Mallo L, Freund M, Eckly A, Hechler B, Mangin P, Lanza F, Gachet C, Strassel C

Université de Strasbourg, INSERM, EFS-Grand Est, BPPS UMR\_S1225, FMTS, F-67000 Strasbourg, France

## A. L'interaction entre AHR et IKAROS, une nouvelle voie pharmacologique non canonique de AHR, essentielle à la production de plaquette *in vitro*

### Introduction

La compréhension d mécanismes moléculaires et cellulaires qui gouvernent les différentes étapes de la MKP est essentielle pour pouvoir produire à terme des plaquettes de culture. Les laboratoires qui développent des plaquettes de culture semblent tous aujourd'hui stagner à un chiffre de 100 à 200 plaquettes libérées par MK alors que les MK *in situ* sont théoriquement capables de générer 1000 à 3000 plaquettes/MK (Strassel, Brouard et al. 2016, Strassel, Gachet et al. 2018). Des améliorations aussi bien cognitives que technologiques doivent encore être réalisées pour espérer faire un jour des plaquettes de culture un substitut transfusionnel.

Lors de l'optimisation des différentes phases de culture, l'équipe a mis en évidence, que l'ajout de SR1 dans le milieu de culture, tout comme la co-culture des cellules CD34<sup>+</sup> avec des cellules stromales mésenchymateuse (MSC) permettaient l'émergence de précurseurs mégacaryoblastiques (CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>) possédant un potentiel plaquettaire important, améliorant ainsi par trois le rendement de plaquettes produites *in vitro* (Strassel, Brouard et al. 2016). L'objectif du travail qui m'a été confié était de mettre en lumière les mécanismes mis en jeu dans l'émergence de la population CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> suite à la modulation de l'AHR par SR1.

Le travail a abouti à un manuscrit qui est en cours de préparation et que nous présentons ci-dessous en format de « lettre » que nous souhaitons soumettre à la revue Haematologica.

## Letter to the Editor (Haematologica)

Manuscrit en cours de préparation

### **AHR-IKAROS interaction promotes platelet biogenesis by inhibiting AHR transcriptional activity in response to SR1**

**L. Mallo\*<sup>1</sup>, V. Do Sacramento\*<sup>1</sup>, Christian Gachet<sup>1</sup>, Susan Chan<sup>2</sup>, François Lanza<sup>1</sup>, Henri de La Salle<sup>1</sup> and C. Strassel<sup>1</sup>**

\*Both authors contributed equally to this study and may be considered as co-first authors

**<sup>1</sup>Université de Strasbourg, INSERM, EFS-Grand Est, BPPS UMR\_S1225, FMTS, F-67000 Strasbourg, France**

<sup>2</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR 7104, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France.

#### **Correspondence to:**

Catherine Strassel, UMR\_S1255, EFS-Grand Est, site de Strasbourg, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg Cedex, France

Tel: (33) 388 21 25 25; Fax: (33) 388 21 25 21; E-mail: [catherine.strassel@efs.sante.fr](mailto:catherine.strassel@efs.sante.fr)

Blood platelets are efficiently generated *in vivo* from bone marrow megakaryocytes (MKs), where each MK produces 2000-3000 platelets. However, despite recent progress, platelet production is only reproduced with low efficiency under *in vitro* culture conditions. In view of the increasing demand for platelet concentrates free of infectious, inflammatory and immune risks, the production of cultured platelets is desirable but still needs to be greatly improved to yield a promising transfusion product (Strassel, Gachet et al. 2018). It is therefore of utmost importance to fully clarify the molecular and cellular mechanisms underlying platelet biogenesis.

Megakaryopoiesis is a hierarchised and complex process where haematopoietic stem cells (HSCs) differentiate to give rise to megakaryocytic progenitors, which further differentiate into mature MKs capable of extending cytoplasmic protrusions into the sinusoid vessels to release platelets under flow (Machlus and Italiano 2013). These successive cell fate decisions are under the coordination of an array of extrinsic factors – differentiation or growth factors, small metabolites and stromal mesenchymal cells (MSCs) – and intrinsic transcription factors (TFs) (Moreau, Evans et al. 2016; Dalby, Ballester-Beltran et al. 2018; Moreau, Evans et al. 2018). In a previous study, we reported that the aryl hydrocarbon receptor (AHR) antagonist stem regenin 1 (SR1) favours the expansion of a specific population of progenitors, phenotypically defined as CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> cells, which have an enhanced potential to generate mature MKs. This enabled us to obtain a yield of 150-200 platelets/MK (Strassel, Brouard et al. 2016). At this point in time, the AHR-dependent mechanisms involved in promoting this specific population nevertheless remain unresolved.

The observation that CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> cells harbour signs of an immature state, illustrated by their low DMS amplification and ploidy (Strassel, Brouard et al. 2016), raised the hypothesis that MK differentiation is downregulated at a transcriptional level

through SR1-modulated AHR. A number of haematopoietic TFs have been found to promote or favour MK progenitor differentiation, MK maturation and platelet formation, including GATA-1, friend of GATA-1 (FOG-1, ZFPM1), Fli-1, RUNX-1 and NF-E2 (Tijssen, Moreau et al. 2016). These TFs have also been described to promote the expression of megakaryocytic receptors (Moreau, Evans et al. 2016; Dalby, Ballester-Beltran et al. 2018; Moreau, Evans et al. 2018). In contrast, IKAROS (IKZF1), which belongs to a zing-finger protein family important for early lymphocyte development, has been shown to exert a repressor effect on MK differentiation and to restrain terminal MK maturation (Malinge, Thiollier et al. 2013; Liu, Li et al. 2018). This effect is thought to result from its interaction with a network of TFs and TF-associated proteins including GATA, NF-E2 and ZFPM1. Interestingly, it was recently observed that IKAROS negatively regulates the immune response of the gut by interacting with AHR. These findings suggested that IKZF1 could represent a molecular link in the expansion of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> cells in response to the AHR antagonist SR1 (Li, Heller et al. 2016).

To test this hypothesis, we first refined the phenotype of the CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> cells. Positivity for CD34, a marker of haematopoietic progenitors, coupled to low expression of CD41, a reliable marker of the early steps of megakaryopoiesis, led us to additionally include the tetraspanin CD9, a marker of mature MKs, as a possible differentiation criterion (Clay, Rubinstein et al. 2001). Flow cytometric analysis of CD9 expression within the CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> population allowed us to distinguish two subpopulations: CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>CD9<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>CD9<sup>-</sup> cells (**Fig. 1Ai**), representing 41.4±0.6% and 58.3±0.7% of the CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> cells, respectively (**Fig. 1Aii**). We then evaluated the capacities of these subpopulations to produce mature MKs and platelets upon culture in the presence of TPO and SR1 (**Fig. 1Bi**), as described previously by our group (Strassel, Brouard et al. 2016). Whereas less than 10% of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>CD9<sup>+</sup>



-derived MKs exhibited proplatelets, this proportion rose to more than 90% when MKs were derived from CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>CD9<sup>-</sup> cells (**Fig. 1Bii**) and was accompanied by a dramatic difference in platelet production between the two subpopulations ( $0.6\pm 0.1\times 10^6$ /well vs.  $1.85\pm 0.3\times 10^6$ /well, respectively) (**Fig. 1Biii**). The latter yield represented a slightly higher efficiency than that of the whole CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> population ( $1.39\pm 0.24\times 10^6$  platelets/well), suggesting a negative effect of the CD9<sup>+</sup> subset on the potential of the CD9<sup>-</sup> subset to support platelet production. Taking this newly defined CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>CD9<sup>-</sup> subpopulation as the population of interest (POI), we then investigated the role of IKAROS in its expansion. qRT-PCR analysis of the POI as compared to mature MKs (MMKs), phenotypically characterized as CD34<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>, revealed a reduced level of expression of a number of IKZF1 target genes (ZFPM2, CD9, PF4, GPIBA, GATA1, NFE2), in keeping with the hypothesis of a role of IKZF1 in the negative regulation of megakaryopoiesis (**Fig. S1**).

We next analysed IKZF1 expression in the POI by flow cytometry and observed a 4.5-fold higher expression as compared to MMKs ( $134.3\pm 5.9$  vs.  $29.3\pm 1.2$  MFI, respectively) (**Fig. 1Ci, ii**), pointing to a functional involvement of IKZF1 in the differentiation and expansion of the POI upon treatment with SR1. This hypothesis was evaluated using complementary gene silencing and pharmacological approaches. Firstly, IKZF1 was knocked down with a specific shRNA lentivirally transduced into CD34<sup>+</sup> cells. A 75% decrease in IKZF1 expression was reached on day 10 in the test cells as compared to cells transduced with a scrambled shRNA ( $17.4\pm 2.2\%$  vs.  $68.5\pm 20.2\%$  expression, respectively) (**Fig. 2A**), resulting in a 3-fold decrease in POI generation ( $12.5\pm 0.7\%$  vs.  $39.1\pm 2.1\%$ , respectively) (**Fig. 2B**). In a second approach, CD34<sup>+</sup> cells were treated with lenalidomide (LenaL), a chemical compound inducing rapid and effective degradation of IKZF1 (**Fig. S2**). Exposure of the cells to increasing

concentrations of Lenal in the presence of SR1 led to a gradual decrease in POI expansion, which reached a factor of 2 at 10  $\mu$ M as compared to control DMSO (16.1 $\pm$ 3.9% vs. 32.9 $\pm$ 2.5%, respectively) (**Fig. 2Ci**). Altogether, these results provided evidence for a functional implication of IKZF1 in the expansion of the POI and the ensuing increased platelet production in response to SR1 (1.52 $\pm$ 0.3 $\times$ 10<sup>5</sup>/well with SR1 vs. 4.1 $\pm$ 0.66 $\times$ 10<sup>4</sup>/well with SR1 and 1  $\mu$ M Lenal) (**Fig. 2Cii**).

To explore a possible molecular link between IKZF1 and AHR in POI expansion, we performed a proximity ligation assay (PLA), a fluorescence-based assay allowing the detection of protein-protein interaction on the basis of physical proximity, using specific antibodies against AHR and IKZF1 (Weibrecht, Leuchowius et al. 2010). As shown in **Fig. 2Di**, numerous positive signals were detected in the POI in response to SR1 as compared to very few positive signals in controls treated with DMSO (7.8 $\pm$ 1.0 vs. 1.9 $\pm$ 0.2 dots per cell, respectively) (**Fig. 2Dii**). These results strongly indicate the existence of a direct interaction between AHR and IKZF1 in response to SR1. This would suggest a mechanism whereby SR1, by preventing the interaction of AHR with its ARNT partner in the canonical pathway, which leads to downregulation of *CYP1B1* (Strassel, Brouard et al. 2016), favours the coupling of AHR to IKZF1 in an alternative pathway leading to downregulation of MK differentiation.

In previous work (Strassel, Brouard et al. 2016), we demonstrated that co-culture of MKs with MSCs also favoured the appearance of a CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> population through an AHR-dependent pathway, as shown by the repression of *CYP1B1*. We therefore investigated whether this effect was, like for SR1, dependent on an AHR-IKAROS interaction. Firstly, we established that CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> subpopulations could be detected in MSC co-cultures in proportions similar to those observed in SR1 cultures (52.8 $\pm$ 6.1% CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> cells vs. 44.7 $\pm$ 7.0%

CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> cells) (**Fig. 3A**). Secondly, we confirmed that IKZF1 was clearly better expressed in the POI (78.2±4.6% of the cells) than in MMKs (45.9±7.1% of the cells) (**Fig. 3**). Additionally, IKZF1 shRNA knock down resulted in markedly reduced amplification of the POI (8.4±0.6% in shIKZF1-treated cultures vs. 36.2±2.5% in shScramble-treated cultures) (**Fig. 3Ci,ii,iii**). Finally, as observed upon SR1 treatment, positive signals in a PLA indicated an AHR-IKAROS interaction in the POI derived from MSC co-cultures (3.7±0.4 dots/nucleus vs. 1.9±0.2 dots/nucleus in controls, N=81) (**Fig. 3D**). Altogether, these results support the hypothesis that MSCs, similarly to SR1, promote amplification of the POI by acting on an AHR pathway distinct from the canonical pathway which also involves an AHR-IKAROS interaction.

Our previous work highlighted the existence and expansion of a megakaryocyte progenitor with high platelet production capacity in response to an AHR antagonist. Repression of the target gene *CYP1B1* in response to SR1 and also after co-culture of CD34<sup>+</sup> cells with MSCs suggested that this could occur via the canonical pathway. The present study reveals a more likely mechanism through an alternative pathway involving an interaction between AHR and IKZF1. This is supported by the following observations: i) increased IKZF1 expression in the POI, ii) prevention of generation of the POI by downregulation or degradation of IKZF1, iii) demonstration of a physical interaction between AHR and IKZF1 and iv) negative regulation of megakaryocytic TFs. These data, in addition to revealing a new mechanism regulating megakaryopoiesis, are consistent with and complement previous reports on the role of IKAROS in MK differentiation and maturation (Malinge, Thiollier et al. 2013; Liu, Li et al. 2018) and AHR-IKAROS interactions in ILC3 cells (Li, Heller et al. 2016). This work opens up the possibility of genetic or pharmacological intervention in this alternative pathway to improve our ability to produce cultured platelets at more acceptable costs.

## References

Clay, D., E. Rubinstein, Z. Mishal, A. Anjo, M. Prenant, C. Jasmin, C. Boucheix and M. C. Le Bousse-Kerdiles (2001). "CD9 and megakaryocyte differentiation." Blood **97**(7): 1982-1989.

Dalby, A., J. Ballester-Beltran, C. Lincetto, A. Mueller, N. Foad, A. Evans, J. Baye, E. Turro, T. Moreau, M. R. Tijssen and C. Ghevaert (2018). "Transcription Factor Levels after Forward Programming of Human Pluripotent Stem Cells with GATA1, FLI1, and TAL1 Determine Megakaryocyte versus Erythroid Cell Fate Decision." Stem Cell Reports **11**(6): 1462-1478.

Li, S., J. J. Heller, J. W. Bostick, A. Lee, H. Schjerven, P. Kastner, S. Chan, Z. E. Chen and L. Zhou (2016). "Ikaros Inhibits Group 3 Innate Lymphoid Cell Development and Function by Suppressing the Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway." Immunity **45**(1): 185-197.

Liu, A., S. Li, V. Donnenberg, J. Fu, S. M. Gollin, H. Ma, C. Lu, D. B. Stolz, M. Y. Mapara, S. A. Monaghan and S. Lentzsch (2018). "Immunomodulatory drugs downregulate IKZF1 leading to expansion of hematopoietic progenitors with concomitant block of megakaryocytic maturation." Haematologica **103**(10): 1688.

Machlus, K. R. and J. E. Italiano, Jr. (2013). "The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation." J Cell Biol **201**(6): 785-796.

Malinge, S., C. Thiollier, T. M. Chlon, L. C. Doré, L. Diebold, O. Bluteau, V. Mabialah, W. Vainchenker, P. Dessen, S. Winandy, T. Mercher and J. D. Crispino (2013). "Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling." Blood **121**(13): 2440-2451.

Moreau, T., A. L. Evans and C. J. G. Ghevaert (2018). "Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Megakaryocytes by Transcription Factor-Driven Forward Programming." Methods Mol Biol **1812**: 155-176.

Moreau, T., A. L. Evans, L. Vasquez, M. R. Tijssen, Y. Yan, M. W. Trotter, D. Howard, M. Colzani, M. Arumugam, W. H. Wu, A. Dalby, R. Lampela, G. Bouet, C. M. Hobbs, D. C. Pask, H. Payne, T. Ponomaryov, A. Brill, N. Soranzo, W. H. Ouwehand, R. A. Pedersen and C. Ghevaert (2016). "Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming." Nat Commun **7**: 11208.

Strassel, C., N. Brouard, L. Mallo, N. Receveur, P. Mangin, A. Eckly, I. Bieche, K. Tarte, C. Gachet and F. Lanza (2016). "Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets." Blood **127**(18): 2231-2240.

Strassel, C., C. Gachet and F. Lanza (2018). "On the way to in vitro platelet production." Transfusion Clinique et Biologique **25**(3): 220-227.

Tijssen, M. R., T. Moreau and C. Ghevaert (2016). Transcriptional Regulation of Platelet Formation: Harnessing the Complexity for Efficient Platelet Production In Vitro. Molecular and Cellular Biology of Platelet Formation: Implications in Health and Disease. H. Schulze and J. Italiano. Cham, Springer International Publishing: 23-60.

Weibrecht, I., K. J. Leuchowius, C. M. Clausson, T. Conze, M. Jarvius, W. M. Howell, M. Kamali-Moghaddam and O. Soderberg (2010). "Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox." Expert Rev Proteomics 7(3): 401-409.

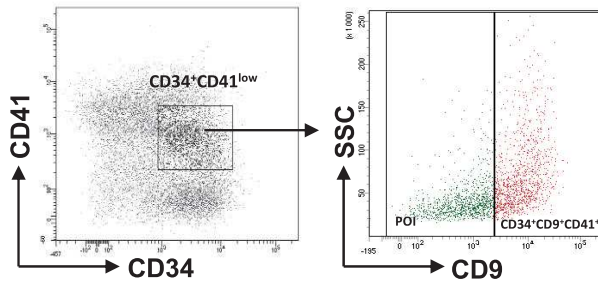
### **Authorship**

Contributions: C.S, H.LS and F.L conceived and designed the experiments, L.M and V.DS performed the experiments, C.S, L.M and V.DS analyzed the data, C.S, L.M, V.DS, H.LS and F.L discussed the techniques and results, C.S supervised the work and C.S, H.LS and F.L wrote the paper.

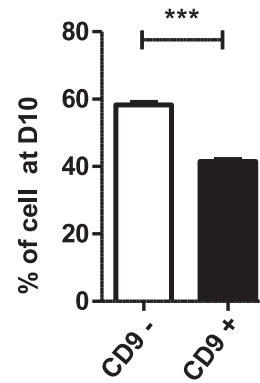
Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Figure 1

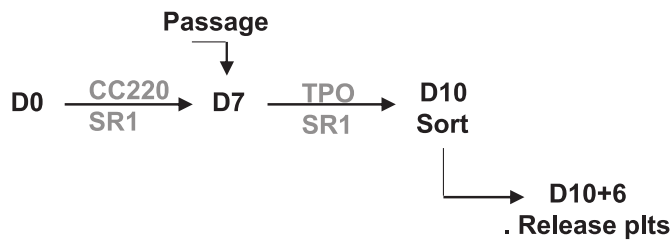
A i



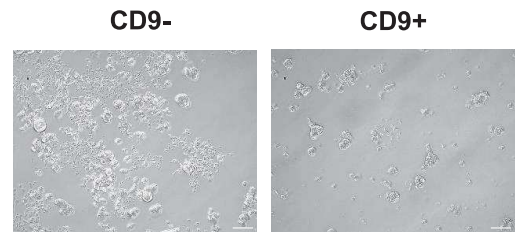
ii



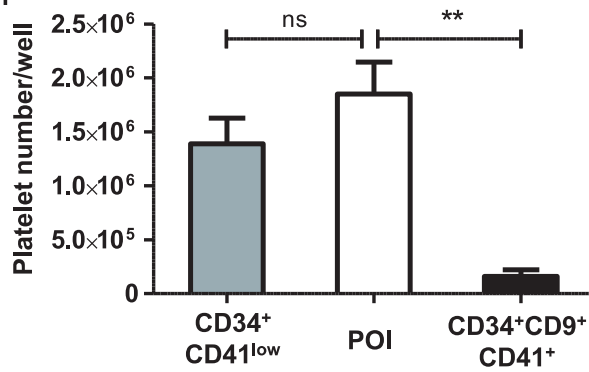
B i



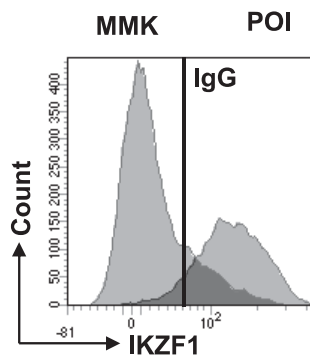
ii



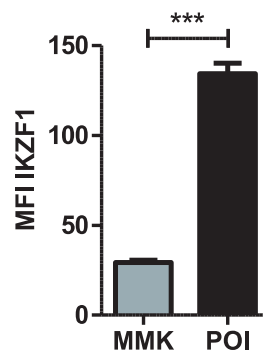
iii



C i



ii



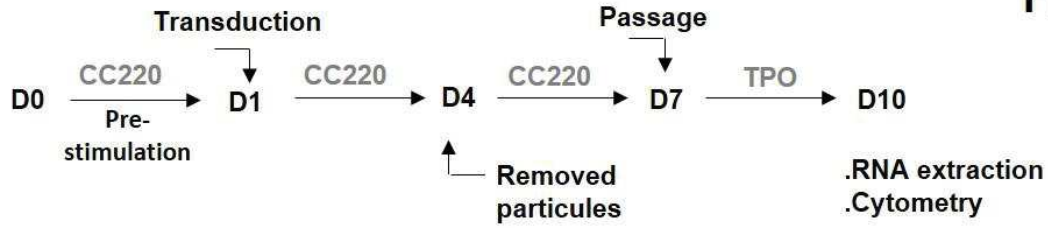
## Figure 1

### Figure legends

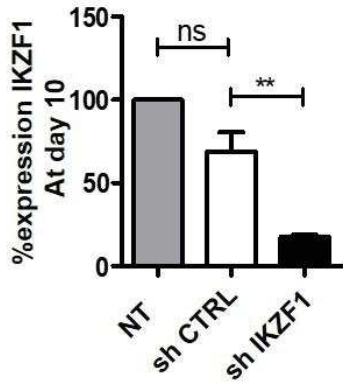
#### SR1-derived POI expresses Ikaros

- A) Refining the CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> cells phenotype as CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup>.** i. Expression of CD34 and CD41 markers at day 10 in SR1 culture conditions (left). Flow cytometric analysis of side scatter and CD9 in CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> cells identifying 2 subpopulations based on CD9 expression (right). ii) analysis of the percentage of CD9<sup>+</sup> and CD9<sup>-</sup> subpopulations in CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> cells ( $41.4 \pm 0.6$  CD9<sup>+</sup> vs  $58.3 \pm 0.7$  CD9<sup>-</sup>). (mean $\pm$ SEM, N=5, \*\*\*p<0.001, Student *t* test)
- B) Analysis of the capacity of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> to produce proplatelets and platelets** i) Culture protocol of CD34<sup>+</sup> cells and flow sorting. CD34<sup>+</sup> cells cultured for 10 days in the presence of SR1 were sorted according to their phenotype (CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup>, CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup>) using a FACS Aria II flow cytometer and then cultured for 6 days in a medium containing TPO with SR1 (left panel). ii) *Representative differential interference contrast (DIC) microscopy photographs of a culture well at day 10+6 following cell sorting.* Scale bar, 50  $\mu$ m (right panel). iii) *Number of platelets produced per well.* The cell suspension was subjected to multiple pipetting on day 10+6 of culture, and platelets were detected and counted by flow cytometry ( $1.39 \pm 0.24 \times 10^6$  plts/well for CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> vs  $1.85 \pm 0.29 \times 10^6$  plts/well for POI vs  $60 \pm 0.60 \times 10^5$  plts/well for CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup>) (mean $\pm$ SEM of 3 experiments; \*\*P< 0.01, ns p>0.5, 1 way ANOVA and a Dunnett post test). CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> cells able to produce platelets are called population of interest (POI).
- C) Analysis of Ikaros expression** i) Flow cytometric analysis of Ikaros (IKZF1) expression in POI (CD34<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>) compared to CD34<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>, mature MK (MMK). ii) *Analysis of mean fluorescence intensity of IKZF1 in POI vs MMK.* IKZF1 expression is increased by 3 in POI relative to MMK ( $29.3 \pm 1.2$  IKZF1 MFI in MMK vs  $134.3 \pm 5.9$  IKZF1 MFI in POI) (mean $\pm$ SEM, n=3, \*\*\*p<0.001, Student *t* test).

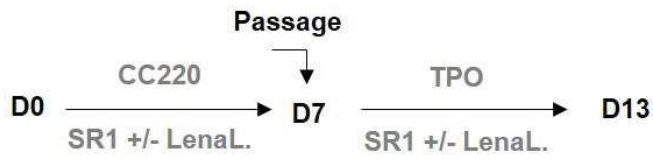
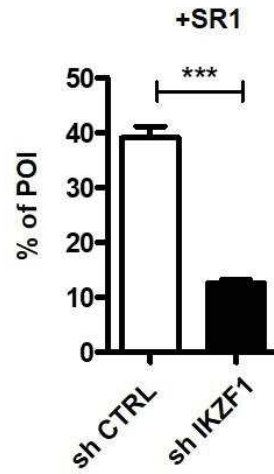
Figure 2



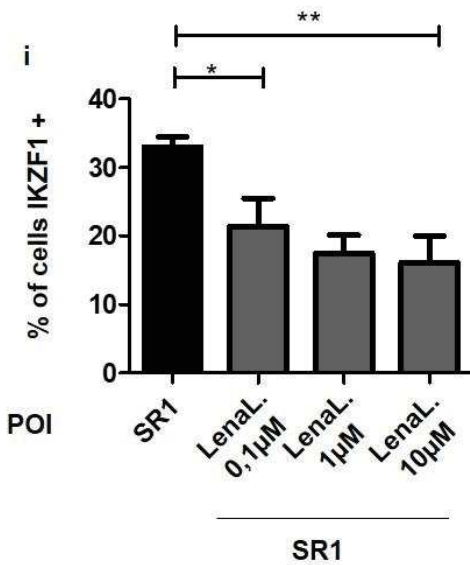
A



B



C



ii

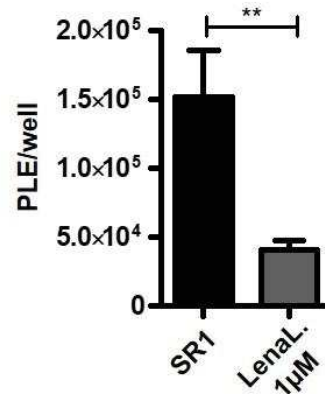
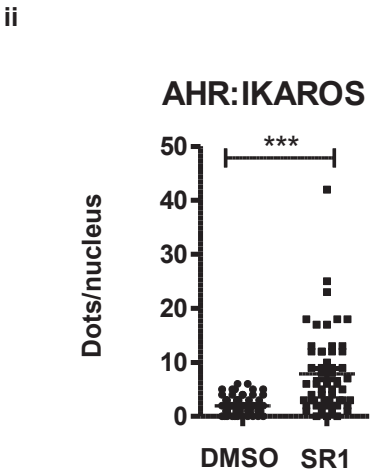
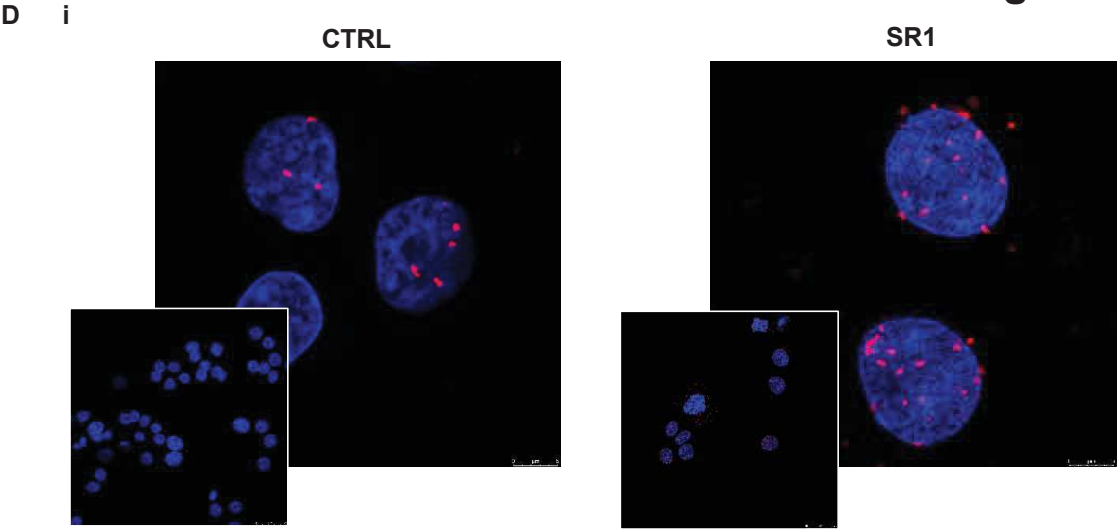




Figure 2

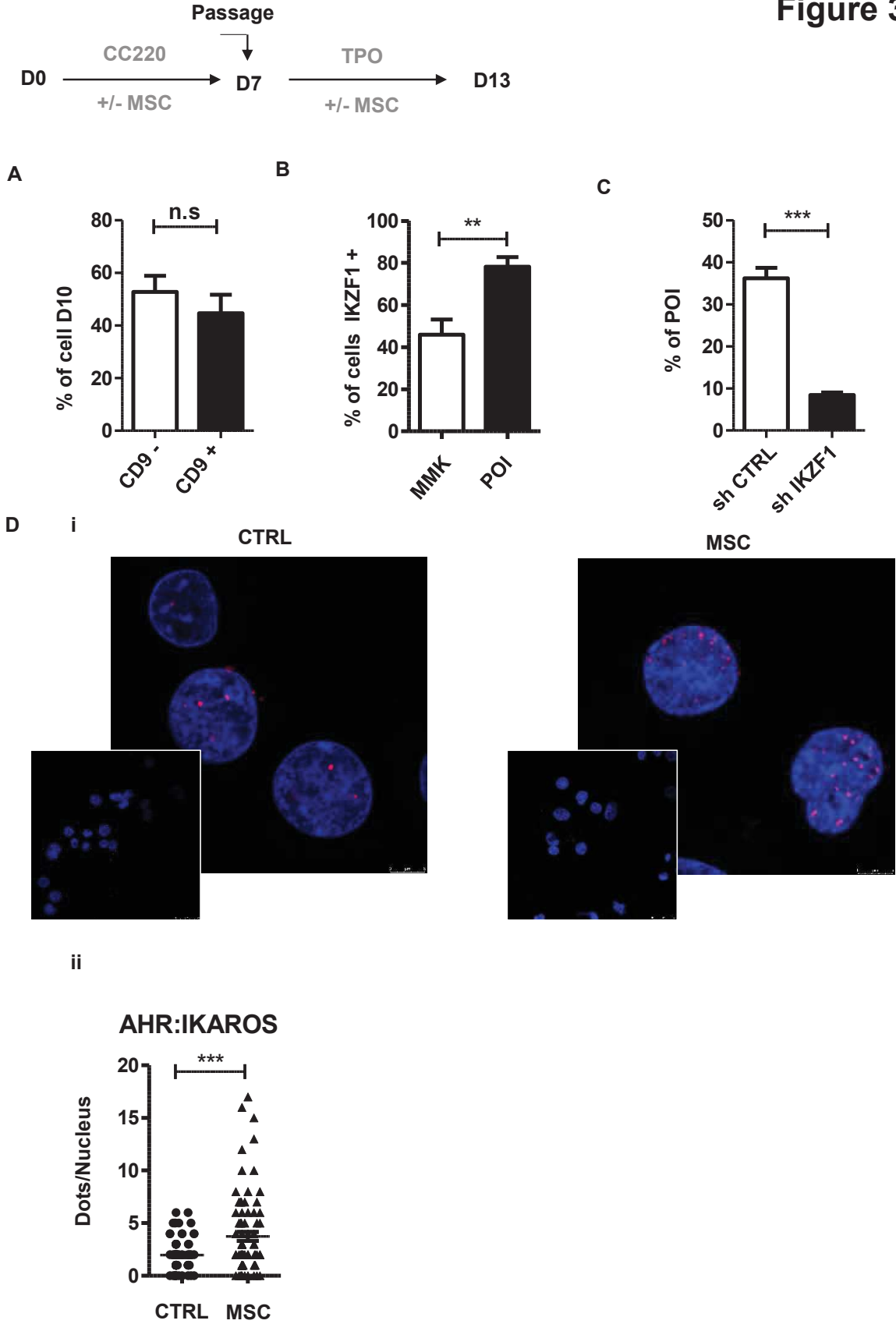


## Figure 2

### Ikaros: an actor of POI expansion.

- A) *Validation of shIKZF1*. CD34+ cells were prestimulated with CC220 cytokine cocktail for 24h and transduced with vectors expressing control GFP shControl or IKZF1-specific shRNA and differentiated into MK for 6 days in a serum free medium containing CC220 cytokine cocktail and SR1, at day 7 cells were washed and then cultured for 3 supplemental days with SR1 and TPO. At day 10, total RNA derived from sorted transduced expressing GFP was subjected to qRT-PCR. The bar graph represents the percentage of IKZF1 expression in cells at day 10 ( $68.7 \pm 11.9$  % with shControl vs  $17.4 \pm 1.4$  % with shIKZF1, the level of IKZF1 in NT cells has been arbitrary put at 100) (mean  $\pm$  SEM, N=3, \*\* $p < 0.01$ , ns  $> 0.5$ , 1 way ANOVA and Bonferroni post test)
- B) shIKZF1-derived POI expansion. Bar graph representing the % of POI-derived shIKZF1 or shControl transduced cells at day 10 ( $39.1 \pm 2.1$  % POI with shControl vs  $12.5 \pm 0.7$  % POI with shIKZF1) (mean  $\pm$  SEM, N=3, \*\*\* $p < 0.001$ , Student t test)
- C) Effect of Lenalidomid (LenaL) on POI expansion. CD34+ cells were cultured for 7 days in serum free medium in presence of SR1 and CC220 cytokine cocktail. At day 7, cells were washed and cultured for 3 supplemental days with TPO and SR1. LenaL was added at increasing concentrations (0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M and 10 $\mu$ M) at day 0 and again at day 7. i) Bar graphs representing IKZF1 derived POI positive cells ( $21.4 \pm 4.1$  with LenaL 0.1 $\mu$ M vs  $17.5 \pm 2.6$  with LenaL 1 $\mu$ M  $16.1 \pm 3.9$  % POI with LenaL 10 $\mu$ M) (mean $\pm$ SEM of 3 experiments; \* $p < 0.5$ , \*\* $p < 0.1$ , 1 way ANOVA and a Dunnett post test). ii)
- D) i) Representative images of the interaction between IKZF1 and AhR in cells at day 10 examined by proximity ligation assay (PLA), where the interaction is visualized by red dots. ii) Dot plots representing the number of positive signals/nucleus in POI obtained in response to SR1 or in DMSO conditions. Positive signals were counted on 8 images 50 cells ( $7.8 \pm 1.0$  signals per POI with SR1 compared to  $1.9 \pm 0.2$  signals in the control DMSO) (mean  $\pm$  SEM, N=2, \*\*\* $p < 0.001$ , Student t test)

Figure 3



## Figure 3

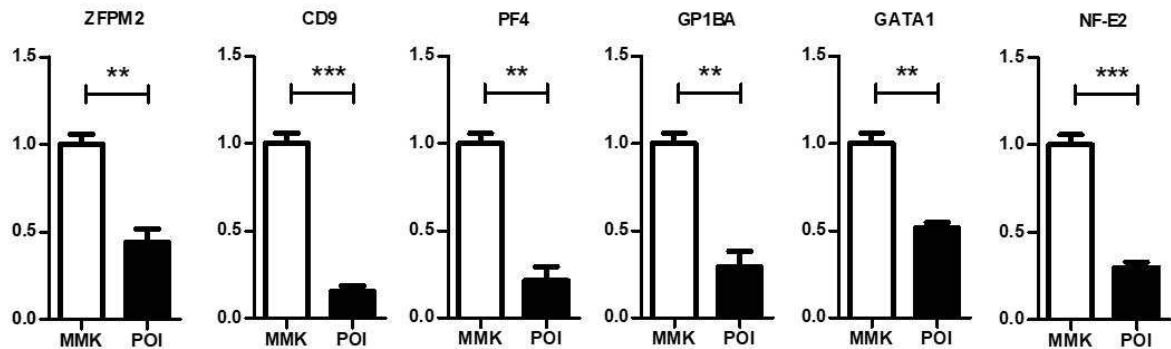
### **The AhR-Ikaros interaction is involved in MSC-triggered POI amplification.**

Peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells were cultured in the absence or presence of monolayer of MSC in serum free medium containing a CC220 cytokine cocktail from day 0 to 7 and with TPO from day 7 to 10.

- A) Bar graphs representing the percentage of CD9<sup>+</sup> and CD9<sup>-</sup> subpopulations within the CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> population obtained at day 10 and analysed by flow cytometry (52.8 ± 6.1 % of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> cells vs 44.7 ± 7.0 % of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> cells) (mean ± SEM, N=3, ns>0,5%, Student *t* test)
- B) Bar graphs representing the percentage of IKZF1 expression in MSC-derived POI or MSC-derived MMK (78.2 ± 4.6 % cells + in POI vs 45.9 ± 7.1 % cells + in MMK) (mean ± SEM, N=3, \*\*p<0,01%, Student *t* test)
- C) Bar graphs representing the percentage of MSC-derived POI obtained following CD34<sup>+</sup> cells transduction with shIKZF1 or shControl (8,4± 0,6% of sh IKZF1-derived POI vs 36.2 ± 2.5% of sh ctrl-derived POI) (mean ± SEM, N=3, \*\*\*p<0,001%, Student *t* test)
- D) Representative images of interaction between AhR and IKZF1 analyzed by PLA in MSC-derived POI and in control POI without MSC. **E)** Dot plots representing the number of positive signals/nucleus in POI obtained in response to CTRL or in MSC conditions. Positive signals were counted on 10 images 50 cells (1.9 ± 0.2 signals in the control vs 3.7 ± 0.4 signals per POI with MSC) (mean ± SEM, N=2, \*\*\*p<0.001, Student *t* test)

Figure S.1

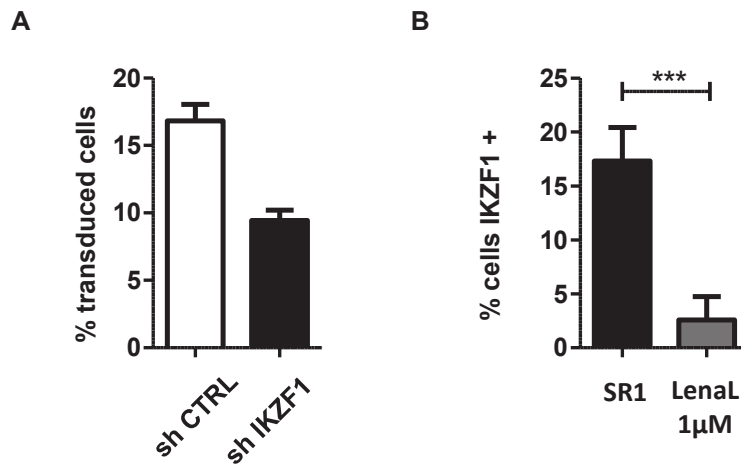
A



Analysis of TF expression in POI.

CD34<sup>+</sup> cells were cultured as in fig 1 for 10 days under control conditions or in the presence of SR1 (1  $\mu$ M). MMK (fig 3) or POI were sorted by flow cytometry cell sorting assay and mRNA was extracted, and the level of *megakaryocytic TF* transcripts were quantified by real-time polymerase chain reaction. The level of transcript were normalized in MMK at 1 and all TF explorer are under expressed ZFPM2  $0.44 \pm 0.07$ , CD9  $0.15 \pm 0.03$ , PF4  $0.21 \pm 0.08$ , GP1BA  $0.29 \pm 0.09$ , GATA1  $0.51 \pm 0.03$  and NF-E2  $0.3 \pm 0.03$  (mean  $\pm$  SEM, N=3, \*\*p<0.01, Student *t* test)

Figure S.2



- A) Bar graphs representing the percentage of transduced cells at day 10 and analysed by flow cytometry ( $16.8 \pm 1.2$  with shControl and  $9.4 \pm 0.7$  with shIKZF1, N=3).
- B) Bar graphs representing the percentage of cells expressing IKZF1 at day 10 in SR1 and LenaL condition ( $17.3 \pm 3.1$  in SR1 vs  $2.6 \pm 2.2$  with LenaL.) (mean  $\pm$  SEM, N=3, \*\*\* $p < 0.001$ , Student *t* test)

## Annexe

### Materials and Methods

#### MK differentiation in culture

Isolated human CD34<sup>+</sup> were allowed to proliferate and differentiate according to Strassel et al, 2016. *StemRegenin 1 (SR1)* (Stemcell Technologies) was used at 1 $\mu$ M. For CD34<sup>+</sup> and MSC co-culture, cells were seeded on confluent layer of MSCs (Guilloton F et al blood 2012) at day 0 and day 7.

The inducer of IKAROS degradation lenalidomide (gift from Chan S. lab), were added in the culture between 0,1  $\mu$ M to 10 $\mu$ M at day 0 and 7.

#### Lentiviral short hairpin knockdown

*CD34<sup>+</sup> cells transduction.* CD34<sup>+</sup> cells were stimulated for 24 hours in Stemspan medium with StemSpan™ Megakaryocyte Expansion Supplement (Stemcell Technologies). Then, cells were thoroughly washed and seeded in wells coated with retronectin (Takara). Transduction was subsequently performed by adding lentiviral particles at 5 MOI for 72h. At day 7 and 10, following infection, cells were analyzed by flow cytometry.

#### Cell sorting and flow cytometry analysis

*Cell sorting.* Cell sorting was performed using an Aria III flow cytometer as previously described by Strassel et al, 2016. Antibodies are listed in supplemental Table I. The sorted CD34<sup>+</sup>41<sup>low</sup>CD9<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup>41<sup>low</sup>CD9<sup>+</sup> populations were seeded in Stemspan medium containing TPO 50 ng/ml, LDL 20  $\mu$ g/ml and SR1 1 $\mu$ M for 7 days.

*Flow cytometry analysis.* Flow cytometry analysis were performed using Fortessa X20 (Becton Dickinson), as previously described by Strassel et al, 2016.

For intracellular staining, cells were first labeled with surface antibodies, fixed, permeabilized using the Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and then, labeled with an anti-IKZF1 antibody or mouse IgG2a  $\kappa$ -647 (BioLegend).



*Platelet generation.* Culture-derived platelets were released following successive pipetting after addition of 0,5  $\mu$ M PGI<sub>2</sub> and 0,02 U/mL apyrase in the culture medium and analyzed as previously described (Strassel et al., 2016).

All samples were analyzed using a Fortessa X20 flow cytometer (Becton Dickinson).

### **Quantitative RT-PCR**

RNA extraction and cDNA synthesis were performed using RNeasy Mini Kit (Qiagen) and RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen), respectively, according to manufacturer's instructions. qPCR was performed using the RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen) on a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad). Relative transcript levels were calculated by the method of  $\Delta\Delta$ Ct with TBP like reference gene. Primers set for *TBP*, *CYP1B1*, *AHR*, *ARNT*, *ZFMP2*, *CD9*, *PF4*, *GP1bA*, *NF-E2*, *GATA1*, *HES6*, *NRARP*, *HES1*, *KIT*, *CDKN1A*, *RUNX1*, *MYB*, *NEDD9*, *MYB*, *TUBB1* and *TUBA4* were purchased from Genecopoeia.

### **DuoLink proximity ligation assay (PLA) analysis**

CD34<sup>+</sup>-derived megakaryocytes were harvested and cytopinned onto poly-L-lysine coated slides. Immobilized cells were then fixed and permeabilized. PLA was subsequently performed according to manufacturer's instructions using primary antibodies against Ikaros and AhR described in table SI). The interacting tandems AHR/IKAROS were visualized by fluorescence on a SP8 confocal microscope (Leica).

### **Ethics statement**

Human blood samples were obtained from voluntary donors recruited at the EFS-Grand Est blood transfusion center (Etablissement Français du Sang-Grand Est) where the research was performed. The donors gave their written informed consent that the samples could be used for research purposes.

### **Statistical analyses**

Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM and statistical comparisons were performed using an unpaired, two-tailed Student's t-test or one-way ANOVA followed by the Bonferoni post-hoc test (Prism, Graph-Pad Software Inc., San Diego, USA). P values of less than 0,05 were considered to be statistically significant.



## **Supplemental MM**

### **Extraction CD34+ cells**

*CD34*<sup>+</sup>-enriched cells from leukofilters (TACSI, Terumo BCT, Zaventem, Belgium) by magnetic-activated cell sorting (CD34 MicroBead Kit UltraPure, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Percentage of viable CD34<sup>+</sup> obtained ranged 97,87 % ( $\pm 0,29$ , n=13).

### **Culture of CD34+ cells**

*In the first phase*, the CD34<sup>+</sup> were seeded in 24-well plates at a density of  $4 \cdot 10^4$ /mL in StemSpan Serum-Free Expansion Medium (SFEM) supplemented with 20  $\mu$ g/mL human LDL, a cocktail of cytokines containing SCF, TPO, IL-6 and IL-9 and with 1  $\mu$ M SR1 (all from Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada). On day 7, the cells were harvested, washed and seeded at a density of  $5 \cdot 10^5$ /mL in StemSpan SFEM containing 1  $\mu$ M SR1, 50 ng/mL TPO and 20  $\mu$ g/mL human LDL and cultured for an additional 6 days.

### **Production of mesenchymal stromal cells**

Bone marrow (BM) aspirates were obtained from patients undergoing cardiac surgery after written

inform consent of the donor. BM mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient and seeded at 104 cells/cm<sup>2</sup> in  $\alpha$ -MEM (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% screened fetal calf

serum (FCS, Hyclone, Logan, UT), 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 1 ng/ml fibroblast growth factor 2 (Cellgenix, Freiburg, Germany)<sup>2</sup>. Adherent cells were replenished twice a week with

fresh culture medium until confluence (P0). MSC were then harvested using trypsin, and seeded at 500 cells/cm<sup>2</sup> until confluence (first passage, P1). MSC batches displayed similar cell morphology and

phenotype including a lack of CD45, CD14, CD34, and CD31 together with a strong expression of CD73,

CD90, and CD105. MSC were maintained in  $\alpha$ -MEM medium supplemented with 10% fetal bovine

serum (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and 1 ng/mL recombinant human FGF2.

## **Lentiviral short hairpin knockdown**

### **Vectors used**

shRNA constructs targeting the human AHR, ARNT, CYP1b1, IKZF1 and shRNA scrambles cloned into psi-LVRU6GP were obtained from GeneCopoeia (Rockville, USA). The plasmids pCG-H $\Delta$ 24 and pCG-F $\Delta$ 30 encoding for glycoprotein of measles virus envelope were kindly gift by Verhoeven E. ([Frecha C., et al., 2008](#)) and p8.91, an encapsidation plasmid lacking all accessory HIV-1 proteins (Vif, Vpr, Vpu and Nef) by A. Dubart-Kupferschmitt.

### **Lentivirus production**

Lentiviruses were produced by transient transfection of HEK293T cells in DMEM (Gibco).

Plasmids: pCG-H $\Delta$ 24 (5 $\mu$ g), pCG-F $\Delta$ 30 (5 $\mu$ g), p.8.91 (16 $\mu$ g), psi-LVRU6GP (AHR, ARNT, CYP1b1 or IKZF1) (16 $\mu$ g) are transfected with Lipofectamin (100  $\mu$ l) in Optimem medium (Life Technologies, Illkirch-Graffenstaden, France) into HEK293T cells. After 18h of transfection, the medium was replaced by Opti-MEM (Invitrogen). Two days later, viral supernatants were harvested and filtered. They are concentrated by ultracentrifugation and the resulting pellet was suspended in phosphate buffered saline (PBS) and frozen at  $-80$  °C in 25- $\mu$ L aliquots until use.

Infectious titers (in transduction units [TU]/ml) were determined by cytometer of target cells using serial dilutions of the supernatants added to HEK293T.

## Conclusion

Pour analyser le progéniteur  $CD34^+CD41^{low}$ , nous en avons tout d'abord affiné son phénotype, en utilisant un marqueur tardif de la MKP, le CD9 (Clay, Rubinstein et al. 2001). Il nous a permis de mettre en évidence au sein de la population  $CD34^+CD41^{low}$  deux populations distinctes, l'une  $CD34^+CD41^+CD9^+$  avec une faible capacité à produire des plaquettes et une autre population  $CD34^+CD41^+CD9^-$  qui possédait une capacité au moins similaire à celle de la population  $CD34^+CD41^{low}$ . Nous avons donc choisi pour le reste de l'étude cette population  $CD34^+CD41^+CD9^-$ , désignée comme population d'intérêt abrégée « POI ».

Différents acteurs sont impliqués dans l'engagement des cellules vers la voie mégacaryocytaire. Parmi eux, les facteurs de transcription jouent un rôle très important. Si certains sont connus pour favoriser la MKP (Tijssen, Moreau et al. 2016), d'autres sont identifiés comme des régulateurs négatifs, comme par exemple IKAROS (Malinge, Thiollier et al. 2013). La famille de facteurs de transcription IKAROS joue un rôle clé dans la différenciation lymphoïde (Heizmann, Kastner et al. 2018). Elle se compose de cinq membres (IKZF1, IKZF2, IKZF3, IKZF4, et IKZF5), mais dans les MK seules IKZF1 a été détecté par qRT-PCR. Des données de la littérature ont montré qu'IKZF1 régulait négativement l'engagement des CSH dans la MKP et la maturation des MKs en réprimant l'expression de GATA-1 (Malinge, Thiollier et al. 2013)(Tijssen, Moreau et al. 2016). D'autre part, une étude récente a également montré, dans des cellules de type ILC3 (Groupe 3 Innate Lymphoid Cell) de l'intestin, une interaction de l'AHR avec un partenaire jusqu'alors jamais décrit : IKZF1. Ce faisceau d'arguments nous a donc encouragé à analyser le rôle d'IKZF1 dans l'émergence et l'amplification de la POI en réponse à SR1.

Après analyse en cytométrie en flux, la POI est apparue positive pour IKZF1. L'utilisation d'un shRNA dirigé contre IKZF1 nous a également montré qu'une diminution drastique de l'expression d'IKZF1 s'accompagnait, en réponse à SR1, d'une diminution de l'expansion de la POI. Cette observation a été confirmée par l'utilisation d'un composé chimique, le lénalidomide, connu pour entraîner la dégradation d'IKZF1. En utilisant des doses croissantes de lénalidomide en présence de SR1, on a pu constater une forte diminution de l'amplification de la POI. L'ensemble de ces données nous a donc permis de proposer un rôle d'IKZF1 dans l'émergence et l'expansion de la POI. Renforçant cette conclusion nous avons démontré l'existence

d'une interaction direct entre IKZF1 et AHR dans les MK par la méthode de « proximity ligation assay). Cette méthode d'analyse est basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques, qui sont révélés par des anticorps secondaires conjugués à des oligonucléotides préalablement marqués par des fluorochromes. Si les deux protéines sont dans un environnement proche (moins de 40 nm), les oligonucléotides respectifs s'hybrident et forment un brin d'ADN amplifié par PCR analysable par microscopie de fluorescence (Weibrecht, Leuchowius et al. 2010). Même si la PLA ne permet pas une analyse quantitative stricte, nous avons observé, après analyse du signal dans le noyau, que cette interaction était amplifiée en présence de SR1. On a également montré que cette interaction avait également lieu dans un contexte plus physiologique lors de l'expansion de la POI lors d'une co-culture des cellules CD34<sup>+</sup> avec les MSC. En effet, dans la précédente étude du groupe, il avait été montré que les MSC mimaient l'effet de SR1, en favorisant l'amplification de la population CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> à fort pouvoir proplaquettaire tout en réprimant la transcription du gène cible de l'AHR, *CYP1B1* (Strassel, Brouard et al. 2016). Cette interaction entre IKZF1 et AHR dans la POI émergeant au contact des cellules MSC confirme donc l'hypothèse d'un signal « SR1-like » entre les MSC et les MK. La nature de ce signal n'est pour l'instant pas identifiée, mais des études transcriptomiques de la POI s'amplifiant sur les MSC sont planifiées dans ce but. Les résultats seront comparés à l'étude transcriptomique précédemment menée sur cette même population en réponse à SR1. En complément, une étude du surnageant issu de la co-culture entre les MSC et les MK est également envisagée, visant à identifier un nouveau ligand endogène de l'AHR. L'ensemble de ces approches devrait permettre d'identifier les acteurs impliqués dans la régulation de la différenciation des MK par les MSC, ce qui représenterait une avancée importante dans la compréhension du rôle du microenvironnement dans la MKP.

En conclusion, nous avons pu montrer, qu'en réponse à SR1, AHR et IKZF1 interagissaient pour promouvoir l'émergence de la POI. Cette étude apporte des arguments supplémentaires sur un rôle important de l'AHR dans la MKP, et plus globalement conforte l'existence d'une nouvelle voie alternative de l'AHR en interaction avec IKZF1. Cette étude suggère enfin que l'AHR agit comme un « modulateur fin » de la MKP, rôle que semble adopter l'AHR lorsqu'il emprunte des voies alternatives à la voie canonique.

La question qui se pose encore est de savoir comment l'AHR modulé par son interaction avec SR1 interagit avec IKZF1. Est-ce que ceci passe par une augmentation de l'affinité de l'AHR pour IKZF1 ? l'interaction entre AHR et son partenaire de la voie canonique ARNT est-elle empêchée ? La réponse à ces questions permettrait un meilleur ciblage par des composés en vue d'améliorer l'amplification de la POI et la production de plaquettes tout en diminuant les coûts de production.

Pour mieux comprendre les mécanismes mis en place, nous avons déjà réalisé un certain nombre d'expériences qui, ne permettant pas de donner de conclusions définitives, apportent malgré tout quelques éléments de compréhension :

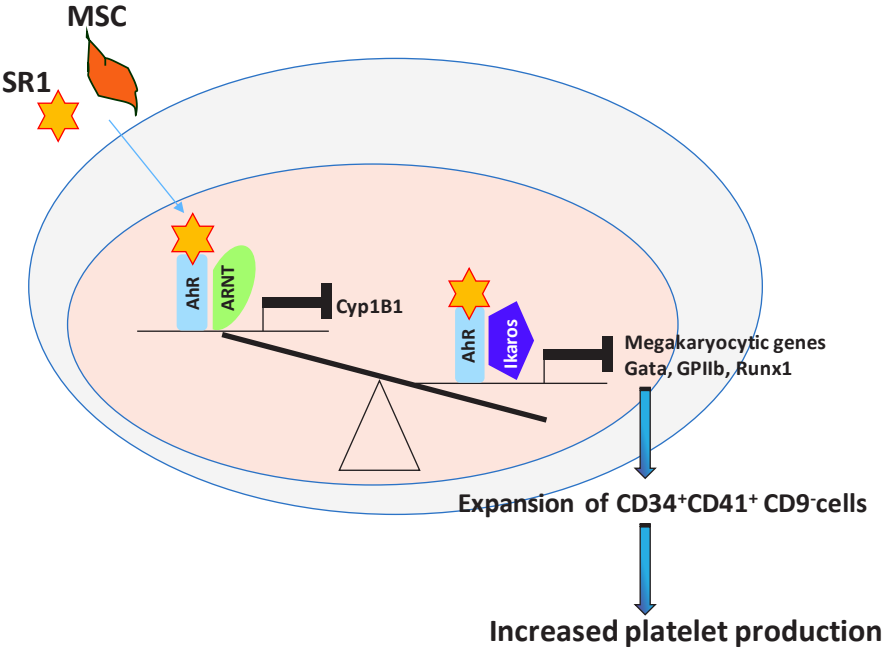
- i) Tout d'abord, en utilisant la technique de PLA, nous avons analysé l'interaction entre AHR et son partenaire principal l'ARNT. Sur les premières analyses, il semblerait que cette interaction soit moindre en présence de SR1 que dans la condition contrôle, ce qui permettrait d'expliquer la faible transcription de *CYP1B1* en réponse à SR1. Cependant, une seule expérience a été réalisée et ce résultat est à confirmer.
- ii) D'autre part, ce résultat suggère également que SR1 puisse déstabiliser l'interaction AHR : ARNT au profit de celle entre AHR et IKZF1, comme cela a déjà été démontré par le groupe qui a identifié l'interaction AHR : IKZF1 (Li, Heller et al. 2016). Une donnée que nous avons et qui pourrait aller dans ce sens, sans le démontrer formellement, est la diminution de l'expansion de la POI suite à la transduction des cellules CD34+ par un shRNA dirigé contre l'ARNT. En effet, on observe dans ces conditions l'émergence de 1.5 fois plus de POI issue de cellules CD34+ transduites avec le shRNA ARNT que dans celles issues des CD34+ transduites avec le shRNA contrôle. Ce résultat suggérerait donc que l'ARNT se présente comme un régulateur négatif de l'émergence de la POI.
- iii) Des expériences de co-immunoprécipitation AHR:IKZF1 ou AHR:ARNT dans différentes situations : en présence de SR1 ou d'agonistes de l'AHR comme la TCDD ou FICZ qui amplifient la transcription de *CYP1B1* ou dans des conditions de transduction avec les shARNT ou shIKZF1, permettraient de confirmer l'interaction AHR :IKZF1 et de donner un aspect quantitatif à ces

interactions. On pourrait ainsi savoir si en présence de SR1, l'interaction AHR:ARNT est réellement déstabilisée au profit de l'interaction AHR:IKZF1. Ces expériences sont cependant difficiles à conduire dans des cultures de cellules primaires. D'une part ces agonistes induisent une toxicité forte des cellules et les immunoprécipitations de partenaires nucléaires nécessitent une quantité importante de matériel que l'on ne peut aisément obtenir avec des cellules primaires. De telles expériences nécessiteraient donc de passer par un système de lignées de cellules de type HEK, des cellules de reins embryonnaires humaines, préalablement transfectées avec les différents acteurs. Ces expériences seraient clés pour affiner le mécanisme responsable de l'interaction de l'AHR avec IKZF1 et déterminer le rôle réel de cette même interaction dans l'expansion de la POI.

- iv) Enfin, une autre manière d'appréhender l'étude de ces mécanismes serait de réaliser, à l'instar d'autres études dans le domaine (Liu, Li et al. 2018), des expériences de surexpression des partenaires ARNT, AHR et IKZF1 dans des systèmes de lignées et/ou dans les MK et d'en analyser la répercussion sur l'émergence de la POI, son amplification et sa capacité à produire des plaquettes.

En conclusion, nous avons pu montrer qu'en réponse à SR1 ou à la co-culture sur MSC, l'AHR et IKZF1 interagissaient pour promouvoir l'émergence de la POI et ce en diminuant l'activité transcriptionnelle de l'AHR. Ce travail représente une avancée des connaissances dans le mode d'action de l'AHR une voie nouvelle de signalisation dans la MKP. Il ouvre des perspectives intéressantes au niveau fondamental dans la compréhension des mécanismes de la MKP et également pour l'amélioration de la production de plaquettes de culture.

Graphical abstract



## B. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des plaquettes produites *in vitro*

### **Introduction**

Un prérequis à la preuve de concept que l'équipe souhaite mener est de vérifier la qualité des plaquettes produites tant sur un plan morphologique que fonctionnel. En effet, pour que les autorités de santé donnent leur autorisation à procéder à l'essai clinique, il est nécessaire de démontrer qu'en plus de la mise en adéquation avec les normes relatives aux MTI, les plaquettes de culture soient comparables d'un point de vue morphologique et fonctionnel aux plaquettes circulantes (Sim, Poncz et al. 2016).



OPEN

# Functional properties of human platelets derived *in vitro* from CD34<sup>+</sup> cells

 V. Do Sacramento, L. Mallo, M. Freund, A. Eckly, B. Hechler, P. Mangin, F. Lanza, C. Gachet  & C. Strassel\*

The *in vitro* production of blood platelets for transfusion purposes is an important goal in the context of a sustained demand for controlled products free of infectious, immune and inflammatory risks. The aim of this study was to characterize human platelets derived from CD34<sup>+</sup> progenitors and to evaluate their hemostatic properties. These cultured platelets exhibited a typical discoid morphology despite an enlarged size and expressed normal levels of the major surface glycoproteins. They aggregated in response to ADP and a thrombin receptor agonist peptide (TRAP). After infusion into NSG mice, cultured and native platelets circulated with a similar 24 h half-life. Notably, the level of circulating cultured platelets remained constant during the first two hours following infusion. During this period of time their size decreased to reach normal values, probably due to their remodeling in the pulmonary circulation, as evidenced by the presence of numerous twisted platelet elements in the lungs. Finally, cultured platelets were capable of limiting blood loss in a bleeding assay performed in thrombocytopenic mice. In conclusion, we show here that cultured platelets derived from human CD34<sup>+</sup> cells display the properties required for use in transfusion, opening the way to clinical trials.

Although the *in vitro* production of transfusion grade human platelets is a goal pursued by several laboratories worldwide, a number of obstacles still remain to be surmounted before we may consider these platelets as a real transfusion alternative. The reported low yields of 50–200 platelets per megakaryocyte (MK) and expected high production costs cast doubts on the prospect of transfusing cultured platelets on a large scale. A reasonable application might nevertheless be envisaged for well-identified needs, as in cases of transfusion failure due to platelet alloimmunization or the development of refractoriness<sup>1,2</sup>.

In this objective, efforts to improve different aspects of *in vitro* platelet production are well warranted. These include the selection of optimal progenitors to achieve adequate cell expansion without hampering differentiation<sup>3,4</sup>, the optimization of culture procedures to reach the highest possible level of MK maturation closely matching that observed in the bone marrow and a major improvement in the platelet release of these mature MK by mimicking native flow and environmental conditions<sup>5–9</sup>. Recently, a significant step forward was accomplished by the group of K. Eto, who reported the production of large numbers of platelets from iPSC-derived immortalized MK in a bioreactor with turbulent flow<sup>10</sup>.

In previous work, we observed that culture of CD34<sup>+</sup> cells in the presence of SR1 led to the emergence of a CD34<sup>+</sup>CD41<sup>low</sup> population with an increased capacity to generate platelet-like elements<sup>11</sup>. The aim of the present study was to determine whether these cultured platelets met the requirements for transfusion. In particular, we explored their capacity to recirculate and to ensure a hemostatic protection equivalent to that of donor-derived platelets.

## Materials and Methods

**MK differentiation in culture.** CD34<sup>+</sup>-enriched cells from leukofilters (TACSI, Terumo BCT, Zaventem, Belgium) were expanded using a previously described two-phase optimized protocol<sup>11</sup>. Briefly, the filter extract was enriched in CD34<sup>+</sup> cells by magnetic activated cell sorting (CD34 MicroBead Kit UltraPure, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The cells were then seeded in StemSpan serum-free expansion medium (SFEM) supplemented with 20 µg/mL human low-density lipoprotein and a cocktail of cytokines (CC220, Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and with 1 µM SR1 (Stemcell Technologies). On day 7, the cells were

Université de Strasbourg, INSERM, EFS-Grand Est, BPPS UMR\_S1225, FMST, F-67000, Strasbourg, France. \*email: [catherine.strassel@efs.sante.fr](mailto:catherine.strassel@efs.sante.fr)

## Résultats expérimentaux

harvested, washed, seeded in StemSpan SFEM containing 1  $\mu\text{M}$  SR1, 50 ng/mL TPO and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  human low-density lipoprotein and cultured for an additional 6 days. The cultures were incubated at 37 °C under normoxic conditions and a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere.

**Platelet isolation.** Cultured Platelets were harvested after addition of 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{PGI}_2$  and 0.02 U/mL apyrase to the culture plates followed by successive pipetting. The platelet-like particles were then centrifuged and resuspended in Tyrode's albumin buffer as previously described<sup>11</sup>.

**Platelet ultrastructure and morphology.** *Transmission electron microscopy.* Cultured platelets or native platelets were fixed in 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a JEol 2100-plus (Jeol, Japan)<sup>12</sup>.

*Confocal microscopy.* After fixation in paraformaldehyde, platelets were cytospun, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated sequentially for 30 min with an anti- $\beta$ 1-tubulin mAb (1:400, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Eurogentec, Liège, Belgium) followed by a secondary GAM-488 antibody (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and an anti-GPIIb/IIIa mAb (Alma.17-647, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in PBS containing 1% BSA. The cells were then embedded in Mowiol (Mountant, Permafluor, Thermo Fisher Scientific, UK) and examined under a confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) equipped with an oil objective (Type F immersion liquid,  $n_{e^{23}} = 1,5180$ ,  $v_e = 46$ , Leica Microsystems). Data were acquired with LASAF software, version 1.62 (Leica Microsystems). Mouse lungs were embedded in a cryogenic gel and serial longitudinal cryosections were stained and observed as previously reported<sup>13</sup>.

**In vitro platelet studies.** *Platelet aggregation.* Aggregation was measured at 37 °C by a standard turbidimetric method in an APACT 4004 aggregometer (ELITech Group, Puteaux, France)<sup>14</sup>. Briefly, a 135  $\mu\text{L}$  aliquot of platelet suspension containing  $20 \cdot 10^6$ . Cultured platelets or Native platelets was stirred at 1,100 rpm and activated by addition of 5  $\mu\text{M}$  ADP in the presence of human fibrinogen (0.05 mg/mL), 10  $\mu\text{M}$  TRAP or 0.1 U/mL thrombin, in a final volume of 150  $\mu\text{L}$ . The extent of aggregation was estimated with APACT LPC software.

*RNA content and GP expression.* Thiazol orange labeling of RNA and surface expression of the major platelet glycoproteins (GP) were analyzed by flow cytometry as previously described<sup>15,16</sup>.

**In vivo functionality and hemostatic properties.** *Recirculation after infusion.* Aliquots containing  $1 \cdot 10^8$  washed human Cultured or Native platelets were injected through the retro-orbital vein into macrophage-depleted (by clodronate liposome abdominal injection on day -1), 7 to 8 week-old female NSG (NOD.Cg-Prkdc scid, Il2rg tm1Wjl/SzJ) mice (Jackson laboratory, Bar harbor, USA). Circulating human and mouse platelets were analyzed by flow cytometry in whole blood samples drawn 3, 6, 15, 30, 120, 240, 1400, 2800 and 4320 min after transfusion. Human platelets were detected with a mAb (ALMA.17) against human GPIIb-IIIa. A mAb against GPIIb $\beta$  (RAM.1) which reacts with human and mouse platelets was used to delineate the platelet region on the plots<sup>17</sup>. The proportion of circulating Cultured or Native platelets recorded in the acquisition gate 3 min after transfusion was arbitrarily set to 1.

*Bleeding assay.* Aliquots containing  $3 \cdot 10^8$  washed human Cultured or Native platelets were injected retro-orbitally into NSG mice made severely thrombocytopenic following intravenous administration of the rat anti-mouse GPIIb $\alpha$  antibody (RAM.6, 5 mg/kg) 24 h prior to the bleeding assay. The tail bleeding time was measured 10 min after infusion of human platelets as described previously. The time required for the arrest of bleeding and the blood loss were recorded over 10 min<sup>16,18</sup>.

**Ethics statement.** Human studies were performed according to Helsinki declaration. Control human samples were obtained from volunteer blood donors who gave written informed consent recruited by the blood transfusion center where the research was performed (Etablissement Français du Sang-Grand Est). All procedures were registered and approved by the French Ministry of Higher Education and Research and registered under the number AC\_2015\_2371. The donors gave their approval in the CODHECO number AC-2008-562 consent form, in order for the samples to be used for research purposes. NSG mice were housed under pathogen-free conditions and all procedures were performed in accordance with the European Union Guideline 2010/63/EU. The study was approved by the Regional Ethical Committee for Animal Experimentation of Strasbourg, CREMEAS (CEEA 35) and registered under the number 10669.

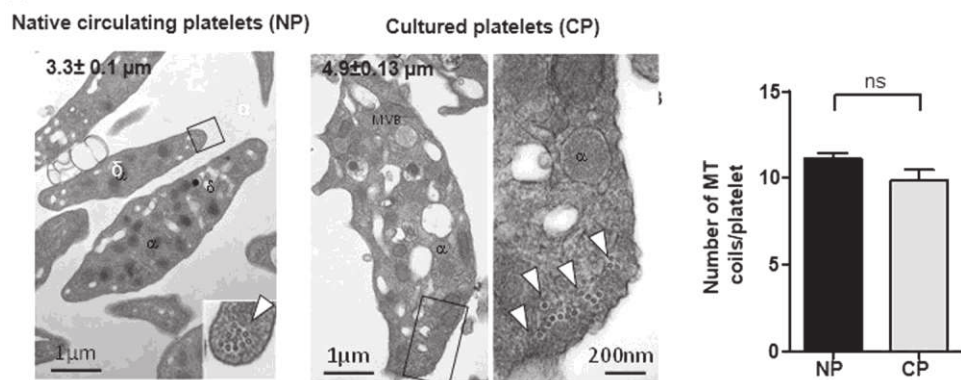
**Statistical analyses.** Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM and statistical comparisons were performed using an unpaired, two-tailed Student's t-test or one-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test (Prism, Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). P values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

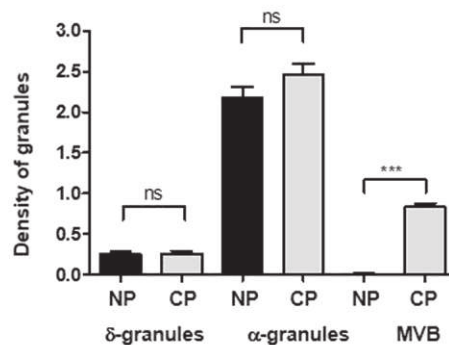
**Morphological characterization of cultured platelets.** Cultured platelets were first examined for their ultrastructure and degree of maturity. Cultured platelets were discoid and displayed a marginal band characteristic of Native platelets containing a similar number of microtubule coils ( $9.8 \pm 0.6$  Cultured Platelets,  $n = 40$  vs  $11.11 \pm 0.3$ , Native platelets  $n = 82$ , ns;  $p > 0.05$ ,  $n = 3$ ). The diameter of Cultured platelets was however enlarged by 1.5 fold as compared to Native platelets ( $4.9 \pm 0.13$  vs  $3.3 \pm 0.1$   $\mu\text{m}$ ,  $n = 70$  and 95 respectively,  $n = 3$ ) (Fig. 1A,B). They had normal densities per platelet section of  $\alpha$ -granules ( $2.2 \pm 0.1$  for Native platelets vs  $2.4 \pm 0.1$  for cultured platelets,  $n = 70$  and 95 respectively, ns,  $n = 3$ ) and  $\delta$ -granules ( $0.3 \pm 0.05$  for Native

## Résultats expérimentaux

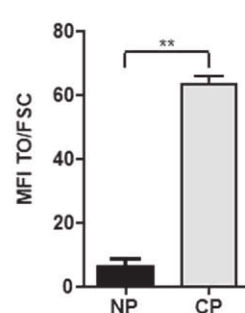
A



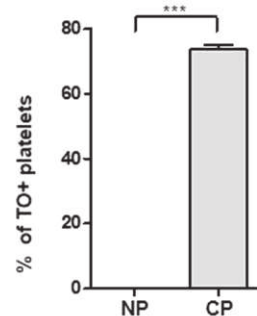
C



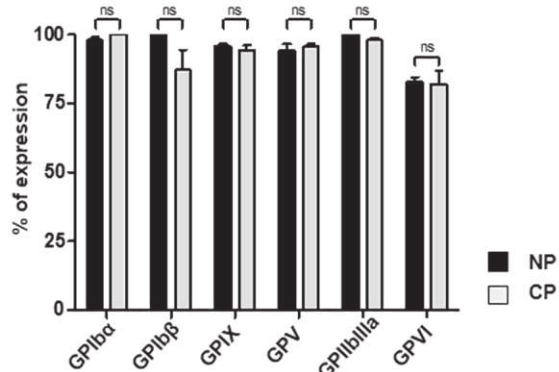
D



E



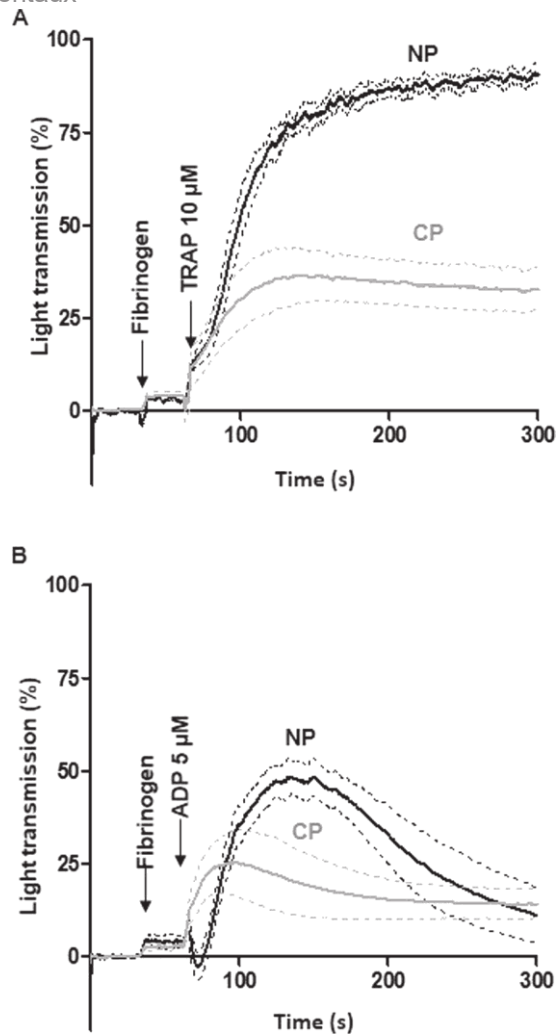
F



**Figure 1.** Characteristics of cultured platelets. (A) *Platelet ultrastructure.* Representative transmission electron microscopy (TEM) images of Native platelets (left panel, Bar = 1 μm) and Cultured platelets (right panel, Bar = 1 μm and 200 nm). (B) *Quantification of MT coils.* Numbers of microtubule coils in the marginal band on TEM images of thin sections of Native platelets and Cultured platelets. Values are the mean ± SEM for 40 and 82 platelets, n = 3, ns = not significant. (C) *Quantification of granules.* The densities of δ-granules, α-granules and multivesicular bodies (MVB) were quantified by TEM. Values are the density of granules reported to the platelet's size ± SEM, \*\*\*p < 0.001, n = 70 and 95 for Native- and Cultured-Platelets respectively, n = 3. (D,E) *Reticulated platelets.* The bar graphs represent (D) the mean fluorescence intensity of thiazol orange (TO) staining in Native platelets or Cultured platelets reported to the platelet size represented by the forward scatter (FSC). (E) The bar graphs represent the percentage of platelets positive for TO and (F) the level of expression of the major surface glycoproteins.

platelets vs  $0.2 \pm 0.03$  for cultured platelets, n = 70 and 95 respectively, ns, n = 3) (Fig. 1C). Cultured platelets nevertheless displayed signs of immaturity illustrated by an increased density of multivesicular bodies (MVB), which represent granules in formation ( $0.6 \pm 0.01$  Cultured Platelets vs  $0.06 \pm 0.01$  Native platelets, n = 95 and 50 respectively, \*\*\*p < 0.001), and an enriched endoplasmic reticulum (Fig. 1A, C). These immature properties, classically observed in newly formed platelets, were confirmed by thiazol orange (TO) staining, with more than 90% of Cultured Platelets being TO positive as compared to less than 2% of Native platelets (Fig. 1D,E).

## Résultats expérimentaux



**Figure 2.** Reactivity of cultured platelets. (A,B) *Aggregation assay.* Washed platelets were stimulated with (A) TRAP (10 µM) (Cultured platelets vs Native platelets:  $32.5 \pm 5.8\%$  vs  $90.5 \pm 1.9\%$  increase in light transmission,  $n = 3$ ) and (B) ADP (5 µM) ( $24.9 \pm 7.9\%$  vs  $48.4 \pm 4.6\%$  increase in light transmission,  $n = 3$ ) in the presence of fibrinogen. Tracings  $\pm$  SEM (dotted lines).

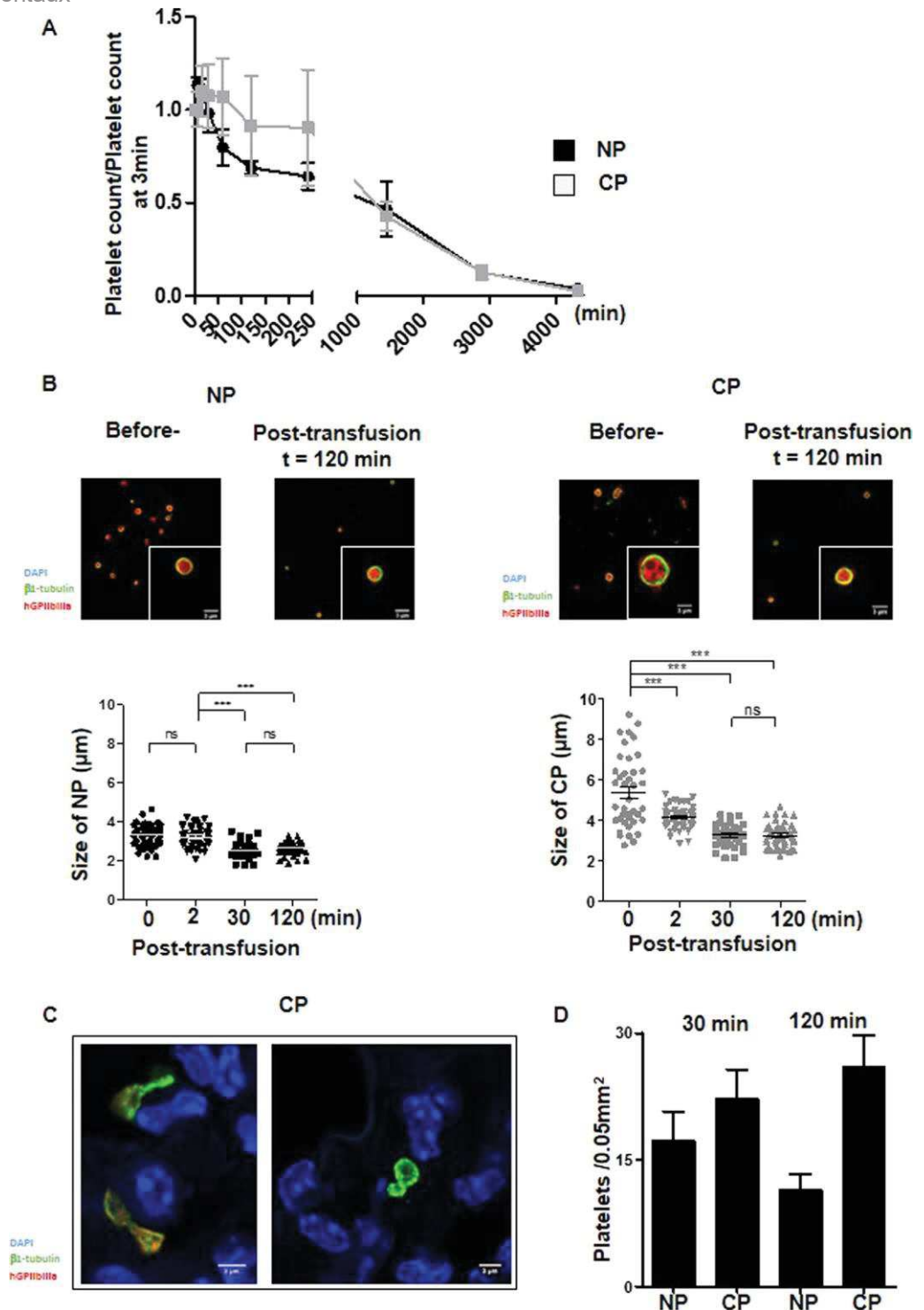
**Functional characteristics of cultured platelets.** We first established that there were no major differences between Cultured and Native platelets in the expression of the main platelet surface glycoproteins (Fig. 1F). The functionality of cultured platelets was then assessed *in vitro* using a standard turbidimetric aggregation assay. TRAP stimulation (10 µM) of Cultured Platelets resulted in  $36 \pm 7\%$  of the maximal aggregation response of Native platelets (Fig. 2A). The responsiveness of Cultured Platelets was also demonstrated using ADP (5 µM), a weak agonist which enables one to easily detect functional defects. A rapid onset of aggregation was observed in Cultured Platelets suspensions, with a maximum representing up to 80% of that in Native platelets suspensions ( $58.6 \pm 11.2\%$ ,  $n = 3$ ,  $*p < 0.05$ ) (Fig. 2B).

**Cultured platelets recirculate *in vivo* and undergo remodeling.** Two essential properties need to be considered for the use of cultured platelets in transfusion: their capacity to recirculate and their ability to sustain hemostasis. The first property was evaluated by infusing Cultured- or Native- platelets into macrophage-depleted immuno-deficient NSG mice and following the human platelet count in the circulation over time. Analysis of the curves revealed a maximal count at 15 min for either Cultured or Native platelets, with disappearance of all infused platelets by day 3 in both cases (Fig. 3A). While the 24 h half-life was similar for Cultured and Native platelets, the kinetics of clearance were different. Thus, following the peak at 15 min, a progressive and linear decrease in Native platelets was observed whereas numbers of Cultured Platelets remained constant for at least 2 h before beginning to decline.

One hypothesis to account for the plateau in Cultured Platelets count would be that these larger platelets remodel to give rise to smaller daughter platelets during recirculation, similarly as in the proplatelet fission process described by Thon *et al.*<sup>19</sup>. This hypothesis was tested by monitoring the platelet size, i.e. by measuring the diameter of the marginal band, at different time points after transfusion (Fig. 3B). Before transfusion, Cultured Platelets displayed a wide range of sizes, whereas after transfusion they became progressively homogenous and



## Résultats expérimentaux



**Figure 3.** Functionality of cultured platelets. **(A)** *Platelet recirculation mouse model.* Cultured- or Native-platelets ( $1.10^8$ ) were transfused into NSG mice pretreated with clodronate liposomes. Blood samples were drawn prior to and at different time points over 72 h following transfusion. Human platelets were detected and counted by flow cytometry. Native platelets decreased linearly over time whereas Cultured platelets reached a plateau 15 min after injection and remained constant for at least 2 h, to progressively decrease and disappear completely after 3 days. Mean of 5 independent experiments. **(B)** *Platelet size.* Native platelets and Cultured platelets were examined by confocal microscopy prior to and 120 min after infusion into NSG mice. Washed platelets were cytopun, immobilized on poly-L-lysine and incubated with antibodies against  $\beta$ 1-tubulin (green) and human GPIIb-IIIa (red). Scale bar = 1  $\mu$ m (upper panels). Dot plots represent the diameter of Native platelets or Cultured platelets on confocal images at different time points following infusion of human platelets (lower panels). **(C)** Representative confocal images of lung cryosections from NSG mice infused with Cultured platelets. The lungs were removed 30 or 120 min after transfusion, embedded in a cryogenic gel and

## Résultats expérimentaux

stained with antibodies against  $\beta$ 1-tubulin (green) and GPIIb-IIIa (red). Cultured Platelets were more amenable to remodeling than Native platelets. (D) Bar graphs represent the quantification on confocal images of platelet remodeling (twisted microtubules) in the lungs of NSG mice infused with Native platelets or Cultured platelets. Values are the mean  $\pm$  SEM in 3 separate experiments.

smaller to reach a size close to that of Native platelets ( $5.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$  before injection vs  $3.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$  120 min after injection,  $n = 3$ ,  $***p < 0.001$ ). In comparison, the size of Native platelets decreased only marginally from  $3.2 \pm 0.1$  to  $2.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ ,  $***p < 0.001$ ) (Fig. 3B). Since it is well documented that proplatelets can fragment and remodel in the pulmonary circulation<sup>20</sup>, we used confocal microscopy to examine the lungs of mice following infusion of human Cultured- or Native- platelets (Fig. 3C). Platelet elements with twisted microtubules, identified as  $\beta$ 1 tubulin-positive events, were frequently observed after infusion of Cultured Platelets ( $26 \pm 3.7\%$  vs  $11.4 \pm 2\%$  for Native platelets,  $n = 5$ ,  $***p < 0.001$ ). Altogether, these results favor a mechanism where Cultured Platelets are remodeled during passage through the pulmonary circulation, contributing to an early stabilization of the platelet count (Fig. 3D).

**Cultured platelets limit blood loss.** The second essential property we evaluated was the capacity of Cultured Platelets to support hemostasis. This was done by performing a tail bleeding assay in NSG mice which had been made severely thrombocytopenic ( $30.10^3$  plts/ $\mu\text{L}$ ). Without transfusion of platelets, bleeding did not cease during a 10 min period of observation in this assay (Fig. 4A). Infusion of  $3.10^8$  Cultured- or Native- platelets, which was expected to rescue only 15% of the normal platelet count in the mouse, was also insufficient to cause cessation of bleeding over 10 min (Fig. 4A). However, administration of Cultured platelets was sufficient to reduce blood loss with respect to the untreated control, as estimated from the amount of hemoglobin (Hb) in the blood collected ( $17.3 \pm 7.7$  vs  $108.8 \pm 2 \mu\text{g/mL Hb}$ ,  $n = 3$ ,  $**p < 0.01$ ). This reduction was even more pronounced than after infusion of Native platelets ( $33.9 \pm 9.9 \mu\text{g/mL Hb}$ ) (Fig. 4B). Overall, these results indicated that Cultured platelets conserve hemostatic properties following transfusion.

## Discussion

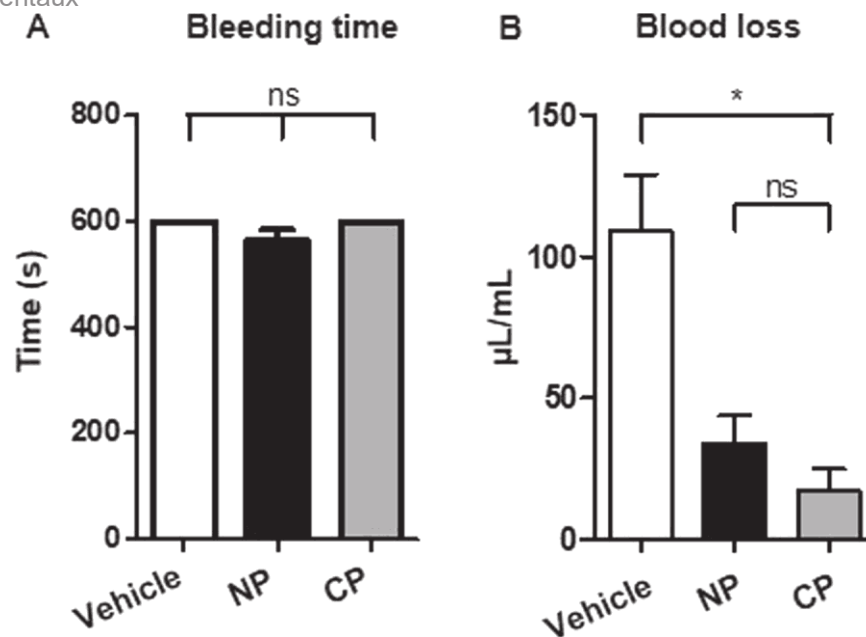
In this study, we differentiated megakaryocytes from peripheral CD34<sup>+</sup> cells in the presence of the chemical compound SR1. In this condition, MK are able to release more than 96% CD41-CD42b positive platelet-like elements following successive pipetting attesting the purity of the future transfused elements (data not shown). We established that cultured human platelets are functional, recirculate efficiently and limit blood loss in a thrombocytopenic NSG mouse model. These properties fulfill the essential prerequisites for the use of platelets generated *in vitro* in transfusion medicine. Moreover, these platelets were obtained without addition of serum or any animal components, which should allow the development of a platelet manufacturing protocol compliant with current good manufacturing practices.

We observed that Cultured platelets were larger than Native platelets, in agreement with the findings of other groups<sup>21</sup>. A large size is characteristic of newly formed or young circulating platelets. Accordingly, we observed that the cytoplasm of Cultured platelets was enriched in MVB and endoplasmic reticulum and contained large amounts of RNA, which are features of young platelets, usually encountered during reactive thrombocytosis after induction of severe thrombocytopenia<sup>15</sup>. In contrast, steady state circulating platelets display an age continuum, from young to old. The transfusion of only young platelets, as obtained in culture, could represent a potential benefit as they would provide better hemostatic protection than platelets from donors.

As reported in many other studies, Cultured platelets appeared to be slightly pre-activated, as illustrated by their exposure of P-selectin and binding of fibrinogen in the absence of added agonist (Suppl. Fig. 3B,C). This activation can be explained by the absence *in vitro* of endothelial cell products such as NO and PGI<sub>2</sub>, which are normally present *in vivo* and reduce platelet activation. Prior to transfusion, Cultured platelets aggregated in response to ADP and TRAP. Since they lack fibrinogen in their  $\alpha$ -granules, thrombin was unable to directly induce platelet aggregation (Suppl. Fig. 1A,B). Culture of platelets in the presence of fibrinogen could be envisaged to solve this problem, but might not be necessary since endocytosis from plasma appears to occur soon after transfusion of Cultured platelets.

When assessing their capacity to recirculate, the half-life of cultured platelets was found to be equivalent to that of native ones. We estimated that the proportion of platelets cleared immediately after transfusion (within 3 min) represented around 20%, in Cultured- or Native-platelets further indicating that Cultured platelets acted as *bona fide* platelets (Suppl Fig. 2B,C). Following transfusion, Cultured platelets progressively lost their TO staining (Suppl. Fig. 3A) and became smaller to reach the size of Native platelets (Fig. 3B). This can be explained by their remodeling attested by the presence of numerous platelets displaying a twisted morphology in the lungs of mice transfused with Cultured platelets (Fig. 3C,D). These observations recall those of J. Italiano's group concerning the conversion of preplatelets, anucleate discoid particles 2–10  $\mu\text{m}$  in diameter, into barbell-shaped proplatelets through microtubule-driven twisting forces<sup>19</sup>. It may be hypothesized that, constrained by the pulmonary microcirculation, Cultured Platelets remodel and divide to form larger numbers of daughter platelets, explaining the initial maintenance of a constant platelet count. It is noteworthy that following transfusion, circulating Cultured platelets no longer exhibited activation and were responsive to thrombin stimulation (Suppl. Fig. 3B,C). Whether pre-activated platelets are eliminated or whether they are passivated through contact with endothelial cells in the blood vessels is at present not known.

An alternative to the transfusion of cultured platelets has been proposed in the form of the infusion of cultured MK into mice. The platelets generated *in vivo* from these cells were mainly released from MK trapped within the pulmonary circulation. They displayed a normal size and as in the case of Cultured platelets produced *ex vivo*, an



**Figure 4.** (A) Bleeding time. Profound thrombocytopenia was induced in NSG mice 24 h before the assay by injecting an anti-GPIb $\alpha$  mAb (RAM.6). On day 0, a tail bleeding assay was performed 10 min after retro-orbital injection of vehicle or  $3.10^8$  Native platelets or Cultured platelets. (B) Blood loss was measured over a period of 10 min and values are the mean  $\pm$  SEM in 3 separate experiments, \* $p < 0.05$ .

almost normal half-life in the blood stream. However, it is difficult to compare their functional properties as they could not be separated from the native platelets of the recipient mice<sup>22</sup>. In addition, a possible complication due to the accumulation of infused MK nuclei in the lungs would be avoided in Cultured platelets.

Additionally, of all the criteria that can be assessed, Cultured platelet satisfied the most reliable for a clinical application, i.e., these platelets limited blood loss and were thus capable of ensuring primary hemostasis upon transfusion. According to this study, it may be expected that Cultured platelets will fully protect against bleeding when scale-up production allows the transfusion of larger numbers of platelets into NSG mice.

To conclude, we could demonstrate here that CD34<sup>+</sup>-derived SRI- Cultured platelets exhibit properties of *bona fide* human platelets. In addition, with the technological breakthroughs made in the last few years to produce large amounts of platelets with a high quality, the concept of cultured platelets as a transfusion alternative thereby becomes realistic. Nevertheless, several obstacles remain to be overcome before it might be possible to introduce the routine use of such innovative blood components.

Received: 29 May 2019; Accepted: 25 October 2019;

Published online: 22 January 2020

## References

- Slichter, S. Platelet refractoriness and alloimmunization. *Leukemia* **12**(Suppl. 1), S51–3 (1998).
- Baigger, A., Blasczyk, R. & Figueiredo, C. Towards the Manufacture of Megakaryocytes and Platelets for Clinical Application. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **44**, 165–173, <https://doi.org/10.1159/00047261> (2017).
- Sugimoto, N. & Eto, K. Platelet production from induced pluripotent stem cells. *J Thromb Haemost* **15**, 1717–1727, <https://doi.org/10.1111/jth.13736> (2017).
- Karagiannis, P. & Eto, K. Manipulating megakaryocytes to manufacture platelets *ex vivo*. *J Thromb Haemost* **13**(Suppl 1), S47–53, <https://doi.org/10.1111/jth.12946> (2015).
- Dunois-Larde, C. *et al.* Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* **114**, 1875–1883, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209205> (2009).
- Zhang, L. *et al.* A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med* **209**, 2165–2181, <https://doi.org/10.1084/jem.20121090> (2012).
- Blin, A. *et al.* Microfluidic model of the platelet-generating organ: beyond bone marrow biomimetics. *Sci Rep* **6**, 21700, <https://doi.org/10.1038/srep21700> (2016).
- Thon, J. N. *et al.* Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* **124**, 1857–1867 (2014).
- Nakagawa, Y. *et al.* Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp Hematol* **41**, 742–748, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.04.007> (2013).
- Ito, Y. *et al.* Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale *Ex Vivo* Production. *Cell* **174**, 636–648 e618, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.011> (2018).
- Strassel, C. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood*, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-670208> (2016).
- Strassel, C. *et al.* Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 241–247, doi:10.1161/01.ATV.0000251992.47053.75 (2007).
- Strassel, C. *et al.* Haemorrhagic and thrombotic diatheses in mouse models with thrombocytosis. *Thromb Haemost* **113**, 414–425, <https://doi.org/10.1160/TH14-08-0667> (2015).

## Résultats expérimentaux

14. Hechler, B. *et al.* Preserved functional and biochemical characteristics of platelet components prepared with amotosalen and ultraviolet A for pathogen inactivation. *Transfusion* **53**, 1187–1200, <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03923.x> (2013).
15. Angenieux, C. *et al.* Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. *PLoS One* **11**, e0148064, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148064> (2016).
16. Strassel, C., Hechler, B., Bull, A., Gachet, C. & Lanza, F. Studies of mice lacking the GPIb-V-IX complex question the role of this receptor in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* **7**, 1935–1938, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03608.x> (2009).
17. Perrault, C. *et al.* A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb/IIIa modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost* **86**, 1238–1248 (2001).
18. Strassel, C. *et al.* Haemorrhagic and thrombotic diatheses in mouse models with thrombocytosis. *Thromb Haemost* **113**, <https://doi.org/10.1160/TH14-08-0667> (2014).
19. Thon, J. N. *et al.* Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol* **191**, 861–874, <https://doi.org/10.1083/jcb.201006102> (2010).
20. Lefrançais, E. *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* **544**, 105–109, <https://doi.org/10.1038/nature21706> (2017).
21. Strassel, C., Gachet, C. & Lanza, F. On the Way to *in vitro* Platelet Production. *Front Med (Lausanne)* **5**, 239, <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00239> (2018).
22. Fuentes, R. *et al.* Infusion of mature megakaryocytes into mice yields functional platelets. *J Clin Invest* **120**, 3917–3922, <https://doi.org/10.1172/JCI43326> (2010).

## Acknowledgements

We thank J.N.M. Mulvihill for reviewing the english of the manuscript.

## Author contributions

C.S. conceived and designed the experiments. V.D.S. and L.M. performed the experiments. A.E. performed and analyzed electron microscopy images. M.F. supervised the animal facilities. C.S., V.D.S. and L.M. analyzed the data. C.S., B.H., P.M., F.L. and C.G. discussed the techniques and results. C.S., B.H., P.M., F.L. and C.G. supervised the work and C.S., F.L. and C.G. wrote the paper.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57754-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to C.S.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020



## Functional properties of human platelets derived *in vitro* from CD34<sup>+</sup> cells

Do Sacramento V, Mallo I, Freund M, Eckly A, Hechler B, Mangin P, Lanza F, Gachet C, Strassel C  
Université de Strasbourg, INSERM, EFS-Grand Est, BPPS UMR\_S1225, FMTS, F-67000 Strasbourg, France

### Correspondence to :

Catherine Strassel, UMR\_S1255, EFS-Grand Est, site de Strasbourg, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg  
Cedex, France

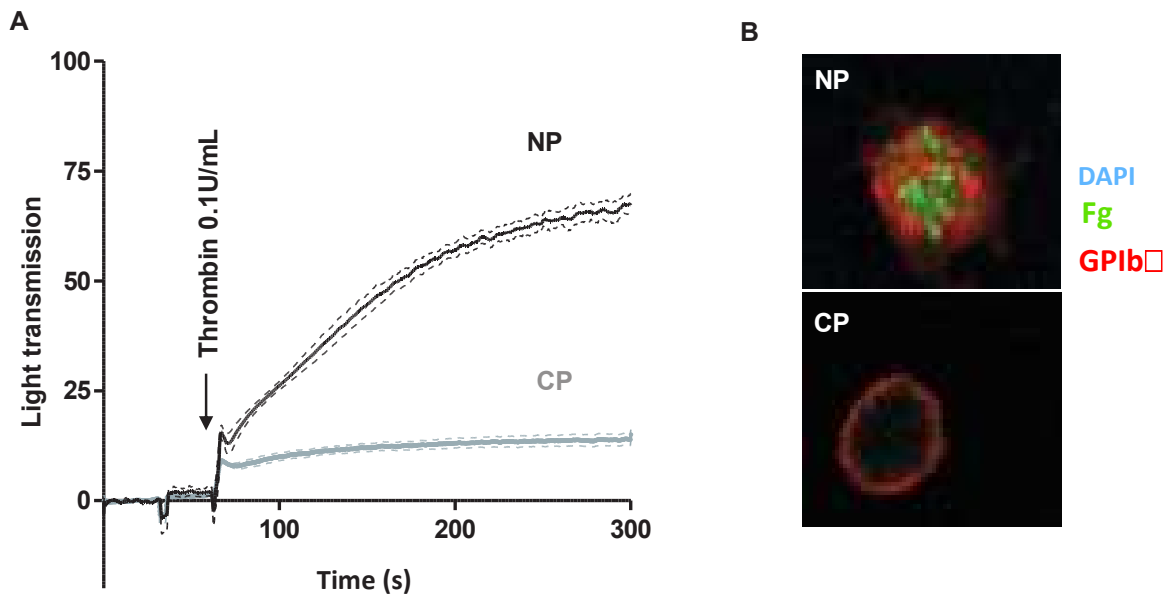
Tel: (33) 388 21 25 25; Fax: (33) 388 21 25 21; E-mail: [catherine.strassel@efs.sante.fr](mailto:catherine.strassel@efs.sante.fr)

### Supplemental Methods

*Platelet aggregation.* Aggregation was measured at 37°C by a standard turbidimetric method in an APACT 4004 aggregometer (ELITech Group, Puteaux, France) <sup>14</sup>. Briefly, a 135 µL aliquot of platelet suspension containing 20.10<sup>6</sup> CP or NP was stirred at 1,100 rpm and activated by addition 0.1 U/mL thrombin, in a final volume of 150 µL. The extent of aggregation was estimated with APACT LPC software.

*Fibrinogen content.* After fixation in paraformaldehyde, CP and NP were cytospun, immobilized on poly-L-lysine, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated sequentially for 30 min, with antibodies against fibrinogen (green) and GPIIb/IIIa (RAM.1, red) and with DAPI (blue) for nuclear staining.

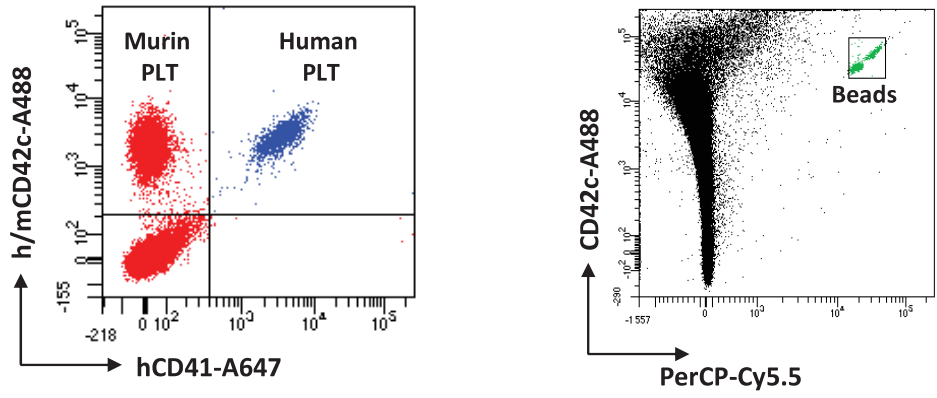
*Activation assay.* Washed NP or CP were stimulated at different time points after infusion into NSG mice, with thrombin (1 U/mL) in the presence of FITC-anti-P-selectin antibody (25 µg/ml), mixed and at 10 min fixed with PBS-20 mg/ml PFA for 20 minutes (min). Platelets were pelleted by centrifugation at 1,000 x g for 2 min and resuspended in 500 µl phosphate-buffered saline (PBS). The fluorescence intensity was measured using a Fortessa-X20 flow cytometer (BD, Biosciences).



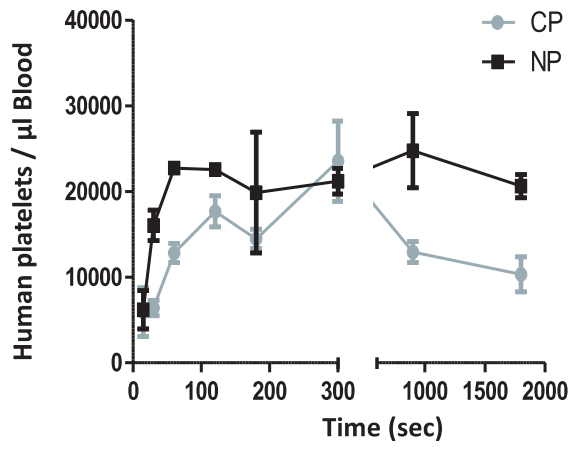
**Supplemental Figure 2: (A)** *Aggregation assay.* Washed human platelets were stimulated with thrombin (0.1 U/mL) in the absence of fibrinogen (CP vs NP:  $15.1 \pm 1.1$  % vs  $65.7 \pm 1.4$  %,  $n=3$ ). **(B)** *Fibrinogen content.* CP and NP were cytospun, immobilized on poly-L-lysine and incubated with antibodies against fibrinogen (green) and GPIIb/IIIa (RAM.1, red) and with DAPI (blue) for nuclear staining. Images were obtained by confocal microscopy, scale bar = 1  $\mu$ m.

Supplemental Figure 1.

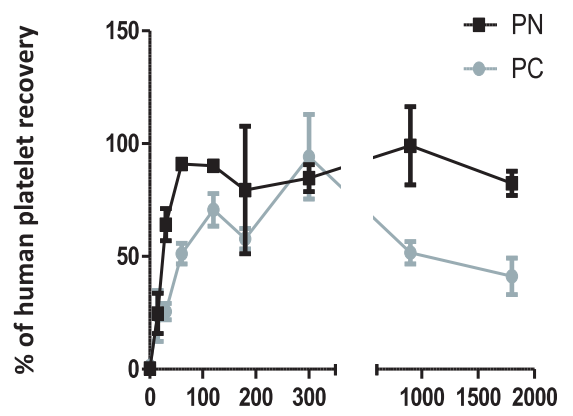
A



B

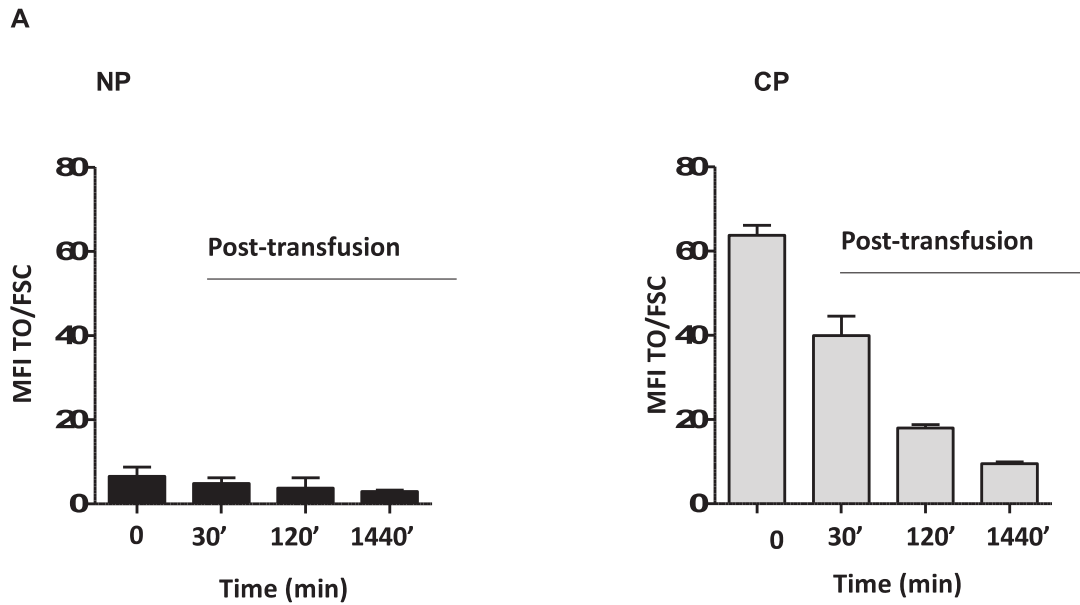


C



Suppl. Fig. 2: Short time murine circulation model. (A) Flow cytometry analysis. Blood samples were drawn prior to and at different time points over 30min following transfusion in a Trucount™ Tubes (BD bioscience) and labeled with specific antibodies. Counting beads are gated and acquisition of events was stopped when 5000 bead events were acquired. (B) The graph represents the number of human platelets circulating in mouse/μL of blood. Values are the mean ± SEM in 2 for Native platelets and 3 for Cultured platelets separate experiments. (C) The graph represents the % of human platelet recovery, values are the mean ± SEM in 3 separate experiments.

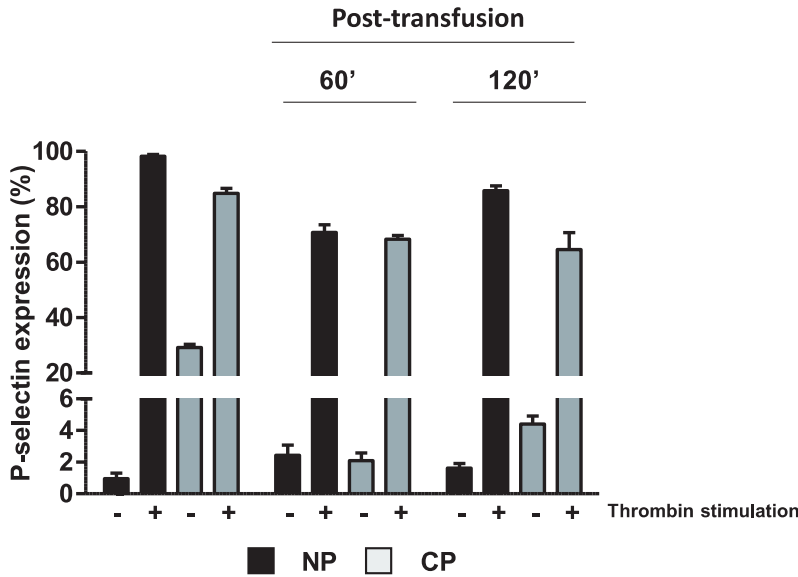
Supplemental Figure 2.



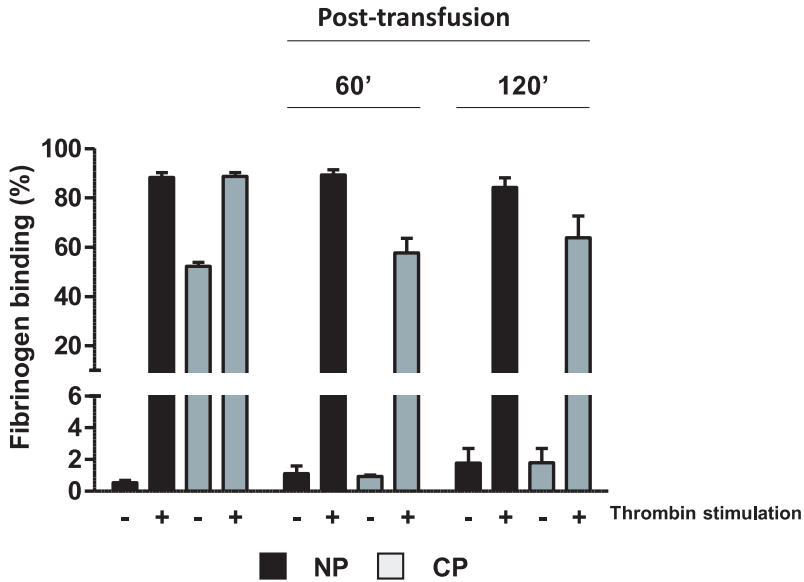
**Supplemental Figure 3: Characterization of cultured platelets after recirculation. (A) Reticulated platelets.** Bar graphs represent the relationship between the thiazol orange (TO) staining and size (FSC) of NP or CP before and at different time points (30, 120 and 1440 min) following infusion into NSG mice. **(B-C) Activation assay.** Bar graphs represent the mean fluorescence intensity of (B) P-selectin expression and (C) fibrinogen binding, in the presence or absence of thrombin, in NP or CP before injection (BI) and at different time points (60 and 120 min) after infusion into NSG mice.

**Supplemental Figure 3.**

B



C



Supplemental Figure 3.

## Conclusion

La méthode de production de plaquettes que nous avons développée permet de libérer après une succession d'aspiration et de refoulement à l'aide d'une pipette de 1 mL des éléments cytoplasmiques dont plus de 95% sont positifs pour des marqueurs spécifiquement mégacaryocytaires que sont la GPIIb-IIIa et la GPIb $\alpha$ .

D'un point de vue morphologique si ces plaquettes sont plus grandes que des plaquettes natives ( $4,9 \pm 0,13$  vs  $3,3 \pm 0,1$   $\mu\text{m}$ ), elles présentent comme les plaquettes natives une forme discoïde soutenue par un anneau de microtubules. Cette grande taille n'est pas une surprise et a déjà été documentée par d'autres groupes (Moreau, Evans et al. 2016, Ito, Nakamura et al. 2018). Des plaquettes de plus grande taille sont souvent le signe de plaquettes nouvellement produites. Alors que les plaquettes jeunes s'observent essentiellement lors de pics de production suite à une thrombopénie sévère, elles sont faiblement représentées dans les concentrés plaquettaires qui sont constitués d'un continuum de plaquettes allant de celles venant d'être produites à celles qui ont plus de 5 jours. Outre leur plus grande taille, l'observation par microscopie électronique à transmission a également permis d'observer la présence de nombreux granules multivésiculaires (MVB), les précurseurs des granules  $\alpha$  et  $\delta$ , et de quantités importantes d'ARN et de réticulum endoplasmique qui sont les caractéristiques principales des plaquettes nouvellement produites. La production de plaquettes jeunes pourrait représenter un avantage pour le produit transfusionnel que l'on souhaite développer, en terme de conservation que l'on pourrait alors supposer plus longue, mais cela reste à démontrer.

Les analyses par cytométrie en flux montrent également qu'elles expriment les principaux récepteurs plaquettaires comme les membres du complexe GPIb-V-IX, la GPVI et la GPIIb-IIIa. Certaines de ces glycoprotéines comme la GPIb $\alpha$  peuvent être clivées par des métalloprotéinases, mais cela peut être évité en utilisant un inhibiteur comme le KP 457 (un inhibiteur d'ADAM10/17), que d'autres études utilisent également (Ito, Nakamura et al. 2018). Les plaquettes de culture pourraient présenter un certain degré de préactivation. En effet, 35% des plaquettes expriment la P-Sélectine après libération qui est le signe d'une activation plaquettaire. Cette préactivation, déjà visualisée par d'autres groupes (Ito, Nakamura et al. 2018, Seo, Chen et al. 2018), pourrait venir de la méthode de libération et des forces de flux

exercées sur les prolongements cytoplasmiques lors des différentes étapes d'aspiration et de refoulement malgré les précautions prises par l'adjonction d'inhibiteurs de l'activation plaquettaire comme la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), un inhibiteur de l'adénosine diphosphate, ou l'apyrase, une enzyme permettant la dégradation de l'ATP et de l'ADP. L'autre hypothèse émise pour expliquer cette préactivation serait l'absence de cellules endothéliales dans le système de culture, qui *in situ* sont le lieu de passage des proplaquettes de la moelle osseuse vers la lumière des vaisseaux sinusoïdes et qui sécrètent des inhibiteurs puissants de l'activation plaquettaire comme le monoxyde d'azote (NO) et la PGI<sub>2</sub>.

*In vitro*, dans des tests classiques d'agrégation on constate que les plaquettes de culture répondent à plusieurs agonistes. Parmi eux, l'agrégation à un agoniste fort comme la thrombine n'est cependant pas maximale. Ceci s'explique par le fait que les granules des plaquettes de culture ne présentent pas la même composition que les granules des plaquettes natives. Elles sont notamment dépourvues de fibrinogène, ce qui empêche un recrutement optimal des plaquettes lors de l'agrégation. On a cependant pu constater qu'après recirculation dans la souris, les plaquettes de culture étaient capables de se charger en fibrinogène. Ne pouvant isoler les plaquettes humaines des plaquettes de souris, on ne peut re-tester leurs capacités d'agrégation après recirculation. Par contre nous décrivons une agrégation avec un agoniste faible, l'ADP, qui n'avait pas encore été décrite et qui signe une bonne réactivité des plaquettes

Concernant les études fonctionnelles *in vivo*, nous avons utilisé des souris immunodéficientes de type NOD SCID gamma (NSG). Ces souris présentent une diminution de l'immunité innée, un défaut de production d'anticorps grâce à la mutation d'une protéine implique dans la recombinaison V(D)J une mutation du récepteur à l'IL2 ainsi qu'une diminution des cellules NK, lymphoïdes B et T (Racki, Covassin et al. 2010). Elles ont été prétraitées au clodronate, afin d'éliminer les macrophages (Hu, Van Rooijen et al. 2011) ce qui permet encore d'améliorer la recirculation des plaquettes humaines. À la suite d'analyse en cytométrie de flux, nous avons constaté que le nombre de plaquettes natives humaines diminuait graduellement après perfusion, alors que le nombre de plaquettes de culture recirculantes atteignait un plateau transitoire pour ensuite diminuer progressivement et comme les plaquettes natives disparaître de la circulation. On a pu en déduire une demi-vie similaire pour les

plaquettes de culture et les plaquettes native d'environ 24h. Il a été mis en évidence que ce plateau correspondait à un remodelage des plaquettes de culture. En effet, après une analyse par microscopie confocale un remodelage des plaquettes a été observé dans la microcirculation pulmonaire, qui permet aux plaquettes de culture qui avant transfusion possédaient une taille de 4,9  $\mu\text{m}$  de diamètre de retrouver la taille des plaquettes natives c'est-à-dire environ 2  $\mu\text{m}$ . Comme montré par l'équipe de Joseph Italiano dans un modèle *in vitro*, ce remodelage met en œuvre une torsion des microtubules qui formant une structure en 8 générant en son centre un point de rupture permet, à partir d'un seul élément, la génération de deux éléments (Italiano, Lecine et al. 1999). Le groupe de Koji Eto obtenant après recirculation ce même plateau avec des plaquettes de culture avait également émis l'hypothèse d'un remodelage (Ito, Nakamura et al. 2018).

Le nombre de plaquettes transfusées dans la souris NSG thrombopénique est de  $3.10^{10}$  plaquettes, mais cette quantité de plaquettes de culture ou de plaquettes natives ne permet pas de corriger le temps de saignement. Il faudrait, pour y parvenir, transfuser bien plus de plaquettes ce qui n'est pour le moment pas envisageable en terme de production au laboratoire. Cependant nous avons pu constater dans nos conditions que les plaquettes de culture comme les plaquettes natives diminuaient drastiquement la perte sanguine mettant en lumière leurs capacités hémostatiques.

En conclusion, cette caractérisation récapitule les analyses essentielles pour démontrer que les plaquettes de culture sont similaires aux plaquettes natives et répondre aux autorités de santé lors de la constitution du dossier que nous présenterons à l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé). Il est à préciser que lors de l'essai, les plaquettes seront libérées non pas manuellement, mais par un dispositif, basé sur l'analyse de la succession d'aspiration et de refoulements, qui est en cours de production par la société Saint-Gobain. Il faudra donc s'assurer que l'ensemble des fonctions seront préservées. Nous avons déjà quelques preuves encourageantes. En effet, nous avons testé le prototype du dispositif développé par Yannick Knapp en analysant la morphologie, les fonctions *in vitro* et la recirculation des plaquettes après transfusion. On a pu observer, qu'il permettait de libérer les plaquettes tout en conservant le rendement de 150 plaquettes/CD34 et que les plaquettes de culture produites étaient similaires aux plaquettes natives. Toutefois



la caractérisation du produit fini ne s'arrêtera pas là, d'autres critères seront à analyser comme la toxicité, la formulation et la stabilité du produit.

L'objectif de ce premier essai chez l'Homme est d'évaluer la durée de vie des plaquettes de culture et pour cela il sera nécessaire de pouvoir déterminer la quantité exacte de plaquettes de culture circulantes dans l'organisme suite à la transfusion. Un suivi sur une semaine est planifié. Pour permettre cette quantification, les plaquettes de culture seront marquées avec un radioisotope, l'Indium<sup>111</sup>, une technique maîtrisée par le service de médecine nucléaire des HUS. Cette technique est intéressante puisqu'elle permet en plus de la quantification de déterminer la localisation des plaquettes par PET-SCAN dans l'organisme. Bien que ce protocole soit réalisé en routine à l'hôpital, il sera important de s'assurer que les plaquettes de culture présenteront un rendement de couplage à l'Indium<sup>111</sup> équivalent à celui des plaquettes natives.

Cette étude constitue un préalable à la preuve de concept que nous souhaitons mener avant d'envisager la prochaine étape qui est : la production de plaquette de culture à grande échelle, pour faire des plaquettes de culture un futur produit transfusionnel.

## **Discussion générale**

---

Les résultats acquis durant cette thèse ont permis de préciser les mécanismes dépendants de l'AHR contrôlant la mégacaryopoïèse et d'avancer dans la production et la caractérisation de plaquettes de culture à visée transfusionnelle.

L'identification d'un progéniteur mégacaryocytaire présentant une forte capacité à produire des plaquettes en présence de StemRegenin 1 (SR1), antagoniste de l'AHR, a non seulement permis d'améliorer notre rendement de plaquettes de culture mais a également soulevé la question du mécanisme impliqué dans cet effet, à l'époque inattendu. Alors que l'hypothèse d'une implication de la voie canonique passant par la dimérisation de l'AHR avec l'ARNT était supposée au vu de la répression de *CYP1B1*, les résultats obtenus durant ce travail de thèse révèlent une voie alternative impliquant le facteur de transcription IKZF1, membre de la famille IKAROS dont il semble être le seul représentant dans la lignée mégacaryocytaire.

Nous avons montré qu'il existait, à l'instar de ce qui a été observé dans les cellules ILC3 (Groupe 3 Innate Lymphoid Cell) de l'intestin, une interaction AHR:IKZF1 dans les MK et plus précisément dans la population à fort pouvoir à produire des plaquettes, la POI. Cette interaction semble indispensable à l'émergence et à l'amplification de la POI en réponse à SR1 ou aux MSC. Elle favorise son maintien à l'état de progéniteur, en régulant négativement sa maturation, comme en atteste la dérégulation de l'expression des transcrits spécifiques de la MKP, une étape qui serait un prérequis pour par la suite la maturation optimale des MK et une production de plaquettes efficace. Nos résultats semblent de plus exclure l'intervention de la voie canonique classique de l'AHR.

Si ces résultats mettent en avant une nouvelle voie alternative, ils n'excluent pas pour autant l'existence ou l'intervention d'autres voies non canoniques de l'AHR, comme la voie Wnt/ $\beta$ caténine, connue pour sa régulation des étapes tardives de maturation des MK ou encore les voies MAPK et JAK/Stat qui sont, quant à elles, mises en jeu lors de la liaison de la TPO à son récepteur MPL.

Au-delà du rôle au cours de la MKP identifié ici, l'AHR agit de manière plus large et plus complexe à différents niveaux de l'hématopoïèse. Il est très exprimé dans les CSH et est responsable de leur maintien dans un état de quiescence. L'utilisation de SR1 permet de lever l'état de quiescence pour permettre aux CSH d'entrer en cycle et de proliférer. Les mécanismes responsables de la prolifération des CSH médiées par

l'AHR sont encore à étayer pour offrir des perspectives d'amélioration de cette étape (Boitano, Wang et al. 2010). L'AHR est également un élément clé dans la décision du MEP à s'orienter soit vers la voie érythrocytaire soit mégacaryocytaire. L'utilisation d'un agoniste comme FICZ favorise son orientation dans la lignée érythroïde et un antagoniste comme SR1 permet son orientation dans la MKP (Smith, Rozelle et al. 2013). Là encore, il serait intéressant de mettre en lumière les mécanismes fins qui régulent cette balance érythro/mégacaryocytaire. Cette étude nous permettrait ainsi d'optimiser efficacement l'orientation du MEP dans la voie mégacaryocytaire. L'AHR a également été décrit pour réguler un certain nombre de protéines du cycle cellulaire également impliquées dans le polyploïdisation des MK, les cycline D1 et E, l'AIP (aryl hydrocarbon receptor interacting –protein) impliquée dans la stabilisation de la survivine, ou encore HES-1, un gène cible de l'AHR (Lindsey and Papoutsakis, 2011). Nos MK de culture apparaissant peu polyploïdes, et il est indispensable d'améliorer cette étape puisqu'il apparait que le niveau de ploïdie serait corrélé à la capacité des MK à libérer les futures plaquettes (Mazzi, Lordier et al. 2018). Enfin, des études ont révélé un rôle important de l'AHR et des CYP450 dans la régulation de la synthèse des acides gras et du cholestérol, des lipides indispensables à l'amplification du DMS et à la maturation optimale des MK (Angrish et al., 2011; Pelclova et al., 2002). L'étude de plusieurs pathologies plaquettaires s'accompagnant d'une diminution du chiffre plaquettaire a montré l'importance d'une organisation et expansion optimales du DMS pour la libération efficace des plaquettes (section II. A. 3. c.). Exploiter la voie de l'AHR pour améliorer la formation du DMS permettrait d'optimiser la maturation des MK .

L'ensemble des rôles de l'AHR au cours de la MKP, issus de la littérature et des travaux de ma thèse ouvrent des perspectives encourageantes pour en explorer les mécanismes avec plus de précision. Identifier les voies alternatives et l'identité de ligands endogènes ou sécrétés permettant d'amplifier la POI en présence de MSC permettrait d'améliorer des étapes aujourd'hui limitantes de la production de plaquettes, comme la prolifération des CSH et la maturation optimale des MK. Une approche envisagée repose sur une étude transcriptomique comparant les POI obtenues en présence de SR1 et de MSC, avec comme acteurs possibles le système enzymatique impliqué dans le métabolisme du tryptophane dont les métabolites sont connus pour être des ligands de l'AHR. La recherche de ligand de l'AHR structurellement proche de SR1 peut également être envisagée dans le milieu de

culture des MSC. Enfin il sera intéressant de croiser les données obtenues dans le contexte de la MKP avec celles d'autres processus physiologiques dans lesquels l'AHR est impliqué.

Concernant le deuxième aspect du travail qui portait sur l'analyse de la qualité des plaquettes produites en culture, il me semble important de situer nos travaux au regard de la compétition internationale. La source de cellules choisies pour la différenciation mégacaryocytaire et la production des plaquettes est un élément clef de comparaison. Il s'agit soit de progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>, choix que nous avons fait, soit d'iPSC. La forte capacité de prolifération des iPSC est un avantage du point de vue de la production, mais est contrebalancée par une moindre capacité de différenciation. A l'inverse les progéniteurs CD34<sup>+</sup> tels qu'utilisés ici présentent une forte capacité de différenciation, mais une plus faible prolifération. La différenciation à partir d'iPSC se heurte, contrairement aux CD34<sup>+</sup>, à une deuxième difficulté, qui est d'être très délicate à mettre au point, longue et onéreuse. Ceci a poussé certaines équipes à optimiser cette différenciation grâce à la réalisation de MK-FOP (Moreau, Evans et al. 2016) ou à la surexpression de c-MYC et à la génération de lignées immortalisées, comme les imMKCL (Takayama, Nishimura et al. 2010). Bien que cette approche permette une forte multiplication, les procédés d'immortalisation pourraient poser problème lors de la production à visée transfusionnelle où il faudrait s'assurer de l'absence de cellule vivantes nucléées potentiellement tumorigènes. Pour cela, la solution proposée pourrait être l'irradiation des poches, qui est envisageable, mais dont l'efficacité pour ce type de concentrés plaquettaire resterait à démontrer. A l'opposé, l'utilisation de CD34<sup>+</sup> comme source cellulaire permettrait d'éliminer les risques de cancérisation post-transfusionnelle par des cellules résiduelles génétiquement modifiées.

Un deuxième élément de comparaison, clé en vue de l'utilisation en transfusion, concerne l'intégrité, la fonctionnalité, les propriétés hémostatiques et la capacité de recirculation des plaquettes de culture. Mon travail a démontré que les plaquettes produites à partir de cellules CD34<sup>+</sup>, dans nos conditions de culture, répondaient à l'ensemble de ces critères. L'examen de la littérature révèle qu'à ce jour la seule analyse aussi exhaustive n'a été réalisée que par l'équipe de Koji Eto sur des plaquettes produites à partir d'imMCKLs. Cette équipe démontre, comme nous et sur les mêmes critères morphologiques et fonctionnels, leur capacité à produire des plaquettes semblables aux plaquettes circulantes.

Un troisième point de comparaison essentiel concerne le développement de systèmes de culture et de libération de plaquettes en vue d'une production à grande échelle en respectant les BPF. Un important travail et des progrès ont été réalisés durant cette thèse sur ce thème mais n'ont pas été présentés pour cause de protection intellectuelle. Plusieurs systèmes ont été présentés dans la littérature mais à ce jour un seul, celui développé par l'équipe de Koji Eto, a été développé pour une production en masse dans des bioréacteurs où les plaquettes sont libérées sous l'effet de flux turbulents. La majorité des autres systèmes s'appuie sur la perfusion au travers de chambres microfluidiques qui semblent peu adaptées à la montée en échelle importante requise pour répondre aux besoins transfusionnels. Un dispositif permettant la libération des plaquettes de culture de conception différente mais également basé sur l'application de flux turbulents a été généré au cours de cette thèse en collaboration avec un biophysicien. Il fait actuellement l'objet d'un dépôt d'un brevet dans lequel nous avons montré une morphologie et une fonctionnalité des plaquettes générées semblables aux plaquettes natives, à l'image de ce qui a été montré dans les travaux présentés dans la publication n°2.

Dans la comparaison des plaquettes issues de cellules CD34<sup>+</sup> ou d'IPSC, un point mis avant en faveur de ces dernières est la possibilité de produire des plaquettes universelles, incapables d'exposer les molécules HLA. Des plaquettes déficientes pour la  $\beta 2$  microglobuline ont permis d'obtenir des plaquettes négatives pour les principaux antigènes d'histocompatibilité (Lindsey and Papoutsakis 2012, Smith, Rozelle et al. 2013, Lindsey, Jiang et al. 2014, Pombo, Lamé et al. 2015). A nouveau ici le risque de transfuser des cellules génétiquement modifiées ne doit pas être sous-estimé. L'utilisation de lots de CD34<sup>+</sup> HLA génotypés permettrait de se prémunir des risques de réactions allo-immunes post-transfusionnelles.

En raison de la production toujours limitée des plaquettes de culture, une alternative serait la transfusion de MK obtenus en culture à partir de CSH. La faisabilité d'une telle technique a déjà été explorée chez l'Homme et si les résultats sont encourageants, un certain nombre de questions sont à résoudre pour que cette stratégie puisse être utilisée à grande échelle dans un cadre clinique (Bertolini, Battaglia et al. 1997)(Xi, Zhu et al. 2013)(Jarocha, Vo et al. 2018). Une première serait de savoir si les MK cultivés peuvent être directement infusés chez l'Homme, car étant de grande taille et formant en culture des agrégats ils pourraient occlure de petits

vaisseaux après leur transfusion. Bien que l'irradiation soit une solution avancée pour éliminer les risques tumorigènes liés à la transformation des MK obtenus *in vitro*, il reste à déterminer si l'irradiation des MK affecte la production de plaquettes et leur fonction *in vivo*. De plus, les conditions de culture ne récapitulant pas encore fidèlement le microenvironnement de la moelle osseuse, les MK obtenus ne sont pas dans un état de maturité optimal ce qui limite leur capacité à produire des plaquettes après perfusion (Di Buduo, Kaplan et al. 2017, Seo, Chen et al. 2018, Strassel, Gachet et al. 2018). Enfin, même si une étude montre, dans un modèle murin, la capacité de plaquettes humaines dérivées de MK humains transfusés à s'intégrer à la formation d'un thrombus, pour l'instant aucune équipe n'a apporté de preuves relatives à leur capacité à assurer une fonction hémostatique normale (Wang and Zheng 2016).

En conclusion bien que la perspective de transfuser des plaquettes de culture à grande échelle paraisse encore lointaine, les prochaines années vont très certainement apporter une bien meilleure connaissance des mécanismes et acteurs impliqués dans la mégacaryopoïèse et la production efficace des plaquettes. La, ou les voies, passant par l'AHR est une des pistes prometteuses dans ce sens. Enfin, malgré les limites actuelles de nos systèmes de culture, les résultats montrant l'obtention de plaquettes très similaires aux plaquettes natives rassurent sur la capacité de transférer les données qui seront obtenues au niveau mécanistique vers la production de plaquettes répondant aux besoins de la transfusion.

## **Bibliographie**

---



A

Abbonante, V., C. A. Di Buduo, C. Gruppi, A. Malara, U. Gianelli, G. Celesti, A. Anselmo, L. Laghi, M. Vercellino, L. Visai, A. Iurlo, R. Moratti, G. Barosi, V. Rosti and A. Balduini (2016). "Thrombopoietin/TGF-beta1 Loop Regulates Megakaryocyte Extracellular Matrix Component Synthesis." Stem Cells **34**(4): 1123-1133.

Adams, G. B. and D. T. Scadden (2006). "The hematopoietic stem cell in its place." Nat Immunol **7**(4): 333-337.

Aguilar, A., J. Boscher, F. Pertuy, C. Gachet and C. Leon (2018). "Three-Dimensional Culture in a Methylcellulose-Based Hydrogel to Study the Impact of Stiffness on Megakaryocyte Differentiation." Methods Mol Biol **1812**: 139-153.

Aguilar, A., F. Pertuy, A. Eckly, C. Strassel, D. Collin, C. Gachet, F. Lanza and C. Leon (2016). "Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation." Blood **128**(16): 2022-2032.

Aguilar, A., J. Weber, J. Boscher, M. Freund, C. Ziessel, A. Eckly, S. Magnenat, C. Bourdon, B. Hechler, P. H. Mangin, C. Gachet, F. Lanza and C. Leon (2019). "Combined deficiency of RAB32 and RAB38 in the mouse mimics Hermansky-Pudlak syndrome and critically impairs thrombosis." Blood Adv **3**(15): 2368-2380.

Angelos, M. G., P. N. Ruh, B. R. Webber, R. H. Blum, C. D. Ryan, L. Bendzick, S. Shim, A. M. Yingst, D. M. Tufa, M. R. Verneris and D. S. Kaufman (2017). "Aryl hydrocarbon receptor inhibition promotes hematolymphoid development from human pluripotent stem cells." Blood **129**(26): 3428-3439.

Angiolillo, D. J., F. Rollini, R. F. Storey, D. L. Bhatt, S. James, D. J. Schneider, D. Sibbing, D. Y. F. So, D. Trenk, D. Alexopoulos, P. A. Gurbel, W. Hochholzer, L. De Luca, L. Bonello, D. Aradi, T. Cuisset, U. S. Tantry, T. Y. Wang, M. Valgimigli, R. Waksman, R. Mehran, G. Montalescot, F. Franchi and M. J. Price (2017). "International Expert Consensus on Switching Platelet P2Y12 Receptor-Inhibiting Therapies." Circulation **136**(20): 1955-1975.

Antkowiak, A., J. Viaud, S. Severin, M. Zanoun, L. Ceccato, G. Chicanne, C. Strassel, A. Eckly, C. Leon, C. Gachet, B. Payrastre and F. Gaits-lacovoni (2016). "Cdc42-dependent F-actin dynamics drive structuration of the demarcation membrane system in megakaryocytes." J Thromb Haemost **14**(6): 1268-1284.

Assefa, E. G., Q. Yan, S. B. Gezahegn, M. T. M. Salissou, S. He, N. Wu, X. Zuo and C. Ying (2019). "Role of Resveratrol on Indoxyl Sulfate-Induced Endothelial Hyperpermeability via Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)/Src-Dependent Pathway." Oxid Med Cell Longev **2019**: 5847040.

Assoian, R. K., A. Komoriya, C. A. Meyers, D. M. Miller and M. B. Sporn (1983). "Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization." Journal of Biological Chemistry **258**(11): 7155-7160.

Au - Perdomo, J., F. Au - Yan, H. H. L. Au - Leung and B. H. Au - Chong (2017). "Megakaryocyte Differentiation and Platelet Formation from Human Cord Blood-derived CD34+ Cells." JoVE(130): e56420.

Avanzi, M. P., O. E. Oluwadara, M. M. Cushing, M. L. Mitchell, S. Fischer and W. B. Mitchell (2016). "A novel bioreactor and culture method drives high yields of platelets from stem cells." Transfusion **56**(1): 170-178.

## B

Baccini, V., L. Roy, N. Vitrat, H. Chagraoui, S. Sabri, J. P. Le Couedic, N. Debili, F. Wendling and W. Vainchenker (2001). "Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes." Blood **98**(12): 3274-3282.

Bain, B. J. and M. Bhavnani (2011). "Gray platelet syndrome." Am J Hematol **86**(12): 1027.

Balduini, C. L. and A. Savoia (2012). "Genetics of familial forms of thrombocytopenia." Human Genetics **131**(12): 1821-1832.

Barone, G., A. Storelli, N. C. Quaglia, A. Dambrosio, R. Garofalo, R. Chiumarulo and M. M. Storelli (2019). "Dioxin and PCB residues in meats from Italy: Consumer dietary exposure." Food Chem Toxicol **133**: 110717.

Barouki, R., M. Aggerbeck, L. Aggerbeck and X. Coumoul (2012). "The aryl hydrocarbon receptor system." Drug Metabolism and Drug Interactions **27**(1): 3.

Barrett, D., R. Morris, F. Akhtar and J. Michalek (2001). "Serum Dioxin and Cognitive Functioning among Veterans of Operation Ranch Hand." Neurotoxicology **22**: 491-502.

Batard, P., M. N. Monier, N. Fortunel, K. Ducos, P. Sansilvestri-Morel, T. Phan, A. Hatzfeld and J. A. Hatzfeld (2000). "TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation." Journal of Cell Science **113**(3): 383.

Becker, R. P. and P. P. De Bruyn (1976). "The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation." Am J Anat **145**(2): 183-205.

Beguín, Y. (1999). "Erythropoietin and platelet production." Haematologica **84**(6): 541-547.

Behnke, O. (1967). "Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet." The Anatomical Record **158**(2): 121-137.

Behnke, O. (1968). "An electron microscope study of the megacaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat." J Ultrastruct Res **24**(5): 412-433.

Behnke, O. and T. Zelander (1966). "Substructure in negatively stained microtubules of mammalian blood platelets." Exp Cell Res **43**(1): 236-239.

Beischlag, T. V., J. Luis Morales, B. D. Hollingshead and G. H. Perdew (2008). "The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **18**(3): 207-250.

Ben-Shushan, E., J. R. Thompson, L. J. Gudas and Y. Bergman (1998). "Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site." Mol Cell Biol **18**(4): 1866-1878.

Berger, G., J. M. Masse and E. M. Cramer (1996). "Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V." Blood **87**(4): 1385-1395.

Beriou, G., E. M. Bradshaw, E. Lozano, C. M. Costantino, W. D. Hastings, T. Orban, W. Elyaman, S. J. Khoury, V. K. Kuchroo, C. Baecher-Allan and D. A. Hafler (2010). "TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **185**(1): 46-54.

Bertolini, F., M. Battaglia, P. Pedrazzoli, G. Antonio Da Prada, A. Lanza, D. Soligo, L. Caneva, B. Sarina, S. Murphy, T. Thomas and G. Robustelli della Cuna (1997). "Megakaryocytic Progenitors Can Be Generated Ex Vivo and Safely Administered to Autologous Peripheral Blood Progenitor Cell Transplant Recipients." Blood **89**(8): 2679-2688.

Best, D., Y. A. Senis, G. E. Jarvis, H. J. Eagleton, D. J. Roberts, T. Saito, S. M. Jung, M. Moroi, P. Harrison, F. R. Green and S. P. Watson (2003). "GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear." Blood **102**(8): 2811-2818.

Blair, P. and R. Flaumenhaft (2009). "Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates." Blood Reviews **23**(4): 177-189.

Blin, A., A. Le Goff, A. Magniez, S. Poirault-Chassac, B. Teste, G. Sicot, K. A. Nguyen, F. S. Hamdi, M. Reyssat and D. Baruch (2016). "Microfluidic model of the platelet-generating organ: beyond bone marrow biomimetics." Scientific Reports **6**(1): 21700.

Bluteau, D., A. C. Glembotsky, A. Raimbault, N. Balayn, L. Gilles, P. Rameau, P. Nurden, M. C. Alessi, N. Debili, W. Vainchenker, P. G. Heller, R. Favier and H. Raslova (2012). "Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression." Blood **120**(13): 2708-2718.

Bock, K. W. (2019). "Aryl hydrocarbon receptor (AHR): From selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions." Biochem Pharmacol **168**: 65-70.

Bock, K. W. and C. Kohle (2005). "Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis." Biochem Pharmacol **69**(10): 1403-1408.

Boitano, A. E., J. Wang, R. Romeo, L. C. Bouchez, A. E. Parker, S. E. Sutton, J. R. Walker, C. A. Flaveny, G. H. Perdew, M. S. Denison, P. G. Schultz and M. P. Cooke (2010). "Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells." Science (New York, N.Y.) **329**(5997): 1345-1348.

Boneu, B. and J. Cazenave (1997). Introduction à l'étude de l'hémostase et de la trombose.

Boneu, B., A. Robert, P. Sie, M. Elkoury, C. Liverato, C. Caranobe and C. Nouvel (1982). "Coulter Counter studies of hypotonic-induced macrothrombocytosis in normal subjects and in idiopathic thrombocytopenic purpura patients." Br J Haematol **51**(2): 305-311.

Bornert, A., J. Boscher, F. Pertuy, A. Eckly, D. Stegner, C. Strassel, C. Gachet, F. Lanza and C. Leon (2020). "Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation." Haematologica.

Bowman, S. L., J. Bi-Karchin, L. Le and M. S. Marks (2019). "The road to lysosome-related organelles: Insights from Hermansky-Pudlak syndrome and other rare diseases." Traffic **20**(6): 404-435.

Briddell, R. A., J. E. Brandt, J. E. Straneva, E. F. Srouf and R. Hoffman (1989). "Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte." Blood **74**(1): 145-151.

Broos, K., H. B. Feys, S. F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke and H. Deckmyn (2011). "Platelets at work in primary hemostasis." Blood Rev **25**(4): 155-167.

Broudy, V. C. (1997). "Stem Cell Factor and Hematopoiesis." Blood **90**(4): 1345-1364.  
Brown, E., L. M. Carlin, C. Nerlov, C. Lo Celso and A. W. Poole (2018). "Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels." Life Sci Alliance **1**(2).

Bryder, D., D. J. Rossi and I. L. Weissman (2006). "Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell." Am J Pathol **169**(2): 338-346.

Buchanan, D. L., T. Sato, R. E. Peterson and P. S. Cooke (2000). "Anti-estrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse uterus: critical role of the aryl hydrocarbon receptor in stromal tissue." Toxicol Sci **57**(2): 302-311.

Bunting, S., R. Widmer, T. Lipari, L. Rangell, H. Steinmetz, K. Carver-Moore, M. W. Moore, G.-A. Keller and F. J. de Sauvage (1997). "Normal Platelets and Megakaryocytes Are Produced In Vivo in the Absence of Thrombopoietin." Blood **90**(9): 3423-3429.

## C

Canobbio, I., C. Balduini and M. Torti (2004). "Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex." Cellular Signalling **16**(12): 1329-1344.

Carrington, P. A., R. J. Hill, P. E. Stenberg, J. Levin, L. Corash, J. Schreurs, G. Baker and F. C. Levin (1991). "Multiple in vivo effects of interleukin-3 and interleukin-6 on murine megakaryocytopoiesis." Blood **77**(1): 34.

Celikel, R., R. A. McClintock, J. R. Roberts, G. L. Mendolicchio, J. Ware, K. I. Varughese and Z. M. Ruggeri (2003). "Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha." Science **301**(5630): 218-221.

Chang, C. C., Y. M. Sue, N. J. Yang, Y. H. Lee and S. H. Juan (2014). "3-Methylcholanthrene, an AhR agonist, caused cell-cycle arrest by histone deacetylation through a RhoA-dependent recruitment of HDAC1 and pRb2 to E2F1 complex." PLoS One **9**(3): e92793.

Chang, E. T., P. Boffetta, H. O. Adami, P. Cole and J. S. Mandel (2014). "A critical review of the epidemiology of Agent Orange/TCDD and prostate cancer." Eur J Epidemiol **29**(10): 667-723.

Chapin, J. C. and K. A. Hajjar (2015). "Fibrinolysis and the control of blood coagulation." Blood Rev **29**(1): 17-24.

Chen, L., M. Kostadima, J. H. A. Martens, G. Canu, S. P. Garcia, E. Turro, K. Downes, I. C. Macaulay, E. Bielczyk-Maczynska, S. Coe, S. Farrow, P. Poudel, F. Burden, S. B. G. Jansen, W. J. Astle, A. Attwood, T. Bariana, B. de Bono, A. Breschi, J. C. Chambers, B. Consortium, F. A. Choudry, L. Clarke, P. Coupland, M. van der Ent, W. N. Erber, J. H. Jansen, R. Favier, M. E. Fenech, N. Foad, K. Freson, C. van Geet, K. Gomez, R. Guigo, D. Hampshire, A. M. Kelly, H. H. D. Kerstens, J. S. Kooner, M. Laffan, C. Lentaigne, C. Labalette, T. Martin, S. Meacham, A. Mumford, S. Nurnberg, E. Palumbo, B. A. van der Reijden, D. Richardson, S. J. Sammut, G. Slodkowitz, A. U. Tamuri, L. Vasquez, K. Voss, S. Watt, S. Westbury, P. Flicek, R. Loos, N. Goldman, P. Bertone, R. J. Read, S. Richardson, A. Cvejic, N. Soranzo, W. H. Ouwehand, H. G. Stunnenberg, M. Frontini and A. Rendon (2014). "Transcriptional diversity during lineage commitment of human blood progenitors." Science **345**(6204): 1251033.

Cheng, T., H. Shen, N. Rodrigues, S. Stier and D. T. Scadden (2001). "Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27(Kip1)." Blood **98**(13): 3643-3649.

Choi, E. S., J. L. Nichol, M. M. Hokom, A. C. Hornkohl and P. Hunt (1995). "Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional." Blood **85**(2): 402-413.

Ciovacco, W. A., W. H. Raskind and M. A. Kacena (2008). "Human phenotypes associated with GATA-1 mutations." Gene **427**(1): 1-6.

Civin, C. I., L. C. Strauss, C. Brovall, M. J. Fackler, J. F. Schwartz and J. H. Shaper (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." J Immunol **133**(1): 157-165.

Clay, D., E. Rubinstein, Z. Mishal, A. Anjo, M. Prenant, C. Jasmin, C. Boucheix and M. C. Le Bousse-Kerdiles (2001). "CD9 and megakaryocyte differentiation." Blood **97**(7): 1982-1989.

Cohen, S., P. E. Bigazzi and T. Yoshida (1974). "Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production." Cellular Immunology **12**(1): 150-159.

Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." Nature **407**(6801): 258-264.

Curtis, B. R. and J. G. McFarland (2014). "Human platelet antigens - 2013." Vox Sang **106**(2): 93-102.

## D

Dahlen, D. D., V. C. Broudy and J. G. Drachman (2003). "Internalization of the thrombopoietin receptor is regulated by 2 cytoplasmic motifs." Blood **102**(1): 102-108.

Davarinos, N. A. and R. S. Pollenz (1999). "Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export." J Biol Chem **274**(40): 28708-28715.



De Cuyper, I. M., M. Meinders, E. van de Vijver, D. de Korte, L. Porcelijn, M. de Haas, J. A. Eble, K. Seeger, S. Rutella, D. Pagliara, T. W. Kuijpers, A. J. Verhoeven, T. K. van den Berg and L. Gutierrez (2013). "A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay." Blood **121**(10): e70-80.

Debili, N., C. Issaad, J. M. Masse, J. Guichard, A. Katz, J. Breton-Gorius and W. Vainchenker (1992). "Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation." Blood **80**(12): 3022-3035.

Debili, N., C. Issaad, J. M. Masse, J. Guichard, A. Katz, J. Breton-Gorius and W. Vainchenker (1992). "Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation." Blood **80**(12): 3022-3035.

Denison, M. S. and S. R. Nagy (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 309-334.

Di Buduo, C. A., D. L. Kaplan and A. Balduini (2017). "In vitro generation of platelets: Where do we stand?" Transfus Clin Biol **24**(3): 273-276.

Di Buduo, C. A., L. S. Wray, L. Tozzi, A. Malara, Y. Chen, C. E. Ghezzi, D. Smoot, C. Sfara, A. Antonelli, E. Spedden, G. Bruni, C. Staii, L. De Marco, M. Magnani, D. L. Kaplan and A. Balduini (2015). "Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies." Blood **125**(14): 2254-2264.

Do Sacramento, V., L. Mallo, M. Freund, A. Eckly, B. Hechler, P. Mangin, F. Lanza, C. Gachet and C. Strassel (2020). "Functional properties of human platelets derived in vitro from CD34+ cells." Scientific Reports **10**(1): 914.

Donovan, M. G., O. I. Selmin and D. F. Romagnolo (2018). "Aryl Hydrocarbon Receptor Diet and Breast Cancer Risk." Yale J Biol Med **91**(2): 105-127.

Doobaree, I. U., A. Newland, V. McDonald, R. Nandigam, L. Mensah, S. Leroy, A. Seesagur, H. Patel, S. Wetten and D. Provan (2019). "Primary immune thrombocytopenia (ITP) treated with romiplostim in routine clinical practice: retrospective study from the United Kingdom ITP Registry." European Journal of Haematology **102**(5): 416-423.

Dou, H., Y. Duan, X. Zhang, Q. Yu, Q. Di, Y. Song, P. Li and Y. Gong (2019). "Aryl hydrocarbon receptor (AhR) regulates adipocyte differentiation by assembling CRL4B ubiquitin ligase to target PPAR $\gamma$  for proteasomal degradation." J Biol Chem **294**(48): 18504-18515.

Douay, L. (2012). "In vitro generation of red blood cells for transfusion: a model for regenerative medicine." Regen Med **7**(1): 1-2.

Douay, L. and M. C. Giarratana (2005). "The cultured red blood cell: a study tool with therapeutic perspectives." Cell Cycle **4**(8): 999-1000.

Drachman, J. G., J. D. Griffin and K. Kaushansky (1995). "The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl." J Biol Chem **270**(10): 4979-4982.

Du, X. and D. A. Williams (1997). "Interleukin-11: Review of Molecular, Cell Biology, and Clinical Use." Blood **89**(11): 3897-3908.

## E

Eckly, A., H. Heijnen, F. Pertuy, W. Geerts, F. Proamer, J.-Y. Rinckel, C. Léon, F. Lanza and C. Gachet (2014). "Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes." Blood **123**(6): 921.

Eckly, A., C. Strassel, J. P. Cazenave, F. Lanza, C. Leon and C. Gachet (2012). "Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment." Methods Mol Biol **788**: 175-192.

Eckly, A., C. Strassel, M. Freund, J. P. Cazenave, F. Lanza, C. Gachet and C. Leon (2009). "Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation." Blood **113**(14): 3182-3189.

Edgar, B. A. and T. L. Orr-Weaver (2001). "Endoreplication Cell Cycles: More for Less." Cell **105**(3): 297-306.

Elagib, K. E., F. K. Racke, M. Mogass, R. Khetawat, L. L. Delehanty and A. N. Goldfarb (2003). "RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation." Blood **101**(11): 4333-4341.

## F

Falcao, L. (1974). "[Ultrastructural study of megakaryocytes in Glanzmann's syndrome]." Blut **28**(5): 337-350.

Fanelli, R., M. P. Bertoni, M. G. Castelli, C. Chiabrando, G. P. Martelli, A. Nosedà, S. Garattini, C. Binaghi, V. Marazza and F. Pezza (1980). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxic effects and tissue levels in animals from the contaminated area of Seveso, Italy." Arch Environ Contam Toxicol **9**(5): 569-577.

Feng, Q., N. Shabrani, J. N. Thon, H. Huo, A. Thiel, K. R. Machlus, K. Kim, J. Brooks, F. Li, C. Luo, E. A. Kimbrel, J. Wang, K. S. Kim, J. Italiano, J. Cho, S. J. Lu and R. Lanza (2014). "Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells." Stem Cell Reports **3**(5): 817-831.

Ferkowicz, M. J., M. Starr, X. Xie, W. Li, S. A. Johnson, W. C. Shelley, P. R. Morrison and M. C. Yoder (2003). "CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo." Development **130**(18): 4393-4403.

Fernandez-Salguero, P. M., D. M. Hilbert, S. Rudikoff, J. M. Ward and F. J. Gonzalez (1996). "Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity." Toxicol Appl Pharmacol **140**(1): 173-179.

Fibbe, W. E., W. A. Noort, F. Schipper and R. Willemze (2001). "Ex vivo expansion and engraftment potential of cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice." Ann N Y Acad Sci **938**: 9-17.

Fielder, P. J., P. Hass, M. Nagel, E. Stefanich, R. Widmer, G. L. Bennett, G. A. Keller, F. J. de Sauvage and D. Eaton (1997). "Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin." Blood **89**(8): 2782-2788.

Fiore, M., C. Garcia, P. Sié, R. Favier, C. Lavenu-Bombled, M.-F. Hurtaud, C. Gachet, M.-C. Alessi and A. Dupuis (2017). "δ-storage pool disease: an underestimated cause of unexplained bleeding." Hématologie **23**(4): 243-254.

Fontana, P., A. Zufferey, Y. Daali and J. L. Reny (2014). "Antiplatelet therapy: targeting the TxA2 pathway." J Cardiovasc Transl Res **7**(1): 29-38.

Frojmovic, M. M. and J. G. Milton (1982). "Human platelet size, shape, and related functions in health and disease." Physiol Rev **62**(1): 185-261.

Fujiki, H., T. Kimura, H. Minamiguchi, S. Harada, J. Wang, M. Nakao, S. Yokota, Y. Urata, Y. Ueda, H. Yamagishi and Y. Sonoda (2002). "Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture." Experimental Hematology **30**(12): 1373-1380.

Furness, S. G. and K. McNagny (2006). "Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis." Immunol Res **34**(1): 13-32.

## G

Gabriely, G., M. A. Wheeler, M. C. Takenaka and F. J. Quintana (2017). "Role of AHR and HIF-1alpha in Glioblastoma Metabolism." Trends Endocrinol Metab **28**(6): 428-436.

Gachet, C. (2006). "Regulation of platelet functions by P2 receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 277-300.

Gachet, C. (2008). "P2 receptors, platelet function and pharmacological implications." Thromb Haemost **99**(3): 466-472.

Gainsford, T., H. Nandurkar, D. Metcalf, L. Robb, C. G. Begley and W. S. Alexander (2000). "The residual megakaryocyte and platelet production in c-Mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor." Blood **95**(2): 528-534.

Gary, E. F., L. Sheldon, A. S. Luis, B. S. Leo and E. L. Samuel (2013). "The Role of Recombinant Human Platelet-derived Growth Factor-BB (rhPDGF-BB) in Orthopaedic Bone Repair and Regeneration." Current Pharmaceutical Design **19**(19): 3384-3390.

Geng, Y., Q. Yu, E. Sicinska, M. Das, J. E. Schneider, S. Bhattacharya, W. M. Rideout, R. T. Bronson, H. Gardner and P. Sicinski (2003). "Cyclin E ablation in the mouse." Cell **114**(4): 431-443.

Gialitakis, M., M. Tolaini, Y. Li, M. Pardo, L. Yu, A. Toribio, J. S. Choudhary, K. Niakan, V. Papayannopoulos and B. Stockinger (2017). "Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Interferes with Early Embryonic Development." Stem Cell Reports **9**(5): 1377-1386.

Giarratana, M. C., L. Kobari, H. Lapillonne, D. Chalmers, L. Kiger, T. Cynober, M. C. Marden, H. Wajcman and L. Douay (2005). "Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells." Nat Biotechnol **23**(1): 69-74.

Green, S. M., M. P. Padula, D. C. Marks and L. Johnson (2020). "The Lipid Composition of Platelets and the Impact of Storage: An Overview." Transfus Med Rev **34**(2): 108-116.

Grossman, C. M., A. M. Macewan and J. Dillely (1960). "The halflife of human platelet phosphatide." Nature **188**: 950-951.

Grozovsky, R., S. Giannini, H. Falet and K. M. Hoffmeister (2015). "Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond." Blood **126**(16): 1877-1884.

Gutierrez-Vazquez, C. and F. J. Quintana (2018). "Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor." Immunity **48**(1): 19-33.

## H

Haas, S., A. Trumpp and M. D. Milsom (2018). "Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity." Cell Stem Cell **22**(5): 627-638.

Hahn, M. E. (2002). "Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution." Chem Biol Interact **141**(1-2): 131-160.

Hahn, M. E., L. L. Allan and D. H. Sherr (2009). "Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor." Biochem Pharmacol **77**(4): 485-497.

Han, T., L. Stutzman, E. Cohen and U. Kim (1966). "Effect of platelet transfusion on hemorrhage in patients with acute leukemia. An autopsy study." Cancer **19**(12): 1937-1942.

Handagama, P. J., B. F. Feldman, N. C. Jain, T. B. Farver and C. S. Kono (1987). "Circulating proplatelets: isolation and quantitation in healthy rats and in rats with induced acute blood loss." American journal of veterinary research **48**(6): 962-965.

Hao, S., C. Chen and T. Cheng (2016). "Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells." Int J Hematol **103**(5): 487-497.

Heazlewood, S. Y., S. K. Nilsson, K. Cartledge, C. L. Be, A. Vinson, M. Gel and D. N. Haylock (2017). "Progress in bio-manufacture of platelets for transfusion." Platelets **28**(7): 649-656.

Hechler, B., M. Cattaneo and C. Gachet (2005). "The P2 Receptors in Platelet Function." Semin Thromb Hemost **31**(02): 150-161.

Heizmann, B., P. Kastner and S. Chan (2018). "The Ikaros family in lymphocyte development." Curr Opin Immunol **51**: 14-23.

Hitchcock, I. S., M. M. Chen, J. R. King and K. Kaushansky (2008). "YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation." Blood **112**(6): 2222-2231.

Holinstat, M. (2017). "Normal platelet function." Cancer Metastasis Rev **36**(2): 195-198.

Holmsen, H. and H. J. Weiss (1979). "Secretable Storage Pools in Platelets." Annual Review of Medicine **30**(1): 119-134.

Howell, W. H. (1890). "Observations upon the occurrence, structure, and function of the giant cells of the marrow." Journal of Morphology **4**(1): 117-130.

Hu, Z., N. Van Rooijen and Y. G. Yang (2011). "Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice." Blood **118**(22): 5938-5946.

Huang, J. S., S. K. Ramamurthy, X. Lin and G. C. Le Breton (2004). "Cell signalling through thromboxane A2 receptors." Cell Signal **16**(5): 521-533.

Humbrecht, C., D. Kientz and C. Gachet (2018). "Platelet transfusion: Current challenges." Transfus Clin Biol **25**(3): 151-164.

I

Ikuta, T., H. Eguchi, T. Tachibana, Y. Yoneda and K. Kawajiri (1998). "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **273**(5): 2895-2904.

Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-267.

Italiano, J. E., Jr., P. Lecine, R. A. Shivdasani and J. H. Hartwig (1999). "Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes." J Cell Biol **147**(6): 1299-1312.

Ito, K. and K. Ito (2018). "Hematopoietic stem cell fate through metabolic control." Experimental Hematology **64**: 1-11.

Ito, Y., S. Nakamura, N. Sugimoto, T. Shigemori, Y. Kato, M. Ohno, S. Sakuma, K. Ito, H. Kumon, H. Hirose, H. Okamoto, M. Nogawa, M. Iwasaki, S. Kihara, K. Fujio, T. Matsumoto, N. Higashi, K. Hashimoto, A. Sawaguchi, K.-i. Harimoto, M. Nakagawa, T. Yamamoto, M. Handa, N. Watanabe, E. Nishi, F. Arai, S. Nishimura and K. Eto (2018). "Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production." Cell **174**(3): 636-648.e618.

## J

Jarocho, D., K. K. Vo, R. B. Lyde, V. Hayes, R. M. Camire and M. Poncz (2018). "Enhancing functional platelet release in vivo from in vitro-grown megakaryocytes using small molecule inhibitors." Blood advances **2**(6): 597-606.

Jayapal, S. R. and P. Kaldis (2013). "Cyclin E1 regulates hematopoietic stem cell quiescence." Cell Cycle **12**(23): 3588.

Junt, T., H. Schulze, Z. Chen, S. Massberg, T. Goerge, A. Krueger, D. D. Wagner, T. Graf, J. E. Italiano, R. A. Shivdasani and U. H. von Andrian (2007). "Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow." Science **317**(5845): 1767.

Juricek, L., J. Carcaud, A. Pelhaitre, T. T. Riday, A. Chevallier, J. Lanzini, N. Auzeil, O. Laprevote, F. Dumont, S. Jacques, F. Letourneur, C. Massaad, C. Agulhon, R. Barouki, M. Beraneck and X. Coumoul (2017). "AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation." Sci Rep **7**(1): 9794.

Juricek, L. and X. Coumoul (2018). "The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System." Int J Mol Sci **19**(9).



**K**

Kahn, M. L., M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara and S. R. Coughlin (1999). "Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin." The Journal of Clinical Investigation **103**(6): 879-887.

Kasirer-Friede, A., M. L. Kahn and S. J. Shattil (2007). "Platelet integrins and immunoreceptors." Immunol Rev **218**: 247-264.

Kaushansky, K. (1998). "Thrombopoietin." New England Journal of Medicine **339**(11): 746-754.

Kaushansky, K. (2006). "Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors." New England Journal of Medicine **354**(19): 2034-2045.

Kazlauskas, A., L. Poellinger and I. Pongratz (2000). "The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor." J Biol Chem **275**(52): 41317-41324.

Kelsey, K. T., M. Rytel, E. Dere, R. Butler, M. Eliot, S. M. Huse, E. A. Houseman, D. C. Koestler and K. Boekelheide (2019). "Serum dioxin and DNA methylation in the sperm of operation ranch hand veterans exposed to Agent Orange." Environ Health **18**(1): 91.

Kewley, R. J., M. L. Whitelaw and A. Chapman-Smith (2004). "The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators." Int J Biochem Cell Biol **36**(2): 189-204.

Kieffer, N., J. Guichard, J. P. Farcet, W. Vainchenker and J. Breton-Gorius (1987). "Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets." Eur J Biochem **164**(1): 189-195.

Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst and S. J. Morrison (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.

Kojima, H., M. Moroi, S. M. Jung, S. Goto, N. Tamura, Y. Kozuma, K. Suzukawa and T. Nagasawa (2006). "Characterization of a patient with glycoprotein (GP) VI deficiency possessing neither anti-GPVI autoantibody nor genetic aberration." J Thromb Haemost **4**(11): 2433-2442.

Kolluri, S. K., U. H. Jin and S. Safe (2017). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target." Arch Toxicol **91**(7): 2497-2513.

Korbecki, J., I. Baranowska-Bosiacka, I. Gutowska and D. Chlubek (2014). "Cyclooxygenase pathways." Acta Biochim Pol **61**(4): 639-649.

Koupenova, M., B. E. Kehrel, H. A. Corkrey and J. E. Freedman (2017). "Thrombosis and platelets: an update." Eur Heart J **38**(11): 785-791.

Kraft, P., C. Drechsler, I. Gunreben, P. U. Heuschmann and C. Kleinschnitz (2015). "Case-control study of platelet glycoprotein receptor Ib and IIb/IIIa expression in patients with acute and chronic cerebrovascular disease." PLoS One **10**(3): e0119810.

Ku, C. J., T. Hosoya, I. Maillard and J. D. Engel (2012). "GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry." Blood **119**(10): 2242-2251.

Kudo, I., M. Hosaka, A. Haga, N. Tsuji, Y. Nagata, H. Okada, K. Fukuda, Y. Kakizaki, T. Okamoto, E. Grave and H. Itoh (2018). "The regulation mechanisms of AhR by molecular chaperone complex." J Biochem **163**(3): 223-232.

Kuter, D. J. (2013). "The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists." International Journal of Hematology **98**(1): 10-23.

Kuter, D. J. and R. D. Rosenberg (1995). "The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit." Blood **85**(10): 2720-2730.

## L

Lacaud, G. and V. Kouskoff (2017). "Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis." Exp Hematol **49**: 19-24.

Lambert, M. P., L. Rauova, M. Bailey, M. C. Sola-Visner, M. A. Kowalska and M. Poncz (2007). "Platelet factor 4 is a negative autocrine in vivo regulator of megakaryopoiesis: clinical and therapeutic implications." Blood **110**(4): 1153-1160.

Lambert, M. P., L. Xiao, Y. Nguyen, M. A. Kowalska and M. Poncz (2011). "The role of platelet factor 4 in radiation-induced thrombocytopenia." Int J Radiat Oncol Biol Phys **80**(5): 1533-1540.

Lanza, F. (2006). "Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic thrombocytic dystrophy)." Orphanet journal of rare diseases **1**: 46-46.

Larigot, L., L. Juricek, J. Dairou and X. Coumoul (2018). "AhR signaling pathways and regulatory functions." Biochim Open **7**: 1-9.

Lee, J., R. S. Yoon, I. Choi and H. Jung (2019). "Causes and Mechanisms of Hematopoietic Stem Cell Aging." International Journal of Molecular Sciences **20**(6).

Lefrançois, E., G. Ortiz-Muñoz, A. Caudrillier, B. Mallavia, F. Liu, D. M. Sayah, E. E. Thornton, M. B. Headley, T. David, S. R. Coughlin, M. F. Krummel, A. D. Leavitt, E. Passegué and M. R. Looney (2017). "The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors." Nature **544**: 105.

Lepage, A., M. Leboeuf, J. P. Cazenave, C. de la Salle, F. Lanza and G. Uzan (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**(13): 4169-4177.

Levin, J., J. P. Peng, G. R. Baker, J. L. Villeval, P. Lecine, S. A. Burstein and R. A. Shivdasani (1999). "Pathophysiology of thrombocytopenia and anemia in mice lacking transcription factor NF-E2." Blood **94**(9): 3037-3047.

Levine, R. F. (1980). "Isolation and characterization of normal human megakaryocytes." Br J Haematol **45**(3): 487-497.

Levine, R. F., P. A. Bunn, Jr., K. C. Hazzard and M. L. Schlam (1980). "Flow cytometric analysis of megakaryocyte ploidy. Comparison with Feulgen microdensitometry and discovery that 8N is the predominant ploidy class in guinea pig and monkey marrow." Blood **56**(2): 210-217.

Levine, R. F., K. C. Hazzard and J. D. Lamberg (1982). "The significance of megakaryocyte size." Blood **60**(5): 1122-1131.

Li, J. (2011). "Quiescence regulators for hematopoietic stem cell." Exp Hematol **39**(5): 511-520.

Li, L. and R. Bhatia (2011). "Stem cell quiescence." Clin Cancer Res **17**(15): 4936-4941.

Li, R. and J. Emsley (2013). "The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex." J Thromb Haemost **11**(4): 605-614.

Li, S., J. J. Heller, J. W. Bostick, A. Lee, H. Schjerven, P. Kastner, S. Chan, Z. E. Chen and L. Zhou (2016). "Ikaros Inhibits Group 3 Innate Lymphoid Cell Development and Function by Suppressing the Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway." Immunity **45**(1): 185-197.

Li, Y., S. Innocentin, D. R. Withers, N. A. Roberts, A. R. Gallagher, E. F. Grigorieva, C. Wilhelm and M. Veldhoen (2011). "Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation." Cell **147**(3): 629-640.

Li, Y., C. Jin, H. Bai, Y. Gao, S. Sun, L. Chen, L. Qin, P. P. Liu, L. Cheng and Q.-F. Wang (2018). "Human NOTCH4 is a key target of RUNX1 in megakaryocytic differentiation." Blood **131**(2): 191-201.

Lindsey, S., J. Jiang, D. Woulfe and E. Papoutsakis (2014). "Platelets from mice lacking the aryl hydrocarbon receptor (AHR) exhibit defective collagen-dependent signaling." Journal of thrombosis and haemostasis : JTH **12**(3): 383-394.

Lindsey, S. and E. T. Papoutsakis (2012). "The Evolving Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in the Normophysiology of Hematopoiesis." Stem cell reviews **8**(4): 1223-1235.

Lindsey, S. and E. T. Papoutsakis (2011). "The aryl hydrocarbon receptor (AHR) transcription factor regulates megakaryocytic polyploidization." British journal of haematology **152**(4): 469-484.

Liu, A., S. Li, V. Donnenberg, J. Fu, S. M. Gollin, H. Ma, C. Lu, D. B. Stolz, M. Y. Mapara, S. A. Monaghan and S. Lentzsch (2018). "Immunomodulatory drugs downregulate IKZF1 leading to expansion of hematopoietic progenitors with concomitant block of megakaryocytic maturation." Haematologica **103**(10): 1688.

Lordier, L., D. Bluteau, A. Jalil, C. Legrand, J. Pan, P. Rameau, D. Jouni, O. Bluteau, T. Mercher, C. Leon, C. Gachet, N. Debili, W. Vainchenker, H. Raslova and Y. Chang (2012). "RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization." Nat Commun **3**: 717.

## M

Macdonald, R. D. and M. Khajehpour (2013). "Effects of the osmolyte TMAO (Trimethylamine-N-oxide) on aqueous hydrophobic contact-pair interactions." Biophys Chem **184**: 101-107.

Machlus, K. R. and J. E. Italiano, Jr. (2013). "The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation." J Cell Biol **201**(6): 785-796.

Majumdar, S., D. Gonder, B. Koutsis and M. Poncz (1991). "Characterization of the human beta-thromboglobulin gene. Comparison with the gene for platelet factor 4." Journal of Biological Chemistry **266**(9): 5785-5789.

Malinge, S., C. Thiollier, T. M. Chlon, L. C. Doré, L. Diebold, O. Bluteau, V. Mabialah, W. Vainchenker, P. Dessen, S. Winandy, T. Mercher and J. D. Crispino (2013). "Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling." Blood **121**(13): 2440-2451.

Marinkovic, N., D. Pasalic, G. Ferencak, B. Grskovic and A. Stavljenic Rukavina (2010). "Dioxins and human toxicity." Arh Hig Rada Toksikol **61**(4): 445-453.

Mazzi, S., L. Lordier, N. Debili, H. Raslova and W. Vainchenker (2018). "Megakaryocyte and polyploidization." Experimental Hematology **57**: 1-13.

McDonald, T., R. Clift and M. Cottrell (1992). "Large, chronic doses of erythropoietin cause thrombocytopenia in mice [see comments]." Blood **80**(2): 352-358.

Metcalf, D. (1991). "The leukemia inhibitory factor (LIF)." The International Journal of Cell Cloning **9**(2): 95-108.

Mimura, J. and Y. Fujii-Kuriyama (2003). "Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD." Biochim Biophys Acta **1619**(3): 263-268.

Miyata, Y., Y. Liu, V. Jankovic, G. Sashida, J. M. Lee, J. H. Shieh, T. Naoe, M. Moore and S. D. Nimer (2010). "Cyclin C regulates human hematopoietic stem/progenitor cell quiescence." Stem Cells **28**(2): 308-317.

Mohammad, K., P. Dakik, Y. Medkour, D. Mitrofanova and V. I. Titorenko (2019). "Quiescence Entry, Maintenance, and Exit in Adult Stem Cells." Int J Mol Sci **20**(9).

Moreau, T., A. L. Evans, L. Vasquez, M. R. Tijssen, Y. Yan, M. W. Trotter, D. Howard, M. Colzani, M. Arumugam, W. H. Wu, A. Dalby, R. Lampela, G. Bouet, C. M. Hobbs, D. C. Pask, H. Payne, T. Ponomaryov, A. Brill, N. Soranzo, W. H. Ouwehand, R. A.

Pedersen and C. Ghevaert (2016). "Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming." Nat Commun **7**: 11208.

Morrison, S. J. and A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." Cell **132**(4): 598-611.

Mossanen, M., A. S. Kibel and R. H. Goldman (2017). "Exploring exposure to Agent Orange and increased mortality due to bladder cancer." Urol Oncol **35**(11): 627-632.

Murone, M., D. A. Carpenter and F. J. de Sauvage (1998). "Hematopoietic Deficiencies in c-mpl and TPO Knockout Mice." STEM CELLS **16**(1): 1-6.

Murphy, A. J., N. Bijl, L. Yvan-Charvet, C. B. Welch, N. Bhagwat, A. Reheman, Y. Wang, J. A. Shaw, R. L. Levine, H. Ni, A. R. Tall and N. Wang (2013). "Cholesterol efflux in megakaryocyte progenitors suppresses platelet production and thrombocytosis." Nat Med **19**(5): 586-594.

Muto, M. (1976). "A scanning and transmission electron microscopic study on rat bone marrow sinuses and transmural migration of blood cells." Arch Histol Jpn **39**(1): 51-66.

## N

Nagata, Y., M. R. Jones, H. G. Nguyen, D. J. McCrann, C. St Hilaire, B. M. Schreiber, A. Hashimoto, M. Inagaki, W. C. Earnshaw, K. Todokoro and K. Ravid (2005). "Vascular smooth muscle cell polyploidization involves changes in chromosome passenger proteins and an endomitotic cell cycle." Exp Cell Res **305**(2): 277-291.

Nakagawa, Y., S. Nakamura, M. Nakajima, H. Endo, T. Dohda, N. Takayama, H. Nakauchi, F. Arai, T. Fukuda and K. Eto (2013). "Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes." Exp Hematol **41**(8): 742-748.

Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa and S. Yamanaka (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." *Nat Biotechnol* **26**(1): 101-106.

Nakamura, S., N. Takayama, S. Hirata, H. Seo, H. Endo, K. Ochi, K.-i. Fujita, T. Koike, K.-i. Harimoto, T. Dohda, A. Watanabe, K. Okita, N. Takahashi, A. Sawaguchi, S. Yamanaka, H. Nakauchi, S. Nishimura and K. Eto (2014). "Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* **14**(4): 535-548.

Nebert, D. W. (2017). "Aryl hydrocarbon receptor (AHR): "pioneer member" of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of "sensors" of foreign and endogenous signals." *Prog Lipid Res* **67**: 38-57.

Negahdaripour, M., N. Nezafat and Y. Ghasemi (2016). "A panoramic review and in silico analysis of IL-11 structure and function." *Cytokine & Growth Factor Reviews* **32**: 41-61.

Neildez-Nguyen, T. M., H. Wajcman, M. C. Marden, M. Bensidhoum, V. Moncollin, M. C. Giarratana, L. Kobari, D. Thierry and L. Douay (2002). "Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo." *Nat Biotechnol* **20**(5): 467-472.

Nishikii, H., N. Kurita and S. Chiba (2017). "The Road Map for Megakaryopoietic Lineage from Hematopoietic Stem/Progenitor Cells." *Stem Cells Transl Med* **6**(8): 1661-1665.

Nitz, R., J. Lokau, S. Aparicio-Siegmund, J. Scheller and C. Garbers (2015). "Modular organization of Interleukin-6 and Interleukin-11  $\alpha$ -receptors." *Biochimie* **119**: 175-182.

Noetzli, L. J., S. L. French and K. R. Machlus (2019). "New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**(7): 1288-1300.



Notta, F., S. Zandi, N. Takayama, S. Dobson, O. I. Gan, G. Wilson, K. B. Kaufmann, J. McLeod, E. Laurenti, C. F. Dunant, J. D. McPherson, L. D. Stein, Y. Dror and J. E. Dick (2016). "Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny." Science **351**(6269): aab2116.

Nurden, A. T., X. Pillois and D. A. Wilcox (2013). "Glanzmann Thrombasthenia: State of the Art and Future Directions." Semin Thromb Hemost **39**(06): 642-655.

## O

Ofosu, F. A. and K. A. Nyarko (2000). "Human platelet thrombin receptors. Roles in platelet activation." Hematol Oncol Clin North Am **14**(5): 1185-1198, x.

Ohtake, F., Y. Fujii-Kuriyama and S. Kato (2009). "AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions." Biochem Pharmacol **77**(4): 474-484.

Ohtake, F., Y. Fujii-Kuriyama, K. Kawajiri and S. Kato (2011). "Cross-talk of dioxin and estrogen receptor signals through the ubiquitin system." J Steroid Biochem Mol Biol **127**(1-2): 102-107.

Ovrevik, J., M. Lag, V. Lecureur, D. Gilot, D. Lagadic-Gossmann, M. Refsnes, P. E. Schwarze, T. Skuland, R. Becher and J. A. Holme (2014). "AhR and Arnt differentially regulate NF-kappaB signaling and chemokine responses in human bronchial epithelial cells." Cell Commun Signal **12**: 48.

## P

Pallotta, I., M. Lovett, W. Rice, D. L. Kaplan and A. Balduini (2009). "Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis." PLoS One **4**(12): e8359.

Patel-Hett, S., J. L. Richardson, H. Schulze, K. Drabek, N. A. Isaac, K. Hoffmeister, R. A. Shivdasani, J. C. Bulinski, N. Galjart, J. H. Hartwig and J. E. Italiano, Jr. (2008).

"Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules." Blood **111**(9): 4605-4616.

Patel-Hett, S., H. Wang, A. J. Begonja, J. N. Thon, E. C. Alden, N. J. Wandersee, X. An, N. Mohandas, J. H. Hartwig and J. E. Italiano, Jr. (2011). "The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation." Blood **118**(6): 1641-1652.

Peytour, Y., A. Villacreces, J. Chevalleyre, Z. Ivanovic and V. Praloran (2013). "Discarded leukoreduction filters: a new source of stem cells for research, cell engineering and therapy?" Stem Cell Res **11**(2): 736-742.

Pick, M., L. Azzola, E. Osborne, E. G. Stanley and A. G. Elefanty (2013). "Generation of megakaryocytic progenitors from human embryonic stem cells in a feeder- and serum-free medium." PLoS One **8**(2): e55530.

Pierre, S., A. Chevallier, F. Teixeira-Clerc, A. Ambolet-Camoit, L. C. Bui, A. S. Bats, J. C. Fournet, P. Fernandez-Salguero, M. Aggerbeck, S. Lotersztajn, R. Barouki and X. Coumoul (2014). "Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin." Toxicol Sci **137**(1): 114-124.

Pietrzyk-Nivau, A., S. Poirault-Chassac, S. Gandrille, S. M. Derkaoui, A. Kauskot, D. Letourneur, C. Le Visage and D. Baruch (2015). "Three-Dimensional Environment Sustains Hematopoietic Stem Cell Differentiation into Platelet-Producing Megakaryocytes." PLoS One **10**(8): e0136652.

Poirault-Chassac, S., K. A. Nguyen, A. Pietrzyk, C. Casari, A. Veyradier, C. V. Denis and D. Baruch (2013). "Terminal Platelet Production is Regulated by Von Willebrand Factor." PLOS ONE **8**(5): e63810.

Poland, A., E. Glover and A. S. Kende (1976). "Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase." Journal of Biological Chemistry **251**(16): 4936-4946.

Pollenz, R. S. (2002). "The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation." Chem Biol Interact **141**(1-2): 41-61.

Pombo, M., M. W. Lamé, N. J. Walker, D. H. Huynh and F. Tablin (2015). "TCDD and omeprazole prime platelets through the aryl hydrocarbon receptor (AhR) non-genomic pathway." Toxicology Letters **235**(1): 28-36.

Potts, K. S., A. Farley, C. A. Dawson, J. Rimes, C. Biben, C. de Graaf, M. A. Potts, O. J. Stonehouse, A. Carmagnac, P. Gangatirkar, E. C. Josefsson, C. Anttila, D. Amann-Zalcenstein, S. Naik, W. S. Alexander, D. J. Hilton, E. D. Hawkins and S. Taoudi (2020). "Membrane budding is a major mechanism of in vivo platelet biogenesis." J Exp Med **217**(9).

Proulle, V., C. Strassel, C. Perrault, M. J. Baas, S. Moog, P. Mangin, P. Nurden, A. Nurden, F. Adam, M. Bryckaert, A. Kauskot, R. Li and F. Lanza (2019). "A novel missense mutation in a leucine-rich repeat of GPIIb/IIIa in a Bernard-Soulier variant reduces shear-dependent adherence on von Willebrand factor." Br J Haematol **186**(6): e184-e187.

Purton, L. E. and D. T. Scadden (2007). "Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays." Cell Stem Cell **1**(3): 263-270.

## Q

Qin, H. and J. A. Powell-Coffman (2004). "The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development." Dev Biol **270**(1): 64-75.

Quach, M. E., W. Chen and R. Li (2018). "Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage." Blood **131**(14): 1512-1521.

**R**

Racki, W. J., L. Covassin, M. Brehm, S. Pino, R. Ignatz, R. Dunn, J. Laning, S. K. Graves, A. A. Rossini, L. D. Shultz and D. L. Greiner (2010). "NOD-scid IL2rgamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection." Transplantation **89**(5): 527-536.

Rafii, S., F. Shapiro, R. Pettengell, B. Ferris, R. L. Nachman, M. A. Moore and A. S. Asch (1995). "Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors." Blood **86**(9): 3353-3363.

Raslova, H., A. Kauffmann, D. Sekkaï, H. Ripoche, F. Larbret, T. Robert, D. T. Le Roux, G. Kroemer, N. Debili, P. Dessen, V. Lazar and W. Vainchenker (2007). "Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach." Blood **109**(8): 3225.

Reick, M., R. W. Robertson, D. S. Pasco and J. B. Fagan (1994). "Down-regulation of nuclear aryl hydrocarbon receptor DNA-binding and transactivation functions: requirement for a labile or inducible factor." Mol Cell Biol **14**(9): 5653-5660.

Rendu, F. and B. Brohard-Bohn (2001). "The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions." Platelets **12**(5): 261-273.

Reya, T., A. W. Duncan, L. Ailles, J. Domen, D. C. Scherer, K. Willert, L. Hintz, R. Nusse and I. L. Weissman (2003). "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells." Nature **423**(6938): 409-414.

Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.

Rodgers, S. D., R. T. Camphausen and D. A. Hammer (2001). "Tyrosine Sulfation Enhances but Is Not Required for PSGL-1 Rolling Adhesion on P-Selectin." Biophysical Journal **81**(4): 2001-2009.

Rothhammer, V. and F. J. Quintana (2019). "The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease." Nat Rev Immunol **19**(3): 184-197.

Rowlands, J. C. and J. A. Gustafsson (1997). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." Crit Rev Toxicol **27**(2): 109-134.

## S

Sanada, C., J. Xavier-Ferrucio, Y.-C. Lu, E. Min, P.-X. Zhang, S. Zou, E. Kang, M. Zhang, G. Zerfati, P. G. Gallagher and D. S. Krause (2016). "Adult human megakaryocyte-erythroid progenitors are in the CD34+CD38mid fraction." Blood **128**(7): 923-933.

Schopf, F. H., M. M. Biebl and J. Buchner (2017). "The HSP90 chaperone machinery." Nat Rev Mol Cell Biol **18**(6): 345-360.

Schuhmann, M. K., J. Guthmann, G. Stoll, B. Nieswandt, P. Kraft and C. Kleinschnitz (2017). "Blocking of platelet glycoprotein receptor Ib reduces "thrombo-inflammation" in mice with acute ischemic stroke." J Neuroinflammation **14**(1): 18.

Schulte, K. W., E. Green, A. Wilz, M. Platten and O. Daumke (2017). "Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Activation." Structure **25**(7): 1025-1033.e1023.

Schulz, G., D. Krumwieh and W. Oster (1991). "Adjuvant therapy with recombinant interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Pharmacology & Therapeutics **52**(1): 85-94.

Seita, J. and I. L. Weissman (2010). "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **2**(6): 640-653.

Selvadurai, M. V. and J. R. Hamilton (2018). "Structure and function of the open canalicular system – the platelet's specialized internal membrane network." Platelets **29**(4): 319-325.

Seo, H., S. J. Chen, K. Hashimoto, H. Endo, Y. Nishi, A. Ohta, T. Yamamoto, A. Hotta, A. Sawaguchi, H. Hayashi, N. Koseki, G. J. Murphy, K. Fukuda, N. Sugimoto and K. Eto (2018). "A  $\beta$ 1-tubulin-based megakaryocyte maturation reporter system identifies novel drugs that promote platelet production." Blood advances **2**(17): 2262-2272.

Shiizaki, K., K. Kido and Y. Mizuta (2019). "Insight into the relationship between aryl-hydrocarbon receptor and beta-catenin in human colon cancer cells." PLoS One **14**(11): e0224613.

Shimizu, R., K. Ohneda, J. D. Engel, C. D. Trainor and M. Yamamoto (2004). "Transgenic rescue of GATA-1-deficient mice with GATA-1 lacking a FOG-1 association site phenocopies patients with X-linked thrombocytopenia." Blood **103**(7): 2560-2567.

Shinde, R. and T. L. McGaha (2018). "The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment." Trends Immunol **39**(12): 1005-1020.

Shivdasani, R. A. (2001). "Molecular and Transcriptional Regulation of Megakaryocyte Differentiation." STEM CELLS **19**(5): 397-407.

Shivdasani, R. A., Y. Fujiwara, M. A. McDevitt and S. H. Orkin (1997). "A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development." The EMBO journal **16**(13): 3965-3973.

Shivdasani, R. A., M. F. Rosenblatt, D. Zucker-Franklin, C. W. Jackson, P. Hunt, C. J. M. Saris and S. H. Orkin (1995). "Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development." Cell **81**(5): 695-704.

Sidney, L. E., M. J. Branch, S. E. Dunphy, H. S. Dua and A. Hopkinson (2014). "Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors." Stem Cells **32**(6): 1380-1389.

Sim, X., M. Poncz, P. Gadue and D. L. French (2016). "Understanding platelet generation from megakaryocytes: implications for in vitro–derived platelets." Blood **127**(10): 1227-1233.

Sixma, J. J., A. van den Berg, A. Hasilik, K. von Figura and H. J. Geuze (1985). "Immuno-electron microscopical demonstration of lysosomes in human blood platelets and megakaryocytes using anti-cathepsin D." Blood **65**(5): 1287-1291.

Smith, B. W., S. S. Rozelle, A. Leung, J. Ubellacker, A. Parks, S. K. Nah, D. French, P. Gadue, S. Monti, D. H. K. Chui, M. H. Steinberg, A. L. Frelinger, A. D. Michelson, R. Theberge, M. E. McComb, C. E. Costello, D. N. Kotton, G. Mostoslavsky, D. H. Sherr and G. J. Murphy (2013). "The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation." Blood **122**(3): 376.

Södergren, A. L., A.-C. B. Svensson Holm, S. Ramström, E. G. Lindström, M. Grenegård and K. Öllinger (2016). "Thrombin-induced lysosomal exocytosis in human platelets is dependent on secondary activation by ADP and regulated by endothelial-derived substances." Platelets **27**(1): 86-92.

Soshilov, A. and M. S. Denison (2008). "Role of the Per/Arnt/Sim domains in ligand-dependent transformation of the aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **283**(47): 32995-33005.

Soshilov, A. A., S. Motta, L. Bonati and M. S. Denison (2020). "Transitional States in Ligand-Dependent Transformation of the Aryl Hydrocarbon Receptor into Its DNA-Binding Form." Int J Mol Sci **21**(7).

Stoffel, R., S. Ziegler, N. Ghilardi, B. Ledermann, F. J. de Sauvage and R. C. Skoda (1999). "Permissive role of thrombopoietin and granulocyte colony-stimulating factor

receptors in hematopoietic cell fate decisions *in vivo*." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(2): 698-702.

Strassel, C., N. Brouard, L. Mallo, N. Receveur, P. Mangin, A. Eckly, I. Bieche, K. Tarte, C. Gachet and F. Lanza (2016). "Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets." Blood **127**(18): 2231-2240.

Strassel, C., A. Eckly, C. Leon, C. Petitjean, M. Freund, J. P. Cazenave, C. Gachet and F. Lanza (2009). "Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome." Haematologica **94**(6): 800-810.

Strassel, C., C. Gachet and F. Lanza (2018). "On the way to in vitro platelet production." Transfusion Clinique et Biologique **25**(3): 220-227.

Strassel, C., M. M. Magiera, A. Dupuis, M. Batzenschlager, A. Hovasse, I. Pleines, P. Gueguen, A. Eckly, S. Moog, L. Mallo, Q. Kimmerlin, S. Chappaz, J. M. Strub, N. Kathiresan, H. de la Salle, A. Van Dorsselaer, C. Ferec, J. Y. Py, C. Gachet, C. Schaeffer-Reiss, B. T. Kile, C. Janke and F. Lanza (2019). "An essential role for alpha4A-tubulin in platelet biogenesis." Life Sci Alliance **2**(1).

Sugimoto, N. and K. Eto (2017). "Platelet production from induced pluripotent stem cells." Journal of Thrombosis and Haemostasis **15**(9): 1717-1727.

Sullenbarger, B., J. H. Bahng, R. Gruner, N. Kotov and L. C. Lasky (2009). "Prolonged continuous in vitro human platelet production using three-dimensional scaffolds." Exp Hematol **37**(1): 101-110.

Sun, S., J. M. Zimmet, P. Toselli, A. Thompson, C. W. Jackson and K. Ravid (2001). "Overexpression of cyclin D1 moderately increases ploidy in megakaryocytes." Haematologica **86**(1): 17.



Suzuki, H., K. Murasaki, K. Kodama and H. Takayama (2003). "Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation." British Journal of Haematology **121**(6): 904-912.

## T

Takahashi, K., M. Ohyanagi, H. Naruse, M. Ohnishi, K. Hiromoto and A. Ueda (2005). "Depiction of residual emboli following pulmonary embolism with thrombotic scintigraphy." Ann Nucl Med **19**(8): 641-645.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." Cell **131**(5): 861-872.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." Cell **126**(4): 663-676.

Takayama, N., H. Nishikii, J. Usui, H. Tsukui, A. Sawaguchi, T. Hiroyama, K. Eto and H. Nakauchi (2008). "Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors." Blood **111**(11): 5298-5306.

Takayama, N., S. Nishimura, S. Nakamura, T. Shimizu, R. Ohnishi, H. Endo, T. Yamaguchi, M. Otsu, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Sawaguchi, R. Nagai, K. Takahashi, S. Yamanaka, H. Nakauchi and K. Eto (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**(13): 2817-2830.

Teino, I., S. Kuuse, S. Ingerpuu, T. Maimets and T. Tiido (2012). "The aryl hydrocarbon receptor regulates mouse Fshr promoter activity through an e-box binding site." Biol Reprod **86**(3): 77.

Thatcher, T. H., M. A. Williams, S. J. Pollock, C. E. McCarthy, S. H. Lacy, R. P. Phipps and P. J. Sime (2016). "Endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor regulate lung dendritic cell function." Immunology **147**(1): 41-54.

Thiery, J. P. and M. Bessis (1956). "Mechanism of platelet genesis; in vitro study by cinemicrophotography." Revue d'hematologie **11**(2): 162-174.

Thon, J. N., H. Macleod, A. J. Begonja, J. Zhu, K. C. Lee, A. Mogilner, J. H. Hartwig and J. E. Italiano, Jr. (2012). "Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production." Nat Commun **3**: 852.

Thon, J. N., L. Mazutis, S. Wu, J. L. Sylman, A. Ehrlicher, K. R. Machlus, Q. Feng, S. Lu, R. Lanza, K. B. Neeves, D. A. Weitz and J. E. Italiano, Jr. (2014). "Platelet bioreactor-on-a-chip." Blood **124**(12): 1857-1867.

Thon, J. N., A. Montalvo, S. Patel-Hett, M. T. Devine, J. L. Richardson, A. Ehrlicher, M. K. Larson, K. Hoffmeister, J. H. Hartwig and J. E. Italiano, Jr. (2010). "Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release." Journal of Cell Biology **191**(4): 861-874.

Tiberghien, P., G. Follea and J. Y. Muller (2016). "Platelet Transfusions in Acute Leukemia." N Engl J Med **375**(1): 96-97.

Tijssen, M. R., T. Moreau and C. Ghevaert (2016). Transcriptional Regulation of Platelet Formation: Harnessing the Complexity for Efficient Platelet Production In Vitro. Molecular and Cellular Biology of Platelet Formation: Implications in Health and Disease. H. Schulze and J. Italiano. Cham, Springer International Publishing: 23-60.

Till, J. E. and E. A. McCulloch (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiation research **14**: 213-222.

Tozzi, L., P.-A. Laurent, C. A. Di Buduo, X. Mu, A. Massaro, R. Bretherton, W. Stoppel, D. L. Kaplan and A. Balduini (2018). "Multi-channel silk sponge mimicking bone marrow vascular niche for platelet production." Biomaterials **178**: 122-133.

Tracey, W. D. and N. A. Speck (2000). "Potential roles for RUNX1 and its orthologs in determining hematopoietic cell fate." Semin Cell Dev Biol **11**(5): 337-342.

Trakala, M., S. Rodriguez-Acebes, M. Maroto, C. E. Symonds, D. Santamaria, S. Ortega, M. Barbacid, J. Mendez and M. Malumbres (2015). "Functional reprogramming of polyploidization in megakaryocytes." Dev Cell **32**(2): 155-167.

Trowbridge, E. A., J. F. Martin and D. N. Slater (1982). "Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation." Thrombosis Research **28**(4): 461-475.

Tsukada, J., M. Misago, M. Kikuchi, T. Sato, R. O. Susumu Oda, S. C. And and S. Eto (1990). "The effect of high doses of recombinant human erythropoietin on megakaryocytopoiesis and platelet production in splenectomized mice." British Journal of Haematology **76**(2): 260-268.

## U

Ulsemer, P., C. Strassel, M. J. Baas, J. Salamero, S. Chasserot-Golaz, J. P. Cazenave, C. De La Salle and F. Lanza (2001). "Biosynthesis and intracellular post-translational processing of normal and mutant platelet glycoprotein GPIb-IX." Biochem J **358**(Pt 2): 295-303.

## V

Vainchenker, W., E. Leroy, L. Gilles, C. Marty, I. Plo and S. N. Constantinescu (2018). "JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders." F1000Res **7**: 82.

Velten, L., S. F. Haas, S. Raffel, S. Blaszkiewicz, S. Islam, B. P. Hennig, C. Hirche, C. Lutz, E. C. Buss, D. Nowak, T. Boch, W. K. Hofmann, A. D. Ho, W. Huber, A. Trumpp, M. A. Essers and L. M. Steinmetz (2017). "Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process." Nat Cell Biol **19**(4): 271-281.

Vitrat, N., K. Cohen-Solal, C. Pique, J. P. LeCouedic, F. Norol, A. K. Larsen, A. Katz, W. Vainchenker and N. Debili (1998). "Endomitosis of Human Megakaryocytes Are Due to Abortive Mitosis." Blood **91**(10): 3711.

Vyas, P., K. Ault, C. W. Jackson, S. H. Orkin and R. A. Shivdasani (1999). "Consequences of GATA-1 Deficiency in Megakaryocytes and Platelets." Blood **93**(9): 2867-2875.

## W

Wagner, J. E., Jr., C. G. Brunstein, A. E. Boitano, T. E. DeFor, D. McKenna, D. Sumstad, B. R. Blazar, J. Tolar, C. Le, J. Jones, M. P. Cooke and C. C. Bleul (2016). "Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft." Cell Stem Cell **18**(1): 144-155.

Wang, X., J. D. Crispino, D. L. Letting, M. Nakazawa, M. Poncz and G. A. Blobel (2002). "Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors." EMBO J **21**(19): 5225-5234.

Wang, B. and J. Zheng (2016). "Platelet generation in vivo and in vitro." Springerplus **5**(1): 787.

Wang, Z. and H. Ema (2016). "Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells." Int J Hematol **103**(5): 498-509.

Waring, P., D. Wall, R. Dauer, D. Parkin and D. Metcalf (1993). "The effects of leukaemia inhibitory factor on platelet function." British Journal of Haematology **83**(1): 80-87.

Warkentin, T. E. (2007). "Drug-Induced Immune-Mediated Thrombocytopenia — From Purpura to Thrombosis." New England Journal of Medicine **356**(9): 891-893.

Watt, K., T. J. Jess, S. M. Kelly, N. C. Price and I. J. McEwan (2005). "Induced alpha-helix structure in the aryl hydrocarbon receptor transactivation domain modulates protein-protein interactions." Biochemistry **44**(2): 734-743.

Weibrecht, I., K. J. Leuchowius, C. M. Clausson, T. Conze, M. Jarvius, W. M. Howell, M. Kamali-Moghaddam and O. Soderberg (2010). "Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox." Expert Rev Proteomics **7**(3): 401-409.

Weksberg, D. C., S. M. Chambers, N. C. Boles and M. A. Goodell (2008). "CD150-side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells." Blood **111**(4): 2444-2451.

White, J. G. and G. Escolar (1991). "The blood platelet open canalicular system: a two-way street." Eur J Cell Biol **56**(2): 233-242.

White, J. G. and W. Krivit (1967). "An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling." Blood **30**(5): 625-635.

## X

Xi, J., H. Zhu, D. Liu, X. Nan, W. Zheng, K. Liu, W. Shi, L. Chen, Y. Lv, F. Yan, Y. Li, X. Xie, Y. Wang, W. Yue, X. Xu, X. Wei, J. Zhu, X. Huang and X. Pei (2013). "Infusion of megakaryocytic progenitor products generated from cord blood hematopoietic stem/progenitor cells: results of the phase 1 study." PLoS One **8**(2): e54941.

Xiao, M., Y. Wang, C. Tao, Z. Wang, J. Yang, Z. Chen, Z. Zou, M. Li, A. Liu, C. Jia, B. Huang, B. Yan, P. Lai, C. Ding, D. Cai, G. Xiao, Y. Jiang and X. Bai (2017). "Osteoblasts support megakaryopoiesis through production of interleukin-9." Blood **129**(24): 3196-3209.

Xing, X., H. Bi, A. K. Chang, M. X. Zang, M. Wang, X. Ao, S. Li, H. Pan, Q. Guo and H. Wu (2012). "SUMOylation of AhR modulates its activity and stability through inhibiting its ubiquitination." J Cell Physiol **227**(12): 3812-3819.

Y

Yamada, E. (1957). "The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen." Acta Anat (Basel) **29**(3): 267-290.

Yamamoto, R., Y. Morita, J. Ooehara, S. Hamanaka, M. Onodera, K. L. Rudolph, H. Ema and H. Nakauchi (2013). "Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells." Cell **154**(5): 1112-1126.

Yang, R., L. Lin, H. Yao, O. Ji and Q. Shen (2019). "Therapeutic options for adult patients with previously treated immune thrombocytopenia – a systematic review and network meta-analysis." Hematology **24**(1): 290-299.

Ye, M., Y. Zhang, H. Gao, Y. Xu, P. Jing, J. Wu, X. Zhang, J. Xiong, C. Dong, L. Yao, J. Zhang and J. Zhang (2018). "Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Leads to Resistance to EGFR TKIs in Non-Small Cell Lung Cancer by Activating Src-mediated Bypass Signaling." Clin Cancer Res **24**(5): 1227-1239.

Youssefian, T., J.-M. Massé, F. Rendu, J. Guichard and E. M. Cramer (1997). "Platelet and Megakaryocyte Dense Granules Contain Glycoproteins Ib and IIb-IIIa." Blood **89**(11): 4047-4057.

Yu, C., K. K. Niakan, M. Matsushita, G. Stamatoyannopoulos, S. H. Orkin and W. H. Raskind (2002). "X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction." Blood **100**(6): 2040-2045.

**Z**

Zhang, Y., S. Gao, J. Xia and F. Liu (2018). "Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap." Trends in Cell Biology **28**(12): 976-986.

Zhu, J., L. Luo, L. Tian, S. Yin, X. Ma, S. Cheng, W. Tang, J. Yu, W. Ma, X. Zhou, X. Fan, X. Yang, J. Yan, X. Xu, C. Lv and H. Liang (2018). "Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes IL-10 Expression in Inflammatory Macrophages Through Src-STAT3 Signaling Pathway." Front Immunol **9**: 2033.

Zimmet, J. M., D. Ladd, C. W. Jackson, P. E. Stenberg and K. Ravid (1997). "A role for cyclin D3 in the endomitotic cell cycle." Molecular and Cellular Biology **17**(12): 7248.

Zucker-Franklin, D. and C. S. Philipp (2000). "Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept." Am J Pathol **157**(1): 69-74.

**Valentin DO SACRAMENTO**

## **L'aryl hydrocarbon récepteur, un acteur important de la biogenèse des plaquettes permettant la production de plaquettes de culture à visée transfusionnelle**

### **Résumé**

Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital en assurant l'hémostase normale. Les anomalies quantitatives ou qualitatives des plaquettes sont responsables d'accidents hémorragiques graves. Afin de prévenir ces complications chez des patients présentant des numérations plaquettaires fortement diminuées, il est nécessaire de les transfuser. La demande croissante en produits sanguins contrôlés, indemnes de risques infectieux, immunitaires et inflammatoires, couplée à la durée de stockage limitée des plaquettes (5 jours) conduisent fréquemment à des situations à flux tendus. Dans ce contexte, une alternative au don serait de disposer de plaquettes sanguines produites en conditions *in vitro*. Il est possible aujourd'hui de produire des plaquettes de culture, dont la taille et la fonctionnalité sont similaires aux plaquettes natives. L'utilisation d'un ligand de l'AHR le StemRegenin1 (SR1), favorise cette production, mais les voies de signalisation impliquées ne sont pas définies. Les rendements sont encore faibles et les verrous scientifiques nombreux. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui gouvernent la biogenèse des plaquettes, afin d'améliorer la production de plaquettes *in vitro* à visée transfusionnelle.

Mots clés : mégacaryocyte, plaquettes *in vitro*, StemRegenin1, aryl hydrocarbon récepteur

### **Résumé en Anglais**

Blood platelets play a key role in ensuring normal hemostasis. Abnormalities in the quantity or quality of platelets are responsible for serious bleeding events. In order to prevent these complications in patients with severely decreased platelet counts, transfusion is necessary. The increasing demand for controlled blood products, free of infectious, immune and inflammatory risks, coupled with the limited storage time of platelets (5 days) leads frequently to a "just-in-time" situation. In this context, an alternative to donation would be the availability of blood platelets produced under *in vitro* conditions. It is now possible to produce cultured platelets, which are similar in size and functionality to native platelets. The use of an AHR ligand, StemRegenin1 (SR1), promotes this production but the signalling pathways involved are not defined. Yields are still low and there are many scientific locks. It is therefore necessary to better understand the cellular and molecular mechanisms governing platelet biogenesis in order to improve *in vitro* platelet production for transfusion.

Key words : megakaryocyte, *in vitro* platelets, StemRegenin1, aryl hydrocarbon récepteur